

Lumiflavin 螢光法에 의한 Rat 糞尿中の vitamin B₂ 와 FMN, FAD, FR 의 定量

李 鉉 琪 · 裴 松 子

釜山大學校 文理科大學 家政學科

Determination of vitamin B₂ by the lumiflavin fluorometric method and FMN, FAD, FR by the paper chromatography in the feces and urine

Hyun-Ki Lee · Song-Ja Bae

Department of Home Economics, Busan National University

Abstract

After ablactation, wistar strain white male rats, weighing 270g and 340g, were fed with a diet of CLEA for three months. The whole daily excretion of each feces and urine were collected, and extracted with water (80°C hot water).

The combined extraction were filtered and the B₂ was determined with the parts of the filterates by the lumiflavin fluorometric method, and the FMN, FAD and FR with the rest of the filterates by paper chromatography.

The following results were obtained;

1. B₂ contents in the feces were 27.52 γ per 100 grams per body weight, and 83.93 γ per each rat per day.
2. B₂ contents in the urine were 18.47 γ per 100 grams per body weight, and 56.33 γ per each rat per day.

The total daily excretion of B₂ contents in the feces were 1.5 times as much as in the urine.

3. Among the total daily B₂ excretion of one white wistar strain rat in the feces were the following; FAD, 81.0%; FMN, 14.9%; FR, 3.3%.

Therefore the order of the contents were FAD > FMN > FR.

序 論

Vitamin B₂의 定量은 生物學의 方法과 理化學의 方法이 있으며 兩法에 依한 成績結果는 잘 一致되나 後者는 簡易하고 그 結果가 正確하므로 많이 使用되고 있다. 理化學의 方法으로서는 比色法과 螢光測定法이 常用되나 檢體中の vitamin B₂의 含量이 微量일 경우 特히 生體나 食品의 경우는 感度가 좋은 螢光測定法이 便利하므로 著者들은 이 螢光測定法으로 vitamin B₂를 lumiflavin으로 誘導하여 共存 螢光物質(盲螢光物質)과 分離하여 螢光光度計로서 그 螢光을 測定하는, Kuhn¹⁾氏 등이 처음 試圖하였던 方法인 lumiflavin 法으로 wistar 系 흰쥐(♂)의 糞尿中으로 排泄되는 total vitamin B₂를 定量하였다. 또한 B₂의 三形物인 FMN(flavin mono nucleotide), FAD(flavin adenine dinucleotide)와 FR(free riboflavin)의 分割, 三形物質量을 Kunio Yagi²⁾法에 依하여 paper chromatography 法으로서 定量하여 몇 가지의 知見을 얻었으므로 그 結果를 報告코자 한다.

實驗方法

1. 試 料

離乳後 CLEA 固形飼料로서 約 3個月間 ad libitum method로서 飼育한, wistar 系 흰쥐 6수를 採糞, 採尿裝置를 한 cage에 넣어 3日間 飼育하였으며, 採糞, 採尿한 것은 HAC(1 vol.) : toluol(1 vol.)의 保存劑에 保存하였다.

CLEA 固形飼料의 組成은 crude protein 25.5%, crude fat 4.0%, crude cellulose 4.0%, crude ash 7.0%, Ca 1.8%, P 1.2%, K 0.5%, Na 0.3% 이며 飼料 1kg當 vitamin mix의 組成은 A 12,000 I.U., D 2,400 I.U., E 20mg, B₁ 7mg, B₂ 10mg, B₆ 4mg, B₁₂ 0.02mg, niacin 80mg, pantothenic acid 30mg, folic acid 0.2mg, choline 1,400mg 이다. 採尿量은 96cc/3日/2匹이며 採糞量은 44g/3日/2匹 이었다.

2. 定量方法

Vitamin B₂의 定量은 lumiflavin 常法¹⁾으로 定量하였다.

a) B₂ 標準液의 檢定

B₂ 結晶體(田邊製 F 3024) 50mg을 105°C에서, 2時間 恒量 乾燥器內에서 乾燥하여 500ml(100γ/ml)

로 定容한 후 10γ/ml가 되게 再定容하여 3檢體(B₂-a, B₂-b, B₂-c)로 하였다. B₂-a는, 100γ/ml로 定容한 위의 液을 1% HAC로서 최종 pH가 2.4 되게 하여 10γ/ml로 하였으며, B₂-b는 1% HAC와 0.5% NaOH로서 최종 pH 7.0이 되게 하여 10γ/ml로 하였고, B₂-c는 buffer solution으로써 최종 pH 6.4가 되게 하여 10γ/ml로 定容하였다. 이때 使用한 buffer solution은 $\frac{1}{15}M$ KH₂PO₄ (9.07g/l) 4용량과 $\frac{1}{15}M$ Na₂HPO₄ · 2H₂O (11.88g/l) 6용량比로 한 液(pH 6.8)을 使用하였다.

이같이 調製한 이 B₂ 標準液의 檢定用 sample(10γ/ml)을 島津光電分光光度計 QV-50形으로 測定하여 B₂를 檢定하였다.

b) 흰쥐 糞尿中 B₂의 定量

① 浸出液의 調製法: 尿 5cc와 糞 5g을 각각 取하여 Fig. 1과 같이 各各 물을 加하고 80°C의 水浴中에서 15分間 浸出하여 이를 冷却시켜 100ml로 定容한 後 遠心分離(3,000 r.p.m.)하여 그 上澄液을 取하여 浸出液으로 하고 冷暗所의 갈색병에 保存하면서 적당히 희석하여 各 定量用으로 하였다.

② Vitamin B₂의 定量方法: 위에서 調製한 浸出液을 3개의 共檢 遠心管에 各各 Fig. 1과 같이 main(f₂), Add(f₁), Blank(f₀)로 分注하여 60分間 光分解시킨 후 f₂, f₁, f₀에 各 水醋酸 1ml, 3% KMnO₄ 0.5ml, 3% H₂O₂ 0.5ml, CHCl₃ 10ml씩을 加한 후 水冷却하여 300回 진탕하고 15分間 遠沈(3,000 r.p.m.)한 후 CHCl₃ 층에서 各各 5cc씩 取하여 Coleman Instruments, Inc. Maywood I, II의 Electronic photofluorometer³⁾ (filter No. I: 12-222, II: 14-212 使用)로서 rat 糞尿中의 B₂ 含量을 測定하였다.

c) FMN, FAD, FR의 定量

b-①에서 얻은 糞의 浸出液 80ml를 갈색 三角 flask에 取하고 (NH₄)₂SO₄ 60.5g을 넣어 飽和시켜 진탕한 후 30分間 放置하고 40cc를 分取하여 이것에 90% phenol 4cc씩을 加하고 150~200回 진탕(黃色이 될 때까지)하여 원심분리(3,000 r.p.m.)한 후 phenol 층만 다른 共檢管에 分取하였다. 이것에 물 0.5ml를 加하고 적당량의 ether을 加한 후 冷却하면서 진탕하였다. 이것을 다시 遠心分離하여(3,000 r.p.m.) phenol 층液을 갈색 共檢 試驗管에 取하고 butanol-食醋酸 展開液으로 15時間 展開하여 暗室에서 乾燥한 후 展開한 filter paper를 紫外線 鑑識器로써 照射 감식 후 그 黃色部分을 分割했다.

이것을 特級 ether에 10分間 잠근 다음 다시 ether

로 洗滌하고 暗室에서 乾燥後 FMN, FAD, FR, blank로 나누어 물 2cc를 加하고 暗室에서 20分間 放置한後 NaOH를 2cc 加했다. 이를 20~30°C의 水中에서 40分間 光分解하여 앞에서와 같이 fluoro-

meter로서 測定하였다. 浸出液의 調製方法, B₂의 定量方法, FMN, FAD, FR의 定量方法을 一括하여 Fig. 1에 나타낸다.

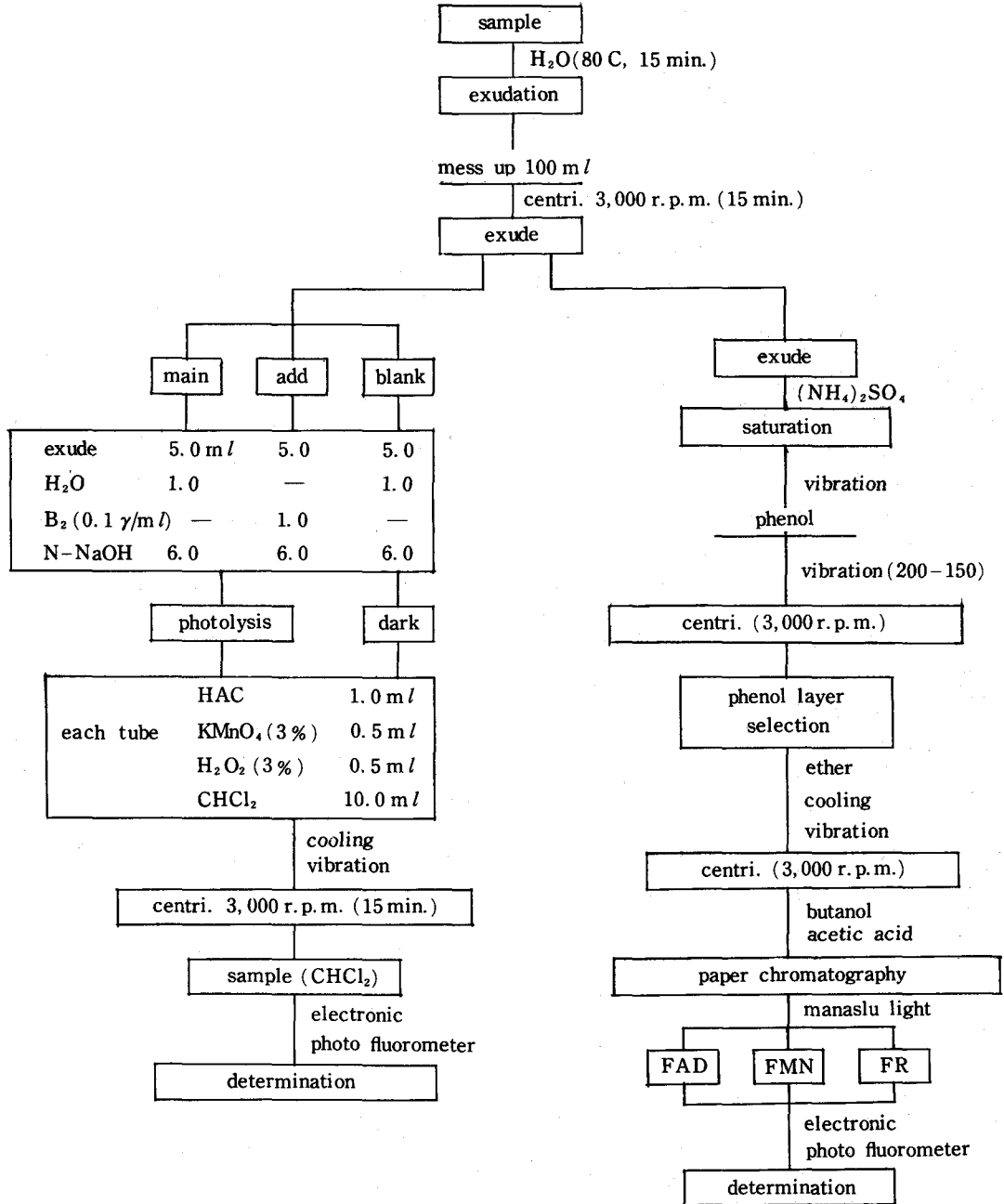


Fig. 1. Determination of vitamin B₂, FAD, FMN and FR in the feces and urine

實驗結果

1. Vitamin B₂의 檢定結果

a) B₂ 標準液의 檢定

Vitamin B₂ 標準液을 島津光電分光光度計 QV-50 形으로 220 m μ ~ 460 m μ 에서 測定한 結果에 따라 B₂

의 純度を 計算했다. E-value(445 m μ)에서의 B₂(10 γ /ml)의 測定 값은 그 absorbency가 0.296이었다. B₂의 標準液의 absorbency는 0.3004이므로 그 B₂의 純度を 換算하니 98.535%이었으므로 factor는 1.0152이었다. 220 m μ ~ 460 m μ 에서 B₂ 標準液의 E-value 測定值를 Table 1에 나타내고 이를 graph로 나타낸 것은 Fig. 2와 같다.

Table 1. E-value(220 m μ ~460 m μ) of standard B₂, 10 γ /ml in pH 2.4 (B₂-a), pH 7.0 (B₂-b), pH 6.4 (B₂-c) solution

wavelength	220(m μ)	222	224	226	228	230	240	250	260
B ₂ -a	∞	∞	∞	∞	2.00	1.507	0.472	0.491	0.729
B ₂ -b	1.84	1.60	1.310	1.07	0.819	0.670	0.485	0.728	0.859
B ₂ -c	1.00	1.112	0.920	0.80	0.670	0.565	0.352	0.500	0.729
wavelength	270	280	290	300	310	320	330	340	350
B ₂ -a	0.760	0.462	0.141	0.045	0.048	0.076	0.113	0.163	0.209
B ₂ -b	0.555	0.299	0.115	0.069	0.096	0.150	0.184	0.213	0.223
B ₂ -c	0.760	0.463	0.152	0.055	0.060	0.087	0.113	0.163	0.209
wavelength	360	370	375	380	440	445	450	460	
B ₂ -a	0.249	0.264	0.274	0.260	0.300	0.296	0.285	0.256	
B ₂ -b	0.213	0.187	0.186	0.185	0.145	0.141	0.128	0.096	
B ₂ -c	0.257	0.265	0.275	0.258	0.300	0.296	0.285	0.257	

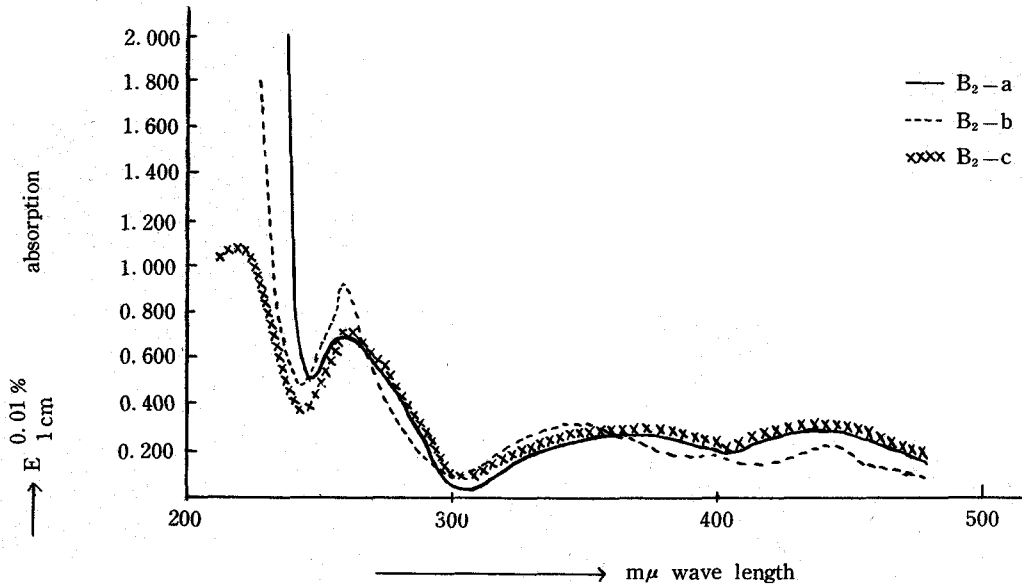


Fig. 2. E-value(220~460 m μ) of B₂, 10 γ /ml in pH 2.4, 7.0, 6.4 solution

b) 標準 vitamin B₂의 檢量曲線
 위의 B₂ 結晶으로 만든 B₂ 標準液(B₂-a)을 1% HAC로 희석하여 2 γ/ml, 1.5 γ/ml, 1.0 γ/ml,

0.5 γ/ml, 0.1 γ/ml로 하여 lumiflavin 형광법으로 測定한 結果를 Table 2와 Fig. 3에 나타낸다.

Table 2. Calibration value of B₂ standard solution

	add		blank		value *		
	1-st	2-nd	1-st	2-nd	1-st	2-nd	avg.
2 γ/ml	102	101	8.6	8.7	93.4	92.3	92.85
1.5 γ/ml	79.8	77.8	7.8	7.8	72.0	70.0	71.00
1.0 γ/ml	54.3	52.7	6.3	6.3	48.0	46.0	47.00
0.5 γ/ml	27.0	26.9	3.5	3.5	23.5	23.4	23.45
0.1 γ/ml	5.5	5.3	1.0	1.0	4.5	4.3	4.40

* value = add - blank

Filter No. (I : 12-222, II : 14-212)

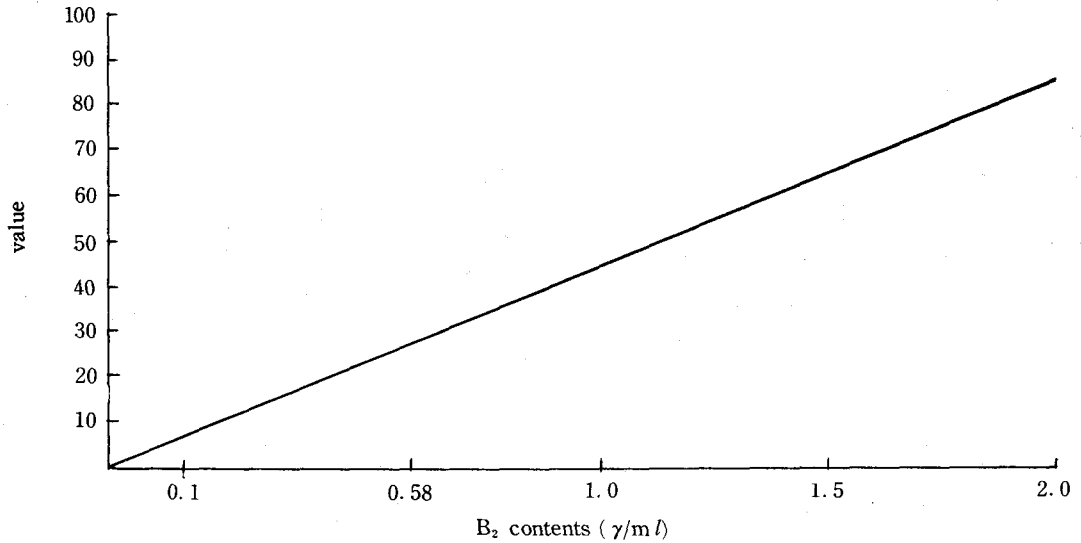


Fig. 3. Calibration curve of B₂ standard solution

2. 糞尿中の B₂의 含量

尿 5 cc와 糞 5 g을 위에서 調製한 各各의 浸出液 5 ml를 取하여 光分解시킨 후 fluorometer로서 B₂를 測定하여 아래 式으로서 含量을 算出하였던 바 大體로 正常의 健康한 約 300 g의 體重을 가진 흰쥐는 1日 糞中으로 約 84 γ의 B₂가 排泄되고, 尿中으로는 糞中에서보다는 多少 적은 約 56 γ 정도의 B₂가 排泄됨을 알 수 있었으며, 또한 흰쥐 體重 100 g當 B₂의 排泄量을 보면 糞中으로는 27.52 ± 0.175 γ/100 g B.W.이었고, 尿

※ Calculation

$$M = C \times \frac{f_1 - f_0}{f_2 - f_1} (\mu g)$$

M : amount of B₂ in the main

C : amount of B₂ add

f₁ : main test

f₂ : add f₀ : blank test

中으로는 18.47 ± 0.245 γ/100 g B.W.이었다. 糞과 尿中으로 排泄되는 B₂의 含量을 Table 3에 나타낸다.

Table 3. B₂ contents in the feces and urine

sample		main (f ₁)	add (f ₂)	blank (f ₀)	contents of sample (γ/g(cc))	total daily feces (γ/day/305g)	daily feces per body (γ/day/100g)	mean error of daily feces per B. W. (100 g)
feces	1-st	30	51	3.5	11.52	84.45	27.69	± 0.175
	2-nd	28	50	3.0	11.36	83.40	37.34	
	avg.	29	50.5	3.25	11.44	83.93	27.52	
urine	1-st	20	38.5	3.5	3.57	57.08	18.71	± 0.245
	2-nd	20	39	3.5	3.47	55.58	18.22	
	avg.	20	38.75	3.5	3.52	56.33	18.47	

또한 糞中の B₂의 FMN, FAD, FR을 butanol-食
醋酸 展開溶液으로써 paper chromatography에 展開
하여 그 分割 三形物質을 fluorometer로써 測定한
FMN, FAD, FR의 含量比는 FMN 14.9% (12.51 γ)
FAD 81.0% (67.98 γ), FR 3.3% (2.77 γ)의 비율로
分割되어 있었음을 알 수 있었다. 糞尿中の B₂의 含量
과 糞中の FMN, FAD, FR의 含量比 등을 一括하여
나타내면 Fig. 4와 같다.

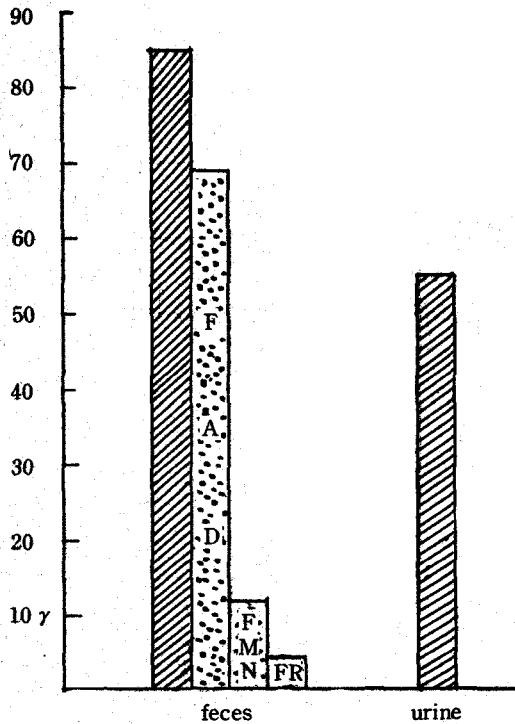


Fig. 4. Contents of B₂ in the feces and urine and the FAD, FMN, FR in the feces (γ/day/rat)

結 論

離乳後 CLEA 固形飼料로서 約 3個月間 ad-libitum
method로서 飼育한, wistar系 흰쥐 숫놈(體重 270g,
340g)의 糞과 尿中으로 排泄되는 vitamin B₂를 lumi-
flavin 형광법으로 定量하고 또 糞中の FMN, FAD,
FR의 3分割 物質量을 paper chromatography 법으
로써 定量하여 아래와 같은 結果를 얻었다.

1) 흰쥐 體重 100g當 糞中으로 하루에 排泄되는 B₂
의 量은 27.52 γ였고, 尿中으로는 18.47 γ이었으며, 各
마리가(體重 305g) 하루에 排泄하는 B₂의 量은 糞中
으로 83.93 γ이며, 尿中으로는 56.33 γ 排泄되었었다.
즉 vitamin B₂가 1日 排泄되는 量은 糞이 尿보다 約
1.5倍 더 많이 排泄됨을 알 수 있었다.

2) 흰쥐 한마리가 하루에 排泄하는 糞中の FMN은
糞中으로 排泄되는 total B₂의 14.9%를 차지하였고,
FAD는 81.0%를 차지하였으며, FR은 3.3%였다. 그
리므로 糞中の vitamin B₂ 分割 三形物質의 含量은
FAD > FMN > FR의 含量順으로 構成되어 있음을 알
수 있었다.

參考文獻

- 1) Kuhn, R., Wagner-Jauregg, T. and Kaltschmidt, H., Ber.: dtsch. chem. Ges., 67, 1452 (1934)
- 2) Kunio Yagi: The Journal of Biochemistry, Vol. 38, No. 2. (1951)
- 3) Electronic Photofluorometer: (Coleman Institute, Inc. Maywood. I. II)
- 4) 藤原 洋, 中田富義: 武田研究所年報 17, 7(1958)
- 5) 藤原 洋: 武田研究所年報 17, (13-15), (1958)