2-Phenyl azo p-cresol によるビタミン A の定量

Determination of Vitamin A with 2-Phenyl azo p-cresol

(昭和 27 年 12 月 23 日受理)

川 崎 近 太 郎 末 永 泉 二

(Chikataro Kawasaki) (Senji Sucnaga)

2-Phenyl azo p-cresol 溶液は紫外外部吸収スペクトル曲線がビタミン A のそれと殆ど同一の型を示しているのでビタミン A を光電分光光度計で定量する場合、器械を調整するに使われている⁽¹⁾この物質は安定な黄金色の結晶でその溶液も極めて安定であり容易に一定の吸光度をもつた溶液を調製することが出来る。従つてこれを標準とすれば紫外部に於てビタミン A を乾板上に比色的に定量することが出来る筈である。我々は 2-Phenyl azo p-cresol を合成しこのアルコール溶液を標準として肝油のビタミン A を定量しベックマン光度計による測定値とを比較した。

2-Phenyl azo p-cresol の合成 p-toluidine より合成した p-cresol を再結晶して精製し之れにアニリンをジアゾ化したものを結合させて 2-Phenyl azo-p-cresol を合成しアルコールで数回再結晶を行つて精製した、このものの融融點は 106.5~107°C で、ベックマン分光光度計による $E_{1cm}^{1\%} 328m\mu = 900.0$ で文献記載に一致した。(文献記載 900.0) 但し

$E_{1cm}^{1\%} 300m\mu / E_{1cm}^{1\%} 328m\mu = 0.648$ (文献記載 0.613)

$E_{1cm}^{1\%} 350m\mu / E_{1cm}^{1\%} 328m\mu = 0.555$ (文献記載 0.650)であつた。

装置及び試薬

使用した装置は英弘社製分光寫真器、タングステン火花放電装置、集光レンズ、ベリー管、3cm 液槽等である。

第 1 圖

標準 2-Phenyl azo-p-cresol 溶液; 2-Phenyl azo p-cresol 0.4166g を純アルコールにとかつて 100cc となし、これを純アルコールで 50 倍にうすめたものを原液とする。これを更に 10 倍に稀釋したものはベックマン分光光度計による E_{1cm} が 0.750 であつた。以下の實驗ではこれを 3 倍に稀釋して $E_{1cm} = 0.25$ を示すものを用いた。

第 1 表 ベックマン光度計測定値と本簡易法測定値の比較

検 體	ベックマン光度計 $E_{328m\mu}$ による I. U.	豫試験 (液厚差 2mm にて測定)		本試験 (液厚差 1mm にて測定)	
		I. U.	ベックマン値に 對する %	I. U.	ベックマン値に 對する %
1 鮫	2,644	3,100	117	2,800	106
2 //	3,068	3,100	101	3,000	98
3 //	3,546	3,900	110	3,500	99
4 //	4,832	5,100	106	5,100	106
5 //	9,560	10,100	106	9,700	101
6 鯨	20,040	20,700	103	19,300	96
7 //	32,000	33,400	104	28,400	89
8 //	39,500	42,700	108	44,500	113
9 //	44,740	42,800	96	42,600	95
10 //	43,900	52,200	119	47,500	108
11 //	41,800	38,400	92	39,000	93
12 //	48,750	46,000	94	47,000	96
13 //	41,800	33,700	81	41,300	99
14 目拔	121,500	97,700	80	112,300	92

第2圖 2-Phenyl azo p-cresol 法と
Beckman 光度計法との相關圖

測定法

先ず標準液を 3cm 液槽にとり数本の吸収スペクトル (幅 1~2mm) を 1~2mm 間隔で撮影する。但し 4 個の小窓を有する黒紙 (第1圖 a) をスリットの前に置く事によつて 4 本の標準スペクトルを同時に撮影した。次に検體肝油のアルコール溶液をベリー管にとり順次液層を変えながら前の標準スペクトルの夫々の間隙に検體スペクトルを撮影する。現像後 328m μ において標準と検體との黒化度が一致する點を求めこの點に相當する検體の液厚及び濃度から検體肝油の $E_{1cm}^{1\%}$ 328m μ を計算する。

$$\text{即ち } E_{1cm}^{1\%} 328m\mu = 0.25 \times 3 \times \frac{1}{C \cdot l}$$

但し C = 検液中の肝油の %, l = 液厚 cm

乾板の觀察は肉眼的に行つたので精密な波長における比較は困難であつた。乾板はパンクロを用い露出時間を 20 秒にした。

測定成績

測定は全て全油に對して行つた、初めに豫試験として檢體液厚を 2mm ずつ變化せしめて撮影し、第2回には液厚を 1mm ずつ變えて撮影した、成績を第1表及び第2圖に示した。

次に同一檢體肝油に對する 4 回の測定では、次のような結果を得た。但し、本肝油ではベックマン光度計によ

る測定は行つていない。15000 I. U. 14700 I. U., 14400 I. U., 16600 I. U., 以上平均値 15200 I. U., 推定標準偏差 982. この推定標準偏差は平均値に對する百分率で示すと 6.5% となる。

考察

本簡易定量法による測定値(y)とベックマン光度計測定値(x)との理論回歸直線は 0 點を通り 45° の方向を示す筈であるが、測定値に基づき回歸直線を計算すると、

$y = a + bx$ の式において

$$a = 191^{(2)} \quad (a \text{ の標準誤差 } 1059^{(4)})$$

$$b = 0.935^{(3)} \quad (b \text{ の標準誤差 } 0.0238^{(5)})$$

しかして相關係数 $\gamma = 0.996$ 即ち圖に示したように推定線は理論直線に殆ど一致している。

即ち以上の成績により本定量法はやや誤差が大きいか平均した測定値はベックマン光度計測定値に殆ど一致しており簡易定量法としては満足し得るものと云い得る。

特に簡便性においては Henri 法より優れていると思う。

總括

石英分光寫眞器及びベリー管を使用し 2-Phenyl azo p-cresol のアルコール溶液を標準とし、檢體肝油のアルコール溶液につき波長 328m μ に於ける吸光係数を測定しビタミン A 量を求めた。成績をベックマン光度計による定量値と比較し本定量法がビタミン A の簡易定量法として使用出来る事がわかつた。

(本研究は文部省科學研究費によるものである)

註

(1) H. R. Kreidert: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 17, 694 (1945).

$$(2) a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$(3) b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{m}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{m}} = \frac{S_{xy}}{S_x}$$

$$(4) (a \text{ の標準誤差})^2 = \frac{1-\gamma^2}{n-2} \cdot \frac{S_y}{n} \left(1 + \frac{n\bar{x}^2}{S_x}\right)$$

$$(5) (b \text{ の標準誤差})^2 = \frac{1-\gamma^2}{n-2} \cdot \frac{S_y}{S_x}$$

$$(6) \gamma = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_x \cdot S_y}}$$