研 究 ノ ー ト

インドフェノール反応法による ヘスペリジン定量の改良法*

中 林 敏 郎**

さきに筆者¹⁾は温州蜜柑の果汁や罐詰シラップ中のヘスペリジンの真価を知るためにインドフェノール反応を利用する定量法を報告したが、その後本法を実施するにあたってしばしば純ヘスペリジンを用いた際の呈色が弱いために標準曲線がいちじるしく低くなるのに対して、果汁やシラップでは呈色の変動が少なく、したがって試料中のヘスペリジン量を標準曲線から算出することが不可能な場合を生じた。

そこで呈色を阻害する原因を検討した結果、それが主に Na_2CO_3 に含まれる微量の NaOH に起因することをつきかめ、これを除くことによって常に一定した標準曲線が得られるようにするとともに、標準曲線作製の場合と実際の試料を処理する場合との次亜塩素酸ソーダの使用濃度を同一 (0.05%) として操作を簡易化し、また Na_2CO_3 の濃度を 5% に下げて氷冷した際の結晶の析出を防止するなど、定量法の改善を行なったので実施上の注意とともに報告する。

1. ジメチル-p-フェニレンジアミン塩酸塩 (DPD)

できるだけ優良品で乾燥した白色結晶を使用する。本試薬は不安定で吸湿しやすいから冷暗所に乾燥状態で保存しなければならない。着色したり吸湿したものは呈色が弱まり、かつ対照に用いる空白試験のブタノール層が着色するので使用を避ける。筆者は東京化成工業株式会社のジメチルパラミン塩酸塩 ($\text{NH}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_3)_2 \cdot 2\text{HCl}$) を使用している。

DPD 量を増すと第 1 表に示したように呈色も強くなるが、対照のブタノールの着色もいちじるしくなるので、前報と同様 50 mg% を使用する。この時のヘスペリジンの定量限界は最大 15 mg% である。

2. 次亜塩素酸ソーダ (NaClO)

使用する度にその濃度を次のように検定する。市販品を 1~2% 濃度に稀釈した液 5 cc に 10% KI 5 cc と 10 %

HCl 5 cc を加え、密栓して暗所に 10 分間放置後、遊離した I を澱粉を指示薬として $N/10$ チオ硫酸ソーダで滴定する (a cc)。別に水 5 cc について同様に処理して滴定すれば (b cc)、反応式より NaClO の濃度は次式から求められる。

$$\text{NaClO}\% = 0.0744(a-b) \times (\text{稀釈倍数})$$

3. Na_2CO_3

筆者が検討した範囲ではほとんどの市販 Na_2CO_3 には微量の NaOH が含まれ、この NaOH が純ヘスペリジンを用いた場合の呈色を一にじめるしく阻害する。したがって遊離の NaOH を除くために Na_2CO_3 を所定濃度に溶解後、これに少量の稀 H_2SO_4 を添加して NaOH を中和することが必要で、その添加量は純ヘスペリジンを用いた時の呈色が最強となるまでで、通常 5% Na_2CO_3 1 l に対し $N/10$ H_2SO_4 10 cc 以内で十分である。

また前報では 10% Na_2CO_3 を用いたが、この濃度では氷冷によって Na_2CO_3 の結晶が析出し、操作が困難となる。そこで Na_2CO_3 の濃度の影響を検討したところ第 2 表のようにほとんど影響はなかった。しかし 1~3% では採取したブタノール層が氷冷によって濁るので、結晶

第 1 表 DPD の濃度の影響
(ヘスペリジン 10 mg%, $\text{NaClO} \cdots 0.025\%$, $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdots 10\%$)

DPD (mg%)	25	50	75	100	125	150
630mμ の吸光度	0.326	0.368	0.411	0.452	0.470	0.482
対照ブタノールの 1 時間後の着色	—	—	±	+	++	+++

第 2 表 Na_2CO_3 の濃度の影響
(果汁 0.5 cc + ヘスペリジン 5 mg%,
 $\text{NaClO} \cdots 0.1\%$, DPD $\cdots 50\text{mg}\%$)

Na_2CO_3 (%)	1	2.5	5	7.5	10
630mμ の吸光度	0.347	0.359	0.358	0.357	0.358

* 前報のインドフェノール法という言葉はビタミン C の定量法とまぎらわしいので、インドフェノール反応法と改称する。

** 静岡大学農学部農芸化学教室 (磐田市見付 4, 300)

Improved Method for the Determination of Hesperidin by the Indophenol Reaction.

By TOSHIO NAKABAYASHI

第3表 NaClO の 濃 度 の 影 響
(DPD...50 mg%, Na₂CO₃...5%)

NaClO (%)	630 m μ の吸光度						
	ヘスペリジン (5 mg%)	果 汁 (I)	果汁+ヘスペ リジン5mg% (II)	II—I	シラップ (III)	シラップ+ヘス ペリジン5mg% (IV)	IV—III
0.025	0.163	0.238	0.349	0.111	0.097	0.219	0.122
0.05	0.141	0.282	0.424	0.142	0.102	0.242	0.140
0.075	0.129	0.290	0.418	0.128	0.110	0.236	0.126
0.1	0.116	0.302	0.414	0.112	0.117	0.227	0.110

の析出しないうえを用いることにした。

4. 標準ヘスペリジン溶液

温州蜜柑果皮より抽出した粗ヘスペリジンを海砂とまぜ、ソックスレー抽出器を用いてメタノールで5~8時間煮沸抽出し、抽出メタノールに少量の水を加えて1夜放置後濾別、水洗、105°Cで乾燥して純ヘスペリジン結晶を得る。

この結晶 10 mg を N/10 NaOH 10 cc に溶解後、遊離の NaOH を除くために N/10 H₂SO₄ 11 cc を加えて微酸性とし、ヘスペリジンの析出を防ぐために 1% Na₂CO₃ 1 cc を加えて微アルカリ性とし、水を加えて正確に 100 cc としたものを標準溶液とする。このヘスペリジンのアルカリ溶液は長時間放置すると分解するので、使用直前に調製する。

5. 水飽和 n-ブタノール

色素の抽出に用いるブタノールは空白試験で着色してはならない。市販の n-ブタノールに少量の NaOH を加えて蒸留し、水を飽和せしめて用いる。なお回収ブタノールの使用は避ける。

6. 標準曲線の作製

前報ではヘスペリジンの標準液を用いて標準曲線をつくる場合 (0.025% NaClO 使用) と実際の試料を処理する場合 (0.1% NaClO 使用) とで NaClO の使用濃度が異なっていたが、操作を簡易化するために両者とも同じ濃度の NaClO を使用することとし、呈色におよぼす NaClO の濃度の影響を第3表のように検討した結果 0.05% NaClO を使用することにした。

この場合の標準曲線と試料に添加したヘスペリジンの回収率を検討するために、後述の実施法にしたがって各種濃度の標準ヘスペリジン溶液 1 cc および果汁の 5 倍稀釈液あるいはシラップの 2.5 倍稀釈液の 0.5 cc に 10 mg% の標準ヘスペリジン溶液を、0.1~0.5 cc ずつ添加し、水を加えて 1 cc としたのについてそれぞれ吸光度を測定したところ、第1図に示したようにいずれも同じ傾斜を有する直線が得られ、試料に添加したヘス

第1図 添加したヘスペリジンの回収曲線
(Na₂CO₃...5%, NaClO...0.05%, DPD...50 mg%)

リジンは完全に回収された。

したがって標準曲線はヘスペリジンの標準液のみを用いて作製してもよいが、とくに試料に各種濃度のヘスペリジンを添加した場合の検量曲線は実際に試料を処理する場合と全く同じ条件の下で作製したヘスペリジンの標準曲線とみることができるので、標準曲線の作製法として適している。

この方法で作製した標準曲線から稀釈した試料 100 cc 中のヘスペリジン量は次式から求められる。

$$\text{ヘスペリジン (mg)} = 35 \sim 37 \times (630 \text{ m}\mu \text{ における吸光度})$$

なおヘスペリジンの標準曲線、したがって計算式の係数は試薬の純度、含量、操作時間、温度および試料の成分などによって若干の変動があるので、実施の度に標準曲線を作成することが望ましい。

7. 実 施 法

- 試薬 i) 0.05% NaClO, 当日新たに調製
ii) 50 mg% DPD, 当日新たに調製
iii) 5% Na₂CO₃
iv) 水飽和 n-ブタノール

試薬はいずれもあらかじめ氷冷しておく。

試料の調製法は前報と同じで果汁は 10 倍, シラップは 5 倍稀釈液を用いる。また果肉中の全ヘスペリジンを定量するには果肉約 10 g を秤量し, 0.5 N NaOH 10 cc とともに磨砕し, 10 分間放置後, 稀硫酸で微酸性とし, 1% Na_2CO_3 を加えて微アルカリ性とし, 水を加えて 100 cc とした後濾過して得た透明液を用いる。

これらの供試液 1 cc を共栓の遠心分離管に入れ, これに 5% Na_2CO_3 2cc, ブタノール 10cc, DPD 1 cc, 0.05% NaClO 1 cc の順に加え, 直ちに数秒間はげし振盪しく, 1,500 回転で数分間遠心分離後上澄ブタノール層を採取

して氷水中に保つ。別に水 1 cc について同様に処理して得たブタノール層を対照として厚さ 1 cm の液槽を用い, 1 時間以内に 630 m μ における吸光度を測定し, 前述の標準曲線または計算式から試料中のヘスペリジン量を求める。

なお測定の際液温と室温が異なるために液槽表面が曇るのを防ぐには, 測定の約 5 分前に抽出ブタノールを氷水中から取り出しておくといよい。

文 献

- 1) 中林敏郎, 神谷真太郎: 農産技研誌, 6, 149(1959).
(1960年2月5日受理)