綜 説

ビタミン A の物理的並びに化學的定量法に就て

J. B. Wilkie (米 國 食 糧 薬 品 局)

Ind. & Eng. Chem. (Analytical edition) 13, 209 (1941)

二 國 二 郎 譯

(東 京 帝 國 大 學 農 學 部)

昭 和 16 年 7 月 31 日 受 理

ビタミン A の定量法は動物試験法、物理的並びに化學的定量法の三種に大別される。動物試験法は從來最もよく研究され、現在でも米國藥局法の公定法である。但しこの方法は時間と費用を要する事大である爲に、物理的及び化學的の定量法が種々考究され多數の文獻が發表されて居る。これ等文獻中には幾多の矛盾、誤謬等もあつたが其の後の研究に依つてほぼ正確を期し得る様になつた。本綜説に於てはこの物理的及び化學的定量法の現状に就て報告する。

ビタミン A は式に示す如く β -イオン核に、一端に OH 基を持ち途中にメチル基を持つ不飽和炭素鎖が結合したものである。

三鹽化アンチモン反應

ビタミン A 定量法は初め主として化學的方法が研究され、肝油が三鹽化砒素⁽³⁹⁾、硫酸⁽⁴⁰⁾、三鹽化アンチモン⁽⁴¹⁾等の藥品に依つて呈色する事が知られた。尙米國藥局法では 1880 年頃に既に肝油の檢出法として硫酸を用ひる事を記載して居つた。

1926 年 Carr 及び Price⁽⁴⁾ は三鹽化アンチモンのクロ、フオルム溶液を用ふる定量法を案出した。但しこの三鹽化アンチモンとビタミン A との呈色は極めて速に褪色する。この色を分光器で檢すると A 濃度の濃厚な場合には 620 及び 583 m μ に、又稀い油では 606 及び 572 m μ に吸収帶を示す。英國藥局法ではこの三鹽化アンチモン法を濃厚肝油の A 定量法として推奨して居る。

同法の概略は、試験すべき油を 20° で 20% 溶液となしその 0.2 cc を厚さ 1 cm の容器に入れ比色計に置く。次に三鹽化アンチモンのクロ、フオルム溶液 2 cc を加へ手早く攪拌して比色する。

三鹽化アンチモン反應は種々の原因に依つてその吸収帶を移動する^(2, 3, 7, 17, 18, 21, 30, 32, 33, 34, 36, 37, 43, 45)。その原因の主なものは阻害質 (inhibitor) 等の存在或は實驗條件の不備 (例へば温度の變化、試料取扱ひ方の不注意、読み方の遅拙等) である。然しある種の試料に就いてよく注意して施行した三鹽化アンチモン法は後に述べる紫外線吸収スペクトル法と同等の精密度を持つて居る。

Carr-Price 法の改良法としてカテコール⁽⁴⁰⁾或はグアヤコール⁽⁴¹⁾を使用する方法がある。グアヤコールを使用すると若しカロチンが混在してもそれに依る誤差が現はれなくなり、色の持続性もよ

くとなると云ふ。Pacini 及び Taras⁽³⁸⁾ は三鹽化アンチモン法の變法 20 種に就て述べて居る。

Dann⁽⁹⁾ は Evelyn の光電比色計をこの三鹽化アンチモン法に利用した。この方法は讀みに對する個人誤差を極めて少なくする事が出来る故優れて居る。ある種の試料に就いては非常に正確な結果が得られて居るが、うまく行かない試料もあり、相當の熟練と注意とが必要である。

紫 外 線 吸 收

ビタミン A の物理的定量法としては、その 328 m μ に於ける吸収を測定する方法があるだけである。328 m μ に特有の吸収帯がある事は 1925 年高橋氏⁽⁴⁶⁾ に依つて初めて發見された。次いで Morton 及び Heilbron 等英國人がこの吸収と生理的效果との關係に氣附いた^(7, 12, 32, 35)。

その結果この紫外線吸収スペクトル測定法の方が三鹽化アンチモン法よりも正確であり簡單である事が明かになつた。1934 年國際聯盟營養部に依つて 0.6 γ の β -カロチンの効力が 1 國際單位と定められて以來、この生理學的効力と 328 m μ に於ける吸光係數 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ で表はされる) との關係を知る爲に英米兩國に於て多大の努力が拂はれた^(1, 23, 26, 27)。ビタミン A 溶液の紫外線吸収が Beer の法則に従ふ事も確められた。従つて現在では $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ の價も、又この價から國際單位に換算する爲の係數も一般に承認されて居る。この係數は生物試験に依つて直接に求められる。又既に生物試験に依つてその効力の解つた他の標準物と比較して定める事もある。かかる標準品として米國藥局法保證の肝油がある。

この $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ から國際單位に換算する係數に關して英米兩國の學者間に中々意見の一致を見なかつた。即ち英國ではこの係數として 1,600 が、又米國では一般に 2,000 が用ひられて居る。これは米國藥局法保證肝油が貯藏中に効力が減少した爲と云ふ事も考へられるが⁽³¹⁾、兩國間の動物試験法の差が最も大きな原因であらう。事實 1939 年に英國の Underhill 及び Coward⁽⁸⁾ はビタミン A エステルの結晶及び β -カロチンの國際標準品を使用してこの數が約 2,000 であると發表して居る。Holmes 及び Corbet⁽⁴⁾ に依れば氏等の得たビタミン A の結晶の最純品は $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2,100$ であると云ふ。これに今の係數 2,000 を乗すれば、計算上この最純ビタミン A 結晶 1 g の効力は $2,100 \times 2,000 = 4,200,000$ 國際單位となる。この A の結晶を用ひて實際に行つた動物試験の結果に依ると 1 g の結晶は 3,500,000 から 4,000,000 國際單位であると云ふから上の計算とよく一致する譯である $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ の數値も未だ中々一致しない。1937 年に American Pharmaceutical Association が行つた試験結果では米國藥局法保證肝油の $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 價は 1.4~1.79 であり、又 1940 年に American Drug Manufacturers Association が分光光度計に依るものと普通の紫外線吸収裝置に依る結果とを綜合して得た數値もほぼ同様の範圍を示したが、分光光度計のみを使用した場合には、誤差の範圍が著しく狭り、僅かに $\pm 8\%$ であつた。目下 U. S. Pharmacopoeia Committee が精密な分光光度計に依つて試験を行つて居るから、一層正確な結果が得られるであらう。

結局紫外線吸収法に於ても比色法に於ても誤差を起す最大の原因はビタミン A 分子の不安定な事である。A₂ 其の他の夾雜物に依る吸収の變化や呈色の攪亂は大した事はない。

Morton, Webster 及び Heilbron は濃厚ビタミン A のアルコール溶液を鹽酸と處理して反應物から 1,6-デメチル・ナフタリンを得て、ビタミン A が閉環する事を知つた^(13, 15, 22)。この事實は反應液が紫外線部に多數の吸収帯を示す様になる事からも裏書きされる。

1,6-デメチル・ナフタリンは普通の狀態に於てもビタミン A から生成されるであらうし、又初

めから存在するかも知れない⁽²⁹⁾。ビタミン A の青色價はこの閉環に依つて變化を受けないが、吸収の方では 368 m μ に主吸収帶を持つ特有の吸収帶を示すに至る。但しこのものは A の効力は有しない。

ビタミン A₁ に極めて類似した物質が最近発見されてビタミン A₂ と呼ばれて居る。即ち Lederer 及び Rosanova (1937) がロシア産のある種の淡水魚中から三鹽化アンチモンに依つて 690 と 645 m μ に吸収帶を有する物質を見出し⁽²⁹⁾、多數の學者が追試實證した^(14, 19, 28)。ビタミン A₁ の吸収が 328 m μ 、又その三鹽化アンチモン添加物の吸収が 620 或は 605 m μ にあるのに對して、A₂ では 345 ~ 350、及び 290 m μ に、又三鹽化アンチモン添加物では上述の如くに 690 ~ 697、645 m μ に吸収帶が存在する。尙兩者の閉環化合物の吸収帶は同一である。Gillam 等⁽¹⁰⁾は多分 A₂ の側鎖が A₁ より -CH=CH- だけ多いものであらうと推定したが、Gray (1939) は A₂ は分子内に二重結合を一つだけ餘分に持つて居るのみで、その C の數は A₁ と同一であらうと述べて居る⁽³⁰⁾。

Embree 及び Shantz⁽¹⁶⁾ はアルミナに對する吸着度の差 (A₂ の方がよく吸着される) に依つて兩ビタミンを分離定量する方法を考案し、Wald⁽⁴⁷⁾ は三鹽化アンチモン添加物の吸収頂點の差によつて兩者を夫々定量する方法を發表して居る。幸ひに A₂ は主として淡水魚に、A₁ は主として鹹水魚に含まれては居るが、兩者が混合して居る場合も多いであらうから、この分離定量法は更に研究されなければならない。

ビ タ ミ ン A の 安 定 度

ビタミン A は酸化作用及び光の作用に依つて破壊される。酸化の影響の方が著しいが、天然の油中にはこの酸化作用を妨げる物質を含んで居る場合が多い。又エステルとして存在して居るビタミン A は抵抗力が強い。如何に暗冷所に貯へて置いても、瓶の上部の空間が大きいと、數週間の内に 328 m μ の吸収帶の吸光係數が低下し、同時にビタミン A の効力が失はれて行く事はよく經驗する所である。尙この際の吸光係數の低下はナフタリン核に閉環する場合と異つて新しい吸収帶は生じない。

光の影響に關しては大多數の研究者は、光に依つて A 効力は完全に消失すると云ふが、然し一方光に依つては一部しか破壊されないと云ふ説もある^(9, 10, 11)。この試験法は光の照射の前後に A の吸収帶を測定するのであるが、未だ充分正確な結果を得るに至つて居ない。

Smith 等^(42, 44) は溶液中の A の安定度に關して興味ある研究を發表して居る。即ち氏等は 328 m μ に於ける吸光係數の低下は一部分可逆的であり、照射に依つて異性體の平衡が起るものであらうと述べて居る。かかる可逆反應はある種の溶劑に依つても起ると云ふ。一例を述べるとビタミン A を含んだ試料をクロ、フオルムに溶かして一定量とし吸収を測定する。次いで減壓でクロ、フオルムを去り、エーテルを加へて同容として再び吸収を測定すると前のクロ、フオルム溶液の場合に比して明かに高い吸光係數を示す。これも異性體を生ずる爲であらうと考へられる。かかる現象は吸収帶測定操作中にも起り得るであらうから一應考慮して置く必要があらう。

吸収帶を測定する試料を作るには普通 A 含有材料の浸出或は鹼化を行ふ^(43, 48) (例へば魚類の肝油の場合には肝油を 20 分間アルコールカリで鹼化し、4 回エーテルで浸出しこれを水で洗つて石鹼を除く、エーテルを注意して大部分蒸溜し、尙少量のエーテルを含む殘渣に適當な溶劑を加へて吸収帶を検する)。

この方法は完全とは云ひ難いが、熟達者が行へば相當信頼の置ける結果が得られる。この方面の研究は更に一層進められるべきであらう。尙この方法ではビタミン A とカロチンとが混在する場合には兩者を分離しなければならない。これには溶剤に依つて分ける方法と吸着に依つて分ける方法とがある。又クロマトグラフ法に依つてビタミン A を單離する方法もあるが、この際 A の分子の變化を起す事があるから注意を要する^(5, 25)。

要するに特定の波長の吸収帶を測定して、A 含有試料の效力を知る事は以上述べた如く現在既に可能である。然し複雑精巧な装置に依つて更に短時間内に一層正確に A の價を知る事は可能であり、又極めて望ましい事である。これには可視部及び紫外部の吸収帶を樂に且つ迅速に測定し得る機械を考案する事が最も必要の様に考へられる。著者は目下この方面に研究の歩を進めて居る故近く發表の機があると思ふ。

文 獻

- (1) Barthen, Berg, Cartar, Copley, Fosbinder, Tewes, Taylor. "A Collaborative Investigation of the Spectrophotometric Assay for Vitamin A" presented at 28th Annual Meeting of American Drug Manufacturers Association, Hot Springs, Va. (May 1, 1939).
- (2) Brode, McGill: J. Biol. Chem., **92**, 89 (1931).
- (3) Carr, Jewell: Biochem. J., **28**, 170 (1934).
- (4) Carr, Price: Ibid., **20**, 497 (1926).
- (5) Castle, Gillam, Heilbron, Thompson: Ibid., **28**, 1702 (1934).
- (6) Chevallier, Andre: Z. Vitaminforsch., **7**, 10 (1938).
- (7) Coward, Dyer, Morton, Gaddam: Biochem. J., **25**, 1402 (1931).
- (8) Coward, Underhill: Ibid., **33**, No. 4, 589 (1939).
- (9) Dann, Evelyn: Ibid., **23**, 1008 (1938).
- (10) De: Indian J. Med. Research, **23**, 505 (1935).
- (11) Ibid., **24**, 737 (1937).
- (12) Drummond, Morton: Biochem. J., **23**, No. 4, 785 (1929).
- (13) Edisbury, Gillam, Heilbron: Ibid., **26**, 1164 (1932).
- (14) Edisbury, Morton, Simpkins, Lovern: Ibid., **32**, 118 (1939).
- (15) Embree: J. Biol. Chem., **127**, 187 (1939).
- (16) Embree, Shantz: Ibid., **132**, No. 2, 619 (1940).
- (17) Emmerie, Eckelen, Wolf: Nature, **128**, 495 (1931).
- (18) Gillam: Biochem. J., **28**, 79 (1934).
- (19) Gillam, Heilbron, Jones, Lederer: Ibid., **32**, 405 (1938).
- (20) Gray: J. Biol. Chem., **131**, 317 (1939).
- (21) Heilbron, Gillam, Morton: Biochem. J., **25**, 1352 (1931).
- (22) Heilbron, Morton, Webster: Ibid., **26**, 1194 (1932).
- (23) Holmes, Black, Eckler, Emmett, Heyl, Nelsen, Quinn: J. Am. Pharm. Assoc., **26**, 525 (1937).
- (24) Holmes, Colbet: J. Am. Chem. Soc., **59**, 2042 (1937).
- (25) Holmes, Colbet: J. Biol. Chem., **127**, 449 (1939).
- (26) Hume: Nature, **143**, 22 (1939).
- (27) Hume, Chick: Med. Research Council, Special Rept. Series **202**, London. His Majesty's Stationary Office, (1935).
- (28) Lederer, Rathman: Biochem. J., **32**, 1252 (1938).
- (29) Lederer, Rosanova: Biokhimiya, **2**, 293 (1937).
- (30) Lovern, Creed, Morton: Biochem. J., **25**, 1341 (1931).
- (31) McFarlan: "Vitamin A Determination", Spectroscopy Conference, Mass. Institute of Technology, Cambridge, Mass. 1940.
- (32) Macwalter: Biochem. J., **28**, No. 2, 472 (1934).
- (33) Morgan, Edisbury, Morton: Ibid., **30**, 1645 (1936).
- (34) Morton: Ibid., **26**, No. 4, 1197 (1932).
- (35) Morton, Heilbron: Ibid., **22**, No. 4, 988 (1928).
- (36) Norris, Church: J. Biol. Chem., **85**, 477 (1930).
- (37) Notevarp, Weedon: Biochem. J., **32**, 1054 (1938).
- (38) Pacini, Taras: J. Am. Pharm. Assoc., **26**, 721 (1937).
- (39) Rosenheim, Drummond: Biochem. J., **19**, No. 4, 753 (1925).
- (40) Rosenthal, Erdelyi: Biochem. Z., **267**, 119 (1933).
- (41) Rosenthal, Szilard: Biochem. J., **29**, 1039 (1935).
- (42) Smith: Ibid., **33**, No. 2, 201 (1939).
- (43) Smith, Hazley: Ibid., **24**, 1942 (1930).
- (44) Smith, Robinson, Stern, Young: Ibid., **33**, 207 (1939).
- (45) Smith: J. Biol. Chem., **90**, 597 (1931).
- (46) Takahashi et al.: Sci. Papers Inst. Phys. Chim. Research (Tokyo), **3**, 81 (1925).
- (47) Wald: J. Gen. Physiol., **22**, No. 3, 391 (1939).
- (48) Wilkie: J. Assoc. Official Agr. Chem., **23**, 336 (1940).
- (49) Willimott, Moore, Wokes: Biochem. J., **20**, 1292 (1926).