Roe 法による L-Ascorbin 酸定量法の検討

Discussion on Measurement of L-Ascorbic Acid by Roe's Method

測定時間の短縮について* On Minimization of Measuring-time

(昭和 35 年 9 月 14 日受理)

毛 戸 澄 子^{*} 池 田 静 徳^{**} 藤 村 吉 之 助^{**}
(Sumiko Kedo) (Shizunori Ikeda) (Kichinosuke Fujimura)

The Roe's method is well known as a 2, 4-dinitrophenyl-osazone method to determine the amount of L-ascorbic acid in tissues. But this method is not convenient in practice due to the long hours required for production of the osazone. The authors attempted to minimize the time of reaction, and it was found that the quantitative analyses of both reduced and oxidized forms of L-ascorbic acid could be made by incubating the sample, which involved 1.2% thiourea, for 60 minutes at 50°C after adding 2, 4-dinitrophenylhydrazine.

緒 言

L-Ascorbin 酸(以下 AsA と記す)の定量法に関し、1943年 Roe ら¹⁾²⁾は、検液に 2,4-dinitrophenylhydrazin を加えて 37° で 6 時間 incubate した後生成する AsA- 酸化物の osazon を濃硫酸中で発色させ比色定量する方法を報告した。以来本法は、AsA の還元力を測定する従来の indophenol 法や KIO₃ 法に比べ幾つかの長所をもつため一般に広く採用されている³⁾⁴⁾。然しながら本法の欠点は測定操作に長時間を要することである。そこで測定時間短縮の目的で水野氏ら⁵⁾による '70° 29分法' 及び Schaffart ら⁶⁾による '100° 10分法' 等の改良法が工夫された。然しこれらの時間短縮法は、AsA と dehydro-L-Ascorbin 酸(以下 DHA と記す)の分離定量に満足な結果を与えず再現性も乏しいのでなお検討の余地があると考えられる。実際、天然物組織中では ascorbin 酸の大部分が還元型として存在しており総 AsA 量に対する DHA 量の比は比較的小さく、特に植物検体ではこの傾向が著しい。そこで私共は、多量の ASA と少量の DHA が共存する場合にその各々を精確簡便に分離定量し得る条件を見出すことを目的として、Roe 法による osazon 生成のための反応温度と時間その他の条件を検討した結果、'50°, 1 hr.' 法が最も目的に合致する事を見出したのでここに報告する。

実験方法及び結果

(A) 試 薬

- (1) AsA 標準液; AsA 10mg を秤量し 5% HPO₃ 溶液に溶かして 100ml 容となす(100γ/ml 溶液)。
- (2) DHA 標準液; AsA 標準液の一部を Br₂ 酸化して DHA 溶液とし直ちに使用する。
- (3) 20% HPO₃ 溶液。
- (4) 1~2% チオ尿素(5% HPO₃ 中) 溶液。[TU 液]
- (5) 2% 2,4-dinitrophenylhydrazine (9N H₂SO₄ 中) 溶液。[DNP 液]
- (6) 85% H₂SO₄。
- (7) Br₂ 水飽和溶液。

(B) '100°, 10分' 法の検討

まず最も incubation time を短縮した方法と考えられる Schaffart ら⁶⁾の '100°, 10分' 法について検討した。以下測定結果は何れも 3~5 回の平均値を示す。

DHA 30γ の外に AsA 20~70γ を含む夫々の検液各 1ml 宛を試験管により、1% TU 液 3ml と 2% DNP 液 1ml を各々に加える。対照液には DNP を加えない。以上を 2 組作り、1 組は '37°, 3 hrs.' に他の 1 組は 100° の沸騰水浴中に 10 分間保ち直ちに氷水中で冷却しつつ 85% H₂SO₄ 5ml を徐々に加える。Blank は 85% H₂SO₄ を加えて後、DNP 液 1ml を加える。よく混合し室温に 30 分放置後 A. K. A. 光電比色計を用いて 530 mμ における吸光度 E を測定し、予め作製しておいた夫々の標準曲線より DHA 量を求めた。結果は第 1 図の如くで '37°, 3 hrs.' 法では共存する AsA の影響が認められないが、'100°, 10分' 法では AsA 量の増加に伴ない測定値が高く現われた。すなわち共存する AsA

* 本報は 'L-Ascorbin 酸の生化学的研究' の第 45 報である。

の酸化による影響が認められた。なお検液を常に正確に 10 分間 100°C に保つ事が困難なため本法は再現性に乏しい。以上の理由から '100°, 10 分' 法は自然物からの抽出液を検液とする場合には、DHA 測定法とした適当でないとの結論を得た。

第1図 AsA 20~70 γ を含む DHA 30 γ 溶液の測定曲線

(C) AsA と DHA の分離定量に適当な測定時間短縮法の検討

(1) 温度の選定

一方に DHA 30 γ のみ、他方に DHA 30 γ +AsA 40 γ の各々を 5% HPO_3 液にて 1ml 容となした 1 組につい

第2図 37°における吸光度-時間曲線

第3図 50~100°における吸光度-時間曲線

て、温度 37°, 50°, 55°, 60°, 70°, 80°, 90°, 100° で incubation を行い、一定時間毎の吸光 E を測定した。結果は第2図及び第3図の如くである。

第2図より明かな如く、37°では6時間 incubate する間共存する AsA の酸化による影響は殆んどない。また、第3図より、50°では80分までは共存する AsA の影響はないけれども、それ以上の時間では徐々に影響が現われる。55°以上では更にその影響が著しい。従って時間短縮法の対象となるのは 50°である事が分った。

(2) 時間の選定

DHA 30 γ を含む検液について反応温度を 50°とした場合に '37° 3 hrs.' の場合とほぼ等しい値を得る反応時間は 70 分であった(第1表)。

(3) AsA 共存時における DHA の定量

多量の AsA が共存する DHA 溶液について '37°, 3 hrs.' '50°, 60 分' '50°, 90 分' で測定した結果は第4図の如く '50°, 90 分' では AsA の酸化による影響が著しく、'50°, 60 分' では AsA 含有量 300 γ までは '37°, 3 hrs.' の場合とほぼ等しいがそれ以上の AsA 量が共存すると影響が増す。但し、'37°, 3 hrs.' においても AsA 量の増加に伴ない酸化の影響がかなり見られた。

第4図 AsA 0~600 γ を含む DHA 30 γ 溶液の測定曲線

(4) 酸化抑制剤⁷⁾の検討

第4図の結果から共存する AsA の酸化抑制剤について再検討する必要を認めたので、10⁻³M EDTA 溶液及び 2% TU 液を用いてそれらの酸化抑制効果を調べた。その結果は第5図の如く EDTA 溶液は不適当で 2% TU 液の添加が著しく効果的であった。ゆえに今後 AsA の酸化防止剤としては常に 2% TU 液を用いることとした。

(5) '50°, 1 hr.' incubation の決定

DHA 30 γ のみと、これに AsA

第5図 チオ尿素及び EDTA による共存 AsA の酸化抑制効果

200 r を共存せしめた場合について, '37°, 3 hrs.' 及び '50°, 50 ~ 100 分' 間夫々 incubate した。測定結果は第1表の如くである。

Table 1 50° における反応時間の検討

温度	時間 (分)	(A) DHA 30r + AsA 200r	(B) DHA 30r	(A)-(B)
37° C	180	0.302	0.281	0.021
	50	0.275	0.261	0.014
	60	0.285	0.268	0.017
	70	0.320	0.279	0.044
50° C	80	0.335	0.289	0.046
	90	0.352	0.302	0.050
	100	0.393	0.312	0.091

従来の '37°, 3 hrs.' 法でも多量の AsA が存在すればその酸化による影響は免かれ得ない ($\Delta E = 0.021$)。50°においても時間の経過に従って著しい AsA 酸化の影響が認められるが, 60 分では $\Delta E = 0.017$ を示し '37°, 3 hrs.' におけるよりもその差はむしろ少ない。従って '37°, 3 hrs.' 法に代る時間短縮法としては '50°, 1 hr.' も適当であるとの結論を得た。

'50°, 1 hr.' 法による標準曲線を常法により求めた結果は第6図の如くである。なお最小自乗法で求めた計算式は次の通りである。

$$\text{DHA量}(r) = \frac{E - 0.007}{0.0084}$$

第6図 '50°, 1 hr.' 法の標準曲線

Table 2 各種植物組織中の AsA 定量値

検 体	酸化型 AsA 定量値 (mg%)			総 AsA 定量値 (mg%)		
	37°, 3 hrs. 法	50°, 1 hr. 法	両法の差	37°, 3 hrs. 法	50°, 1 hr. 法	両法の差
ト マ ト	3.2	2.5	-0.7	15.2	14.8	-0.4
ト マ ト 生 葉	9.0	9.0	0	125.0	125.5	+0.5
ビ ー マ ン	8.8	8.0	-0.8	102.2	102.9	+0.7
三つ葉 (緑葉)	5.6	5.9	+0.3	40.0	40.5	+0.5
三つ葉 (茎部)	2.0	2.4	+0.4	11.1	11.4	+0.3
セ ロ リ ー	12.4	12.4	0	99.0	97.5	-1.5
大 豆 生 葉	12.3	12.3	0	202.0	202.5	+0.5
キ ャ ベ ツ	4.0	3.8	-0.2	42.6	42.6	0
西 洋 人 参	3.3	3.3	0	7.8	8.1	+0.3
モ ヤ シ	1.3	1.7	+0.4	14.4	15.3	+0.9
人 参 (緑葉)	10.5	11.5	+1.0	67.0	70.0	+3.0
人 参 (根部)	4.0	4.0	0	12.1	12.0	-0.1
柚 子	26.7	27.1	+0.4	112.0	116.0	+4.0
大 根 生 葉	5.7	6.2	+0.5	132.0	134.0	+2.0
つ ま み 菜	1.0	1.0	0	24.0	24.0	0
梨	0.7	0.7	0	6.0	6.0	0
胡 瓜	1.8	1.9	+0.1	9.0	8.6	-0.4

Table 3 50°, 1 hr. 法による測定値の再現率

検 体	No.	試料原液の 全AsA量(γ)	添加AsA量(γ)	測定値(γ)	回収AsA量(γ)	再現率(%)
パセリ	1	21.2	10	30.5	9.3	93
	2	21.2	20	40.8	19.6	93
	3	21.2	40	60.2	39.0	98
人 参	1	2.2	5	7.0	4.8	96
	2	2.2	10	12.0	9.8	98
	3	2.2	20	21.5	19.5	97
ほうれん草	1	6.9	10	16.3	9.4	94
	2	6.9	20	27.4	20.5	103
	3	6.9	30	36.2	29.3	98
	4	6.9	40	46.2	39.3	98

(D) 植物組織中の AsA 含有量測定

天然植物組織中の各型の Ascorbin 酸量を '37°, 3 hrs.' 法及び '50°, 1 hr.' 法について比較定量した。

検液の調製：試料 3 g に 20% HPO_3 液 7.5 ml 及び水 7.5 ml を加えて磨碎し、更に水を加えて 30ml 容となし、15分放置後濾過し、濾液 1 ml についてそのまま測定した場合の '酸化型 AsA' 値及び濾液を Br_2 酸化してから測定した場合の '総 AsA' 値を求めた。mg% に換算した値を示すと第2表の通りである。

第2表より、両法による測定値に実験誤差の範囲内でありよく一致している。また常法に従って行った '50°, 1 hr.' 法による回収実験の結果は第3表の如くであって再現率は 97% であった。

これより '50°, 1 hr.' 法は時間短縮法として充分実用に供し得られるものと信ずる。

要 約

植物組織中の Ascorbin 酸量を精確簡便に測定し得る方法を求める目的で Roe 氏原法の改良法である '37°, 3hrs.' 法に対し更に改良を加えて実際に正確にして便利に様に改善しようと試みて実験を行った結果以下の知見を得た。

1) Incubation time を最も短縮したと考えられる '100°, 10分' 法を検討した結果、共存する AsA の酸化による影響が著しく、DHA との分離定量が困難であるのみならず、操作上における再現性に乏しいことを知った。

2) Incubation の温度と時間を種々に変えて AsA が共存する場合の DHA 量を測定した結果、AsA の酸化による影響をほとんど受けない条件は '50°, 60分' で

あった。

3) 天然植物組織内におけると同様に多量の AsA が共存する試料中の DHA 量を '37°, 3 hrs.' 及び '50°, 60分' で測定した結果、何れの場合も AsA 量の増加に比例してその酸化による影響が現われた。但し、それは検液に 2% TU 液を加える事により防止する事が出来た。EDTA の添加は効果がなかった。

4) '37°, 3 hrs.' 法においても共存する AsA 酸化による影響は完全には免かれ得ないが、'50°, 1 hr.' では 37° の場合よりむしろその影響が少ない。

従って '37°, 3 hrs.' 法に代る incubation の条件は '50°, 1 hr.' が妥当であるとの結論を得た。

5) 天然植物組織中の AsA 量を '50°, 1 hr.' 法で測定し '37°, 3 hrs.' 法と比較した結果、両法は約 2% の誤差範囲内でほぼ同値を得、また回収実験の結果も再現率 97% であった。

本論文の内容は 1959 年 10 月 17 日日本農芸化学会関西支部大会（奈良）において発表した。

文 献

- 1) J. H. Roe and C. H. Kuether: J. Biol. Chem. **147**, 399 (1943)
 - 2) J. H. Roe and M. J. Oesterling: J. Biol. Chem., **152**, 511 (1944)
 - 3) 藤田秋治, 照内淳也: ビタミン, **4**, 53 (1951)
 - 4) 照内淳也, 島田よね子, 中村恵美子: ビタミン, **7**, 508 (1954)
 - 5) 水野勝治: 慈恵会医誌, **67**, 9 (1953)
 - 6) R. Schaffart and G. R. Kingsley: J. Biol. Chem., **212**, 59 (1955)
 - 7) 稲垣長典: 日農化誌, **29**, 416 (1955)
 - 8) A. M. Mayer: Nature, **180**, 4599 (1957)
- (* 京都学芸大学家政科)
(* ** 京都大学食糧科学研究所)