

水溶性ビタミン関連化合物の定量方法

9. ビタミン C

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

本研究で使用したビタミン C の測定方法をまとめた。

A. 実験方法

1. HPLC による尿中アスコルビン酸測定方法

1-1. 試薬作成方法

Ascorbic acid (AsA) 標準 (用事調製)

L-Ascorbic acid = 176.13

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

1) 5 mM の AsA 標準溶液を作成した。

L-Ascorbic acid を 0.0088 g 秤量し, 5% HPO₃ 10 ml に溶解した。

2) 50 μM* の AsA 標準溶液を作成した。

1) を 0.05 ml 取り, 5% HPO₃ 4.95 ml 加えて 100 倍希釈した。

3) 2) の吸光度を測定し, ε_{243.2 nm} = 10000 より正確な濃度を求め, これを標準液とした。(図 1)

AsA を溶解させる溶媒を 5% HPO₃ の代わりに超純水にすると ε_{265 nm} = 11500 となる。

標準 1: 50 μM AsA 標準溶液* 50 μl

+ 5% HPO₃ 50 μl

標準 2: 50 μM AsA 標準溶液* 100 μl

1% SnCl₂/5%HPO₃ (2.の操作は用時)

Tin(II) Chloride = 189.62

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

Metaphosphoric Acid, Lump Assay 37%

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

$5 \times 100 / 37 \times 10 / 100 = 1.35135$

1) メタリン酸 (HPO₃) を 1.35 g 秤量し, 超純水で 10 ml とした。

2) 塩化スズを 0.1 g 秤量し, 1) に溶解させた。(使用するまで氷冷)

0.2% Dichloroindophenol 溶液

(冷蔵, 遮光保存, 毎週新調)

2,6-Dichloroindophenol-indophenol Sodium salt dihydrate = 326.11 (MERCK, 遮光保存)

2,6-Dichloroindophenol-indophenol Sodium salt dihydrate を 0.1 g 秤量し, 超純水で 50 ml にした。

2% Dinitrophenyl hydrazine / 4.5M H₂SO₄

(遮光, 常温保存, 毎月新調)

2,4-Dinitrophenyl hydrazine = 198.14

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

Sulfuric acid = 98.08

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

$98.08 \times 4.5 \times 100 / 1000 = 44.136$

1) 硫酸 44 ml と超純水 56 ml を混合した(氷冷しながら)

2) 2,4-Dinitrophenyl hydrazine を 2 g 秤量し, 1) に溶解させた。

0.1% (C₂H₅)₃N (冷蔵保存)

Triethylamine = 101.19

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

Phosphoric acid = 98.00

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

1) (C₂H₅)₃N を 10g 秤量し, 約 80ml の超純水を加えた。

2) 1) に市販のリン酸を滴下し, pH を 3.0 にした。

3) 超純水で全量を 100ml にした。(10% (C₂H₅)₃N)

4) 移動相作成時に 3) を超純水で 100 倍希釈した。(0.1% (C₂H₅)₃N)

1-2. 試料調製方法

尿前処理

採尿後, 10%メタリン酸で 2 倍希釈したものを尿サンプルとした。

使用するまで -20 °C で保存。

複数回の測定による解凍を避けるため, エピンドルフに, 尿 0.5ml と 10%メタリン酸 0.5ml を入れたものを複数本作成した。(ラット尿の処理の場合は, 他の測定サンプル用に

0.1 M HCl で一定量にメスアップした尿を
10%メタリン酸で2倍希釈.)

(以降の操作は、図2に示す.)

1-3. 測定条件

カラム: Waters μ Bondasphere 5 μ C18-100A
(ϕ 150 \times 3.9mm)

カラム温度: 40

移動相: アセトニトリル 500ml に 0.1% トリ
エチルアミン(C₂H₅)₃N(pH3.0)溶液
を加え 1000 ml にしたもの

流速: 1.0 ml / min

検出器: UV DETECTOR SPD-10Avp
SHIMADZU

検出方法: 505 nm

1-4. 計算方法

1) 5.289 \times 10⁻⁵ M の AsA 標準溶液(標準1,2)
を 100 μ l をサンプルと同様に処理して
20 μ l インジェクションした.(317.34pmol
インジェクトした.)(図3)

・100 μ l 使用

・酢酸エチル層 1000 μ l 中 600 μ l 採取

・アセトニトリル 200 μ l 中 20 μ l インジェク
ション

そして、1pmol あたりの AREA を計算した。
(約 600 / pmol)

標準1 (2.64 \times 10⁻⁵ M) 20 μ l 中 158.67 pmol

標準2 (5.29 \times 10⁻⁵ M) 20 μ l 中 317.34 pmol

2) (検出 AREA / 1pmol 当たりの AREA)
 \times (1000 μ l / 600 μ l) \times (200 μ l / 20 μ l) \times
(24 時間尿の全量 ml / 0.05 ml) \times 1 / 1000
= ___ nmol / day

例)

1. ラット尿 (図4)

139421 / 553 \times 1000 / 600 \times 200 / 20 \times 25 / 0.05
 \times 10⁻³ = 2100.98 nmol / day

2. ヒト尿 (図5)

181256 / 600 \times 1000 / 600 \times 200 / 20 \times 1885 /
0.05 \times 10⁻³ = 189.82 nmol / day

2. HPLC による食品中のビタミン C 測定方 法

2-1. 試薬作成方法

1%SnCl₂ / 20%HPO₃ (2) の操作は用事)

Tin()Chloride = 189.62

(和光純薬工業株式会社、常温保存)

Metaphosphoric Acid, Lump Assay37%

(和光純薬工業株式会社、常温保存)

20 \times 100 / 37 \times 20 / 100=10.81

1) メタリン酸 (HPO₃) を 10.81g 秤量し、超
純水で 20ml とした。

2) 塩化スズ(SnCl₂)を 0.2g 秤量し、1) に溶解
させた。(使用するまで氷冷)

10%タカジアスターゼ溶液 (用事調製)

タカジアスターゼ(三共株式会社、常温保存)

タカジアスターゼ 1g を秤量し、超純水
10ml に溶解させた。

PBS (冷蔵保存)

Phosphate Buffered Salts Tablets

(TAKARA SHUZO, 常温保存)

PBS 1錠を超純水 100 ml に溶解させた。

以下、尿中総アスコルビン酸測定と同じ試
薬を使用

2-2. 試料調製方法

食品を用いた時のビタミン C 定量用 HPLC
試料調整のための操作方法を 図6 に示した。

2-3. 測定条件

尿中総アスコルビン酸測定条件と同様

2-4. 計算方法

1) AsA 標準を流し、1pmol あたりの AREA
を計算した。(約 600 / pmol)

2) サンプル全量 (g) \times (6500 μ l / 100 μ l) \times
(1000 μ l / 100 μ l) \times (サンプルの検出 AREA /
1pmol 当たりの AREA) \times (1000 μ l / 600 μ l) \times
(200 μ l / 20 μ l) \times (1 / 1000)
= ___ nmol

* 食事ホモジネート 1g と PBS 5 ml を合わせ
た容積を 6 ml とした。

B. 健康危険情報

特記する情報は無い。

C. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 口頭発表

なし

D. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含
む)

1. 特許予定

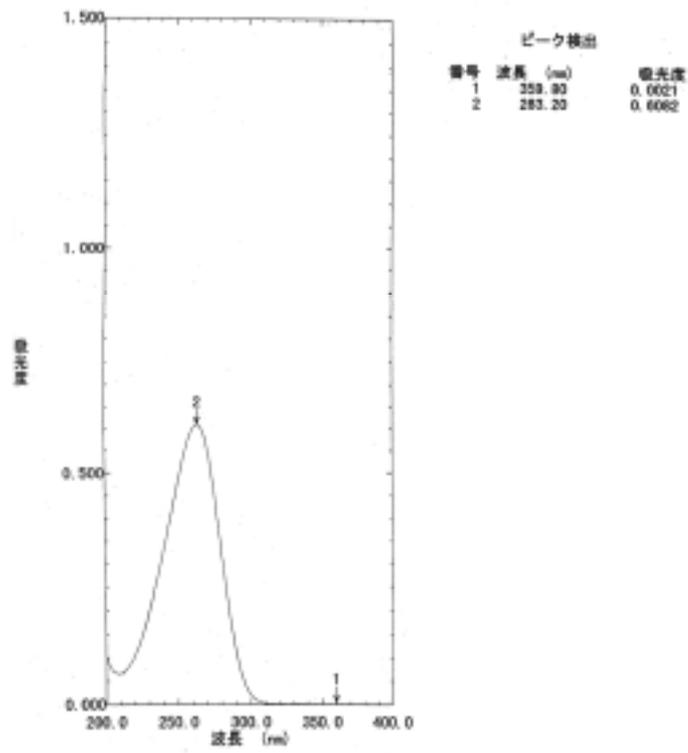
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし





- * * 遠心エバポレーター Centrifugal Evaporator HITACHI CE1
 Cold Trap HITACHI TP6D
 Diaphragm Vacuum Pump HITACHI VD3
 使用する約 1 時間前に Cold Trap を作動させておくこと .

(注意事項)

- ・ 遠心エバポレーターで乾固させた乾固物は冷蔵 , 冷凍保存可能
- ・ 酢酸エチルを採取するピペットの先は通常のプラスチック製 (アイビス IUCHI) が使用可能 .
- ・ 操作はできるだけ手早く行うこと . (酢酸エチルやアセトニトリルが揮発してしまわないように)
- ・ バイアルの蓋のセプタムはアルミ製 (SIL-6A 島津 GLC) のものを使用し , 1 回使い切りとする .

図 2 . 尿中アスコルビン酸測定のための HPLC 用試料の調整方法

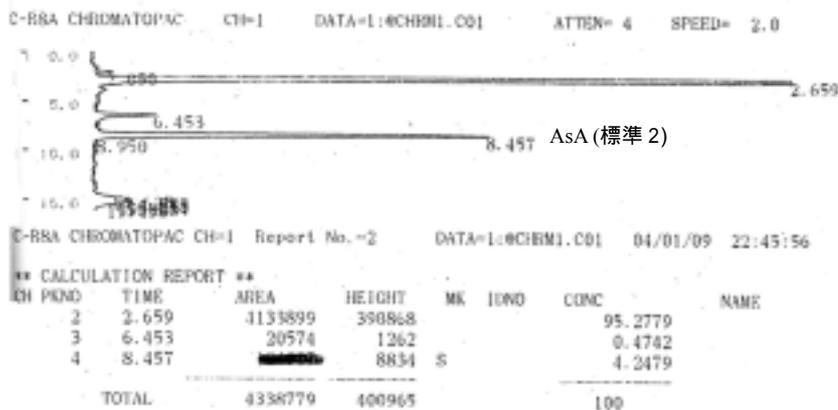
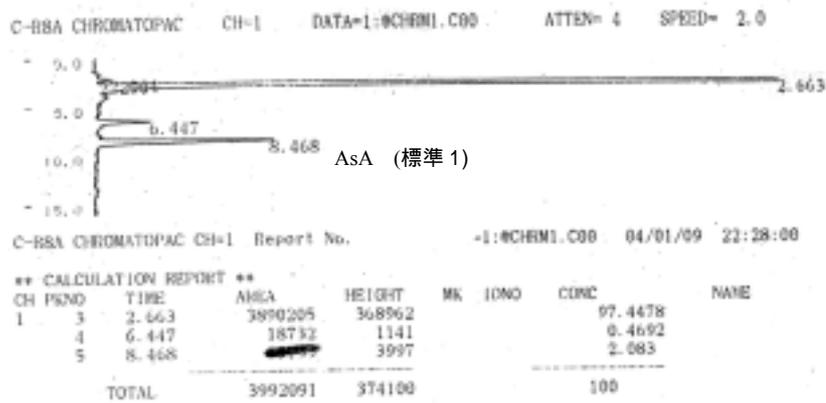


図3 . アスコルビン酸標準の HPLC クロマトグラム の例

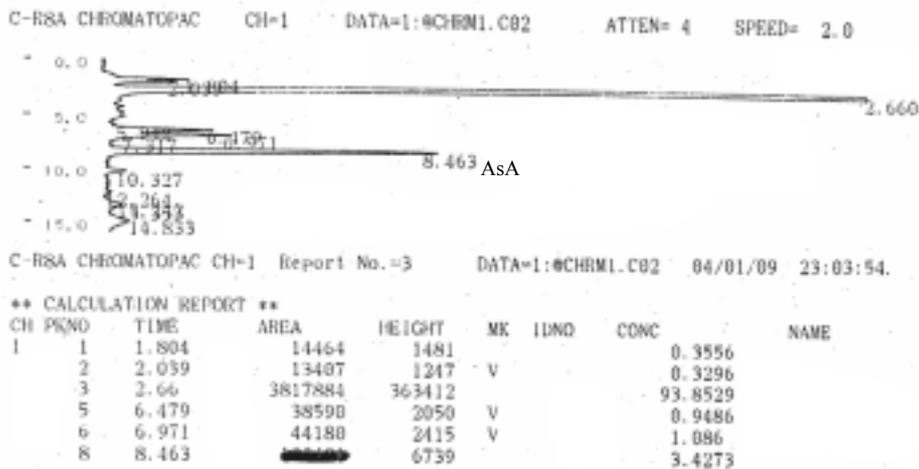


図4 . 尿 (ラット) を試料としたときの HPLC のクロマトグラム の例

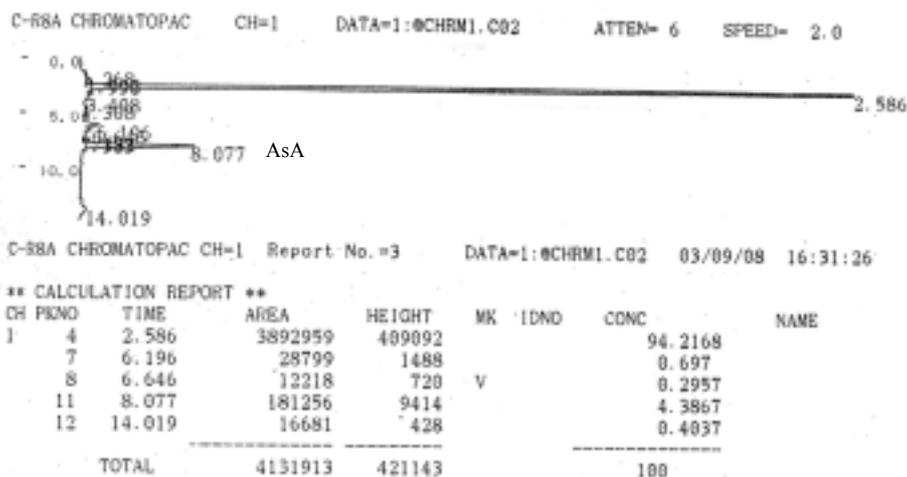


図5 . 尿 (ヒト) を試料としたときの HPLC のクロマトグラム の例

前処理

測定法 Kishida et al. Anal. Chem. 1992, 64, 1505-1507 より

食品 1 g を秤量し , 5 ml の PBS を加える

↓

ホモゲナイズし , ホモジネート 100 μl に 1% SnCl₂ in 20% HPO₃ 900 μl を加える

↓

攪拌後 , 10000 rpm , 5 min , 4 で遠心分離

↓

上清をサンプル液とする

実際行った前処理

食品をフードプロセッサー (National MK-K77-W) でホモゲナイズし , -20 で冷凍保存した .

↓

解凍後 , 1g 秤量し , PBS 5ml を加えて攪拌した .

↓

10% タカジアスターゼ溶液 500 μl を加えて攪拌後 , インキュベーターで 37 , 80min 加温した .

↓

ホモジネート 100 μl に 1% SnCl₂ in 20% HPO₃ 900 μl を加えた .

↓

攪拌後 , 10000rpm , 5min , 4 で遠心分離

↓

上清をサンプル液とした .

以降の操作は尿中の総アスコルビン酸測定法と同様 (図 2)
(食品サンプル量を 100 μl として処理開始)

図 6 . 食品中アスコルビン酸測定のための HPLC 用試料の調整方法