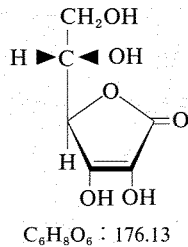


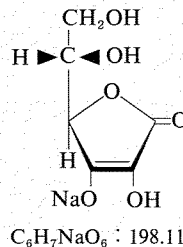
83 L-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸ナトリウム

L-Ascorbic Acid and Its Compounds

L-アスコルビン酸
L-Ascorbic Acid
別名：ビタミンC



L-アスコルビン酸ナトリウム
Sodium L-Ascorbate
別名：ビタミンCナトリウム



1. 試験法の概要

食品中のアスコルビン酸及びアスコルビン酸ナトリウムは、液体クロマトグラフィーにより還元型アスコルビン酸として、また、その酸化型であるデヒドロアスコルビン酸を還元して、液体クロマトグラフィーにより総アスコルビン酸¹⁾として定量する。必要があれば分子量比を乗じてアスコルビン酸ナトリウムの量として求める。

2. 試験法 (液体クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する²⁾。

(2) 試料液の調製

① 液状及び半流動状食品

試料約 10g を精密に量り、50ml の褐色メスフラスコ³⁾ に入れ、試料と同量の 4% メタリン酸溶液⁴⁾ を加えた後、2% メタリン酸溶液を加えて 50ml に定容する。次に、メンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過し、ろ液を還元型アスコルビン酸測定用試料液とする。また、ろ液 2ml を採り、0.1% ホモシステイン溶液 1ml 及び 10% リン酸水素二ナトリウム溶液 1ml を加えて混合後⁵⁾、40°C で 20 分間加温し⁶⁾、総アスコルビン酸測定用試料液とする。

② 粉体及び固体食品⁷⁾

試料約 10g を精密に量り、100ml の褐色抽出管³⁾に入れ、試料と同量の 4%メタリン酸溶液⁴⁾を加えた後、2%メタリン酸溶液 30ml を加え、5 分間振とうする。更に、超音波を用いて 10 分間抽出を行った後、2%メタリン酸溶液を加えて 50ml に定容する。次に、メンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過し、ろ液を還元型アスコルビン酸測定用試料液とする。また、ろ液 2ml を採り、0.1%ホモシステイン溶液 1ml 及び 10%リン酸水素二ナトリウム溶液 1ml を加えて混合後⁵⁾、40℃で 20 分間加温し⁶⁾、総アスコルビン酸測定用試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

アスコルビン酸 0.050g を正確に量り⁸⁾、100ml の褐色メスフラスコに入れ、2%メタリン酸溶液を加えて溶かして正確に 100ml とし、標準原液とする (この液 1ml は、アスコルビン酸 500 μ g を含む)。標準原液 5ml を正確に量り、50ml の褐色メスフラスコに入れ、2%メタリン酸溶液を加えて正確に 50ml とし、標準液とする (この液 1ml は、アスコルビン酸 50 μ g を含む)。標準液 1, 5, 10ml 及び 20ml をそれぞれ正確に量り、50ml の褐色メスフラスコに入れ、2%メタリン酸溶液を加えて正確に 50ml とし、検量線用標準液とする⁹⁾ (これらの液 1ml は、アスコルビン酸 1, 5, 10 μ g 及び 20 μ g を含む)。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外線吸収検出器付液体クロマトグラフ¹⁰⁾を用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：アミノプロピル基を化学結合したシリカゲル¹¹⁾

カラム管：ステンレススチール製、内径 4.6~6.0mm、長さ 150~250mm

カラム温度：室温

移動相：アセトニトリル・0.01mol/l リン酸二水素ナトリウム・0.03%ホモシステイン溶液・メタノール混液 (600:100:30:30)

流速：1.0ml/分

測定波長：270nm

② 検量線

検量線用標準液それぞれ 5 μ l ずつを正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、ピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量¹²⁾

試料液 5 μ l を正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線から試料液中のアスコルビン酸濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中の還元型又は総アスコルビン酸含量 (g/kg) を計算する。また、両者の差から酸化型アスコルビン

酸含量 (g/kg) を求める。

$$\text{還元型アスコルビン酸含量 (g/kg)} = \frac{C_1}{20 \times W}$$

$$\text{総アスコルビン酸含量 (g/kg)} = \frac{C_2}{10 \times W}$$

$$\text{酸化型アスコルビン酸含量 (g/kg)} = \text{総アスコルビン酸含量 (g/kg)} - \text{還元型アスコルビン酸含量 (g/kg)}$$

C_1 : 試料液中の還元型アスコルビン酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

C_2 : 試料液中の総アスコルビン酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W : 試料の採取量 (g)

$$\text{アスコルビン酸ナトリウム含量 (g/kg)} = \text{アスコルビン酸含量 (g/kg)} \times 1.125$$

試薬・試液

1. アセトニトリル : [残留農薬試験用]
2. メタノール : [残留農薬試験用]
3. DL-ホモシステイン : [特級]
4. リン酸二水素ナトリウム二水和物 : [特級]
5. リン酸水素二ナトリウム (12 水塩) : [特級]
6. メタリン酸 : [特級]
7. 4%メタリン酸溶液 : メタリン酸 40.0g に水を加えて溶かして 1,000ml とする。冷所に保存する。
8. 2%メタリン酸溶液 : メタリン酸 20.0g に水を加えて溶かして 1,000ml とする。冷所に保存する。
9. 0.1%ホモシステイン溶液 : DL-ホモシステイン 10.0mg を水に溶かして 10ml とする。
10. 0.03%ホモシステイン溶液 : DL-ホモシステイン 30.0mg を水に溶かして 100ml とする。
11. 10%リン酸水素二ナトリウム溶液 : リン酸水素二ナトリウム (12 水塩) 1.0g に水を加えて溶かして 10ml とする。

[注]

- 1) アスコルビン酸の残留を調べるには、還元型のみ測定でよいが、使用の状況を調べるには、酸化型のデヒドロアスコルビン酸を含めた総アスコルビン酸を測定する必要がある。
- 2) アスコルビン酸は酸化されやすいので、試料の調製には包丁、ハサミなどを用いて細切するか、乳鉢で粗粉碎し、長時間空気と接触させないようにする。
- 3) 50ml 及び 100ml の標線付きの褐色遠心管などが使用できる。
- 4) アスコルビン酸の酸化防止のため、メタリン酸溶液を用いる。抽出液の終濃度を 2% としたのは、タンパク質の除去ができ、かつ、カラムの劣化防止のためである。

- 5) 0.1%ホモシステイン溶液は、酸化型のデヒドロアスコルビン酸の還元のために用いる。この反応は、中性に進むため、中和の目的で10%リン酸水素二ナトリウム溶液を加える。
- 6) 40℃に加温することにより、還元反応を促進する。20℃前後の温度では60~90分を要する。
- 7) バン粉、小麦粉などの乾燥した吸水性の高い試料で、本法による抽出が困難な場合、次のように抽出するとよい。試料約10gを精密に量り、100mlの褐色抽出管に入れ、2%メタリン酸溶液80mlを加え、5分間振とうする。更に超音波を用いて10分間抽出を行った後、100mlの褐色メスフラスコを受器として綿栓ろ過（漏斗に脱脂綿を軽く詰めて、ろ過する）し、抽出管及び残留物は、2%メタリン酸溶液10mlずつで2回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、2%メタリン酸溶液を加えて100mlに定容する。次に、メンブランフィルター（0.45 μ m）でろ過し、ろ液を還元型アスコルビン酸測定用試料液とする。また、ろ液2mlを採り、0.1%ホモシステイン溶液1ml及び10%リン酸水素二ナトリウム溶液1mlを加えて混合後、40℃で20分加温し、総アスコルビン酸測定用試料液とする。
- 8) 標準溶液にエリソルビン酸を加えておくことにより、アスコルビン酸とエリソルビン酸の同時分析が可能である。
- 9) カラムへの吸着があるため、原点を通る直線とはならないが、1~20 μ g/mlの濃度範囲では、直線関係が得られる。試料液の濃度が、検量線の濃度範囲を超える場合、試料液を2%メタリン酸溶液を用いて適宜希釈するか、試料採取量を減らして試験する。
- 10) 還元型のアスコルビン酸は、本移動相条件下で270nm付近に吸収極大を示すことから、紫外線検出器により測定可能であるが、電気化学検出器を用いることにより、より高感度で選択的に測定できる（加電圧：70mV）。また、電気化学検出器を用いた場合、高感度となるぶん、検量線の直線領域が低濃度側へ移動することがあるので注意を要する。
- 11) 液体クロマトグラフィーのカラムとしては、Lichrosorb NH₂、Unisil Q NH₂、TSKgel-NH₂-60、Finepak SIL NH₂、Zorbax NH₂などの市販品がある。また、移動相としては、アセトニトリル・酢酸・水混液（87：2：11）なども使用可能である。
- 12) 本法による定量限界は、還元型アスコルビン酸で0.005g/kg、総アスコルビン酸で0.01g/kgである。