エリソルビン酸のポーラログラフ的研究 (第1報)

エリソルビン酸の定量について

梶 田 武 俊*

L-アスコルビン酸およびアスコルビン酸 ナトリウムに代る食品酸化防止剤として近年、エリソルビン酸およびそのナトリウム塩がかなり着目されるようになってきた。このエリソルビン酸はアスコルビン酸の化学的異性体で、物理、化学的性質がきわめて類似しているため、混合物よりの分離定量は従来もっとも困難なものの1つとされていた。しかるに 1949 年 MAPSON ら¹⁾²⁾ により paper chromatography による分離定量が報告され、その後 2, 3 の研究者³⁾⁴⁾ によって改良され、最近水谷ら⁵⁾ によりジュース、ハム、ソーセージなどの微量混合物中の分離定量について発表された。しかし、この方法は操作が複雑で、一般的な測定にはかなり困難が予想される。そこで、著者はかかる点の改良を目的として、いまだ報告をみないポーラロ法による分離定量について研究をはじめた。

今回はまずその基礎実験としてエリソルビン酸の定量条件の検討と、あわせて酸化に及ぼす影響を、アスコルビン酸の場合と比較検討したのでその結果を報告する。

実験方法

1. 試料

エリソルビン酸は藤沢薬品よりの提供品を用い、L-アスコルビン酸は和光純薬の製品を使用した。エリソルビン酸は L-アスコルビン酸の立体的異性体で、構造および諸性質は第1表のごとくである。

構造的には5番目の C につく H と OH とが反対になったいわゆる d 型で、エリソルビン酸の生理作用は L-アスコルビン酸の 1/20 であるといわれている⁶⁾。

2. 試薬および装置

実験に用いた試薬はすべて特級品を用い、使用水は再蒸留水を用いた。ポーラログラフは柳本製ペン自記式

第1表 構造および諸性質

	エリソルビン酸	L-アスコルビン酸
構 造 式	$ \begin{array}{c} \text{O}=\text{C} \\ \\ \text{HO}-\text{C} \\ \\ \text{HO}-\text{C} \\ \\ \text{H}-\text{C} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{O}=\text{C} \\ \\ \text{HO}-\text{C} \\ \\ \text{HO}-\text{C} \\ \\ \text{H}-\text{C} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $
分 子 式	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$
分 子 量	176.1	176.1
融 点	168°C (分解)	187~192°C
比 旋 光 度	-16~18.5°	+20.5~21.5°
定 量 法	還元力は両者全く同一である	

PB 4 型を使用し、測定はすべて恒温槽使用により一定温度のもとで行なった。

なお、外部基準電極は1規定甘コウ電極 (N.C.E.) を使用し、1N-KCl をもって液絡し、溶存酸素の除去には水素ガス通気を 10 分行なったのち、これを電解液としてポーラログラムを記録した。

pH の測定には柳本ガラス電極 pH メーター 42A 型を用いた。

実験結果および考察

1. pH の影響

エリソルビン酸のポーラロ的定量を検討するにあたり、もっとも測定しやすい波形を得るため、電解液の pH がポーラログラフ波に及ぼす影響をアスコルビン酸の場合と比較した。すなわち pH 2.2~8.0 の McIlvaine

* 奈良女子大学家政学部食物教室 (奈良市北魚屋西町)

Polarographic Studies on the Erythorbic Acid. Part I. On the determination of erythorbic acid. By TAKETOSHI KAJITA.

第2表 pH による影響

pH	エリソルビン酸		L-アスコルビン酸	
	E 1/2 V. vs. N.C.E.	拡散電流 μA	E 1/2 V. vs. M.C.E.	拡散電流 μA
2.2	+0.08	2.92	+0.10	2.96
3.0	+0.02	2.90	+0.04	2.92
4.0	-0.03	2.88	-0.01	2.84
5.0	-0.09	2.84	-0.07	2.80
6.0	-0.13	2.80	-0.11	2.80
7.0	-0.18	2.80	-0.15	2.80
8.0	-0.20	2.60	-0.18	2.46

Buffer にて $4 \times 10^{-4}M$ エリソルビン酸およびアスコルビン酸溶液を調製し、これを電解液としてポーラログラムを撮った。その結果は第2表に示すごとく、酸化電位は各 pH ともエリソルビン酸は L-アスコルビン酸に比し、約 0.02 V (－) 側に現われ、両者とも pH 2.2 から 8.0 とアルカリ側に向うに従って漸次 (－) に移動する。拡散電流もまた両者とも pH の増加とともに漸減し、pH 8.0 に至って急激に減少する。おそらく自動酸化によるためと思われる。

なお pH 5.0 以下の強酸性下では波形が縦に伸びるため、定量は pH 6~7 が適当と考えられる。

2. 水銀圧の影響

$4 \times 10^{-4}M$ エリソルビン酸を含む pH 7.0 の McIlvain Buffer において、水銀圧を変化した際の波高の変化率を示したのが第1図である。

図で明らかなごとく、波高は水銀溜の高さの平方根に比例して変化し、正常な拡散電流のタイプを示している。

第1図 水銀溜の高さによる波高の変化

第3表 温度による影響

温度 (°C)	E 1/2 V. vs. N.C.E.	拡散電流 μA	温度 (°C)	E 1/2 V. vs. N.C.E.	拡散電流 μA
15	-0.17	2.26	25	-0.18	2.60
17.5	-0.17	2.34	27.5	-0.18	2.68
20	-0.17	2.43	30	-0.18	2.77
22.5	-0.17	2.51	32.5	-0.19	2.85

3. 温度による影響

前と同じ電解液を用いて、温度が拡散電流に及ぼす影響を 15~32.5°C の範囲で検討したのが第3表である。

これによると拡散電流は温度の上昇とともに比例的に増加する。この波高の温度係数は 1°C あたり 3.3% であり、一般拡散電流の温度係数よりもかなり高い値がみられた。

4. 濃度と波高との関係

エリソルビン酸の濃度を $1 \sim 8 \times 10^{-4}M$ にかえてポーラログラムを撮った結果は第2図に示す如くである。図によると濃度と波高とは比例的関係を満足し、原点を通る直線となる。このように濃度と波高との間に一定の要関関係が成立すれば定量が可能であるから、したがって波高の測定から、未知濃度溶液中のエリソルビン酸を定量することができる。なお濃度と酸化電位との間には関係がなかった。

5. 還元物質ならびに金属イオン共存下におけるエリソルビン酸のポーラログラム

エリソルビン酸および L-アスコルビン酸 ($2 \times 10^{-3}M$) 2% メタリン酸液 1ml に、還元物質ならびに金属イオン ($2 \times 10^{-3}M$ 水溶液) 1ml を添加し、pH 7.0 の

第2図 濃度と波高との関係

- (1) エリソルビン酸 ($2 \times 10^{-4} M$)
 (2) L-アスコルビン酸 "
 (3) エリソルビン酸 "
 (4) L-アスコルビン酸 "
 (5) エリソルビン酸 "
 (6) タンニン酸 "
 (7) エリソルビン酸 "
 (8) ハイドロキノン "
 (9) エリソルビン酸 "
 (10) ニコチン酸 "
 (11) エリソルビン酸 "
 (12) EDTA "

電解液 PH 6.5 McIlvain Buffer

第3図 エリソルビン酸のポーラログラム

第4表 金属イオンの共存による影響

金属イオン ($2 \times 10^{-4} M$)	酸化電位 Volt		拡散電流 μA	
	エリソル ビン酸	アスコル ビン酸	エリソル ビン酸	アスコル ビン酸
FeCl ₃	-0.13	-0.11	1.40	1.36
MnSO ₄	-0.14	-0.12	1.42	1.40
ZnSO ₄	"	"	"	"
SnCl ₂	"	"	"	"
COCl ₂	"	"	"	"
CaCl ₂	"	-0.11	"	"
MgCl ₂	"	"	1.40	"

McIlvain Buffer にて 10 ml としたのち、これを電解液としてポーラログラムを記録したのが第3図、第4表である。

まず第3図によると、エリソルビン酸と L-アスコルビン酸とは -0.13 および -0.12 V の半波電位を有する酸化波を示し、共存する場合は合波となって現われる。したがって分離定量は不可能である。なおエリソルビン酸とタンニン酸、ハイドロキノン、ニコチン酸、EDTA などと共存する場合は、0.14~0.15 V の差で2段波となって現われる。しかしこれらが共存しても、エリソルビン酸のポーラログラムには全く影響がみられない。なおまた金属イオンと共存する場合も第4表のごとく、エリソルビン酸、L-アスコルビン酸ともになんら影響がみら

第5表 メタリン酸およびシュウ酸濃度による影響

濃度 %	電解液の pH	エリソルビン酸		L-アスコルビン酸	
		拡散電流 (μA)	酸化電位 (V)	拡散電流 (μA)	酸化電位 (V)
メ リ ン 酸	0 6.8	2.72	-0.16	2.68	-0.14
	1 5.8	1.40	-0.12	1.36	-0.10
	2 4.4	0	0	0	0
シ ュ ウ 酸	0.1 6.6	2.72	-0.16	2.68	-0.14
	0.25 6.2	2.60	-0.15	2.48	-0.13
	0.5 5.2	1.48	-0.12	1.64	-0.10

れない。

6. メタリン酸およびシュウ酸濃度による影響

$4 \times 10^{-4} M$ のエリソルビン酸および L-アスコルビン酸を含む pH 7.0 の McIlvain Buffer 中に 20% メタリン酸および 5% シュウ酸を所要濃度となるよう添加し、これを電解液としてポーラログラムを記録したのが第5表である。

表によると拡散電流ならびに酸化電位はメタリン酸およびシュウ酸の濃度によって左右され、濃度が高くなるに従って拡散電流は減少し、電位は(+)側に転移する。おそらくこの現象は溶液粘度に起因するものと考えられる。なおエリソルビン酸と L-アスコルビン酸の両者間における差は全くみられない。

7. 加熱処理による影響

加熱処理を施した場合と施さざる場合のエリソルビン酸の安定度をアスコルビン酸の場合と比較した。

すなわちエリソルビン酸およびアスコルビン酸 20 mg% 水溶液を 80°C で 30 分加熱処理したものとせざるものを作り、29°C の恒温器中に保存して一定時間ごとに残存せる還元型エリソルビン酸およびアスコルビン酸量を測定したのが第6表である。

第6表 加熱による影響

還元物質 処理法		経過日数 0 1 2 3			
		0	1	2	3
エリソルビン酸 20mg%	無 加熱	100.0	62.1	24.2	4.5
	加 熱	84.8	48.4	6.1	0
L-アスコルビン酸 20mg%	無 加熱	100.0	62.0	33.8	18.3
	加 熱	91.6	63.4	45.1	28.2

注：値は残存率 (%)

第7表 トマトおよびオレンジジュースに添加せるエリソルビン酸・L-アスコルビン酸の経日変化

経過日数		初 濃 度 mg%	殺菌直後 残 存 率 %	1	3	5	7
ト マ ト ジ ュ ース	エリソルビン酸	37.54	95.65	71.01	56.52	40.58	5.79
	L-アスコルビン酸	38.08	92.86	70.00	58.57	47.14	28.57
オ レ ン ジ ジ ュ ース	エリソルビン酸	48.96	93.10	65.52	32.18	9.20	0
	L-アスコルビン酸	47.60	93.02	69.77	55.81	32.56	20.93

第8表 銅イオンおよび V.C 酸化酵素液添加による影響

添加後の時間 (分)		0	30	60	90	120
エ リ ソ ル ビ ン 酸 (20mg%)	対 照	100.0	95.1	94.6	93.8	92.5
	銅 液 { 1 ml	53.1	22.2	19.8	18.5	12.3
	2 "	51.9	21.0	12.3	7.4	0
	粗酵素液 { キウリ 1ml	93.8	54.3	51.8	47.0	34.6
	ナ ス 1 "	96.3	92.6	88.9	87.2	84.0
	対 照	100.0	99.3	96.8	94.4	93.1
L-アスコルビン酸 (20mg%)	銅 液 { 1 ml	53.9	36.8	34.4	28.2	18.4
	2 ml	49.0	31.6	22.1	18.4	17.2
	粗酵素液 { キウリ 1ml	90.7	83.3	53.9	49.0	41.7
	ナ ス 1 "	99.3	94.5	93.6	92.4	90.7
	対 照	100.0	99.3	96.8	94.4	93.1
	銅 液 { 1 ml	53.9	36.8	34.4	28.2	18.4

その結果加熱処理による減少率は、アスコルビン酸よりもエリソルビン酸のほうが著しく、処理後3日目ですでに0%となっている。これに対しアスコルビン酸は28.2%とかなり高い残存率がみられた。

8. トマト、オレンジジュースに添加せるエリソルビン酸およびアスコルビン酸の経日変化

実験に使用したトマト、オレンジはいずれも市販品を用い、ステンレスナイフにて2分し、ガーゼで搾汁後遠心分離しその上澄液を使用した。この供試果汁100gにエリソルビン酸、アスコルビン酸各20mgを添加し、85°Cで30分加熱殺菌後30°Cの恒温器中に24時間保存し、以後は10°Cの冷蔵庫に貯蔵し、経日的な変化を測定したのが第7表である。

表によるとトマト、オレンジジュースともエリソルビン酸よりもアスコルビン酸の残存率が高く、ことに貯蔵7日目においてその差が顕著である。上述のエリソルビン酸およびアスコルビン酸水溶液を加熱処理した結果と全く同様な傾向がみられた。

9. 銅イオンおよびアスコルビン酸酸化酵素による影響

銅液としては硫酸銅100mg%水溶液を調製し、酵素液はキウリ、ナスを陶器製おろし器ですりおろし、ガー

ゼで濾過した濾液を遠心分離し、その上澄液を粗酵素液として使用した。エリソルビン酸およびアスコルビン酸20mg%水溶液中に銅液1~2ml、粗酵素液各1mlを加え30°Cの恒温器に貯蔵して、一定時間ごとに未酸化のエリソルビン酸およびアスコルビン酸量を測定し残存率を求めたのが第8表である。

表のごとく銅液の添加により著しく接触酸化されるが、その酸化程度は添加直後では両者間の差はみられないが、時間の経過とともにエリソルビン酸量は目立って減少し、ことに銅液の濃度が高くなるとそれが一層顕著となる。キウリ酵素液に対しても銅の場合と同じような傾向がみられた。

要 約

(1) エリソルビン酸のポーラログラムをpHを変えてとるとき、6.0~7.0においてもっとも測定しやすい酸化波を示し、濃度と波高とは比例的直線関係にあるため、波高の測定から未知濃度溶液中のエリソルビン酸を定量することができる。なお定量において温度および水銀圧を一定に保つことは、定量上きわめて肝要なことである。

(2) エリソルビン酸とアスコルビン酸は同一電位を示し、共存する場合は合波となって現われるため分離

量は不可能である。

(3) エリソルビン酸およびアスコルビン酸がタンニン酸、ニコチン酸、ハイドロキノン、EDTAなどと共存する場合はいずれも2段波となって現われる。しかしこれらが共存してもまた鉄、マンガンなどの金属イオンが共存しても、エリソルビン酸のポーラロ波には全く影響がみられなかった。

(4) エリソルビン酸ならびに L-アスコルビン酸の拡散電流、酸化電位はメタリン酸およびシュウ酸の濃度によって左右され、濃度が高くなるに従って拡散電流すなわち波高は減少し電位は(+)側に転移する。この現象はおそらく溶液粘度に起因するものと考えられる。

(5) 熱に対しまして銅イオンならびにアスコルビン酸酸化酵素による酸化に対する安定度は、エリソルビン酸よりもアスコルビン酸のほうが大であることを認めた。

終りにのぞみ本実験に御懇篤な御指導を賜りました、京都大学農学部館勇教授ならびに鈴木信先生に対し謹ん

で感謝の意を表するとともに、実験試料の提供を頂いた藤沢薬品工業株式会社に厚くお礼申し上げます。

なお本研究の概要は、1962年10月13日梶山女学園大学において行なわれた日本家政学会第14回総会において発表したことを附記する。

文 献

- 1) MAPSON, L.W. and PARTRIDGE, S.M.: *Nature*, **164**, 479~80 (1949).
- 2) YU-TUAN CHEN, ISHERWOOD, F.A. and MAPSON, L.W.: *Biochem. J.*, **55**, 821 (1953).
- 3) MITCHELL, L.C. and PATTERSON, W.I.: *J. Assoc. Offi. Agr. Chem.*, **36**, 1127 (1953).
- 4) KADIN, H. and OSADCA, M.: *J. Agr. Food Chem.*, **7**, 358 (1959).
- 5) 水谷 清・藤崎和夫・上田昌三郎・関口孝夫: 栄養と食糧, **14**, (3), 90 (1961).
- 6) 稲垣長典: 食生活, **56**, (5), 72 (1962).

(1962年11月2日受理)