〔農化 第 42 卷, 第 3 号, p165~171, 1968〕

生体試料中におけるポリビニルアルコールの定量法

石川 鹿生, 山谷 洋二*
(三重大学農学部農芸化学科)

昭和 42 年 7 月 31 日 受 理

Determination of Poly (vinyl alcohol) in Biological Materials

(Note)

By Shikao ISHIKAWA and Yôji YAMATANI

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Mie University, Tsu*

A spectrophotometric method was developed for the determination of partially hydrolyzed poly (vinyl alcohol) in biological materials such as digesta, feces, urine, blood and several common feeds.

Liquid sample or aqueous extract is pre-treated with Somogyi's precipitants, and furthermore with α -amylase if starch be present, in order to remove colorimetric interference. The concentration of the polymer is determined by reference to a previously prepared calibration formula, relating the concentration of the polymer ranging from 0 to 1.0 mg per 50 ml of final test solution and absorbance at 690 m μ for the greenish brown color produced by the reaction of the polymer with iodine in the presence of boric acid.

(Received July 31, 1967)

緒 言

著者らは、家畜の消化管内における栄養素その他の添加物の消化吸収、および移動の様相を知るための水溶性指標物質の検索を行なっているが、ポリビニルアルコール (PVA) は、この目的に適した物質の一つであると考えられる。その適格性を判定する第 1 段階として、比較的簡易な操作による定量法が必要である。

PVA とヨウ素の呈色反応は、古く Staudinger ら⁽¹⁾により指摘されており、Miller ら⁽²⁾はヨウ素滴定における鋭敏な指示薬として PVA を応用することを提案している。最近において、PVA-ヨウ素複合体の可視光線吸収に関する研究報告は相当数⁽³⁻⁹⁾見られるが、この原理を基礎とした PVA 比色定量法に関する研究は少なく⁽¹⁰⁻¹²⁾、中でも他物質と共存する場合の定量法としては Finley⁽¹⁰⁾のペーパーコーティングスとして添加されるもの、または Snell ら⁽¹²⁾の生体試料中における方法

があるに過ぎない。しかも、いずれも完全ケン化 PVA (PVA-f) の定量である。しかし水に易溶である部分ケン化 PVA (PVA-p) が、著者らの検索する指標としては適格有望である。そこで、本重合体の生体試料中における定量法について検討を加えた結果、一応の操作法を設定したので報告する。

実 験 方 法

1. 試料と試薬

試料として用いた PVA (日本合成化学工業株式会社製品) は、特に言及しない限り未分別のケン化度 86.3 mol%, 平均重合度 500 ± 50 のものである。これらの値は、それぞれ常法⁽¹³⁾、溶液極限粘度測定法⁽¹⁴⁾により求められたものである (本試料をメタノールで洗浄後、乾燥した場合でも、以下述べる方法による分析値は未処理の場合と同じであった)。

0.1% PVA 液: PVA-p 1.000 g を 100 ml の温水に溶かし冷却後水を加えて 1 l にする。

* 現在、広島大学水畜産学部

0.3 N $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 液: $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (1 級試薬) 47.3 g を CO_2 を除いた水に溶かして 1 l にする。

2.7% ZnSO_4 液: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 級試薬) 10 g を水に溶かして 200 ml にする。

3.8% H_3BO_3 液: H_3BO_3 (1 級試薬) 40 g を水に溶かして 1 l にする。

0.1 N I_2 液: KI (1 級試薬) 25 g を含む濃厚水溶液に I_2 (1 級試薬) 12.7 g を溶かし、これに水を加えて 1 l にする。

1% α -アミラーゼ液: α -アミラーゼ (ニュートリショナル・バイオケミカルズ社製) 0.5 g を水に溶かして 50 ml にする。

2. 装 置

吸光度の測定には島津 QB-50 型分光光度計を使用し、液槽はガラス製で幅 10 mm のものを用いる。pH は日立・堀場ガラス電極 pH メーターを用いて測定する。

3. 操作法

PVA-p (0~10 mg) を含む生体試料 (消化管内容物、排泄物、血液、飼料) 0.5~1.0 g を予めよく磨砕した後、水 50 ml を注加して 10 分間沸点以下で加熱浸出する (液状試料はこの操作を省略する)。冷却後 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 液 10 ml および ZnSO_4 液 10 ml を添加して生じた沈殿を遠心分離して除き、上澄液に水を加えて 250 ml に定容する。この液にヨウ素反応による澱粉の存在が検知されないことが確認できた⁽¹⁵⁾ (PVA の希薄溶液はホウ酸が存在しなければ、ヨウ素と呈色反応をしないから、PVA と澱粉を分離識別する手段によらずとも澱粉の存否を識別できる場合が多い)、本試料液の一部 (PVA-p 0~1.0 mg) を 50 ml-定容フラスコに分取し、水を注加して約 25 ml にする。次いで H_3BO_3 液 15 ml、 I_2 液 3 ml を順次によく攪拌しながら添加し、最後に水を補充して約 50 ml にする。恒温水槽中で約 20°C に 10 分間保ち、正確に 50 ml 定容としてから、可及的速やかに 690 m μ における吸光度を測定する。予め作成した検量式から PVA-p の量を算出する。さきの遠心分離後の試料液に澱粉の存在が予測または検知される時は、試料液を石灰水または 0.5 N 酢酸液により pH 6.2 付近に調節し α -アミラーゼ液 0.5 ml を添加して、65°C で 2~5 分間酵素分解を行ない、ヨウ素・澱粉反応が認められなくなしてから、上記の発色操作に移る。著者らが用いた生体試料の中で、本処置を必要としたものは、植物性飼料と胃内容物であった。

4. 検量式の作成

0.1% PVA 液の 0, 2, 5, 7, 10 ml を入れたビーカーに水を加えて 50 ml とし、それぞれに $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 液 10 ml および ZnSO_4 液 10 ml を添加して生じた沈殿を遠心分離して除き、上澄液に水を加えて 250 ml に定容する。各標準試料液より 25 ml を 50 ml-定容フラスコに分取し、 H_3BO_3 液 15 ml および I_2 液 3 ml を順次に振り混ぜながら添加して、最後に恒温水槽中で 20°C にして 50 ml になるまで水を加える。直ちに 690 m μ における吸光度を測定し、PVA-p 量に対する吸光度の回帰から検量式を求める。Fig. 10 に回帰を示す。

$$y = 1.906x - 0.010$$

x : 吸光度

y : 最終溶液 50 ml 中の PVA-p mg 数

考察および実験成績

以下の各項については、初め PVA-p の既知量を含む水溶液に沈殿剤を加えないものについて検討考察し、最後に沈殿剤添加の吸光度に及ぼす影響について検討を加えた。

1. PVA-p の呈色反応

著者らの方法では、PVA-p は緑褐色を呈し、Fig. 1 に示すように、690 m μ において極大吸収が認められ、本波長における吸光度は、最終溶液 50 ml 中 PVA-p 0~1.0 mg の濃度範囲において Beer の法則に従うことがわかる (Fig. 10)。

緑色を呈する PVA-f-ホウ酸-ヨウ素複合体の可視領域における極大吸収は、West⁽¹⁶⁾、Mokhach ら⁽¹⁷⁾ は 670 m μ 付近にあるとし、Zwick⁽⁷⁾ はホウ酸濃度により変化し 620~700 m μ の間にあるとしている。また Finley⁽¹⁰⁾ は同複合体は 690 m μ で極大吸収を示すとしている。し

Fig. 1. Spectral Absorption of PVA-Boric Acid-Iodine Complex.

PVA/50 ml of final solution: 1) 0.5 mg, 2) 1.0 mg.

かして Miller ら⁽²⁾はアセチル基を約 20mol% 含む PVA はヨウ素と鋭敏に反応して深紅色を呈すると報告している。著者らの PVA-p の呈色複合体はケン化度の相違にかかわらず Finley の極大吸収と同じ結果を示している。

本反応を PVA-p 定量に適用するに際して、同様の条件下で生成され、600 m μ 付近で極大吸収を示す澱粉-ヨウ素複合体の 690 m μ における吸光を無視できない。従って、生体試料に澱粉が含まれている時は、予め共存の PVA-p に変化を与えぬ方法を用いて澱粉とヨウ素の呈色反応を阻止する必要がある。

2. 重合度の影響

未分別のケン化度 86 mol%, 平均重合度 300, 500, 1100, 1400, 1700, 2000 の PVA-p の吸光度は、Fig. 2 に示すように、500 以上のものではほぼ同じ値が得られるが、300 のものは僅かに低い値を示し、水溶液中の濃

Fig. 2. Relation between Degree of Polymerization of PVA and Absorption of its Complex.

PVA/50 ml of final solution : 1) 0.2 mg, 2) 0.5 mg, 3) 1.0 mg.

Fig. 3. Effect of Degree of Saponification on Absorption of Complex.

Degree of saponification : 1) 86%, 2) 99%.

度が高いとこの傾向が著しくなる。

3. ケン化度の影響

重合度の等しい完全ケン化、部分ケン化の両 PVA について、PVA-ホウ酸-ヨウ素複合体の吸光度を比較したところ、前者が高い値を示した。重合度 500 のものを例として Fig. 3 に示す。これに関して、林ら⁽¹⁸⁾は PVA とヨウ素の呈色反応はケン化度およびケン化条件により影響され、それは PVA 分子内のエステル基分布に起因すると推論している。

4. PVA 製品の相違による影響

日本の A, B, C, D 4 社の PVA 製品で重合度、ケン化度のはほぼ同じ PVA-p を試料として、その吸光度を比較したところ、Table I に示すように、大差のない測定値が得られた。Zwick⁽⁷⁾は重合体の立体規則性によりヨウ素の取り込み方が違うから、PVA の合成工程がヨウ素との呈色に影響すると述べているが、本実験に用いた試料間には、少なくとも 690 m μ における吸光の相違はないと考えられる。

5. 試料溶液の希釈の影響

溶液中のホウ酸濃度が高いと PVA はゲル化し、ヨウ

Table I. Comparison of Different PVA Products

Designation	Degree of polymerization	Degree of saponification mol%	Absorbance at 690 m μ
A	500	86	0.323
B	550	88	0.318
C	600	88	0.319
D	500	88	0.326

PVA 0.5 mg/50 ml of final solution.

Fig. 4. Effect of Dilution of Test Solution before Coupling.

PVA/50 ml of final solution : 1) 0.5 mg, 2) 1.0 mg.

Fig. 5. Effect of Boric Acid Concentration on Absorption of Complex.

PVA/50 ml of final solution : 1) 0.5 mg, 2) 1.0 mg.

素呈色が溶媒中に均一に拡散しない^(19,20)。したがって発色試薬添加前に試料溶液を水で希釈する必要がある。Fig. 4 からわかるように、本法における PVA-p 含量範囲内においては、発色試薬添加前の容積が 15 ml を越えると一定の吸光度となる。安全性を考慮して、水で 20 ml 以上に希釈する。

6. ホウ酸添加量の影響

前項とも関連するのであるが、試料とヨウ素の濃度を一定にして、加えるホウ酸液を変える場合、Fig. 5 に示すように 10 ml を越えると吸光度の上昇傾向は小さくなり、15 ml であればホウ酸添加増量による吸光度の上昇は無視できる程度となる。この結果は PVA-f 発色時⁽¹⁰⁾とよく似ている。Zwick⁽⁷⁾はホウ酸が PVA の Helix 形成を促進しヨウ素の取り込みが増すと共に極大吸収波長が 580~700 mμ 間で移動するとし、少なくとも PVA-f

Fig. 6. Effect of Iodine Concentration on Absorption of Complex.

PVA/50 ml of final solution : 1) 0.5 mg, 2) 1.0 mg.

Fig. 7. Change of Absorption of Complex During Standing.

PVA/50 ml of final solution : 1) 0.25 mg, 2) 0.50 mg, 3) 0.75 mg.

の場合、立体規則性によるヨウ素の取り込みの相違はホウ酸濃度 0.16 M 以上であれば出現しないことを実証している。本実験法におけるホウ酸量であれば、約 0.19 M 相当である。

7. ヨウ素濃度の影響

Fig. 6 に示すとおり、ヨウ素液添加は 1 ml 以上になると吸光度の上昇は緩まんであり、3 ml とすれば吸光度が一定すると見なせる。

8. 呈色の安定性

発色試薬添加後、直ちに呈色は最高値に達し、室温においては少なくとも 4 時間は安定である (Fig. 7)。PVA-f について Finley⁽¹⁰⁾が指摘しているが、本法においても、ホウ酸液、ヨウ素液の添加順序を逆にすると、吸光度が

Fig. 8. Effect of Temperature on Absorption of Complex.

PVA/50 ml of final solution : 1) 0.25 mg, 2) 0.50 mg, 3) 0.75 mg.

僅かに低下するから、試薬添加の順序を変えてはならない。

9. 温度の影響

室温に近い各温度に溶液を調節し呈色せしめたものの吸光度は、Fig. 8に示すとおりである。温度により影響されることは明らかであり、高くなると吸光度は低い値を示す。林ら⁽¹⁸⁾も、PVA-pとヨウ素の呈色の480mμにおける吸光度について同傾向があるから、測定時の温度を一定にすべきことを強調している。

10. 酸、塩基の影響

最終溶液に $0\sim3\times10^{-4}$ mol HCl または $0\sim4\times10^{-4}$ mol NaOH を含有させても吸光度に影響がなく、pH がおよそ2~7の範囲内で本法の適用は可能である。Fig. 9に示すように、吸光度は一般に強酸性になると高く、塩基性に偏ると低くなる。Vink⁽²¹⁾は、溶媒が水、1 M

のNaCl, HCl または NaOH のいずれでも、PVA-fの25°Cにおける極限粘度は不変であると報告している。PVA-pの場合でも、分子そのものの変化によるのではなく、呈色反応機構がpHにより影響されるのであろう。

11. 澱粉分解操作の影響

発色試薬添加前の0.5および1.0 mg PVA-pを含む水溶液をpH 6.2に調節し、それぞれにα-アミラーゼ液0.5 mlを添加して前述のとおり処理したものの吸光度の値は、本処理をしない場合のそれと変わらない。

澱粉のヨウ素反応を消去するのにFinley⁽¹⁰⁾は0.2 N HClで1.5時間の煮沸を行なっているが、桜田ら⁽²²⁾によれば、2% HCl, 80°C, 1時間処理によりPVAの平均重合度は低下する。Finley⁽¹⁰⁾のHCl濃度は低いが処理温度が高いから、PVAの崩壊が危ぶまれ、また操作時間が長くなることから、著者らは酵素分解法を選んだ。

12. 沈殿剤添加の影響

生体試料中のPVA-p比色定量に際しては、温水抽出液の混濁および着色を予め消去せねばならない。活性炭、酸性白土を試用して見たがPVA-pそのものも相当量吸着されたので、3塩化酢酸を用いるSnell and Snell法⁽¹²⁾とBa(OH)₂とZnSO₄を用いるSomogyi法⁽²³⁾によったところ、Fig. 10に示すように後者では対照PVA-p水溶液の場合に比べて吸光度の低下は小さく、定量範囲内における吸光度差の平均は1 mg PVA-p 当り0.038であった。

以上、各項についての検討結果から、前述の操作法により生体試料中のPVA-p定量を試みた。

Fig. 9. Effect of Acidity and Basicity on Absorption of Complex.

PVA/50 ml of final solution : 1) 1.00mg, 2) 0.50 mg, 3) 0.25 mg.

* pH value at 20°C measured immediately after dilution and color production of 0.1% PVA stock solution (pH 6.98).

Fig. 10. Regression Curves for Test Solution Pre-treated with Different Precipitants
1) Control, 2) Somogyi method,
3) Snell and Snell method.

回 収 実 験 例

1. 各種飼料中の PVA-p

市販豚用配合飼料および 7 種の単味飼料について、PVA-p の添加回収試験を行なった。風乾試料 0.5 g に 0.1% PVA 液 25 ml を良く混和して 1 昼夜室温に放置後、所定の操作に従い、PVA-p を定量した結果を Table II に示した。ヨウ素反応から見て澱粉含量の多いと考えられる試料では非常に高い見掛けの回収率が得られたが、 α -アミラーゼ処理を施すと、いずれも大よそ 100% を示し、各種飼料の温水抽出液を沈殿剤で処理した後の試料液中には、他に本比色定量を妨げる物質は存在しないと考えられる。

Table II. Recovery of PVA in Several Feeds

Feed	Color reaction with iodine	Recovery % no treatment	Recovery %* α -amylase treatment
Formula feed	++	186	99 $\pm$ 3.1
Corn	++	196	99 $\pm$ 2.6
Barley	++	180	101 $\pm$ 3.5
Wheat bran	++	179	100 $\pm$ 3.8
Linseed meal	+	120	101 $\pm$ 2.5
Soybean meal	+	115	99 $\pm$ 2.1
Alfalfa meal	+	109	101 $\pm$ 2.5
Fish meal	—	99 $\pm$ 4.6*	99 $\pm$ 3.8

* Triplicate analyses : Mean $\pm$ S. D.

2. 消化管内容物、糞、尿および血液中の PVA-p

それぞれ市販豚用配合飼料およびラット用固型飼料を給与飼育した体重約 80 kg の豚および体重約 250 g のラ

Table III. Recovery of PVA in Digesta, Excreta and Blood (%)

	Air dry sample	Fresh sample	
	Pig*	Pig*	Rat**
Digesta			
Stomach	102 $\pm$ 2.2	***	***
Small intestine proximal part	98 $\pm$ 0.8	101 $\pm$ 1.3	99 $\pm$ 1.6
Small intestine distal part	99 $\pm$ 1.0	99 $\pm$ 1.3	99 $\pm$ 1.1
Cecum	103 $\pm$ 1.2	104 $\pm$ 0.3	98 $\pm$ 1.7
Colon	99 $\pm$ 1.0		97 $\pm$ 1.8
Rectum	98 $\pm$ 0.3	97 $\pm$ 0.6	99 $\pm$ 1.0
Excreta			
Feces	101 $\pm$ 1.0	103 $\pm$ 0.5	101 $\pm$ 1.4
Urine		102 $\pm$ 1.5	100 $\pm$ 1.2
Blood		99 $\pm$ 0.3	97 $\pm$ 1.7

* 2 pigs, duplicate analyses : Mean $\pm$ S. E.** 3 rats : Mean $\pm$ S. D.*** Treatment with α -amylase.

ットの消化管内容物、糞、尿および血液を用いて回収試験を行なった。試料として、消化管内容物および糞の風乾物は 0.5 g を、これらの新鮮物および血液は乾物の 0.5 g 相当量を、尿は 10 ml を用いた。各試料に 0.1% PVA 液 25 ml を良く混和して 1 昼夜放置後、所定の操作に従い PVA-p を定量した結果を Table III に示した。回収率はいずれも大よそ 100% を示し、本比色定量に干渉する物質は存在しないと判断できる。

要 約

本研究は家畜の消化吸収研究のための指標物質としてのポリビニルアルコールの定量法設定を目的として行なわれた。

部分ケン化ポリビニルアルコールがホウ酸の存在下でヨウ素と反応して 690 m μ に吸光極大を持つ緑褐色複合体を生成することを基礎にして、生体試料中における部分ケン化ポリビニルアルコールの定量法について検討した。最終供試溶液 50 ml 中本重合体 0~1.0 mg の濃度範囲でその定量が可能であった。同条件下で青色複合体を生成する共存澱粉は、予め α -アミラーゼによる酵素分解により、その妨害を消去できた。各種飼料、豚とラットの消化管内容物、排泄物および血液について本重合体の添加回収試験を行ない、大よそ 100% の回収が可能であることを確かめ得た。

本研究を行なうにあたり、各種ポリビニルアルコール試料を供与いただいた日本合成工業株式会社をはじめ、電気化学工業、倉敷レイヨン、信越化学工業の各株式会社に深謝いたします。なお、本研究に要した費用の一部は昭和 39 年度文部省科学研究費によった。

本報告の一部は昭和 40 年度の日本農芸化学会大会において発表した。

- (1) H. Staudinger, K. Frey and W. Stark : *Ber.*, **60**, 1782 (1927).
- (2) S. A. Miller and A. Bracken : *J. Chem. Soc.*, 1933 (1951).
- (3) S. A. Glikman, S. N. Ushakov, E. P. Korzhagina and E. N. Lavrentéva : *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **154**, 372 (1964).
- (4) L. G. Tebelev, G. F. Mikul'skii, E. P. Korzhagina and S. A. Glikman : *Chem. Abst.*, **63**, 8510 (1965).
- (5) Wen-Hsiang Yang : *ibid.*, **63**, 16490 (1965).
- (6) L. G. Tebelev and N. A. Silkina : *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **161**, 1096 (1965).
- (7) M. M. Zwick : *J. Appl. Polymer Sci.*, **9**, 2393

- (1965).
- (8) M. M. Zwick : *J. Polymer Sci.*, Pt. A-1, **4**, 1642 (1966).
- (9) L. G. Tebelev : *Chem. Abst.*, **65**, 7300 (1966).
- (10) J. H. Finley : *Anal. Chem.*, **33**, 1925 (1961).
- (11) H. Horáček : *ibid.*, **36**, 260 R (1964).
- (12) F. D. Snell and C. T. Snell : "Colorimetric Methods of Analysis", III, 3rd ed., D. Van Nostrand, 1953, p. 54.
- (13) 日本分析化学会編 : 分析化学便覧, 丸善, 1961, p. 1035.
- (14) 桜田一郎 : 工化誌, **47**, 137 (1944).
- (15) 石川鹿生, 山下晃一 : 分析化学, **15**, 156 (1966).
- (16) C. D. West : *J. Chem. Phys.*, **15**, 689 (1947).
- (17) V. O. Mokhnach and I. P. Zueva : *Dokl. Akad. Nauk SSSR.*, **155**, 846 (1964).
- (18) 林 貞男, 中野千世子, 本山卓彦 : 高分子化学, **20**, 303 (1963).
- (19) S. Saito, H. Okuyama, H. Kishimoto and Y. Fujiyama : *Kolloid Z.*, **144**, 41 (1955).
- (20) H. Thiele and H. Lamp : *ibid.*, **173**, 63 (1960).
- (21) H. Vink : *Makromol. Chem.*, **67**, 105 (1963).
- (22) 桜田一郎, 松沢秀二 : 高分子化学, **20**, 349 (1963).
- (23) M. Somogyi : *J. Biol. Chem.*, **160**, 69 (1945).
-