カツオ塩水漬罐詰中の所謂ビタミン C について

藤巻正生・小田切 敏・稻垣長典

(日本罐詰協会研究部・日本罐詰協会研究部・お茶の水大学)

On the So-Called Vitamin C of Canned Bonito in Brine
Masao FUJIMAKI, Satoshi ODAGIRI and Choten INAGAKI.

It happened in 1951 that our exported canned bonito (skipjack) in brine had been rejected in Canada by reason of containing an acid, believed to be ascorbic acid. So, several experiments were carried out to confirm whether the substance was true vitamin C or not.

By 2,6-dichlorophenol indophenol (INP) method vitamin C content of canned bonito was determined as about 10 mg%, but 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNP) method was 0.5 mg%. For the liquid of canned bonito concentrated to 92 mg% of reducing substance as vitamin C (by INP method) in vacuum, paper chromatography was tested, but the spot of vitamin C was not found. During canning process, reducing power of bonito meat by INP method increased, but the value by DNP method decreased. Therefore it seems that this reducing substance was not vitamin C, but value by DNP method was perhaps true vitamin C.

緒 言

昭和 26 年 7 月に、カナダへ輸出されたカツオ塩水漬罐詰が、検査官によつてその中に明らかに酸（それもアスコルビン酸と思われる）が含有されている、という理由でクレームをつけられそうになったことがあつた。その検査によると、従来色沢保持のためにアスコルビン酸が多くの罐詰に用いられているが、この場合もアスコルビン酸の添加によつて品質の低下を改善するために用いられたのではないかという疑いがある、アスコルビン酸はビタミン C であるから勿論有害ではないが、少くとも現在は許可されていないというのであつた。しかし実際に製造に際してアスコルビン酸を添加していないし、又混入の心配もなかつたので、この罐詰にどれ程のアスコルビン酸（以後ビタミン C と称する）が検出されるのか、又そのものは眞のビタミン C であるか否かを確かめるために以下記す実験を行った。

実 験 の 部

文献によると新鮮魚類筋肉中のビタミン C は、魚種によつて相当の差異はあるが大体 0.5~1.5 mg% (淡水魚)¹⁾、10~15 mg% (海水魚)²⁾、6~30 mg% (淡水魚)³⁾ と報告されている。この罐詰の場合は、天然物に由来するもの以外に添加されたと疑われる可成りの量のビタミン C が定量されたものと思われたので、問題になつた A 社製品及び製造月日の近似した B, C, D 社製品について、インドフェノール法⁴⁾によつて還元型ビタミン C の定量を行った。

1953 年 2 月 12 日受理 (印刷費負担)

定量方法 魚肉の場合には肉 20 g. に蒸溜水 30 cc. 及び 40 % HPO_3 溶液 5 cc. を加えて、ブレンダーで破碎した浸出液を用い、又罐詰液汁の場合には、その 25 cc. に 40 % HPO_3 5 cc. を加えて除蛋白を行つた濾液を 5 % HPO_3 で適当に稀釈した液を用い、約 4 mg% 濃度の 2, 6 ジクロールフェノール・インドフェノール溶液に対して滴定を行つた。

その結果は Table 1 に示してある。

Table 1 Vitamin C content (mg%) of canned bonito in brine (Indophenol method).

Sample number	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B	C	D	E*
Liquid	11.4	11.4	9.0	11.8	11.1	13.0	8.5	7.7	12.2	
Solid	7.7	7.8	6.5	6.6			6.0	5.1	8.5	6.6

* Canned bonito in cotton seed oil.

Table 1 の結果によると、罐詰肉中に 5~9 mg%, 液汁中に 8~12 mg% のビタミン C が定量された。

次に蒸溜水、5 % HPO_3 溶液、及び 1 % チオ尿素溶液でそれぞれ肉の浸出液を作つて 36°C. に放置し、経過時間によるビタミン C の減少曲線を求めると Fig. 1 の如くなり、これは結晶ビタミン C 溶液の減少曲線に近似していた。

罐詰製品は新鮮肉に比して蒸煮及び殺菌の 2 工程によつて長時間加熱されているので、新鮮肉中には更に多量のビタミン C が存在するものと思われたから、予備実験としてカツオの鮮肉及びそれを 100°C., 40 分蒸煮した肉についてビタミン C を測定した。

その結果は Table 2 に示してある。

Table 2 Changes of vitamin C of bonito meat by heating at 100°C. for 40 min. (Indophenol method)

	Red. Vit. C mg%	Tot. Vit. C mg%
Fresh	1.21	17.7
Cooked	1.15	17.3

魚体を 96.7°C. (魚体中心温度 76~77°C.), 2 時間 50 分蒸煮し、その反対側の雄節の肉を蒸煮肉として採取し、残りの雄節肉を罐詰肉とした。殺菌は 7 封度、90 分間行い、罐詰製造後 1 週間して開罐し分析に供した。

この 3 種の肉についてインドフェノール法によつて定量した還元力をビタミン C として表わすと Table 3 に示す如くでつた。

総ビタミン C は硫化水素で還元型に戻して滴定する常法により求めた。また同時に測定した水分は Table 4 に示してある。

Table 4 にあるように水分含量には大きな差異は認められなつた。

従つて Table 3 によると鮮肉、蒸煮肉、罐詰肉の順に加熱する程ビタミン C の値が増加する結果を示している。即ち鮮肉では 1 mg% 前後であつたものが、蒸煮肉では約 20 % 増加し、罐詰肉の液汁では約 10 倍

Fig. 1 Retention curves of reduction power in the vitamin C extract solutions. (Indophenol method)

Table 2 にあるように新鮮肉及び蒸煮肉の還元型ビタミン C は、罐詰肉の値に比して非常に低く、また両者の総ビタミン C は還元型ビタミン C の約 15 倍を示した。そこで更に罐詰製品にする場合の変化を検討するために、罐詰工場に於いて次の試製実験を行つた。

カツオ 5 尾 (水揚げ後 15 日位の冷凍魚) を選びそれぞれの雄節の中央部より一部を鮮肉として採取後

Table 3 Changes of vitamin C content in canning process of bonito.
(Indophenol method)

Sample number		B1	B2	B3	B4	B5
Fresh	Red.	1.01	1.03	1.01	0.97	1.23
	Tot.	12.4	13.6	13.0	17.6	14.9
Cooked	Red.	1.27	1.29	1.22	1.25	1.70
	Tot.	13.8	14.9	5.87	19.2	19.0
Canned	Liquid	Red.	11.3	7.18	8.32	11.2
		Tot.	25.3	18.8	21.1	22.8
	Solid	Red.	5.58	3.49	4.76	5.82
		Tot.	25.2	16.7	23.3	20.9

Table 4 Water content (%) of bonito meats in each stage of canning.

	Sample B2
Fresh meat	70.34
Cooked meat	66.18
Canned meat	73.08

の値を示した。

元来ビタミン C は加熱によつて破壊され減少するものであるが、全く逆の結果を示した。しかしながらインドフェノール法による定量値は、ビタミン C に対してのみ特有の数値を示すものでなく、インドフェノールに対して還元力を有するすべてのものが測定されているからこの場合ビタミン C 以外のものも反応していると考えられる。従つて罐詰肉の分析に見られる約 10 mg% という値は、加熱によつて増加する

ような還元性物質に由来するもので真のビタミン C を表わしているものではないと考えられる。

そこでこれを確かめるために、

- (1) DNP 法
- (2) ポーラログラフ法
- (3) ペーパークロマトグラフ法

の3種類の方法によるビタミンCの定量を行つた。

(1) DNP (2, 4 ジニトロフェニルヒドラジン) 法

本方法は DNP が α -ケト酸に反応して、オサゾンを作りこれが硫酸溶液中で呈する赤色を比色する方法^{5),6)}である。故にビタミン C を一旦酸化剤で酸化型にすればこの方法により定量が可能である。

著者等の行つた方法は、魚肉 20 g. に蒸留水 30 cc. 及び 40 % HPO_3 5 cc. を加えてブレンダーで細砕攪拌して浸出除蛋白濾液 (F 液) を得る。F 液 5 cc. に 1 % SnCl_2 溶液 5 cc. を加え、硫化水素を 15 分間通じて還元してから濾過し、濾液を真空ポンプで吸引して硫化水素を完全に除く (SF 液)。

試薬は次の溶液をそれぞれ濾過して用いる。

- i) 5 % HPO_3 水溶液
- ii) 0.2 % 2, 6 ジクロールフェノール・インドフェノール水溶液 (INP)
- iii) 5 % HPO_3 溶液に SnCl_2 を 1 % 溶解した液
- iv) 1 : 4 H_2SO_4 に DNP を 2 % 溶解した液
- v) 85 % H_2SO_4

共栓試験管に夫々次のように試薬を加えた。W は対照区である。

X = F 1.0 cc. + 5 % HPO_3 1.1 cc. + SnCl_2 2.0 cc. + DNP 1.0 cc.

Y = SF 2.0 cc. + INP 0.1 cc. + SnCl_2 2.0 cc. + DNP 1.0 cc.

$Z = \text{SF } 2.0 \text{ cc.} + 5\% \text{ HPO}_3 \text{ } 0.1 \text{ cc.} + \text{SnCl}_2 \text{ } 2.0 \text{ cc.} + \text{DNP } 1.0 \text{ cc.}$

$W = 5\% \text{ HPO}_3 \text{ } 2.1 \text{ cc.} + \text{SnCl}_2 \text{ } 2.0 \text{ cc.} + \text{DNP } 1.0 \text{ cc.}$

これらを 37°C . に 3 時間保つて反応させた後取出し、氷水中に冷却して $85\% \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 5 \text{ cc.}$ を 1 滴宛攪拌しながら加える。加え終わったら室温に 30 分間放置後、プルフリツヒ光度計で液層 10 mm. , S_{53} の濾光板を用いて比色する。 X , Y , Z , は夫々 $\text{DHA} + \text{DKA}$, $\text{ASA} + \text{DHA} + \text{DKA}$, DKA であるから、

$\text{ASA (Ascorbic acid)} = Y - X$

$\text{DHA (Dehydroascorbic acid)} = X - Z$

$\text{DKA (Diketogulonic acid)} = Z$

予め上述の条件で作成した既知量のビタミン C の標準曲線より求めた係数は次の如くである。

試料中の $\text{ASA mg}\% = 8.77 \times E \times v$

但し、 E = 光度計の読み

v = F 液の稀釈倍数

この方法によつて得られた値を、インドフェノール法と比較すると Table 5 の如き結果が得られた。

Table 5 Comparison of vitamin C content of liquid of canned bonito by DNP method with that by INP method.

		A	B
INP method	ASA mg%	12.1	9.8
DNP method	ASA mg%	0.48	0.36
	DHA mg%	0.66	0.60

即ち DNP 法によると、インドフェノール法で得られる $12.1 \text{ mg}\%$ のうち、 $0.5 \text{ mg}\%$ だけがビタミン C であるという結果を示した。

(2) ポーラログラフ法

ポーラログラフにより $\text{pH } 6.0$ の枸橼酸緩衝液中で電解を行うと、 0 V 附近にビタミン C の酸化波が得られる。⁷⁾⁸⁾ これを利用して陽電圧装置により $+0.3 \text{ V} \sim -0.3 \text{ V}$ の間のポーログラムを撮った。先ず結晶ビタミン C の $40 \text{ mg}\%$ 溶液 0.4 cc. に $0.1 \text{ N KCl } 0.1 \text{ cc.}$, $\text{pH } 6.0$ McIlvaine 緩衝液 4.5 cc. を加えた溶液について撮影したところ、半波電位 $E_{1/2} = +0.07 \text{ V}$ (飽和甘汞電極基準) の位置に Fig 2-A の如き波形が得られた。次に罐詰液汁 20 cc. に $40\% \text{HPO}_3$ 溶液 2 cc. を加えて除蛋白した濾液に充分窒素ガスを通じる。この液 1.5 cc. を電解瓶にとり $0.1 \text{ N KCl } 0.1 \text{ cc.}$ 及び $\text{pH } 6.0$ McIlvaine 緩衝液 3.4 cc. を加え、窒素ガスを通じてからポーラログラムを撮たが Fig 2-B で示されているようにビタミン C の波は得られなかつた。

C は B に $40 \text{ mg}\%$ ビタミン C 溶液 0.4 cc. を添加したものであるが殆んど B と同形で、ビタミン C の波は現われなかつた。即ち罐詰液中にはビタミン C の酸化波の発現を阻害する物質が含まれているものと考えられるので、この結果だけではビタミン C はないとは断定出来なかつた。

(3) ペーパークロマトグラフ法

ビタミン C をペーパークロマトグラフにより濾紙上に展開してインドフェノール溶液を発色剤として噴霧すると、ビタミン C は無色の点となつて現われ、これによつてその検出が可能となる。

即ち東洋濾紙 No. 2 を使用し、溶剤として n -ブタノール 40, 醋酸 10, 蒸溜水 10 の溶液で、 18°C ., 16 時間展開し乾燥後、インドフェノール 8 mg. , 蒸溜水 10 cc. , エタノール 10 cc. を発色剤とする方法⁹⁾ を用いた。罐詰液汁 52 g. に $40\% \text{HPO}_3$ 溶液 1 cc. を加えて 1.5 時間減圧濃縮 (外温 $38 \sim 40^\circ\text{C}$., 蒸溜温度 28°C .) した濃縮物約 9 g. に 40%

Fig 2 Polarograms of liquid of canned bonito in brine in $\text{pH } 6.0$ McIlvaine buffer solution.

HPO₃ 溶液 0.5 cc. を加えて濾過した濾液を試料液とした。この場合インドフェノール法で滴定してこの液のビタミン C は 91.8 mg% (約 10 倍濃縮) を示した。これを上記の方法で濾紙上に展開したが $Rf=0.38$ の位置に痕跡程度の存在しか認められなかつた。この方法ではビタミン C が 20 γ /0.02 cc. の濃度で明瞭なスポットが得られるのであるから、試料液の 91.8 mg% が正しいビタミン C の数値なら充分認め得る濃度の筈である。故に試料液中の真のビタミン C は、インドフェノール法で定量された値よりも更に低い値であることがクロマトグラフ法からも判る。

以上諸実験の結果の中、インドフェノール法による定量値が加熱によつて漸増すること、DNP 法の値がインドフェノール法による値よりはるかに低いこと、ペーパークロマトグラフ法によるビタミン C の存在が定量限界以下の程度であること、からインドフェノール法による数値はビタミン C 以外の還元性物質ではないかと考えられる。

次にインドフェノール法による値が加熱によつて漸増することから、ビタミン C 以外の還元性物質として加熱変性を受けた蛋白質によるものであらうと考えて次の実験を行つた。

試料はキハダマグロを用い、鮮肉と、97°C. に 1.5 時間加熱した蒸煮肉及び、更にそれを加圧釜に入れて 7 封度 (111°C.) に 2 時間加圧蒸煮した肉 (いずれも工場の加熱条件に等しい) の 3 区分を作り、加熱処理中の還元力の変化をモノヨード醋酸法¹⁰⁾ 及び赤血塩法¹¹⁾ により測定し、その結果を夫々光度計の読み E で示した。また同時に DNP 法及び INP 法によりビタミン C を測定した。その結果は Table 6 に示してある。

Table 6 Changes of reduction power and vitamin C in tuna meat by heating.

	Fresh	Heating	
		100°C., 1.5h	111°C., 2h.
pH (Glass electrode)	6.10	6.28	6.32
Iodacetamide method E (S61)	0.151	1.097	0.801
Ferrieyanide method E (S72)	0.150	0.709	0.262
A S A mg%	0.46	0.29	0.26
DNP method D H A mg%	0.22	0.15	0.11
D K A mg%	0.66	0.50	0.39
INP method A S A mg%	0.77	1.61	1.74
D H A mg%	1.53	0.90	1.33

このマグロの実験に於ける INP 法の値を Table 3 のカツオの場合と比較すると、加熱によつて INP 値が増加するという現象はカツオの方が顕著であり、又 DNP 法の値が明らかに減少の傾向を示していることはこの結果からもインドフェノール法による定量値が真のビタミン C を示していないということがいえよう。モノヨード醋酸法及び赤血塩法による還元力が

加熱によつて非常に増加していることにより蛋白質は変性を受けていると思われ、その還元力の一つとして SH 基を推定した。

Table 6 のモノヨード醋酸法に現われた SH 量は魚肉試料であるので、次にインドフェノール滴定法と同じ条件で、そのメタ磷酸による除蛋白浸出液について行つたところ、痕跡程度の呈色度しか示さなかつた。故にインドフェノール還元力は蛋白質の変性による SH 基だけでなく、その他の還元性物質によるものが大きいと考えられる。

以上を要約すると、カツオ塩水漬罐詰中のビタミン C は、インドフェノール法によつて定量された値は肉の加熱、その他によつて現われた還元力によるもので真のビタミン C を表わしてはいないことが判つた。そのことは DNP 法及びペーパークロマトグラフ法によつて証明された。即ちインドフェノール法によつて定量された 10 mg% 前後の値は真のビタミン C ではなく、DNP 法の結果より得られた約 0.5 mg% の値が真値であると思われる。

本研究に當つて種々御指導を賜つた東大農学部佐々木林治郎先生、並びに罐詰試製に御援助いただいた鈴

啓食品株式会社，同社渡辺義雄氏，日本罐詰検査協会富永静彦氏及び日本罐詰協会研究部長熊倉悟氏に厚く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) GYORGY IUDANY: *Bioch. Z.* **284**, 108 (1936).
- 2) 大谷武夫，広沢裕: 日水会誌, **5**, 195 (1936).
- 3) M. N. RUNDRA: *J. Indian Chem. Soc.*, **13**, 740 (1936).
- 4) 藤田秋治: ビタミン研究. No. 2, 4 (1942).
- 5) ROE, MILLS, OSTERLING, DAMRON: *J. Biol. Chem.*, **174**, 201 (1948).
- 6) 藤田秋治: 規準食品分析法設定報告, 70 (1952).
- 7) 岡田郁之助: 農化, **19**, 955 (1943).
- 8) 岡田郁之助: 農化, **20**, 325 (1944).
- 9) 稲垣長典: 1952 年日本ビタミン学会講演
- 10) 森茂樹: 農化, **18**, 41 (1942).
- 11) 森高次郎，秦満夫: 日水会誌, **15**, 407 (1949).