研 究 ノ ー ト

ペーパークロマトグラフ法による 食品中の L-アスコルビン酸と エリソルビン酸の分離定量について

梶田 武俊*・詫間 清江*・千田 貢**

Separation and Determination of L-Ascorbic
Acid and Erythorbic Acid in Foods by
Paperchromatographic Method

TAKETOSHI KAJITA, KIYOE TAKUMA,
and MITSUGI SENDA

The separation and determination of L-ascorbic acid (AA) and erythorbic acid (EA) in foods were investigated by paperchromatographic method. EA was not recognized in natural foods, but detected in some canned foods in which EA was added as an antioxidant. The amount of AA determined by this method in commercial AA-enriched canned fruits and other canned foods was over the labeled level on the contents.

(Received July. 1, 1969)

天然物および加工食品中にエリソルビン酸 (EA) が存在するか否かを検討することは、栄養的な立場から、また、L-アスコルビン酸 (AA) との分離定量の上からも、きわめて重要なことである。この点について稲垣¹⁾はすでに1963年、ペーパークロマトグラフ法 (PPC法) による天然物中の EA の存在有無について検討し、EA は検出されなかったと報告している。この実験は定性実験で R_f 値だけしか測定していない。しかし、天然物中の EA 存在量が PPC 法の試料検出限界濃度より低いことも考えられるので、三木²⁾の改良法³⁾による PPC を行なったのち、ヒドラジン法⁴⁾によって AA および EA の定量を行ない、かかる点の検討を行なった。なお、加工食品とくにビタミン C 強化食品をとりあげ、標示量の AA が含まれているかどうか、また AA の代わりに EA

が使用されていないかどうかなどの諸点についても検討したので、これらの結果を併せて報告する。

1. 実験方法

(1) 試料

AA は和光純薬の市販結晶を用い、EA は藤沢薬品の製品を用いた。AA および EA はいずれも一定濃度となるよう再蒸留水で溶解したもの (蒸留水試料) および次の方法で作った合成オレンジジュースで溶解したもの (オレンジジュース試料) とを用いた。

合成オレンジジュースは、水 1 l に砂糖 150 g、クエン酸 4 g、オレンジクラウディ (色素含有エッセンス) 1.5 ml を混溶させて作ったものである。

天然食品としては、温州みかん、ほうれん草、レモン、煎茶 (上級および中級)、かき、ブロッコリーの 7 種、加工食品は、もも、みかん、びわ、ぶどう、アスパラガス、ふき、ジュースなどの缶詰 9 種、ビタミン C 強化食品として、ジュースその他 18 種の缶またはびん詰製品を用いた。これらはいずれも市販品である。

(2) 試料の調整

天然食品はいずれも 30 g (煎茶のみ 2 g) に、等量の 2% メタリン酸液を加えて磨砕後、遠心分離し、その上澄液を供試した。市販缶詰は汁液のみを汁過し、粉末ジュースは 2% メタリン酸液にて溶解後、汁過した汁液を供試液とした。なお、強化食品で標示量が 50 mg % をこえるものについては、6% メタリン酸液に 20~50 mg % の濃度となるよう希釈して使用した。

(3) PPC 法による AA と EA の分離定量法

三木の改良法³⁾により、つぎのごとくして行なった。

i) 試薬

a. 水飽和メチルエチルケトン……79°~80°C で蒸留したメチルエチルケトン 200 ml に、再蒸留水 40 ml を加えて充分振盪し、一夜放置後上層を使用した。

b. 0.025% インドフェノール溶液……2,6-ジクロロフェノールインドフェノールナトリウムを再蒸留水にて 0.025% 溶液に調整し、汁過後使用した。

c. 6% メタリン酸液

d. 2% DNP 液……2, 4-ジニトロフェニールヒドラジンを 2% となるよう 9 N H_2SO_4 に溶解して使用した。

e. 85% H_2SO_4 ……濃硫酸 9 容と水 1 容を混合して用いた。

* 奈良女子大学家政学部 (奈良県奈良市北魚屋西町)
Department of Living Science, Nara Women's
University, Nara.

** 京都大学農学部 (京都府京都市左京区北白川)
Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto.

ii) 展開用紙

東洋用紙 No. 50 (40×40 cm) を使用し、6% メタリン酸液に 5~10 分間浸漬したのち、一夜風乾して使用した。

iii) 操作

処理用紙の下端より 3 cm の距離を原線とし、4 cm 間隔に試料液を 0.02 ml 添付し、15 分間室温にて風乾し、ついで水飽和メチルエチルケトンを展開溶媒として、 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ の下で 30 分間溶媒中にさらしたのち、5 時間展開した。展開終了後の用紙は室温にて 15 分間風乾し、0.0125% インドフェノール溶液を噴霧してスポットを記録した。各スポットは周囲 2 mm を含むように用紙を切り取り、切り取った用紙片を 2 枚 1 組にして試験管に入れ、直ちに 6% メタリン酸液 2 ml および 0.0125% インドフェノール液 1 ml を加え、振盪後 15 分間放置し、インドフェノールが完全に脱色したのち、2% チオ尿素液 3 ml を加えてよく混合し、密栓して冷蔵庫内に一夜放置した。翌日検液をとりだし室温にもどしてから上澄液 4 ml をとりだし、これに 2% DNP 液 1 ml を加え、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の恒温水槽中に 3 時間保ったのち氷水中で急冷した。これを冷却攪拌しながら、85% H_2SO_4 5 ml を徐々に滴下した。つぎに室温で 15 分間放置後、日立分光光度計を用いて 520 m μ にて比色定量した。(盲検として試料用紙片とほぼ同一面積を有する 6% メタリン酸処理用紙につき同一操作を行なった。)

2. 試料濃度と吸光度との関係

AA または EA の濃度を 10~50 mg % まで変化させ、上記の方法に従って吸光度を測定した。その結果は第 1 図に示すとおりである。値は、いずれも 5 回測定したその平均値を示す。この図によると AA, EA とも、濃度と吸光度との間には、比例的関係を有し、原点を通る直線となっている。

第1図 AA および EA の濃度と吸光度との関係

3. AA と EA の混合濃度と吸光度との関係

AA と EA を等量混合させた蒸溜水試料またはオレンジジュース試料について、前法に従って吸光度を測定した。その結果は第 2 図に示すとおりである。

蒸溜水およびオレンジジュース試料いずれの場合も、濃度と吸光度の間には直線的関係を示すが、蒸溜水試料とオレンジジュース試料とは値に差異がみられ、後者のほうが AA, EA とも高値となって現われた。したがって蒸溜水試料で得られた検量線を用いて、オレンジジュース中の AA または EA 量を求めることは適当でないと考えられる。なお、 R_f 値は濃度変化によっても変化せず、またこの実験における濃度範囲内では AA と EA とはよく分離した。

第2図 AA と EA との混合濃度と吸光度との関係

4. 標準添加法による AA と EA の定量結果

オレンジジュースまたはトマトジュースに AA または EA 標準液を一定量添加し、上記の方法に従って AA および EA の定量を行ない回収率を求めた。結果は第 1 表に示すとおりであって、測定値、回収率ともほぼ満足すべき結果が得られた。

第1表 添加法による AA および EA の定量結果

試 料	添加量 (mg %)		測定値 (mg %)		回収率 (%)	
	AA	EA	AA	EA	AA	EA
オレンジジュース	21.0	20.0	20.1	18.8	100.5	94.0
トマトジュース	20.0	21.0	19.7	17.4	98.5	87.0

5. 天然食品中の AA および EA の分布

7 種の天然食品につき、EA 存在の有無について検討した。その結果は第 2 表に示すとおりである。

定性実験すなわち、 R_f 値からは EA の存在を確認す

第2表 天然食品中の AA および EA の分布

試 料 (品 種)	R_f 値			定 量 値 (mg %)		試料 + EA - EA
	試料	結晶 AA	結晶 EA	試料 (AA)	試料 + EA	
み かん (温 州)	0.21	0.21	0.30	20.8	27.6	(3.1)
ほうれん草 (次 郎 丸)	0.23	0.24	0.33	47.0	35.0	(8.5)
レ モ ン	0.26	0.26	0.34	27.6	31.6	(6.1)
煎 茶 (上 級)	0.26	0.26	0.32	277.0	23.2	(0.7)
煎 茶 (中 級)	0.24	0.23	0.30	326.2	23.4	(0.9)
か ぼ ち (富 有)	0.22	0.21	0.29	31.2	23.8	(1.3)
ブロッコリー	0.26	0.26	0.32	—	22.5	(0)

*添加法により EA の位置で測定された未知の還元物質

ることはできなかった。このことは稲垣ら¹⁾の報告とも一致する。しかし、これら試料に EA を添加して展開し、EA の R_f 位置に認められた還元斑を測定し、添加 EA の値を差引いたところ、第2表右端のカッコ内に示すように、わずかではあるが EA の R_f 位置に還元物質を認めた。これらはまだ未確認であり、EA とは断定できない。なお試料中の AA の R_f 値と結晶 AA の R_f 値は、いずれの場合もほぼ等しく、結晶 EA との間に 0.06~0.1 の差がみられた。また結晶 EA 単独の場合における検出率は 90% であり、PPC の検出限界濃度は 2 γ であった。

6. 缶詰食品中の AA と EA の分離定量結果

市販缶詰数種について、AA および EA の分離定量を行なった。みかん、アスパラガス、レモンジュース、オレンジジュースには AA のみ検出され、EA は認められなかった。これに対しもも、びわ、ぶどう、ふきには EA のみ検出された。EA のみ検出された食品は褐変しやすいため、抗酸化剤として EA が使用されたためと思われる。

7. ビタミン C 強化食品中の AA と EA の分離定量結果

市販のビタミン C 強化の特種栄養食品 18 種について、AA と EA との分離定量を行なった結果は第3表に示すとおりである。

AA の検出量は、D 社のグレープジュースを除いては、いずれも標定量を上回り、平均 115.2% の検出率であった。なお、定量は、昭和43年12月~44年1月に行なっ

第3表 ビタミン C 強化缶詰食品中の AA 量

会社名	食 品 名	製 年 月 日	添 加 量 (mg %)	検 出 量 (mg %)	検 出 率 (%)
A	オレンジジュース缶詰	8 1 1 4	25	30.5	122.0
	バ イ ン	8 7 1 8	25	25.6	102.5
	グ レ ー プ	8 8 1 9	25	25.4	101.6
B	オレンジ	7 7 2 1	30	32.7	108.7
	バ イ ン	8 6 1 1	30	30.6	102.0
C	オレンジ	8 8 1 7	30	31.0	103.0
D	オレンジ	8 1 1 6	25	25.0	100.0
	バ イ ン	8 8 0 7	25	27.1	108.5
	グ レ ー プ	8 6 2 2	25	23.0	92.0
E	ト マ ト	8 8 1 3	30	31.7	105.7
A	オレンジネクター缶詰	8 3 1 1	49	63.2	128.9
	モ モ	8 Y 2 6	49	62.2	126.8
	リ ン ゴ	8 5 1 7	49	59.7	121.7
F	オレンジ	8 1 1 9	50	68.0	136.0
	モ モ	8 Y 0 1	50	63.8	127.5
	ミ ッ ク ス	8 7 0 9	50	64.9	125.7
G	合 成 レ モ ン 汁	8 Z 1 2	100	135.9	135.9
H	粉 末 レ モ ン テ ィ ー	表示なし	112	139.5	124.5

たもので、これらの食品には AA のみ検出され、EA は全く検出されなかった。

8. 要 約

(1) 蒸留水試料またはオレンジジュース試料いずれの場合も、AA および EA の濃度と吸光度との間には比例関係を有するが、蒸留水試料よりもオレンジジュース試料のほうが AA、EA とともにわずかに高値となって現われた。したがって蒸留水試料で得られた検量線を用いて、オレンジジュース中の AA および EA 量を求めることは困難であり、添加法によるほうが適当と考えられた。

(2) 天然食品中の EA 存在有無について検討したところ、定性実験すなわち R_f 値からは EA の存在を認めることができなかった。定量実験においても EA の存在を確認するまでには至らなかった。

(3) ビタミン C 強化特種栄養食品の AA 検出量は、実験範囲内では標定量を上回っていた。

文 献

- 1) 稲垣長典・小谷田衣子・福羽博保：食品工誌，10，(2)，44 (1963)。
- 2) 三木太平・佐藤佳一：ビタミン，25，171，178 (1962)。
- 3) 梶田武俊：未発表。
- 4) 満田久輝：実験栄養化学 (1)，(いずみ書房)，232 (1961)。(1969年7月1日受理)