

14

總ビタミンCの定量に就て

(總ビタミンC定量に於て還元せるアスコルビン
酸液の不安定性と安定化対策)

藤 田 秋 治 沼 田 勇

(北里研究所生化学室)

藤田、海老原¹⁾の總ビタミンC定量法は添加アスコルビン酸量の完全に再検出される事と、その測定値の確實なる事(再現性のよい事)とにより内外ともに弘く行はれ、わが國に於ける研究でこれによらざるもの殆どなき現況にある。同法は元來比色的定量法の爲に考案したものであるが、インドフェノール法にも用ゐ得られ、従つて今春發表したインドフェノール色素を用ゐる比色的定量法²⁾にも應用し得る事は勿論である。同論文に總ビタミンC定量の事を斷つてなかつたため各方面より問合せがあつたので茲に改めて一言附記して置く次第である。しかるに上述の總ビタミンC定量法を追試された諸君のうち、同法の最後の前處置たるH₂S驅逐のため方式の如きゲーデポンプなきため水流ポンプのみを用ゐて30分以上1時間も吸引を繼續する時、檢出値が往々低下し總ビタミンCの眞値が奈邊にあるか判斷に苦しむ事があるといふ事を申越された人があつた。よつて我々は更にこの點を追試検討して見た。

原著の記載では水流ポンプ10分吸引の後ゲーデポンプにて10分吸引する事にしてある。當時使用の水流ポンプは約10-14 mm Hg, ゲーデポンプは約3 mm Hg位の眞空度を示した。兩者を使用したものはH₂Sをまづ水流ポンプで大部分除去し、ゲーデポンプ中にH₂Sを吸込む事をなるべく避けるためであつた。實驗の結果水流ポンプ(上述の程度の吸引力あるもの、ポンプがよくても、水壓が低くて充分吸引力を發揮しない場合は論外として)5分間の吸引にて(この間液はよく動かして置

1) 藤田、海老原、東京醫新。3011, 1, 1936; *Bioch. Z.* 290, 192, 1937.

2) 藤田、沼田、日本醫學 3224, 5, 1941.

く) H_2S の驅逐は充分で、水流ポンプ 3 分吸引の後、ゲーデポンプ 1 分間強く吸引しても結果に變りはない。しかるに水流ポンプにて 30 分以上吸引する時には、アスコルビン酸の純粹液を同様に處置した場合には變りはないが³⁾、組織浸出液の場合には、殆ど不變の事もあるが(植物組織例へばエンジンの根、葉等)、また往々アスコルビン酸値の低下する事がある事を知つた(動物組織例へば、南京鼠の肝腎の如きものに往々 30 分で 10 乃至 20% 減少する事のある事を知つた)、この關係は總ビタミン C 値測定にメタ磷酸濾液を用ゐた場合も、これを用ゐず HCl、醋酸第二水銀等で組織を直接處置した場合でも大體同様であつた、またインドフェノール法に上述の濾液を用ゐる場合には、相樂、永山兩氏⁴⁾の實驗によると、我々の緩衝液を加へても加へなくても多くの動植物組織の場合殆ど同じ値を示すから、 H_2S 驅逐後直ちに測定するのであれば緩衝液を加へず、その儘測定して差支ないと思ふ。(氏等の實驗では緩衝液を加へる時は然らざる場合に比して往々 7-8% 位高値を示す事が見られてゐるが、これは恐らく色素檢定に同様の緩衝液添加液を用ゐなかつたために、酸性緩衝液による色素褪色の影響が一見アスコルビン酸含量大なる如き結果を示したためであらう)。

兎に角 H_2S 驅逐を不必要に長く行はず、十分強力なる水流ポンプにて 5 分位吸引して直ちに測定するやうにすれば、常に正しい還元値を與へる譯であるが、還元型定量の場合の如く濾液中のアスコルビン酸を安定化して置く方が、澤山の實驗を行ふ場合には都合がよい譯であるから、我々は總ビタミン C 測定の場合にメタ磷酸を含む酸性緩衝液を H_2S 處置液に添加する事を試みた處、吸引の時間が 30 分となつても放置時間が更に 1 時間⁵⁾となつても殆ど變化ない事を知つた。それには舊緩衝液の代りに次の新緩衝液を用ゐればよい。

新緩衝液の調製 20% メタ磷酸液 30.0 cc に 2 n HCl 25.0 cc と水 45.0 cc とを混する。

藤田、海老原の比色的定量の場合 方法は全く原法と同様で緩衝液に新緩衝液を同量用ゐる。液の pH も同じであり、 f 値も全く同様である。

3) 室温約 20° の時 2 時間でも大抵變りがない。

4) 相樂、永山、日本醫學 3240, 15, 1941.

5) 2 時間以上では往々多少の減少が見られる。

即ち檢體 2 g + 1 n HCl 10.0 cc + HgAc₂ 7.0 cc + NaAc 8.0 cc + PbAc₂ 1.0 cc → 混和 → 遠心 → H₂S 飽和 → 1 夜放置 → 濾過 → 4.0 cc に對して, 新緩衝液 2.0 cc 混和 → 水流ポンプにて 5 分吸引⁶⁾ → 容積補正* → この 3 cc をとる → + 沃度醋酸 0.5 cc → 40°, 5 分 → + Folin 試薬 0.5 cc → 40°, 10 分 → 冷却 → 光度計的測定.

藤田, 沼田のインドフェノール比色法の場合 * 印送前法に同じ → 此 5.0 cc をとる → + 6 mg% インドフェノール水溶液 10.0 cc → 15 秒振盪 → 醋酸アミル 5.0 cc → 振盪 → 方式の如く處置. (インドフェノール滴定法の場合にも新緩衝液は可檢濾液の半容を加へる). 本法に於ては新緩衝液を加へず, H₂S 驅逐濾液のみを直接用ゐても差支ない. 1 時間以内に行ふ

表 1

新緩衝液添加の有無	吸引後 放置時間 (時間)	脾臓 (家兔)	腎丸 (家兔)	小松菜	ニンジン
添 加	直 後	100	100	100	100
	1	100	100	100	100
	2	78	100	100	100
添 加 せ ず	直 後	100	100	100	100
	1	97	100	100	100
	2	91	95	100	92

のであれば大抵變りはない. これに反しインドフェノール滴定法について藤田, 海老原の記載した舊緩衝液等容を加へる方式は本法には適當でない. (安全性が劣る). 今本比色法を用ゐた實驗例を表 1 に示す. 數字は檢出率(%)を示す(室温 26°).

要約 (1) 總ビタミン C 定量の場合 H₂S 驅逐に際し, 水流ポンプで 30 分或はそれ以上吸引する時は, 動物組織では時として可なり定量値が減ずることがある. 十分強力な水流ポンプで 5 分吸引すれば H₂S の驅逐は充分である. 定量は吸引後なるべく早く(少くとも 30 分以内)行へば従來の方式で常に正しい値を與へる⁷⁾.

6) これ以上 30 分になつても 1 時間になつても差支ない.

7) H₂S で飽和する時間は長くなつても差支ないから, 測定準備の完了しない間は H₂S で飽和した儘にして置くがよい.

(2) 吸引後のアスコルビン酸を安定させるためには H_2S 處置後にメタリン酸含有の酸性新緩衝液を加へて H_2S 除去を行へばよい。酸性強ければ H_2S の驅逐も容易であり、この場合は 30 分吸引をつゞけても更に室溫に 1 時間放置してもアスコルビン酸値が變らない。

(3) インドフェノール色素を用ゐる藤田、沼田の比色定量法は總ビタミン C の場合にも用ゐる得るが、 H_2S 驅逐後の濾液に半容の新緩衝液を加へるか、或は何も加へずに定量を行ふがよい。舊緩衝液の添加は適當でない。また藤田、海老原の比色定量法にも新緩衝液を同様に用ゐる事が出来る。

(受附：昭和 16 年 11 月 19 日)