ビタミン C の微量定量法へのポーラログラフ *o*-フェニレンジアミン法の応用

大森 光明， 明橋 八郎*， 重岡 茂， 北岡 正三郎， 高木 正之助**

(1976 年 2 月 28 日受理)

ビタミン C の実用的な微量定量法として、デヒドロアスコルビン酸と *o*-フェニレンジアミン (OPD) の縮合物であるキノキサリン誘導体の還元波を利用する方法を再検討した。ノーリット “A” で L-アスコルビン酸を酸化し、OPD を最終濃度で $4 \times 10^{-4} \text{M}$ とし、pH 3, 6 の緩衝液中、25°C で約 50 分縮合させると $E_{1/2} = -0.207 \text{V}$ 及び -0.590V の還元波が得られ、後者の波を利用すると L-アスコルビン酸について $(0.45 \sim 4.5) \times 10^{-5} \text{M}$ の範囲で良好な検量線が得られ定量できることが分かった。又、この方法を用いて生体試料である *Euglena* 培養液中に生成すると思われる微量のビタミン C の定量を試みた。

1 緒 言

L-アスコルビン酸 (AA) の定量に関しては、従来よりインドフェノール法¹⁾²⁾、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNP) 法^{3)~6)}をはじめとして数々の報告がある。更に著者の一人高木らが提唱した *o*-フェニレンジアミン (OPD) ポーラログラフ法⁷⁾⁸⁾がある。この方法は水溶液試料中の AA をなんらかの方法で酸化し、デヒドロアスコルビン酸 (DAA) としてから室温で OPD と縮合させ、その縮合物のポーラログラフ還元波を利用する方法であり、DAA に対する、すなわち AA に対する特異性の高い定量方法である。そして、その後梶田、千田ら⁹⁾¹⁰⁾により更に検討された。

又、この方法は DAA と OPD の縮合により生成するキノキサリン誘導体の還元波と遊離の AA の示す酸化波が全く異なった電位範囲で観察できるので原理的には AA と DAA の混在する試料についての AA, DAA の同時定量を可能にするものである。しかしながら、実際の生体試料中に AA が微量に存在する場合定量分析にかけり得る濃度にまで濃縮するとか、きょう雑物を除くための濾過などの前処理の過程で AA は容易に空気酸化を受け DAA に変化してしまう。又、生体試料中に、もともと DAA として存在するものは pH 4 以下の酸性で

ないかぎり、取り出す過程で不可逆的に 2,3-ジケトグルコン酸あるいは更にその分解物にまで変化してしまう可能性が非常に高い。従って、生体試料中に微量に存在する AA あるいは DAA は、例えば定性的に検出しえたとしても、操作中の変化を考えると分離定量することはあまり意味のないことに思われ、むしろ総ビタミン C として AA に換算して表示するのが適当であると考え

る。著者らは上記のような論議があてはまる系として、たまたま原生動物である *Euglena*¹¹⁾ の培養液中に生成すると思われる微量の AA の定量分析が必要となったのを契機にして改めて OPD 法による微量総ビタミン C の実用的な定量法を検討した。

一方、Deutsch ら¹²⁾ 及び小川¹³⁾ によって OPD けい光法、Eldawy ら¹⁴⁾ による吸光光度法などいくつかの微量定量法が報告されている。本法はそれらの方法と比較しても定量限界濃度、簡便さ、きょう雑物の影響が少ないなどの点において優れた方法と思われるので報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

ノーリット “A”：American Norit Co. 製品を和光純薬工業(株)より購入し、そのまま使用した。L-アスコルビン酸：和光純薬工業(株)製特級品を使用した。

o-フェニレンジアミン：Merck 社製クロマトグラフ用試薬を使用した。

緩衝液：0.2M 酢酸と 0.2M 酢酸ナトリウムを混合

* 大阪市立環境科学研究所：大阪府大阪市天王寺区東上町 21

** 大阪府立大学農学部農芸化学科：大阪府堺市百舌鳥梅町 4-804

し, pH 3.6 の酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液を使用した。

2.2 装 置

ポーラログラフ: 柳本製作所製 P-8 型を使用した。滴水水銀電極の特性は酢酸緩衝液中で, $h=72.5\text{ cm}$ のとき, 加電圧 -0.6 V , $(25\pm 0.2)^{\circ}\text{C}$ において $m=1.86\text{ mg/s}$, $t=4.50\text{ s/drop}$ であった。飽和カロメル電極を参照電極として使用した。温度調節には恒温そうを使用し, その精度は $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ であった。

pH メーター: Beckman 社製 SS-2 形を使用した。

3 実験方法

十分に脱酸素した pH 3.6 の酢酸緩衝液で AA の $5\times 10^{-5}\text{ M}$ 液を調製する。その液 10 ml にノーリット“A” 30mg を混合し, 激しく手で振とうする。その汙液 4.5 ml を電解びんに取り, 約 10 分間窒素ガスを通気する。十分に脱酸素した再蒸留水を用いて調製した必要濃度の OPD 水溶液を 0.5 ml 加え, 窒素ガスを通気しながら 25°C で適当な時間 DAA と OPD を縮合させた後, ポーラログラムを記録し, 出現する還元波の波高を測定する。

検量線作成のためには汙液を十分に脱酸素した酢酸緩衝液で順次必要濃度まで希釈し, その液 4.5 ml を用いて同様操作により OPD との縮合を行わせる。

4 実験結果及び考察

4.1 酸化の方法

以前の研究⁷⁾⁸⁾で DAA と OPD の縮合物の還元波を定量に利用する場合の適当 pH 値は約 3.6 であることが分かっているので, 今回も pH 3.6 の酢酸緩衝液を使用した。

試料のポーラログラムを記録したとき, AA の酸化波が現れない場合には直接 OPD 液を加えればよいが, 酸化波が現れる場合にはなんらかの方法で AA を DAA に酸化しなければならない。酸化の方法としては硝酸銀酸化法, 臭素酸化法, インドフェノール酸化法, ノーリット酸化法, 酸素による酸化法などが考えられるが, 操作上簡便であるノーリットによる方法について検討した。

pH 3.6 の酢酸緩衝液を用いて $5\times 10^{-5}\text{ M}$ の AA 液を調製し, その 10 ml をせん付き試験管に取る。これにノーリット“A”の一定量を少量ずつ加え分散させ, 約 2 分間手で激しく振とうした後, 約 10 分間静置する。反応はすべて室温で行い, 静置後汙過し, その汙液について常法に従ってポーラログラムを記録し, AA の酸化波の有無によって酸化を調べたところ, ノーリット“A”を (20~30)mg 加えることによって酸化が 100%

Fig. 1 The oxidation of AA with Norit “A”

(a) Before the oxidation; (b) After the oxidation;
Concn. of AA: $5\times 10^{-5}\text{ M}$; Norit “A” 30 mg/10 ml
of electrolyte solution; pH: 3.6; Temp.: 25°C

完了することが分かった。Fig. 1 にノーリット“A”を 30mg 加えた場合の酸化前と酸化後のポーラログラムを示した。

4.2 DAA と OPD の縮合物 (キノキサリン誘導体) の還元波

4.2.1 OPD 濃度の影響 3 で述べた方法に従い, OPD 濃度を種々変え, その縮合物の還元波について検討した。OPD の最終濃度 $1\times 10^{-3}\text{ M}$, $5\times 10^{-4}\text{ M}$, $4\times 10^{-4}\text{ M}$, $2.5\times 10^{-4}\text{ M}$ について縮合時間 (OPD 溶液添加からポーラログラムを 0V より記録開始まで) を 60 分としたときのポーラログラムを Fig. 2 に示した。いずれも $E_{1/2}=-0.207\text{ V}$, -0.590 V の波を示し, -0.590 V の波は, -0.207 V の波に比べ, かなり大きな波を示した。OPD 濃度 $1\times 10^{-3}\text{ M}$ の場合, 縮合時間 40 分ごろより, 又 $5\times 10^{-4}\text{ M}$ の場合には 80 分ごろより, $E_{1/2}=-0.380\text{ V}$ 付近にわずかに認められる新たな還元波が出現した。これら三つの還元波の還元機構については, 以前に高木ら¹⁵⁾が AA を硝酸銀溶液で酸化したときの DAA と OPD の縮合物について検討した場合と同様に考えられた。微量定量という観点から, 定量に用いる還元波は $E_{1/2}=-0.590\text{ V}$ の波にすることにした。

4.2.2 縮合時間と波高の関係 AA 最終濃度 $4.5\times$

Fig. 2 Polarograms of the condensation products of DAA with OPD

Concn. of DAA : 4.5×10^{-5} M; Concn. of OPD : (1) 1×10^{-3} M, (2) 5×10^{-4} M, (3) 4×10^{-4} M; (4) 2.5×10^{-4} M; pH : 3.6; Temp. : 25°C ; Polarograms were taken 60 min after the addition of OPD.

10^{-5} M とし, OPD 濃度を種々変えたとき (最終濃度 1×10^{-3} M $\sim 2.5 \times 10^{-4}$ M) の縮合時間 (実際に還元波を記録するまでの時間) と縮合物の還元波の波高との関係を検討した. 定量に用いる $E_{1/2} = -0.590$ V の還元波に注目すると, OPD 濃度 1×10^{-3} M の場合, 波高はポーラログラムを記録しはじめた 20 分ごろよりわずかながら減少する傾向にあった. 5×10^{-4} M の場合, その波高は 40 分ごろより 80 分ごろまでは一定であったが, その後は多少減少した. 4×10^{-4} M, 2.5×10^{-4} M の場合については各々 50 分ごろ及び 70 分ごろより一定値に達し, 記録し続けた 100 分程度まで安定であった.

定量にこの還元波を用いる場合, OPD の最終濃度は 5×10^{-4} M 以下であれば適当であるが, 安定時間が長く, 縮合時間が比較的短時間で一定値に達する 4×10^{-4} M が最適と考えられた. 又, AA の定量限界付近と考えられる 4.5×10^{-6} M についても OPD 濃度 4×10^{-4} M で同様の結果が確かめられた. この場合 $E_{1/2} = -0.207$ V の波は認められなかった.

Fig. 3 に最適 OPD 最終濃度 4×10^{-4} M の場合の縮合時間と波高との関係を示した.

4.2.3 検量線の直線性 以上の実験より OPD 最終濃度は 4×10^{-4} M が最適と分かったので, AA の最終濃度 $(0.45 \sim 4.5) \times 10^{-5}$ M の範囲について, それら縮合物の還元波の波高と AA 濃度の関係を調べた.

実験方法の操作に従って, 縮合時間 50 分でポーラログラムを 0 V より記録し, 波高を測定したところ Fig. 4

Fig. 3 The relations between the limiting currents and condensation times

Concn. of OPD : 4×10^{-4} M; Concn. of DAA : — 4.5×10^{-5} M, --- 4.5×10^{-6} M; ○ The wave of which the $E_{1/2}$ is -0.590 V; ● The wave of which the $E_{1/2}$ is -0.207 V

Fig. 4 Linear relationships between the limiting currents and the concentrations

Concn. of OPD : 4×10^{-4} M; ● 1st wave ($E_{1/2} = -0.207$ V), ○ 2nd wave ($E_{1/2} = -0.590$ V)

に示すような結果が得られた. 特に定量に用いられる $E_{1/2} = -0.590$ V の波については非常によい直線性を示し, 良好な検量線が得られた.

4.3 Euglena 培養液中の総ビタミン C の定量

Euglena は原生動物に属し, 光合成生物で, 暗所でも生育し, 環境に対して非常に適応性があり, 代謝生理研究の好材料である. *Euglena* の休止細胞を緩衝液中, 光照射下で振とうすると, 細胞内に AA の生成量の増加が認められると同時に細胞外への排出がオサゾンの生成により認められ, 薄層クロマトグラフィーにより明らかに AA であることが同定された¹⁶⁾. 細胞内の AA は DNP 法により十分定量可能であったが, 培養液中に排出され

Table 1 Determination of AA contents in cultured medium of *Euglena gracilis* Z

	Limiting current (nA)			Contents of AA in sample, M(μ g/ml)
	A. Sample only	B. Sample+added AA (3.6 μ g/ml)	B-A. Added AA (3.6 μ g/ml)	
Sample 1 ^{a)}	21	87	66	6.50×10^{-6} (1.15)
Sample 2 ^{b)}	44	107	63	1.43×10^{-5} (2.51)

a) Cultured medium of *E. gracilis* Z. grown for ten days; b) Cultured medium of *E. gracilis* Z grown for six days

た AA は微量であり発色阻害物質の存在も認められ、DNP 法では不可能であった。そこで今回検討したポーログラフ法を応用して総ビタミンCの定量を試みた。この場合生体試料であるので波高に影響を及ぼす物質が存在する可能性がある。そこで標準添加法により実験を行った。

Euglena gracilis Z. を Koren-Hutner¹⁷⁾ の培地 150 ml を用い、27°C で振とう培養を行い生育定常期の細胞を集めた。0.01M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で2回洗浄し、培養液と等量の緩衝液に懸濁して、光照射下4時間振とうした。その後遠心分離 (2000 g) により細胞を除いた上澄液を pH 3.6 に調整しその全量 120 ml を2分し、一方には標準添加として 40 μ g の AA を加え、無添加のものも平行して濃縮し、各々 10 ml にしノーリット“A”を 30mg 加えて酸化した後ろ過する。ろ液 6.3 ml を試料液とし、 4×10^{-5} M OPD 溶液 0.7 ml を加えて前記の操作に従ってポーログラムを記録した (この場合標準添加 AA は 3.6 μ g/ml である)。二つの試料について測定した結果は Table 1 のようになった。

Sample 1 は 6.50×10^{-6} M (1.15 μ g/ml), Sample 2 は 1.43×10^{-5} M (2.51 μ g/ml) という非常に低い濃度で定量が可能で濃縮前の緩衝液中の含有量に換算すると各々 1.34×10^{-6} M (0.24 μ g/ml), 2.94×10^{-6} M (0.52 μ g/ml) となる。このようにこの定量法によって AA と実験操作中に DAA に変化したもの及びごく微量と考えられる最初から存在する DAA の総和を総ビタミンCとして AA に換算して表示すれば薄層での分離などの複雑な処理も全く不要であり、不安定な化合物である AA を短時間に測定しうることが明らかになった。

文 献

- 1) J. Tillmans : *Z. Unters. Lebensm.*, **60**, 34 (1930), **63**, 1, 21, 27, 241, 267 (1932).
- 2) 藤田秋治 : 医学と生物, **2**, 265, 272 (1942).
- 3) J. H. Roe, C. H. Kuether : *Science*, **95**, 77 (1942).
- 4) J. H. Roe, C. H. Kuether : *J. Biol. Chem.*, **147**, 399 (1943).
- 5) J. H. Roe, M. J. Oesterling : *ibid.*, **152**, 511 (1944).
- 6) J. H. Roe, M. B. Mills, M. J. Oesterling, C.

- M. Damron : *ibid.*, **174**, 201 (1948).
- 7) T. Wasa, S. Ono, M. Takagi : *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **34**, 518 (1961).
- 8) M. Takagi : *Bull. Univ. Osaka Pref. Series B*, **11**, 177 (1961).
- 9) 梶田武俊, 千田 貢 : 農化, **46**, 137 (1972).
- 10) 梶田武俊, 山本喜男, 千田 貢 : 本誌, **22**, 1051 (1973).
- 11) “*The Biology of Euglena*”, Edited by D. E. Buetow, Vol., 1, 2 (1968). (Academic Press, New York).
- 12) M. J. Deutsch, C. E. Weeks : *A. O. A. C.*, **48**, 1248 (1965).
- 13) 小川俊太郎 : 薬誌, **73**, 316 (1953).
- 14) M. A. Eldawy, A. S. Tawfik, S. R. Elshabouri : *Anal. Chem.*, **47**, 461 (1975).
- 15) M. Takagi, R. Hosogaki, S. Ono : *Rev. of Polarography*, **14**, 367 (1967).
- 16) 重岡 茂, 北岡正三郎 : 未発表.
- 17) L. E. Koren, S. H. Hunter : *J. Protozool.*, **14**, Suppl. 17 (1967).

☆

Investigations on polarographic *o*-phenylenediamine method for microdetermination of vitamin C. Mitsuaki OHMORI, Hachiro AKEHASHI*, Shigeru SHIGEOKA, Shozaburo KITAOKA and Masanosuke TAKAGI** (*Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 21, Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka-shi, Osaka; **Department of Agricultural Chemistry, University of Osaka Prefecture, 4-804, Mozuume-machi, Sakai-shi, Osaka)

The previously reported polarographic method for determination of dehydro-L-ascorbic acid (DAA) by *o*-phenylenediamine (OPD) has been applied for microdetermination of total Vitamin C (V.C).

To 10 ml of dilute L-ascorbic acid (AA) solution in deoxygenated acetate buffer (pH 3.6), 30 mg of active charcoal (Norit“A”) was added to oxidize AA to DAA. The suspension was vigorously shaken for 2 minutes and allowed to stand for 10 minutes at room temperature. After removal of the charcoal by filtration, 4.5 ml of the filtrate was reacted with 0.5 ml of deoxygenated aqueous OPD solution (4mM) under nitrogen bubbling. The condensation reaction to quinoxaline derivatives was completed in 50 min at 25 °C. The reaction mixture showed two reduction waves with half-wave potentials of -0.207 V and -0.590 V (vs.S.C.E.) by polarography. The second wave was utilized for the determination of AA. A linear relationship between the limiting current and the concentration of AA was demonstrated in 4.5 to 45 μ M of AA. The present method was applied for

determination of V. C in a culture medium of *Euglena gracilis* Z. and a microamount of 1.15 $\mu\text{g/ml}$ (6.5 μM) could be measured, which was impossible for DNP method.
(Received Feb. 28, 1976)

Keywords

Biological system

Condensation

Dehydro-L-ascorbic acid

o-Phenylenediamine

Polarographic method

Vitamin C

ビス(4-スルホベンジル) ジチオカルバミン酸ナトリウムを用いる水銀(II)の直接キレート滴定

田中 善正, 尾堂 順一, 狩屋 和子*

(1976 年 7 月 9 日受理)

9 種類の水溶性ジチオカルバミン酸誘導体を用いて水銀(II)の直接キレート滴定を行い、滴定試薬としての有用性を比較検討した結果、ビス(4-スルホベンジル)ジチオカルバミン酸ナトリウム(Na-BSDTC)が最も優れていることを見いだした。BSDTCは各種金属イオンとキレートを生成し、なかでも水銀(II)との安定度が最も高い。微量銅(II)イオンの存在下、水銀(II)をNa-BSDTCで滴定すると水銀(II)とのキレート生成(極淡緑色のHg-BSDTC)が終了した所で、Cu-BSDTCの黄かっ色を呈する。この反応を利用して、 10^{-3}M 程度の微量水銀(II)の直接キレート滴定を行った。

1 緒 言

ジチオカルバミン酸誘導体と水銀(II)との高い安定度を利用する種々の水銀(II)の滴定法が報告されている。水銀(II)を含む水溶液にジエチルジチオカルバミン酸銅(Cu-DDTC)の四塩化炭素溶液を滴下し、四塩化炭素相の黄かっ色が消えてなくなる所を終点とする直接滴定^{1)~3)}、又、Cu-DDTCのクロロホルム溶液又は水に懸濁させた液を加えて、交換反応で遊離する銅(II)を滴定する置換法⁴⁾⁶⁾がある。これらはろ過やかくはんなどの操作が必要であり、やや複雑である。又、ビス(2-ヒドロキシエチル)ジチオカルバミン酸銅(Cu-BHDTG)による滴定法⁶⁾が報告されているが、試薬の水溶性が低く、試薬調製に有機溶剤が必要である。著者らは9種類の水溶性ジチオカルバミン酸誘導体を合成し、水銀(II)滴定試薬としての有用性を比較検討した結果、ビス(4-スルホベンジル)ジチオカルバミン酸ナトリウム(Na-BSDTC)が最も優れていることを見いだした。BSDTCはDDTC及びBHDTGよりも水溶性に優れており、

滴定にろ過やかくはんなどの操作も不要で、銅(II)イオンを指示薬として、簡易な微量水銀(II)の直接滴定が可能である。

2 試薬と装置

2.1 試薬の合成

ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムの合成法⁷⁾に準じて、水溶液中で計算量の2級アミン、二硫化炭素及び水酸化ナトリウムを反応させ、Table 1に示す9種類のジチオカルバミン酸誘導体を合成した。合成した試薬はデシケーター中、五酸化リン上で1夜乾燥した後、銅(II)イオンを指示薬として、塩化第二水銀標準液で滴定し、純度を測定した。なお、試薬： $\text{Hg}^{2+}=2:1$ の組成比として、純度を計算した⁸⁾

2.2 試 薬

水銀(II) 滴定用試薬溶液： $2 \times 10^{-3}\text{M}$ 溶液を用いた。各種ジチオカルバミン酸ナトリウムの $2 \times 10^{-4}\text{mol}$ に相当する量を水に溶解して100 mlとし、黄かっ色びん中に保存した。各試薬溶液はいずれも1日のみ安定であり、調製後直ちに使用した。

* 岡山大学薬学部：岡山県岡山市津島中 1-1-1