

ビタミンC(アスコルビン酸)の定量法並に結合型アスコロビン酸の存在に就て

片井, 喜太郎
九州帝國大學農學部生物化學教室

<https://doi.org/10.15017/20930>

出版情報：九州帝國大學農學部學藝雜誌. 8 (3), pp.286-291, 1939-06. 九州帝國大學農學部
バージョン：
権利関係：



ビ タ ミ ン C (ア ス コ ル ビ ン 酸) の 定量法並に結合型アスコロビン酸の存在に就て

On the Determination of Ascorbic Acid and the Presence
of Combined Ascorbic Acid.

片 井 喜 太 郎

1928年 SZENT-GYÖRGY⁽¹⁾ が副腎から抗壞血病の作用を有し且つ $C_6H_8O_6$ の分子式を有する物質を結晶として分離し Hexuronic acid と命名した。其後此物質はビタミンCと同一物質であることが確められ⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾ アスコルビン酸と改名せられた。TILLMANS⁽⁶⁾⁽⁷⁾ は食品の新鮮度をその還元力によつて測定し此際 2,6-Dichlorophenol-indophenol に對する還元力がそれ等物質の有する抗壞血病性に比例する事を知り、又生物組織の硫酸浸出液に於て 2,6-Dichlorophenol-indophenol を以てアスコルビン酸を定量し得る事を發表した⁽⁸⁾。其後アスコルビン酸の化學的定量法に就ては種々なる方法が發表せられ現在は 1) 沃素滴定法, 2) 2,6-Dichlorophenol-indophenol 色素滴定法, 3) 尿酸試薬を用ふる比色法, 4) mono-Molybdo-phosphotungstic acid を用ふる比色法, 5) メチレン青法, 6) 赤血鹽を用ふる比色法の 6 種類の定量法がある。是等の諸方法中 2,6-Dichlorophenol-indophenol 色素滴定法は多くの人々によつて改良せられ廣く使用せられてゐる。又尿酸試薬を用ふる比色法は藤田, 海老原兩氏⁽⁹⁾ によつて深く研究せられビタミンCに特殊なる定量法が設定せられたが Pulfrich 光度計を使用する爲之を有せざる實驗室に於ては行ひ得ざる事、又無色液に於ては普通の比色計にても定量をなし得れども浸出液自身の色の爲標準液の色調と著しく異なる場合のある事が不便である。

Indophenol 法は一般に廣く用ひらるゝ所であるが尙二三の缺點あるを以て奥田氏及著者⁽¹⁰⁾ はアスコルビン酸を組織より浸出する際に冷メタリン酸液中に組織を浸漬しつゝ搗碎し冷水にて稀釋する事、酸化型アスコルビン酸の還元は pH 4 乃至 6 に於て行ふ事、滴定は溫度零度附近の溶液に於て行ふ事の必要を指摘し此定量法を改良發表した。

著者は近頃此方法を 藤田氏の 尿酸試薬比色法及他の諸氏の indophenol 法と比較した。又 McHENRY 及 GRAHAM⁽¹¹⁾, AAMAD⁽¹²⁾, GUKA 及 PAL⁽¹³⁾ 及 LEVY⁽¹⁴⁾ 等の結合型アスコルビン酸 (Combined Ascorbic acid) に就て實驗したるを以て茲に報告する事にする。

一. アスコルビン酸定量法の比較

Indophenol 法としては 1) 奥田氏及著者の方法, 2) 室温滴定法, 3) 強酸性溶液 (pH 1.4) を硫化水素にて還元する方法 4) EMMERIE 法⁽¹⁵⁾ 變法 (メタ磷酸浸出液に醋酸水銀と醋酸曹達を加へ pH 5 附近として妨害物質を除去) により, 尿酸試薬を用ふる比色法としては藤田, 海老原氏法によつてアスコルビン酸を定量した。

組 織	還元型アスコルビン酸含量 mg %			總アスコルビン酸含量 mg %			
	indophenol 法		比 色 法 藤 田 法	indophenol 法			比 色 法 藤 田 法
	室温滴定	奥田, 著者法		奥 田 著 者 法	酸液にて還元	EMMERIE 變 法	
鶏 肝 臓	14.5	12.9	—	19.0	15.9	—	—
"	13.0	11.5	9.0	18.4	17.2	16.9	18.0
牛 肝 臓	26.5	24.9	—	30.7	32.1	—	—
白鼠睾丸	26.2	26.2	—	30.7	27.9	—	—
" 肝 臓	10.4	9.7	—	17.4	14.6	—	—
グ チ 肉	4.4	4.4	4.5	5.3	5.1	—	5.5
" 肝 臓	5.7	4.7	—	6.4	7.0	6.3	—
大根ノ根	21.7	21.7	22.2	24.0	24.3	—	23.1
皮	18.1	18.1	—	22.1	23.2	—	—
葉	164.2	164.2	160.8	200.7	192.2	192.2	194.2
蕪 菁 根	15.1	14.1	—	19.6	17.5	18.8	—
葉	55.1	55.1	—	151.2	112.9	151.2	—
ホーレン草葉	110.3	110.3	110.0	114.4	114.8	115.4	114.1
莖	0	0	0	6.9	5.8	6.9	7.3
馬 鈴 薯	12.9	12.9	12.8	14.6	13.9	14.6	14.1
甘 藷	0	0	0	24.7	19.7	25.8	26.0
苹果、國光	0	0	0	3.3	2.7	4.1	4.0
" 紅玉	0	0	0	1.9	1.5	2.0	2.2
密 柑 汁	33.9	33.9	33.5	33.3	33.9	33.9	33.6
皮	159.1	159.1	156.6	208.3	196.1	200.3	201.6
ボンカン汁	29.8	29.8	29.5	34.5	33.8	34.9	36.7
皮	39.7	39.7	35.5	101.3	84.8	107.3	108.1
番 茶	180.0	156.9	58.0	175.6	148.1	209.1	72.8
緑 茶	167.6	154.7	63.3	185.6	191.5	246.3	174.6

(材料は市販品であるから新鮮度は不明である)

還元型アスコルビン酸含量は動物組織に於ては室温にて滴定したる時は 0° 附近にて滴定したる時よりも高く、藤田氏は最低値を示した。 0° 附近にて滴定しても尙影響する物質の存在する如くであるが室温にて滴定するよりも勝つてゐる。植物組織に於ては茶葉を除いては何れも相似たる値である。

總アスコルビン酸含量は強酸性溶液にて還元したる時は常に少く他は大體相似てゐる。奥田氏及著者は藤田氏法に於ける總ビタミン C 定量操作の後半及 EMMERIE の醋酸水銀處理により Dehydro-ascorbic acid は著しく分解を蒙る事を報告したが速に操作を行へば著しき影響を及ぼさない様である。McHENRY 及 GRAHAM (16) が EMMERIE 法にて定量する際著しく損失を來し添加したるアスコルビン酸の 70 % が回收せられたのみと云へるが之れは操作中比較的高温にして時間を要したるに因るものと思はれる。かゝる恐れあるを以て醋酸水銀にて處理する事は注意せねばならぬ。

茶葉に於ては甚しく相異した、茶葉中のアスコルビン酸を indophenol 法にて定量する時は誤差を生ずる如くである。

二. 結合型アスコルビン酸に就て

McHENRY 及 GRAHAM ⁽¹¹⁾ は或種の植物組織を加熱する時は indophenol 滴定値を著しく増加し最初の5分間加熱にて最高に達する事を報告し、次で兩氏は馬鈴薯を水で浸出した時は三鹽素醋酸又はメタ磷酸で浸出した時よりもアスコルビン酸含量多く、水浸出液を三鹽素醋酸又はメタ磷酸で除蛋白を行へばアスコルビン酸含量は減少し、其沈澱を稀鹽酸で加水分解した後蛋白を除き定量すれば前の減量を回収する事が出来る。又豫め組織を 0.2~1% の鹽酸にて加水分解したる後定量すれば然らざる場合に比し其含量が多い事を實驗し、これは Protein-Ascorbic acid の存在によるものであつて此物質は水には溶解し蛋白沈澱劑にては沈澱するが豫め稀鹽酸にて加水分解すれば遊離して蛋白沈澱劑に溶解するに至る事を報告した。AHMAD ⁽¹²⁾, GUHA 及 PAL ⁽¹³⁾ LEVY ⁽¹⁴⁾ 等も是等の結果を承認した。

他方 EEKELEN ⁽¹⁷⁾ 及 MACK ⁽¹⁸⁾ は之を確むる事を得ず加熱によつて増加するのはアスコルビン酸オキシダーゼの破壊による爲で總アスコルビン酸を定量すれば等しき結果を得ると報告した。

McHENRY 氏等の結合型アスコルビン酸が存在するものと假定すれば組織を稀鹽酸にて加水分解したる後アスコルビン酸を定量せねばならぬ。著者は結合型アスコルビン酸の存否を検知する爲に馬鈴薯及甘藍を用ひ加熱又は稀鹽酸にて加水分解したる前後に於けるアスコルビン

酸含量を定量した。

試料を 1 cm 平方位に切り次の如く実験した。

1. 試料 10 g を採り少量の硅砂と搗碎したる後 10% メタ磷酸 10 c.c. 及水を加へ 50 c.c. とす。
2. 試料 10 g 採り水 10 c.c. と少量の硅砂を加へ搗碎したる後 10% メタ磷酸 10 c.c. 及水を加へて 50 c.c. とす。
3. 試料 10 g 採り 10% メタ磷酸 10 c.c. と硅砂を加へ搗碎せる後水にて 50 c.c. とす。
4. 試料 10 g 採り 2.5% メタ磷酸 20 c.c. 添加し窒素瓦斯又は炭酸瓦斯を通じながら 98° の水浴中にて 4 分間加熱後上記瓦斯を通じながら冷水にて冷却し搗碎し 50 c.c. の 2% メタ磷酸溶液とす。
5. 試料 10 g 採り水 20 c.c. 加へ前記の如く加熱冷却せる後搗碎し 10% メタ磷酸及水を加へ 50 c.c. とす。
6. (5) と同様加熱冷却後 10% メタ磷酸 10 c.c. 加へ搗碎し水にて 50 c.c. とす。
7. (3) の如く搗碎し 50 c.c. としたる後前記の如く加熱冷却す。
8. 試料 10 g に水 30 c.c. 加へ搗碎したる後前記の如く加熱冷却し 10% メタ磷酸 10 c.c. 及水を加へ 50 c.c. とす。
9. 試料 10 g に 1% HCl 30 c.c. 加へ搗碎せる後窒素瓦斯又は炭酸瓦斯を充滿し 4° の冷蔵庫に 1 時間置きたる後 10% メタ磷酸 10 c.c. と水を加へ 50 c.c. とす。

浸出後還元型、酸化型及總アスコルビン酸含量を定量し、(3) の總アスコルビン酸含量と他の總アスコルビン酸含量との差を結合型アスコルビン酸と見做した。実験結果は次の如くである。

	馬 鈴 薯 (mg%)				甘 藍 (mg%)			
	還元型	酸化型	總和	結合型	還元型	酸化型	總和	結合型
1. 搗碎後 HPO_3 添加	0.72	19.89	20.61	-0.19	1.47	31.73	33.20	-3.38
2. 水と搗碎後 HPO_3 添加	1.56	18.84	20.40	-0.40	3.47	30.99	34.46	-2.12
3. HPO_3 と搗碎	17.60	3.31	20.80	0	31.26	5.32	36.58	0
4. HPO_3 溶液にて加熱	18.50	3.08	21.58	0.78	31.47	5.33	36.80	0.22
5. 水溶液にて加熱し搗碎後 HPO_3 添加	17.65	2.78	20.43	-0.37	31.07	4.37	35.44	-1.14
6. 同 上 HPO_3 を加へ搗碎	16.75	2.49	19.24	-1.56	31.47	3.97	35.44	-1.14
7. HPO_3 と搗碎し加熱	—	—	—	—	32.10	5.61	37.71	1.13
8. 水と搗碎し加熱	—	—	—	—	3.07	4.22	7.29	-29.29
9. HCl 加水分解	18.90	2.41	21.31	0.51	30.87	6.05	36.92	0.12

實驗結果に見る如く加熱又は酸加水分解によつて アスコルビン 酸含量の増加を認めなかつた。只 (1) 及 (2) の如き浸出法を用ふれば 幾分酸化分解を蒙る爲加熱したものに於て増加を認めたが酸化を充分防ぐ時は増加しなかつた。McHENRY 及 GRAHAM は 馬鈴薯, LEVY は馬鈴薯及 Cauliflower の水浸出液にては 三鹽素醋酸又は メタ 磷酸浸出液に於けるよりも其アスコルビン酸含量多い事を報告してゐるが、著者は水浸出液を作りたるも着色甚しく滴定不可能であつた。三鹽素醋酸又は メタ 磷酸浸出液に於て少きは 奥田氏及著者の報告したる如く硫化水素にて還元する 際酸液其儘にて行ひし爲還元充分ならざりし事に因るものと思はれる。甘藍に於て GUHA 及 PAL は加熱にて増加を認め McHENRY 及 GRAHAM は減少した事を報告してゐるが著者の實驗では殆増減を示さなかつた。

以上の如く著者の實驗結果の範圍内に於ては 所謂結合型 アスコルビン 酸の存在は認め得なかつた。即ち奥田氏及著者の浸出法で定量して差支ない事を認めた。之を要するに McHENRY 等が結合型 アスコルビン 酸の存在を想定したるは アスコルビン 酸オキシダーゼに關する注意を怠りたるに起因し、組織を水又は鹽酸液と煮沸してアスコルビン酸の増加するが如き誤りたる結果を得たるは偶然オキシダーゼを無力化したる結果に過ぎざる事を確めた。

總 括

1. 奥田氏及著者のアスコルビン酸定量法と他の諸氏の indophenol 法及藤田, 海老原兩氏の比色法とを比較し、又 McHENRY 等の稱する結合型アスコルビン酸に就て實驗した。

2. 還元型は動物組織に於ては藤田, 海老原兩氏比色法最低値を示し、次に奥田氏及著者の方法にして他の 諸氏の 室温滴定法にては 最高値であつた。植物組織に於ては 殆相似たる結果を得た。總アスコルビン酸は強酸性液にて還元したる時は常に少く、他は大同小異である。

茶葉に於ては著しく相異した。

3. 所謂結合型アスコルビン酸の存在を否定した。

附言 終りに當り本實驗中御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた奥田先生に謹謝する。

文 献

- 1) SZENT-GYÖRGY; *Biochem. J.*, 22, 1387 (1928).
 - 2) SVIRBELY SZENT GYÖRGY; *Nature* 129, 690 (1932).
 - 3) HARRIS, MILLS & INNES; *Lancet.*, ii, 235 (1932).
 - 4) HARRIS RAY; *Biochem. J.* 26, 2068 (1932), 27, 303 (1933).
 - 5) BIRCH, HARRIS RAY; *Chem. Ind.*, 52, 159, *Nature* 131, 273 (1933).
 - 6) TILLMANS, HIRSCH & REINSHAGEN; *Z. Unters. Lehensm.*, 56 272 (1928).
 - 7) TILLMANS, HIRSCH & DICK; *ibid.*, 63, 267 (1932).
 - 8) TILLMANS, HIRSCH & HIRSCH; *ibid.*, 63, 1 (1932).
 - 9) 藤田, 海老原; *東京醫事新誌*. 3010, 1, 3011, 1 (昭和11年).
 - 10) 奥田, 片井; *日本農藝化學會誌*, 15, 80 (昭和14年).
 - 11) McHENRY & GRAHAM; *Nature* 135, 871 (1935), *Biochem. J.*, 29, 2013 (1935), *ibid.*, 32, 85 (1938).
 - 12) AHMAD; *Nature* 136, 797 (1935).
 - 13) GUHA & PAL; *ibid.* 137, 946 (1936).
 - 14) LEVY; *ibid.* 138, 933 (1936).
 - 15) EMMERIE; *Biochem. J.*, 28, 268 (1934).
 - 16) McHENRY & GRAHAM; *ibid.*, 29, 2013 (1935).
 - 17) EEKELEN; *Nature*, 136, 144 (1935).
 - 18) MACK; *ibid.*, 138, 505 (1936).
-