

# 農産物のビタミンC測定の簡便化の検討\*

石田 恵美\*\*・吉田 誠・小清水 正美

## Application of Simple and Rapid Methods to Determination of Vitamin C in Agricultural Products

Emi ISHIDA\*\*, Makoto YOSHIDA, Masami KOSHIMIZU

### 摘 要

農産物のビタミンC迅速測定の検討を行うため、各種測定法の比較を行った。

1. 標準還元型ビタミンCでは、自己駆動型クーロメトリー法は、インドフェノール滴定法、ヒドラジン比色法といった従来法に比較し、迅速、簡便であり、測定範囲が広がった。また、HPLCポストカラム誘導体化法やリアクター型バイオセンサー法に比較しても測定範囲が広く、低濃度から高濃度まで測定が行え、測定時間が短かった。
2. 農産物中には、自己駆動型クーロメトリー法に影響を与える物質が含まれていたが、オクタデシル基を官能基とする固相抽出により、除去することが可能であった。
3. HPLCポストカラム誘導体化法は、還元型、酸化型ビタミンCを同時に分別定量することが可能であった。
4. 各種迅速測定法は、従来法に替わって農産物中のビタミンC測定に適用できると考えられた。

キーワード：ビタミンC，インドフェノール滴定法，ヒドラジン比色法，自己駆動型クーロメトリー法，HPLCポストカラム誘導体化法，リアクター型バイオセンサー法，

### Summary

Vitamin C has been determined by various methods, as 2,6-dichlorophenolindophenol method or the 2,4-dinitrophenylhydrazine method. These conventional methods, however, are very complicated and time-consuming methods. Some new methods, as self-driven coulometry method, high-performanced liquid chromatography (HPLC) method with postcolumn derivatization or biosensor system with reactor, have been developed in recent years. The availability of these newly developed methods for the simple and rapid determination of vitamin C contents in agricultural products was investigated.

The self-driven coulometry method was simple and rapid compared with conventional methods, and ascorbic acid could be determined in extensive concentration.

Though some other constituents in agricultural products have affect on determination of vitamin C contents, they are removable through the cartridge for extraction with solid phase.

Ascorbic acid and dehydroascorbic acid are selectively determined separately at the same time by the

\*\*現神奈川県横浜地域農業改良普及センター

本報告の一部は平成6年度食品科学工学会において発表した。

HPLC method with postcolumn derivatization.

Each newly developed methods was available for determination of vitamin C in agricultural products as well as conventional methods.

Key words: vitamin C, 2,6-dichlorophenolindophenol method, 2,4-dinitrophenylhydrazine method, self-driven coulometry method, high-performanced liquid chromatography (HPLC) method with postcolumn derivatization, biosensor system with reactor

## 緒 言

ビタミンCは動物体内では結合組織であるコラーゲンの生成に関与し、抗壊血病因子として知られるようになり、その栄養性、機能性から食品中の含量が測定されるようになった。また、植物体にも多く含まれ、農産物、青果物ではその栄養性ととも収穫後における流通、保管時の鮮度変化の指標として測定されている。

ビタミンCの測定は、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール滴定法<sup>1)</sup>(インドフェノール滴定法)や2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法<sup>2)</sup>(ヒドラジン比色法)のような方法で行われてきたが、従来からの方法は、反応終点の判定に個人差が出たり、操作が煩雑で、測定に長時間を必要とする測定法だった。

近年、自己駆動型クーロメトリー法<sup>3)</sup>、HPLCポストカラム誘導体化法<sup>4)</sup>、リアクター型バイオセンサー法<sup>5)</sup>などの、迅速、簡便なビタミンC測定法が開発され、飲料や、加工食品などで測定した例が報告されている。

そこで、これらの新しい方法と従来法とを比較し、農産物、青果物のビタミンC測定に適用できるかどうかを検討した。

## 実験方法

### 1. 測定方法

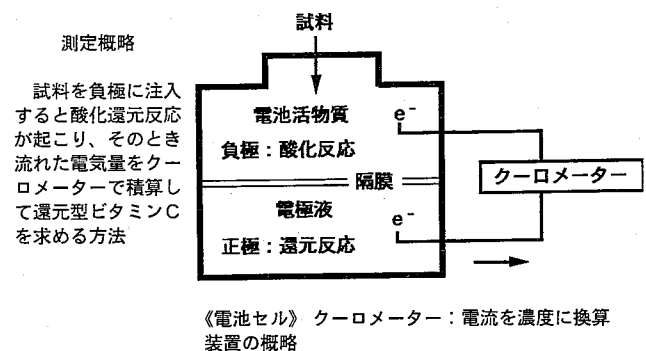
ビタミンCの測定法として従来法としてはインドフェノール滴定法、ヒドラジン比色法、迅速、簡便法として自己駆動型クーロメトリー法、HPLCポストカラム誘導体化法、リアクター型バイオセンサー法を採用して比較した。

インドフェノール滴定法：2,6-ジクロロフェノールインドフェノールが還元型ビタミンCにより還元され、酸性溶液中で赤色から無色になる性質を利用した滴定法である。操作手順は実験農芸化学<sup>1)</sup>の記載に準じた。

ヒドラジン比色法：ビタミンCをすべて酸化させ、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと反応させ、赤色のオサ

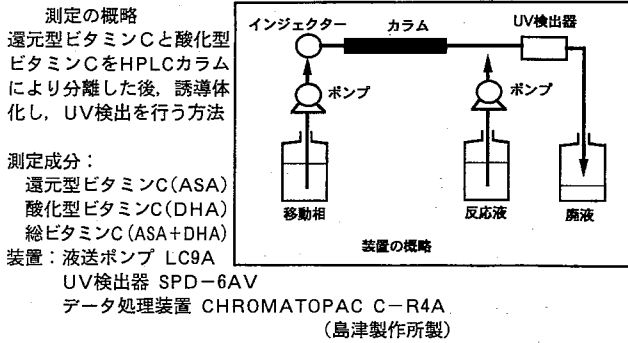
ゾンを作らせ、この呈色を比色定量する方法である。測定成分は、酸化型ビタミンCと総ビタミンCであるが、その差から還元型ビタミンCも測定できる。操作手順は食品分析法<sup>2)</sup>に準じた。

自己駆動型クーロメトリー法(第1図)：試料を注入すると酸化還元反応が起こり、そのとき流れた電気量をクーロメーターで積算して還元型ビタミンC濃度を求める方法である。測定成分は、還元型ビタミンCである。装置は、FOOD ANALYZER NA-F031(アジノキ製)を用い、試料は5 $\mu$ lを装置に注入した。



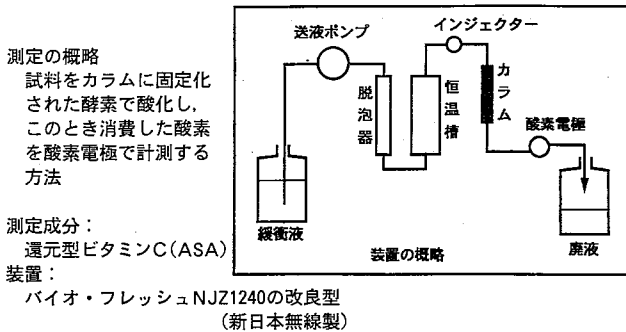
第1図 自己駆動型クーロメトリー法(クーロメトリー法)

HPLCポストカラム誘導体化法(第2図)：還元型ビタミンCと酸化型ビタミンCをHPLCカラムにより分離した後、誘導体化し、UV検出を行う方法である。測定成分は、還元型ビタミンC、酸化型ビタミンCを同時に分別定量する。それらを合わせて総ビタミンCの定量を行うことができる。装置は、紫外部分光検出器付き高速液体クロマトグラフ(島津製作所)を用い、測定条件はカラム：Shimpack SCR-101N(7.9mmI.D.×300mL)、ガードカラム：SCR(N)(4.0mmI.D.×50mmL.)、移動相：1mMエチレンジアミン四酢酸2ナトリウムを含む10mMシュウ酸ナトリウム緩衝液(pH3.8)、液量：1.0ml/min、温度：40℃、検出：ポストカラム誘導体化法、反応液：50mM水素化ホウ素ナトリウムを含む100mM水酸化ナトリウム溶液、反応温度：40℃、検出波長：300nm、試料注入量：20 $\mu$ lで行った。



第2図 HPLCポストカラム誘導体化法(HPLC法)

リアクター型バイオセンサー法(第3図)：試料を、カラムに固定化された酸化酵素で酸化し、このとき消費した酸素を酸素電極で計測し、ビタミンC濃度を求める方法である。測定成分は、還元型ビタミンCである。装置は、バイオ・フレッシュ(NJZ1240)の改良型を用いた。これは、低濃度測定ができるよう、試料注入量を増やせるように改良したものである。試料注入量は、500 $\mu$ lで測定を行い、検量線は5mg/100g、20g/100gに調整した還元型ビタミンC溶液で作成した。



第3図 リアクター型バイオセンサー法(バイオセンサー法)

## 2. 試料の調製

### (1) 還元型ビタミンC測定の簡便化の検討

#### ア. 各種測定法の測定範囲と精度の比較

標準還元型ビタミンC溶液：試薬特級L-アスコルビン酸(ASA)(和光純薬)を5%メタリン酸溶液にて溶解し、100mg/100g標準還元型ビタミンC溶液を調製した。実験時に各種濃度に調製し、測定に供した。

#### イ. 各種共存物質が自己駆動型クロマトリー法に与える影響の検討

試薬特級L-アスコルビン酸と、糖、有機酸、アミノ酸、アルコール、界面活性剤を、5%メタリン酸溶液に溶解し、調製した。

ウ. インドフェノール滴定法と自己駆動型クロマトリー法による青果物の還元型ビタミンC測定の比較

ウンシュウミカンの測定：ウンシュウミカンを剥皮後、

搾汁し、ガーゼ、ろ紙(No.3)にてろ過した。インドフェノール滴定法は、ろ液を2%メタリン酸溶液にて希釈し、測定を行った。自己駆動型クロマトリー法は、ろ液を0.45 $\mu$ mフィルターに通し、測定を行った。

ハウレンソウの測定：ハウレンソウを細断し、2%メタリン酸溶液中にて磨砕抽出し、ろ過(ろ紙No.3)した。インドフェノール滴定法は、ろ液を2%メタリン酸溶液にて希釈し、測定を行った。自己駆動型クロマトリー法は、ろ液と、インドフェノール滴定法に用いた試料を、0.45 $\mu$ mフィルターに通し、測定を行った。

#### エ. 固相抽出による共存物質の除去の検討

ウンシュウミカンは剥皮後、搾汁し、ガーゼ、ろ紙(No.3)にてろ過した。その他の青果物は5%メタリン酸溶液中にて磨砕後、ろ紙(No.3)にてろ過した。

インドフェノール滴定法は、ろ液を2%メタリン酸溶液にて希釈し、測定した。自己駆動型クロマトリー法は、ろ液をそのまま測定した。また、ろ液をメタノール、2%メタリン酸溶液にて活性化した固相抽出用ミニカートリッジ(官能基C<sub>18</sub>, 固相130mg)に通し、最初の1.5mlを流去した後の溶出液を回収し、試料として測定を行った。

#### オ. 各種測定法による還元型ビタミンC測定の比較

各種測定法にて数種の農産物の還元型ビタミンCを測定し、測定値を比較した。自己駆動型クロマトリー法は、試料を固相抽出し、HPLCポストカラム誘導体化法は、試料をフィルター(0.45 $\mu$ m)ろ過して測定を行った。

### (2) 還元型・酸化型ビタミンC測定の簡便化の検討

#### ア. HPLCポストカラム誘導体化法を用いた還元型・酸化型ビタミンC同時分別定量の検討

酸化型ビタミンCの標準物質の検討：100mg/100g試薬特級L-アスコルビン酸-2%メタリン酸溶液1mlに0.03%2,6-ジクロロフェノールインドフェノール溶液7mlを加え、混和し、約1分間放置しても溶液に微紅色が残ることを確かめ、2%チオ尿素-2%メタリン酸溶液で10mlに定容した。これをHPLCに注入した。基準物質として、試薬特級デヒドロアスコルビン酸(DHA, アルドリッチ)を秤量し、1%メタリン酸溶液にて溶解、定容し、HPLCに注入した。

酸化型ビタミンCの測定範囲の検討：試薬特級デヒドロアスコルビン酸を秤量し、1%メタリン酸溶液に溶解し、定容した。この基準液を各種濃度に希釈し、HPLCで面積を求めた。標準ビタミンC溶液を酸化し、酸化型ビタミンCを調製し、HPLCで面積を求め、デヒド

ロアスコルビン酸濃度と面積の直線性から、測定範囲を検討した。

標準還元型ビタミンCと酸化型ビタミンCの同時分別定量：還元型ビタミンCと酸化型ビタミンCを各種濃度で混合（標準ビタミンC溶液）し、還元型ビタミンCと酸化型ビタミンCの同時分別定量を行った。

イ、HPLCポストカラム誘導体化法に用いる農産物試料の調整法の検討

抽出におけるメタリン酸溶液濃度の検討：ピーマン、キュウリを用い、各種濃度のメタリン酸溶液中でポリトロホンホジナイザーにて抽出し、HPLCにて還元型ビタミンCと酸化型ビタミンC濃度を測定した。

保存による影響：1%メタリン酸溶液を含む抽出液を0℃に保存し、ビタミンC含量の変化を検討した。

ウ、ヒドラジン比色法、HPLCポストカラム誘導体化法による還元型ビタミンC、酸化型ビタミンC、総ビタミンC測定の比較

ヒドラジン比色法、HPLCポストカラム誘導体化法で農産物のビタミンC含量を測定し、測定値を比較した。HPLCポストカラム誘導体化法は、試料をフィルター(0.45μm)ろ過して測定を行った。HPLCポストカラム誘導体化法では分別定量した値を合計して総ビタミンC含量とした。

## 結果と考察

### 1. 還元型ビタミンC測定 の簡便化の検討

#### (1) 各種測定法の測定範囲と精度の比較

標準還元型ビタミンCを用い各種の測定法で測定範囲と精度を検討した（第1表）。

インドフェノール滴定法は標準還元型ビタミンC、1mg/100gから10mg/100gの濃度で95%~105%回収率であった。しかし、試料のビタミンC濃度が濃い場合には滴定量が少なすぎ、滴定法として定量は困難であった。ヒドラジン比色法は標準還元型ビタミンC1mg/100gから7mg/100gの濃度で95%~105%の回収率であり、高濃度になると、ヒドラジン試薬に対しビタミンCが過剰になり回収率が低くなった。自己駆動型クロマトリー法は標準還元型ビタミンC1mg/100g~500mg/100gの濃度で95%~105%の回収率であった。また、回収率の相対標準偏差は、4%未満であり、ばらつきが少なかった。相対標準偏差は、還元型ビタミンC濃度が高い方が小さくなる傾向があった。検出時間は、10mg/100gで約30秒であった。HPLCポストカラム誘導体化法は標

準還元型ビタミンC2mg/100g~100mg/100gの濃度で95%~105%の回収率であった。相対標準偏差は、2%未満であり、ばらつきが少なかった。検出時間は、約10分であった。リアクター型バイオセンサー法は標準還元型ビタミンC5mg/100g~20mg/100gの濃度で95%~105%の回収率であった。相対標準偏差は、3%未満で、ばらつきが少なかった。検出時間は約10分であった。

標準還元型ビタミンCを用いた各種の測定法を比較するとインドフェノール滴定法、ヒドラジン比色法は低濃度で精度よく測定が行え、自己駆動型クロマトリー法、HPLCポストカラム誘導体化法は低濃度から、従来法では測定できない高濃度まで、広い範囲で精度よく測定が行えた。リアクター型バイオセンサー法は10mg/100mg程度の濃度では精度よく測定が行えたが、インドフェノール滴定法、ヒドラジン比色法で精度よく測定できる低濃度の測定や自己駆動型クロマトリー法、HPLCポストカラム誘導体化法が測定できる高濃度の測定は困難だった。

各種の測定法の操作性では自己駆動型クロマトリー法が最も迅速、簡便に測定が行えた。

第1表 各種測定法の定量範囲の比較

還元型 ビタミンC mg/100g	インドフェノール 滴定法	ヒドラジン 比色法	クロマトリー法 (n=10)		HPLC法 (n=3)		バイオセンサー法 (n=3)	
	回収率 %	回収率 %	回収率 %	CV %	回収率 %	CV %	回収率 %	CV %
1	99	95	99	2.6	84	1.0	n.d.	—
2	100	99	101	3.4	95	0.8	77	2.2
5	96	101	98	2.2	99	0.5	96	2.9
10	96	76	97	1.1	100	1.1	100	0.1
20	n.d.	n.d.	98	2.0	101	0.2	96	0.6
50	n.d.	n.d.	99	0.9	104	0.6	n.d.	—
100	n.d.	n.d.	98	0.6	105	0.5	n.d.	—

n.d.: 定量できず

#### (2) 共存物質が自己駆動型クロマトリー法に与える影響の検討

標準ビタミンCに各種の有機物を添加し、その影響を検討した（第2表）。

ブドウ糖、果糖、ショ糖は、還元型ビタミンC濃度の1000倍濃度の添加でも回収率は、101%~103%であった。ペクチン(レモン製)、クエン酸、L-リンゴ酸、シュウ酸、酢酸、グルタミン酸、アルギニン、100倍濃度の添加で99%~102%の回収率であった。エタノールは、1%では、101%の回収率であったが、80%では、回収率88%と低下し、相対標準偏差は5%であった。Tween80は、10倍濃度の添加で回収率34%、相対標準偏差12%であった。

以上の結果、糖類、有機酸類・アミノ酸類、低濃度のアルコール類では、ビタミンCの回収率に影響は認めら

れなかったが、高濃度のエタノール、Tween80では、回収率が低下するが、青果物中に共存する濃度の糖類、有機酸類、アミノ酸類では影響がなかったため、自己駆動型クーロメトリー法は青果物にも適用できると考えられた。

第2表 共存物質がクーロメトリー法による還元型ビタミンCの回収率に与える影響

共存物質	濃度 %	還元型ビタミンC 10mg/100g の回収率 %
ブドウ糖	10	102
果糖	10	103
ショ糖	10	101
ペクチン	1	102
クエン酸	1	100
L-リンゴ酸	1	99
シュウ酸	1	101
酢酸	1	100
グルタミン酸	1	100
アルギニン	1	100
エタノール	1	101
エタノール	80	88 5 (n=10)
Tween 80	0.1	34 12(n=3)
Tween 80	1	38 17(n=3)

(3) インドフェノール滴定法と自己駆動型クーロメトリー法による青果物還元型ビタミンC測定と比較

ウンシュウミカンとハウレンソウを用いて、自己駆動型クーロメトリー法とインドフェノール滴定法を比較した。

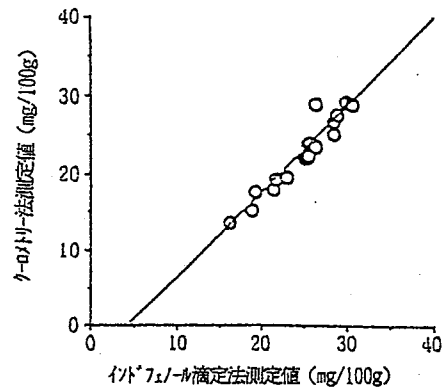
19果のウンシュウミカンを測定したところ、自己駆動型クーロメトリー法による測定値は、インドフェノール滴定法の91%の平均測定値を示した。インドフェノール滴定法と、自己駆動型クーロメトリー法との相関係数は、 $0.954(y=-4.945+1.113x)$ であった(第4図)。

このことより、ウンシュウミカン中には自己駆動型クーロメトリー法に影響を与える物質が共存することが考えられた。

ハウレンソウの測定を希釈倍率を変えて行い、インドフェノール滴定法と比較した。20倍希釈では、インドフェノール滴定法の90%の測定値となり、2倍希釈では80%の測定値となった(第3表)。

ハウレンソウは高い希釈率では、自己駆動型クーロメトリー法値はインドフェノール滴定法値に近似していたが、低い希釈率では、やや低くなった。このことからハウレンソウ中には自己駆動型クーロメトリー法に影響を与える物質が共存することが考えられた。

以上の結果から、自己駆動型クーロメトリー法による青果物の還元型ビタミンC測定は、青果物の種類により精度が異なり、同一試料でもその希釈率によって精度が異なるなど、共存物質の影響が多種多様であることが考



第4図 ウンシュウミカンを用いたインドフェノール滴定法とクーロメトリー法の還元型ビタミンC測定との関係

第3表 ハウレンソウの希釈率によるクーロメトリー法値の変化

試料 No.	インドフェノール 滴定法 測定値 mg/100g	クーロメトリー法			
		20倍希釈		2倍希釈	
		測定値 mg/100g	CV % (n=3)	測定値 mg/100g	CV % (n=3)
1	67	60	9.9	58	2.6
2	79	72	7.2	57	11.6
3	42	38	2.5	32	3.5
4	68	60	3.5	57	2.2
5	42	37	5.5	34	9.6
平均相対比 (SD)%		90 (0.8)		80 (6.8)	

えられ、自己駆動型クーロメトリー法でより精度よく青果物のビタミンC測定を行うために、共存物質の影響を除去することが必要であると考えられた。

(4) 固相抽出による共存物質の除去の検討

青果物からの抽出液を固相抽出し、自己駆動型クーロメトリー法にて測定し、インドフェノール滴定法と比較しその影響を検討した(第4表)。

インドフェノール滴定法では、供試したリンゴは、1mg/100g未満で測定不可能であった。ろ紙ろ過した試料をそのまま自己駆動型クーロメトリー法で測定すると、モロヘイヤはインドフェノール滴定法の測定値の133%となり、相対標準偏差が12%、測定時間は80秒であった。ハウレンソウはインドフェノール滴定法の測定値の73%、相対標準偏差19%であった。煎茶は、試料注入後5分経過しても測定結果が得られず測定不可能であった。リンゴは測定値が3.6mg/100gとなり、相対標準偏差は26%、計測時間は35秒であった。

同じ試料で固相抽出を行ったところ、固相抽出に要した試料は2.5ml程度であった。固相抽出試料の自己駆動型クーロメトリー法の測定値は、インドフェノール滴定法の測定値に対して、モロヘイヤ95%、ハウレンソウ99%、煎茶107%となり、計測時間は30秒以内となった。

第4表 クーロメトリー法による農産物中の還元型ビタミンCの測定

試料	インドフェノール		クーロメトリー法					
	測定値 mg/100 g	希釈 倍率 倍	ろ紙ろ過抽出液 (n=5)			固相抽出素通り分 (n=5)		
			相対比 %	C V %	計測時間 秒	相対比 %	C V %	計測時間 秒
ジャガイモ	20	5	99	4.5	25	102	1.5	15
モロヘイヤ	122	10	133	12.1	80	95	2.7	15
ウンシュウミカン	19	1	96	5.6	70	99	0.5	25
ハウレンソウ	15	5	73	18.8	25	99	5.0	10
キャベツ	35	2.5	99	1.5	30	102	1.3	20
煎茶	282	30	— <sup>b)</sup>	—	>300	107	1.7	30
リンゴ	<1	2	— <sup>b)</sup>	25.7	35	— <sup>c)</sup>	—	—

a) : 定量できず

b) : 測定値 : 3.6mg/100 g

c) : 検出限界(1mg/100 g)未満

第5表 各種測定法による農産物中の還元型ビタミンCの測定値の比較

試料	インドフェノール	ヒドラジン	クーロメトリー法		HPLC法		バイオセンサー法	
	滴定法 測定値 mg/100 g	比色法 測定値 mg/100 g	測定値 mg/100 g	C V %	測定値 mg/100 g	C V %	測定値 mg/100 g	C V %
ブロッコリー	114	127	112	0.5	114	1.2	116	0.1
ハウレンソウ	50	56	48	0.6	51	1.7	50	0.8
キャベツ	34	41	37	1.8	37	0.3	37	2.2
ピーマン	90	107	95	1.8	99	0.8	95	0.6
イチゴ	n.d.	77	71	0.3	73	1.2	71	0.9
キウイフルーツ	48	55	48	0.9	49	0.4	46	0.5
ウンシュウミカン	25	25	24	1.3	23	0.6	24	0.9
レモン	50	56	50	1.5	52	3.7	49	0.4
カキ	70	76	71	0.8	69	0.2	72	0.8
インドフェノール滴定法との 相関関係(n=8)		0.997	0.997		0.995		0.999	

n.d. : 定量できず

また、リンゴは測定限界以下で測定不可能であった。

ろ紙ろ過液を固相抽出することにより、自己駆動型クーロメトリー法値はインドフェノール滴定法値に近づき、煎茶も測定できるようになった。また、相対標準偏差も小さくなり、計測時間も短縮され、固相抽出の効果が認められた。このことから、固相抽出により、自己駆動型クーロメトリー法に影響を与えていた物質が除去され、精度の高い測定が行えると考えられた。

自己駆動型クーロメトリー法に影響を与えていた物質としては固相の官能基がオクタデシル基であること、2%メタリン酸溶液(pH2)で活性化していることから、測定値を高くしていた物質として、高分子や酸性の還元物質が考えられる。また、添加試験で、Tween80によって回収率が低くなったことから、測定値を低くしていた物質は、界面活性剤のような両親媒性物質が、試料の測定セル内での拡散を妨害していると考えられた。

(5) 各種測定法による数種の農産物の還元型ビタミンC測定値の比較

各種測定法の還元型ビタミンC値を比較すると、ヒド

ラジン比色法で高くなる傾向があった。イチゴは試料に含まれる色素の影響で、インドフェノール滴定法では終点の判別が不可能であった。インドフェノール滴定法との相関関係は、ヒドラジン比色法0.997、自己駆動型クーロメトリー法0.997、HPLCポストカラム誘導体化法0.995、リアクター型バイオセンサー法0.999であった(第5表)。

HPLCポストカラム誘導体化法、リアクター型バイオセンサー法は測定試料の還元型ビタミンC濃度が定量範囲内であるならば、従来法と同じ精度で測定が可能であった。自己駆動型クーロメトリー法は測定試料を固相抽出することで従来法では共存する色素で測定が困難な青果物についてもより迅速、簡便に各種農産物の還元型ビタミンCを測定することができると考えられた。

## 2. 還元型・酸化型ビタミンC測定 の簡便化の検討

(1) HPLCポストカラム誘導体化法を用いた還元型・酸化型ビタミンC同時分別定量の検討

L-アスコルビン酸の酸化物は、デヒドロアスコルビン酸のメインピークと一致したが、L-アスコルビン酸

の酸化物のピークの方が、秤量によって同濃度に調製した標準デヒドロアスコルビン酸のピークより大きかった。L-アスコルビン酸の酸化物には未反応物と思われるピークは存在せず、ピーク面積の再現性は良好であった。

L-アスコルビン酸の酸化反応は安定して行うことができ、酸化型ビタミンCの標準濃度溶液としてデヒドロアスコルビン酸溶液より適していると考えられた。

L-アスコルビン酸の酸化物の濃度と面積を基準にすると、1mg/100g~50mg/100gの範囲でばらつきが少なく、良好な回収率が得られた(第6表)。

第6表 HPLCポストカラム誘導体化法による標準酸化型ビタミンCの測定

酸化型ビタミンC		回収率 10mg/100g =100%	CV % (n=3)
濃度 mg/100g	注入量 μg		
0.5	0.1	94	2.7
1.0	0.2	95	0.5
2.5	0.5	97	0.4
5	1	100	0.5
25	5	100	2.0
50	10	104	1.8

このことからL-アスコルビン酸の酸化物10mg/100gを基準として一点検量線で、1mg/100g~50mg/100gの範囲の定量が可能であると考えられた。

第7表 HPLC法による還元型・酸化型ビタミンCの同時分別定量

混合比		濃度		回収率	
還元型 ビタミンC	酸化型 ビタミンC	還元型 ビタミンC mg/100g	酸化型 ビタミンC mg/100g	還元型 ビタミンC %	酸化型 ビタミンC %
10	0	20	0	102	—
9	1	18	2	94	106
8	2	16	4	101	106
7	3	14	6	100	103
6	4	12	8	99	97
5	5	10	10	100	97
4	6	8	12	100	104
3	7	6	14	98	99
2	8	4	16	97	97
1	9	2	18	98	102
0	10	0	20	—	96

標準還元型ビタミンCと酸化型ビタミンCを各種の比率で混合した試料で同時分別定量を行ったが、還元型・酸化型ともに良好な回収率が得られた(第7表)。

還元型、酸化型ビタミンCは、同時に分別定量が可能であると考えられた。

(2) HPLCポストカラム誘導体化法に用いる農産物試料の調整法の検討

ピーマンとキュウリを用い、HPLC注入用の試料を調製するため低濃度のメタリン酸溶液によるビタミンC

の抽出を検討した。ピーマンは、水抽出で5%メタリン酸溶液抽出の94%の還元型ビタミンCが回収された(第8表-1)。しかし、キュウリでは1%以下のメタリン酸濃度では回収率が低下した(第8表-2)。

第8表-1 メタリン酸濃度がピーマン磨砕抽出物のビタミンC測定値に及ぼす影響

メタリン酸溶液		測定値		回収率	
濃度 %	溶液の ph	還元型 ビタミンC mg/100g	総 ビタミンC mg/100g	還元型 ビタミンC %	総 ビタミンC %
5.0	1.8	83	87	100 <sup>a)</sup>	100 <sup>a)</sup>
2.0	1.9	86	90	104	104
1.0	2.5	87	91	105	105
0.5	3.2	85	89	102	103
0.0	5.7	78	88	94	102

<sup>a)</sup>:メタリン酸5%の値を100%として回収率を計算

第8表-2 メタリン酸濃度がキュウリ磨砕抽出物のビタミンC測定値に及ぼす影響

メタリン酸溶液		測定値		回収率	
濃度 %	溶液の ph	還元型 ビタミンC mg/100g	総 ビタミンC mg/100g	還元型 ビタミンC %	総 ビタミンC %
5.0	1.4	6.9	9.6	100 <sup>a)</sup>	100 <sup>a)</sup>
2.0	1.8	6.8	9.4	97	97
1.0	2.0	6.0	8.8	87	92
0.5	3.2	5.0	9.3	72	96
0.0	6.2	n.d.	8.7	—	91

n.d.: 定量できず

<sup>a)</sup>:メタリン酸5%の値を100%として回収率を計算

農産物によって抽出可能なメタリン酸濃度が異なり、1%メタリン酸溶液では抽出不可能なものもあるが、2%メタリン酸溶液であればホモジナイザーを用いて抽出可能であると考えられた。HPLC注入用の試料としては、2%メタリン酸溶液抽出後、1%以下に希釈し、HPLC注入用試料とすることが望ましいと考えられた。

1%メタリン酸を含んだ試料液を0°Cに保存すると還元型ビタミンCは時間の経過により減少するが、1週間後の残存率は90~95%以上であった。総ビタミンCも、1週間ではあまり変化がなかった(第9表)。

1%メタリン酸を含んだ農産物の抽出試料は0°Cに保存すれば、1週間程度保存することができると考えられた。(3) ヒドラジン比色法とHPLCポストカラム誘導体化法による還元型、酸化型、総ビタミンC測定の比較

ヒドラジン比色法とHPLCポストカラム誘導体化法の総ビタミンC値を比較すると、還元型、総ビタミンCはHPLCポストカラム誘導体化法の方が低くなる傾向があり、酸化型ビタミンCは、HPLCポストカラム誘導体化法の方がやや高い傾向があった。総ビタミンCの

第9表 1%メタリン酸溶液抽出試料の0℃保存中の  
ビタミンCの変化

試料	抽出直後の測定値 mg/100g	保存抽出試料のビタミンC					
		1日 回収率%	3日 回収率%	7日 回収率%	10日 回収率%	14日 回収率%	
ブロッコリー	還元型ビタミンC	115	99	94	96	90	92
	総ビタミンC	126	99	97	98	92	95
ホウレンソウ	還元型ビタミンC	54	94	92	92	87	91
	総ビタミンC	57	96	97	96	91	95
キャベツ	還元型ビタミンC	37	99	99	98	94	95
	総ビタミンC	40	100	100	100	96	97
ピーマン	還元型ビタミンC	99	— <sup>a)</sup>	94	95	92	92
	総ビタミンC	106	— <sup>a)</sup>	92	92	89	89
イチゴ	還元型ビタミンC	73	— <sup>a)</sup>	94	97	95	93
	総ビタミンC	79	— <sup>a)</sup>	95	98	96	91
キウイ フルーツ	還元型ビタミンC	49	— <sup>a)</sup>	92	95	92	94
	総ビタミンC	51	— <sup>a)</sup>	101	104	100	100
ウンシュウ ミカン	還元型ビタミンC	23	— <sup>a)</sup>	99	95	95	— <sup>a)</sup>
	総ビタミンC	26	— <sup>a)</sup>	100	97	94	— <sup>a)</sup>
レモン	還元型ビタミンC	52	— <sup>a)</sup>	101	98	97	— <sup>a)</sup>
	総ビタミンC	53	— <sup>a)</sup>	101	99	97	— <sup>a)</sup>
カキ	還元型ビタミンC	69	— <sup>a)</sup>	104	100	98	— <sup>a)</sup>
	総ビタミンC	86	— <sup>a)</sup>	101	96	90	— <sup>a)</sup>

—<sup>a)</sup>: 未測定

相関係数は、0.998であった(第10表)。

農産物中の酸化型ビタミンCの含量は少なく、還元型ビタミンCを測定範囲内に調整すると酸化型ビタミンCは測定範囲以下となることが多かった。

HPLCポストカラム誘導体化法の総ビタミンC値は、ヒドラジン比色法より低い傾向があったが、ヒドラジン比色法は還元型ビタミンC値が高くなる傾向があり、総ビタミンC値も高くなっている可能性が考えられた。

ヒドラジン比色法値とHPLCポストカラム誘導体化法による総ビタミンC測定値との間には高い相関関係が認められた。

HPLCポストカラム誘導体化法は、還元型ビタミンC、酸化型ビタミンCを同時に分別定量でき、その合計から総ビタミンC値も得られる簡便な方法であると考えられた。

第10表 ヒドラジン比色法と

試料	ヒドラジン 比色法 測定値 mg/100g	HPLC法 測定値 mg/100g	
			還元型ビタミンC
ブロッコリー	酸化型ビタミンC	9	11
	総ビタミンC	136	125
	還元型ビタミンC	56	51
ホウレンソウ	酸化型ビタミンC	4	4
	総ビタミンC	60	55
	還元型ビタミンC	41	37
キャベツ	酸化型ビタミンC	2	3
	総ビタミンC	43	40
	還元型ビタミンC	107	99
ピーマン	酸化型ビタミンC	1	2
	総ビタミンC	108	102
	還元型ビタミンC	77	73
イチゴ	酸化型ビタミンC	2	7
	総ビタミンC	79	79
	還元型ビタミンC	55	49
キウイ フルーツ	酸化型ビタミンC	4	6
	総ビタミンC	59	55
	還元型ビタミンC	25	23
ウンシュウ ミカン	酸化型ビタミンC	3	2
	総ビタミンC	28	26
	還元型ビタミンC	56	52
レモン	酸化型ビタミンC	n.d.	2
	総ビタミンC	56	53
	還元型ビタミンC	76	69
カキ	酸化型ビタミンC	15	17
	総ビタミンC	91	86

n.d.: 定量できず

## 引用文献

- 1) 東京大学農学部農芸化学教室 (1960): 実験農芸化学 上巻, 151p
- 2) 日本食品工業学会食品分析法編集委員会編 (1982): 食品分析法, 464p
- 3) 内山俊一(1993): 自己駆動型クーロメトリーを測定原理とする新しい食品分析装置, 食品機械装置、1993、12, 93~101
- 4) 安居嘉秀(1993): HPLCによるアスコルビン酸・デヒドロアスコルビン酸の分析, 日本分析化学会, 第42年会
- 5) 大熊廣一(1994): リアクター型バイオセンサーによる食品分析, 食品工業, 1994-9.30, 35~45