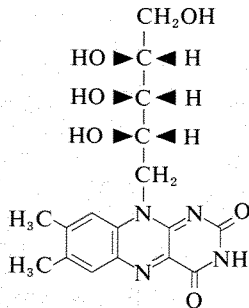


92 リボフラビン及びその誘導体

Riboflavin and Its Derivatives

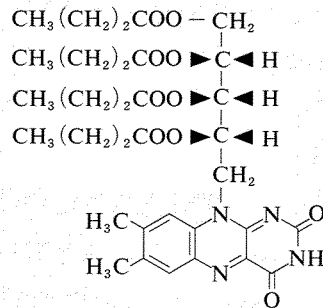
リボフラビン

Riboflavin

別名：ビタミン B₂C₁₇H₂₀N₄O₆ : 376.37

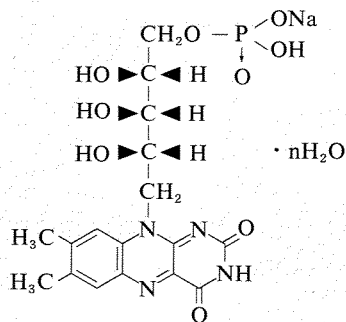
リボフラビン酪酸エステル

Riboflavin Tetrabutryrate

別名：ビタミン B₂酪酸エステルC₃₃H₄₄N₄O₁₀ : 656.73

リボフラビン 5'-リン酸エステルナトリウム

Riboflavin 5'-Phosphate Sodium

別名：リボフラビンリン酸エステルナトリウム、
ビタミン B₂リン酸エステルナトリウムC₁₇H₂₀N₄NaO₉P · nH₂O (n=2 又は 0)(C₁₇H₂₀N₄NaO₉P : 478.33)

1. 試験法の概要

食品中のリボフラビン、リボフラビン酪酸エステル及びリボフラビン 5'-リン酸エステルナトリウムは、ルミフラビン蛍光法により、リボフラビンとして定量する。必要があれば分子量比を乗じて、リボフラビン酪酸エステル又はリボフラビン 5'-リン酸エステルナトリウムの量として求める。食品中には、天然のリボフラビン、フラビンアデニンジヌクレオチドなどリボ

フラビンのエステル型が広く分布している。したがって、定量値は食品由来のリボフラビンと添加されたものとの合計値である。

2. 試験法 (ルミフラビン蛍光法)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料溶液の調製¹⁾

① 一般的方法

通常、試料 1~10g を精密に量り、少量の水とともに乳鉢又はホモジナイザーを用いて磨砕する。次に水 5~50ml を用いて三角フラスコに移し、約 20~30 分間水浴中でしばしば振り混ぜながら加熱抽出する。冷後、ろ過又は遠心分離し、ろ液又は上澄液を分取する。残留物は少量の水を用いて数回洗浄又は遠心分離を行い、洗液又は上澄液は先のろ液又は上澄液に合わせる。水を加えて正確に 50ml 又は 100ml とし、試料溶液とする²⁾。

② 高タンパク性食品

通常、試料 1~10g を精密に量り、少量の水とともに乳鉢又はホモジナイザーを用いて磨砕する。次に水 5~50ml を用いて三角フラスコに移し、約 20~30 分間水浴中でしばしば振り混ぜながら加熱抽出する。冷後、抽出液に対し 10% トリクロル酢酸溶液 1/4 容量を少量ずつ加え、ろ過又は遠心分離し、ろ液又は上澄液を分取する。残留物は少量の水を用いて数回洗浄又は遠心分離を行い、洗液又は上澄液は先のろ液又は上澄液に合わせる。水を加えて正確に 50ml 又は 100ml とし、試料溶液とする²⁾。

③ 高デンプン性食品

通常、試料 1~10g を精密に量り、少量の水とともに乳鉢又はホモジナイザーを用いて磨砕する。次に水 5~50ml を用いて三角フラスコに移し、三角フラスコの液に、必要があれば 1mol/l 塩酸又は 1mol/l 水酸化ナトリウム溶液を加え、pH を 4.5~5.0 に調整した後、その 1/10 容量のジアスターゼ溶液 (1→20) を加え、37~40℃ で約 24 時間保つ。冷後、ろ過又は遠心分離し、ろ液又は上澄液を分取する。残留物は少量の水を用いて数回洗浄又は遠心分離を行い、洗液又は上澄液は先のろ液又は上澄液に合わせる。水を加えて正確に 50ml 又は 100ml とし、試料溶液とする²⁾。

④ 油脂性食品³⁾

通常、試料 1~10g を精密に量り、塩酸・エタノール混液約 10ml を加え、ブレンダー用カップに入れ、ホモジナイズする。塩酸・エタノール混液約 25~30ml を用いて共栓遠心管に移し、37℃ で一昼夜保つ。次に 1mol/l 水酸化ナトリウム溶液で pH を 4.5 に調整し、遠心分離

する。分離液を分取し、残留物は少量の水で洗い、洗液はろ過し、分離液に洗液を合わせ、水を加えて正確に 50ml 又は 100ml とし、試料溶液とする。

(3) 試料液の調製

試料溶液に盲蛍光物質が多い場合には、試料溶液 25ml を 50ml 共栓遠心管に採り、クロロホルム 25ml を加え、激しく振とうする。これを遠心分離し、下層のクロロホルム層を取り除き、再びクロロホルム 25ml を加え、同様に操作する。この操作をクロロホルム層に蛍光が認められなくなるまで繰り返す⁴⁾、試料液とする。

(4) 標準液の調製

リボフラビンを 105℃ で 2 時間乾燥した後、その 0.020g を正確に量り、酢酸 (1 → 400) 800ml を加え、加温して溶かし、冷後、水を加えて正確に 1,000ml とする。この液は褐色びんに入れ、冷蔵庫に保管する。用時、この液 5ml を正確に量り、酢酸 (1 → 400) を加えて正確に 200ml とし、標準液とする (この液 1ml は、リボフラビン 0.5μg を含む)。

(5) 測定法

① 測定条件

蛍光光度計を用い、励起波長 436nm、蛍光波長 530nm、液層 10mm の条件によって測定する。

② 測定液の調製

試料液 2~4ml の一定量ずつを正確に量り、それぞれ 3 本の共栓試験管 A, B, C に入れ、A には標準液 1ml を正確に量って加え、B, C には水 1ml ずつを加える。この液と同容量の 1mol/l 水酸化ナトリウム溶液をそれぞれ A, B, C に加え、混和した後、A, B を光分解装置⁵⁾に 1 時間入れ、C は 1 時間暗所に放置する。次に A, B, C それぞれに、その内容量と同容量の酢酸を加え、A, B, C に 4% 過マンガン酸カリウム溶液 0.5ml を加え、混和して 1 時間放置した後、過酸化水素水の溶液 (1 → 10) 0.5ml を加える。次にクロロホルム 10ml ずつを正確に量り、A, B, C それぞれに加え、2 分間激しく振り混ぜた後、静置⁶⁾、下層のクロロホルム層を分取し、測定液 A, B, C とする⁷⁾。

③ 定量

測定液 A, B, C を蛍光光度計用セルに入れ、蛍光強度を測定する。A の蛍光強度を 100% に合わせ、B, C の蛍光強度を測定する。

次式によって検体中のリボフラビン含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{リボフラビン含量 (g/kg)} = \frac{D \times (b - c) \times V}{(100 - b) \times V' \times W \times 1,000}$$

D : 測定液 A に添加した標準リボフラビン量 (μg)

b : 測定液 B の蛍光強度

c : 測定液 C の蛍光強度

V : 試料液の調製に用いた試料液の採取量 (ml)

V : 試料の溶液量 (ml)

W : 試料の採取量 (g)

リボフラビン酪酸エステル含量 (g/kg) = リボフラビン含量 (g/kg)
 $\times 1.745$

リボフラビン 5'-リン酸エステル含量 (g/kg) = リボフラビン含量 (g/kg)
 $\times 1.271$

試薬・試液

1. エタノール : [95v/v %, 特級]
2. 塩酸・エタノール混液 : 塩酸 190ml にエタノール 700ml を加え, 更に水を加えて 1,000ml とする。
3. 過酸化水素水 : [30 %, 特級]
4. 過マンガン酸カリウム : [特級]
5. クロロホルム : [特級], 蛍光のないことを確かめ, 水を飽和させて用いる。この液は冷暗所に保存する。
6. ジアスターゼ : 市販品を用いる。
7. トリクロル酢酸 : [特級]

[注]

- 1) リボフラビンは光により分解されやすいため, 試料溶液の調製には褐色のガラス容器を用いる。
- 2) 試料溶液 1ml 中にリボフラビン 0.1~1.0 μg 含有するようにする。必要があれば水で正確に希釈する。
- 3) 油脂性食品には主にリボフラビン酪酸エステルが添加されており, エステルの加水分解処理を酸性下で行う。
- 4) 通常 3~4 回繰り返す。
- 5) 蛍光灯に反射鏡を付けて試験管の両側面から蛍光灯を照射し, 試験管のほぼ全面から光分解できるように装置。
- 6) 1,500 回転/分で遠心分離してもよい。
- 7) 少量の無水硫酸ナトリウムを加えてもよい。