アスコルビン酸モノステアレートの定量法

(昭和 43 年 3 月 22 日 受理)

池上 幸江* 高居百合子* 岩尾 裕之*

Determination of Ascorbic Acid Monostearate

Sachie Ikegami, Yuriko Takai and Hiroyuki Iwao

(National Institute of the Nutrition:

Toyama-cho, Shinjuku-ku, Tokyo)

Determination methods of ascorbic acid monostearate (AsA-MS) were studied with particular reference to titration procedure and colorimetry, including its extraction from foods.

Titration: H_2SO_4 , HPO_3 and 0.1 N KIO_3 were added to the ethanolic solution of AsA-MS and then excess KIO_3 is titrated with 0.1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Colorimetry: The ethanolic solution of AsA-MS containing H_2SO_4 and HPO_3 was hydrolysed at 30°C overnight (17 hr) and then 2,4-dinitrophenylhydrazine method is applied to this hydrolysed solution.

The results obtained from the both methods were coincident and these could be applied to the determination of ascorbic acid monopalmitate.

According to the results of the colorimetry, it was found that 89% of added AsA-MS was extracted from foods (chocolate, margarine) with ethanol.

(Received March 22, 1968)

緒 言

アスコルビン酸モノステアレート (以下, AsA-MS と略す) の定量法は, 食品添加物公定書収載の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法 (DNP 法)¹⁾, 4-メトキシ-2-ニトロアニリン法 (MNA 法)²⁾, ヨウ素法³⁾, などいずれも従来アスコルビン酸 (以下, AsA と略す) の定量に用いられていた方法を応用したものである。しかし, DNP 法では発色が不完全であり, MNA 法では AsA-MS 以外のアスコルビン酸脂肪酸エステルには応用できず, ヨウ素法では終末点が不明瞭であるなどの欠点がある。著者らは, 主に AsA-MS について, 逆滴定によるヨウ素法, 加水分解後 DNP 法を適用した比色法, ならびに, 食品からの抽出定量法を比色法を用いて検討し, ほぼ満足すべき結果を得たので報告する。

実験方法

1. 滴定法

試 薬

エタノール: 常法により精製蒸留。

20%メタリン酸: 特級メタリン酸の 20% 水溶液を作り, 氷室保存。

50%硫酸: 濃硫酸 9 容と水 12 容とを混合する。

5%ヨウ化カリウム液: 用時調製。

1%デンブレン試液

0.1 N ヨウ素酸カリウム液

標準 0.1 N チオ硫酸ナトリウム液: 標定は食品添加物公定書の方法に準じて行なう。

定量法

操作: 試料約 100 mg を精秤し, エタノール 20 ml に溶解する (必要あれば加温)。20%メタリン酸 10 ml, 50%硫酸 5 ml を加え, さらに 0.1 N ヨウ素酸カリウム液 10 ml を加えてよくふりまぜると液は透明となる。暗所に 5~10 分放置後, ヨウ化カリウム 2 ml, 水約 100 ml を加えて暗所に 2~5 分放置する。1%デンブレン試液 1 ml を加えて過剰の酸化剤を標準 0.1 N チオ硫酸ナトリウム液で滴定する。

空試験は試料を加えずに同様に操作する。

計算: 試料の純度は次式により求める。

$$[(t_0 - t_s) \times f \times C] / S \times 100 (\%)$$

t_0 : 空試験の滴定値 (ml)

t_s : 試料の滴定値 (ml)

f : 標準 0.1 N チオ硫酸ナトリウム液力価

* 国立栄養研究所: 東京新宿区戸山町 1

S: 採取した試料の重量 (mg)

C: AsA-MS: 22.13, AsA-MP: 20.73

2. 加水分解および比色法

試薬

エタノール

20% メタリン酸

50% 硫酸

0.2% インドフェノール液: 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0.2%の割合に温湯に溶解し、ろ過する。用時調製。

1% 塩化第一スズ (5% メタリン酸溶液): 塩化第一スズ ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) を5%メタリン酸に1%の割合で溶解する。用時調製。

2% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン液 (DNP 液): 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを10N 硫酸に2%の割合に溶解し、ろ過する。冷暗所保存。

85% 硫酸: 濃硫酸 9 容と水 1 容を混合する。

標準アスコルビン酸溶液: アスコルビン酸約 40mg を20%メタリン酸 10 ml に溶解し、水で 100 ml とする。原液として氷室に保存。用時標準 0.001 N ヨウ素酸カリウム液により標定し、原液を1%メタリン酸で希釈して 20 $\mu\text{g/ml}$ としこれを標準アスコルビン酸溶液とする。

加水分解

試料 100 mg を精秤し、エタノールに溶解し (必要あれば加温)、100 ml とする。その 5 ml をとり、エタノール 15 ml, 20% メタリン酸 10 ml, 50% 硫酸 5 ml を加えて、30° に調節したふ卵器中で一夜 (17時間) 加水分解を行なう。

比色法

操作: 加水分解液に20%メタリン酸 5 ml と水を加えて 100 ml とし、そのろ液について、DNP 法を行なう。

ろ液 2 ml をとり、0.2% インドフェノール液 2~3 滴 (試験溶液が紅色を呈するまで) を加え、1% 塩化第一スズ液 2 ml, 2% DNP 液 1 ml を加えた後、60° の水浴中で30分反応させる。その後ただちに氷水中で冷却し、冷却しつつ85%硫酸 5 ml を滴下し、オサゾン溶解させる。同時に、2% DNP 液を加えずに同様に操作し、硫酸滴下後、冷却しつつ2% DNP 液 1 ml を加えて空試験とする。室温に30分放置し、波長 540 m μ における吸光度を測定する。

標準 AsA 溶液 2 ml についても試料の場合と同様に操作する。

計算: 試料の純度は次式により求める。

$$(s/S) \times (442.60/176.13) \times (A/a) \times 100 (\%)$$

s: 標準 AsA 原液に含まれる AsA 量 (mg)

S: 試料の採取量 (mg)

A: 試験溶液の吸光度

a: 標準 AsA 溶液の吸光度

3. 食品からの抽出定量法

試料約 10 g (AsA-MS 0.5% 含有のチョコレートおよびマーガリン) からエタノールで抽出ろ過し、ろ液を 200 ml とする。この 20 ml について、前述の方法で加水分解後、DNP 法を行ない含有量を求める。

実験結果および考察

1. 滴定法の検討

AsA の滴定法は、その酸化を受ける性質によるヨウ素法 (酸化剤としてヨウ素のほか、ヨウ素酸カリウム、N-ブロモサクシニイミドなど)、インドフェノール法がある³⁾。AsA 脂肪酸エステルの滴定法として、このヨウ素法を応用した報告⁴⁾があるが、ヨウ素・デンプン反応による終末点に不明瞭で良好な結果を得にくい。これは AsA 脂肪酸エステルが水に難溶で、その溶液調製にはエタノールなどの有機溶媒を用いる必要があり、これらの有機溶媒が、ヨウ素・デンプン反応を妨害するためである。著者らは、有機溶媒と溶解させた AsA-MS を過剰の酸化剤 (ヨウ素酸カリウム) で酸化させ、多量の水で有機溶媒を希釈して、ヨウ素・デンプン反応の感度を高めて、未反応の酸化剤を還元剤 (チオ硫酸ナトリウム) を用いて逆滴定を行なった。

主に終末点による誤差をみる目的で、AsA-MS 約 1 g をエタノールに溶解させて 100 ml とし、その 10 ml を同一ピペットでとり、これについて滴定法を行ない、その標準偏差を求めたところ、 $97.4 \pm 0.33\%$ (試料の純度で表わして) であり、終末点による誤差はごくわずかであることがわかった。

また、滴定法の全操作による標準偏差も、 $97.0 \pm 0.64\%$ と良好な結果を得た。

50% 硫酸 5 ml は加水分解剤と同時に、その機構は不明であるが、溶解補助剤として働く。すなわち、試料のエタノール溶液に20%メタリン酸を加えたときに生ずる白色沈でんが、硫酸を加えた後、酸化剤を加えてふりまぜると完全に澄清となる。

2. 比色法の検討

加水分解の条件

AsA 脂肪酸エステルの比色定量法に AsA 定量法を応用するためには、まず一般に加水分解を行なう必要がある。しかし、AsA 脂肪酸エステルの加水分解は、同時に AsA の分解をともないやすい。足立らは、AsA-MS の2%塩酸、エタノール溶液を85~90°の水浴中90分還流させて加水分解を行なっているが、AsA を同一条件におくと10%以上の損失があり、計算的に AsA の分解率を考慮する方法をとっている²⁾。著者らは AsA を分解することなく AsA-MS を加水分解する条件を検討した結果、AsA の分解は加水分解時の硫酸濃度によるよりも、温度による影響の大きいことがわかった。その結果を Table 1 に示す。

すなわち、低温 ($10 \pm 2^\circ$) で一夜 (17時間) 放置すると、AsA は安定であるが、AsA-MS の加水分解が不十

Table 1. Effect of Temperature and Time on Hydrolysis of AsA-MS

Condition of Hydrolysis		Recovery of AsA-MS	
Temperature	Time	Hydrolysis AsA-MS	AsA
80±5°C* ¹	30 min	87.6%	92.6%
55±5 * ¹	3 hr	99.5	100.0
50±5 * ¹	2	81.2	100.0
35±1 * ²	17 (overnight)	99.4	97.5
30±1 * ²	17	100.0	99.5
10±2 * ³	17	81.3	100.0

*¹ in water bath*² in incubator*³ in refrigerator

分であり、高温 (80±5°) では短時間でも AsA が分解する。55±5°・3時間、35±1°・一夜 (17時間)、30±1°・一夜 (17時間) など比較的低温で長時間加水分解を行なう場合において、AsA の分解が起こりにくい。著者らは、実験の便宜上、30°・一夜 (17時間) の方法をとることにした。

滴定法の場合と同様に、硫酸は溶解補助剤としての作用ももつ。

比色法の検討

AsA の比色法としては、インドフェノールキシレン法⁶⁾、4-メトキシ-2-ニトロアニリン法⁷⁾、o-フェニレンジアミン法⁸⁾、DNP 法⁹⁾などがある。このうち DNP 法は、AsA に対する特異性があり、多くの改良法が提案されている。この方法は、糖がとくに多量に存在すると妨害となることや、とくに反応に長時間を要する (原法では 37°, 6 時間) 欠点がある。時間と反応温度に関しては毛戸らの改良法¹⁰⁾がある。著者らの採用した 60°, 30分は短時間で、しかも反応液の濃縮や、食品の抽出液に応用したときの呈色液の濁りなどがほとんどない。しかし、原法や他の改良法と同様、反応が完全に終了していないので、かならず同時に標準 AsA 溶液による呈色度を測定する必要がある。

Fig. 1. Calibration curve of AsA MS**Table 2.** Comparison of Titration and Colorimetry

Sample No.	Titration	Colorimetry
AsA-MS 1	97.3%	96.7%
2	97.6	97.7
3	97.2	97.1
4	97.3	97.6
5	97.6	97.5
6	99.0	98.6
AsA-MP 1	99.3	98.9

Table 3. Recovery of AsA-MS from Foods

Food	Time added AsA-MS	Recovery
Chocolate	not added	4.5%
	before extraction	89.6
	before hydrolysis	98.3
	during manufacture	58.7
Margarine	not added	3.0
	before extraction	88.1
	before hydrolysis	99.0

この方法を AsA-MS の加水分解液に応用して、AsA-MS の濃度と吸光度の関係を求めると Fig. 1 に示すごとく、0~140 μg/10 ml の間で直線性がある。

滴定法と比色法の測定例

市販の AsA-MS およびアスコルビン酸モノパルミテート (AsA-MP) を試料として、滴定法と比色法を応用したところ、Table 2 に示すごとく良好な結果を得た。

3. 食品からの抽出定量法の検討

AsA-MS の添加される食品として、チョコレートとマーガリンを選び、エタノールにより抽出し、前述の加水分解および比色法を応用して、抽出法の問題点を明らかにした。その結果は Table 3 に示す。

表のごとく、無添加のチョコレート、マーガリンの抽出液はほとんど比色法を妨害しない。しかし、抽出前に AsA-MS をねりこんだ試料からの回収率はいずれも 89%前後であった。一方、加水分解を行なう前に、無添加食品の抽出液に AsA-MS を加えたときの回収率は約 99%である。このことは、抽出液中に AsA-MS の加水分解および比色を妨害する物質の存在しないことを示している。したがって、食品に添加した AsA-MS が完全に回収されず、その回収率が 89%であるのは、おそらく抽出中に AsA-MS の一部が分解されるためである。

なお、製造工程中に AsA-MS を添加したチョコレートからの回収率は抽出の分解以外に製造工程中にかなり分解を起こすことを示している。

要 約

アスコルビン酸脂脂肪酸エステル定量法を AsA-MS

を用いて、滴定法、比色法、食品からの抽出定量法を検討した。

滴定法は試料 100 mg をエタノール 20 ml に溶解し、50%硫酸 5 ml, 20% メタリン酸 10 ml を加えた後、0.1 N ヨウ素酸カリウム 10 ml で酸化し、多量の水でエタノール濃度を低くして、ヨウ素・デンプン反応の感度を高めた後、過剰の酸化剤は標準 0.1 N チオ硫酸ナトリウム液で滴定し、試料の純度を求める。

比色法は、試料 100 mg をエタノールに溶解して 100 ml とし、その 5 ml にエタノール 15 ml, 20% メタリン酸 10 ml, 50%硫酸 5 ml を加えて、30°, 一夜(17時間)で加水分解し、そののち、水で 100 ml としろ過後、ろ液 2 ml について、DNP 法(反応は 60°, 30分)を行なう。

この両法を市販の AsA-MS, AsA-MP に応用したところ、両者の測定値はよく一致した。

また、チョコレート、マーガリンに添加した AsA-MS をエタノールで抽出し、加水分解および比色法を応用したところ、回収率は約89%であった。

本論文は第 24 回日本薬学会大会(昭和42年4月、京都)で発表。

文 献

- 1) 厚生省編: “食品添加物公定書” p. 4 (1965).
- 2) 足立 造, 中路幸男, 他 2 名: ビタミン **34**, 188 (1966).
- 3) 朝比奈正人: 第 98 回脂溶性ビタミン総合委員会発表 (1965).
- 4) 三坂亭雄, 辻 仁郎, 他 2 名: 東医誌, **18**, 1743 (1960).
- 5) 永原太郎, 岩尾裕之, 久保彰治: “食品分析法” p. 233 (1964).
- 6) 八木国夫, 太幡利一編: “薬剤のビタミン定量法” p. 129 (1956).
- 7) L. P. Pepkowitz: J. Biol. Chem. **151**, 405 (1943).
- 8) 河内敬朝, 笠原 閑: ビタミン **8**, 199 (1955).
- 9) 小川俊太郎: 薬誌, **73**, 54, 94, 309, 316, 324 (1953).
- 10) J. H. Roe: J. Biol. Chem. **236**, 1611 (1961).
- 11) 毛戸澄子, 池田静徳, 藤村吉之助: 栄養と食糧 **13**, 242 (1960).