

食品中のビタミン C の安定性に関する基礎的検討

Fundamental Examination on Cooking Stability of Vitamin C in Foods

林 宏 子*
(Hiroko Hayashi)

The conditions of quantitative analysis of vitamin C in foods by Fujita's method of thin layer chromatography were investigated and the following improvements were made.

- 1) The drying step of ethylacetate dissolving osazon can be omitted.
- 2) The thin layer after development is able to be left alone for 2 days before starting the next step.
- 3) The fraction of vitamin C can be dissolved with 50% sulfuric acid without any trouble.
- 4) Silica gel should be removed by the use of a glass filter.

The amount of vitamin C in foods was determined by subtracting the amount of diketoglucic acid which was estimated from the remaining amount following reduction of an aliquot portion of the test sample according to Tamura's method from the amount of vitamin C determined by this modified method. The remaining amounts of vitamin C in some fruits and vegetables such as broccoli, were determined under various cooking conditions; without heating, heating at 100°C pH-changing etc. From the present results, it was demonstrated that the amount of vitamin C in foods including ascorbinase varies considerably and vitamin C tends to be short of stability at cooking.

序

食品中のビタミン C は L-アスコルビン酸 (L-AsA, 還元型ビタミン C) およびデヒドロ L-アスコルビン酸 (D-AsA, 酸化型ビタミン C) として存在し, 生物学的効果を同等とみなす^{1,2)} 現在では両方の挙動を知ることが重要である。食品成分中不安定な栄養成分の一つとされ, 生鮮食品以外では調理, 加工や保蔵の過程で酸化分解されて, 生理作用を失った 2, 3-ジケト L-グルコン酸 (DKG) を経て蓚酸とスレオニン酸への分解の進行が考えられている。食物中にはこれら中間物質の他, 共存する化学成分や添加調味料なども影響してビタミン C の真値をとらえることは容易とはいえない。L. W. Mapson³⁾ や藤田^{4,5)} らによるビタミン C の薄層クロマトグラフ定量法は Roe らのヒドラジン法^{6,7)} に薄層クロマトグラフ法を加えた方法で, 検液中のビタミン C を酸化型として,

そのヒドラジン反応による生成オサゾン酢酸エチルに抽出して, その一定量のクロマトグラムのビタミン C 由来の画分を剝離し, 硫酸に溶解して比色する方法で, 共存物質の影響少なく測りとれる優れた定量法とされている。しかし, この方法によっても還元型 C を酸化型 C に移して定量する総 C 値と, 最初から直接定量した酸化型 C 値には共存の DKG を含むために, この DKG を分別^{8,9-12)} した定量値を減じる必要がある。DKG の分別のためには, 低濃度域における測定が多くなることから, 定量反応の条件を整えて吸光度を向上させるために, また一方, 調理科学の立場から, 食品中のビタミン C の安定性をとらえる指標として, ビタミン C の残存, 酸化型 C の比率, DKG 生成の傾向などを探るためにも, 多数の食品試料の定量処理が必要となるが, 本定量法では, 操作の複雑さと定量に長時間を要するため, 先ず定量操作の合理化と時間計画のために, 若干の検討を要するものと考え, 実際的な定量条件を探ることを目的とした。

以上の諸点から本研究では先ず, 藤田らによる薄層ク

* 滋賀大学教育学部

食品中のビタミンCの安定性に関する基礎的検討

ロマトグラフ法の操作ごとの定量条件の検討と、多量食物試料の場合の機器磨砕抽出による検液調製とそのDKG分別用検液の調製についても検討を行った。次に、食品の基礎的調理条件である非加熱、100°C加熱および、pH、調味料などに対するビタミンCの残存に及ぼす影響を調べて、食品中ビタミンCの安定性を検討することを目的とした。食品中ビタミンCとその利用における残存については先人による多くの業績¹¹⁻¹⁹⁾があるが、DKG分別による報告は少ない。本研究では、食品中のビタミンCをDKGと分別して薄層クロマトグラフ法により定量して、食品利用上の基礎的な安定性を探ることを目的とした。

実験方法

1) 薄層クロマトグラフ法による食品中ビタミンCの定量条件の検討

試料は標準ビタミンCとしてL-アスコルビン酸(結晶)と食品試料としてカリフラワー汁液を用いた。吸収スペクトルの測定には日立556二波長自記分光光度計、吸光度の測定には日立101分光光度計および、島津ボッシュロムSP-20Aを、また、野菜、果実の磨砕汁液の調製には、ナショナルジューサーMJ-890を使用、また、電動磨砕抽出用機器としては、エクセルオートホモジナイザーDX-4(ニッシン製)ガラスカップ型、ブレンダーBL-10(サンビーム製)ミキサー型およびフーズミルサーIFM-140(イワタニ製)樹脂製カップ型を使用した。

薄層クロマトグラフ法の藤田らによる原法⁴⁾

検液5mlに0.5%インドフェノールを用いてビタミンCを酸化し、これに10%チオ尿素(50%エタノール中)0.5ml、2%ヒドラジン1mlを加えて50°C90分(又は37°C180分)で反応させる。生成したオサゾンを経酸エチル抽出して、無水芒硝で脱水後、洗液に用いた酢酸エチルも合わせて蒸発乾固する。改めて1mlの酢酸エチルに溶解して展開用試料として薄層板に添付し、トルエン:アセトン:5%酢酸(2:1:1)容量比の混和上層を用いて、13cm薄層展開してビタミンC相当画分を剝離し、85%硫酸5mlに溶解させ、遠心分離により上清をとり530nmで測定する。

原法⁴⁾による定量の過程に従い、ヒドラジン反応、オサゾン移行、薄層展開および溶解比色にいたる各操作毎の条件の吸光度に与える影響により検討した。また、定量操作の中断可能カ所を5つの時期について探り、多量食物試料の電動磨砕抽出による検液調製について、常法の少量乳鉢磨砕との比較により検討した。さらに、DKG分別用検液調製についても、田村らの方法⁸⁾の硫化水素通過条件と調製検液の安定度を調べた。

2) 食品中のビタミンCの基礎的調理条件に対する安定性の検討

試料は標準ビタミンCとしてL-アスコルビン酸(結晶)を使用し、食品試料としては、レモン、キウイ、イチゴ、ダイコン、ニンジン、キュウリ、キャベツ、ピーマン、トマト、カボチャ、カリフラワー、ブロッコリーなどの野菜、果物のジューサー磨砕汁液の二重ガーゼ濾過液を用いた。ビタミンCの定量は1)の検討結果により一部改良を加えた薄層クロマトグラフ法を用い、田村らの方法⁸⁾に準じてDKGを分別定量し、通常定量値からDKG値を減じてビタミンC値とした。ビタミンCの安定性については総Cとその酸化型Cの分別比率及びDKGの存在比率と、これらの経時残存の推移に与える影響を次の四つの基礎的調理条件について検討した。

i. 非加熱における安定性

野菜と果実の非加熱汁液の総C値とその分別比率を調べた。また、汁液の冷蔵(10°C)による24時間に至る残存の傾向を調べ、食品毎の経時的分別残存推移図を作成して比較した。

ii. 100°C加熱における安定性

標準ビタミンCと六食品の汁液の100°Cで210分に至る加熱中のビタミンC経時残存の推移について、各汁液200mlを逆流冷却管付設下で、100°C加熱して計測時間ごとに停止氷冷して、5%メタリン酸濃度に定容後定量して、残存傾向を調べた。また、食品毎の非加熱と100°C30分加熱後のビタミンC残存と分別比率を比較した。

iii. pHの変化に対する安定性

McIlvaine緩衝液を汁液と同量使用して、pH3,5,6,7,8における非加熱と、100°C加熱完了後冷蔵(10°C)して24時間に至る残存と、100°C加熱して60分に至る汁液中のビタミンC残存傾向から食品に対するpHの影響を比較した。

iv. 調味料添加に対する安定性

標準ビタミンCと8種類の調味料の普通調味濃度添加による100°C30分加熱後の残存に及ぼす影響を無添加を対照に検討した。

実験結果と考察

1. 薄層クロマトグラフ法によるビタミンCの定量条件

1) ヒドラジン反応

i. 試薬

検液中の還元型Cの酸化は定量範囲(0.1~1mg/5ml)では0.3%2,6-ジクロロフェノールインドフェノールの使用により1ml以内で酸化でき、反応液全容は補正を

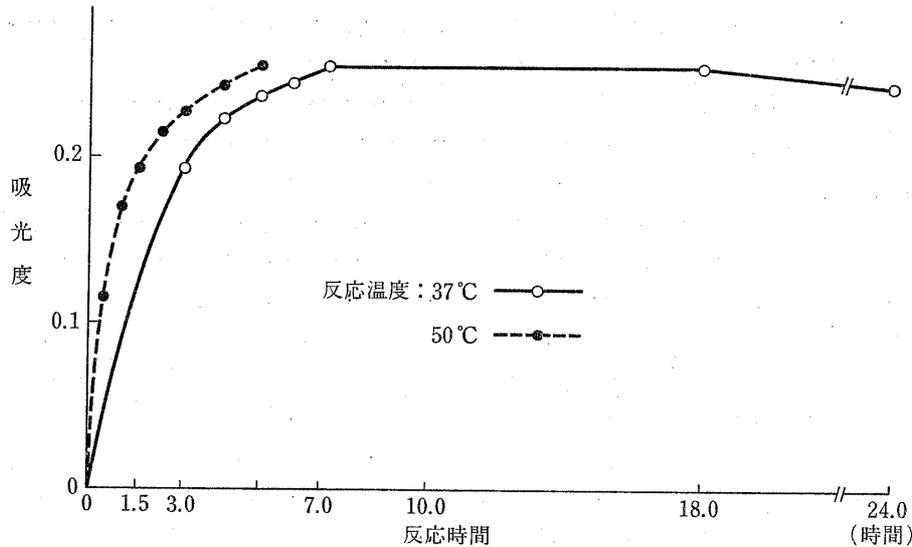


図 1. ヒドラジン反応におけるオサゾン生成
添加量: L-アスコルビン酸 8 μg

要しない範囲の $10 \pm 1 \text{ ml}$ を越えず、この時酸化終了の赤紫色の確認が重要である。また、チオ尿素の溶解には分別定量における還元型Cの酸化抑止のために、エタノールを使用せず、2% チオ尿素メタリン酸混液 2ml の使用を適当とした。また、分別定量では低濃度周辺で測りとることが多いために、反応条件を整えて吸光度の高い検量線を得るために、2% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン 2ml の使用を適当と認めた。

ii. 反応の進行と停止

まず、ヒドラジン反応の進行についてオサゾンの生成状態を調べ、図1の結果から原法⁴⁾の 50°C 90分と 37°C 3時間の反応が同一吸光度に達することの再現性を確認したが、この反応の終結には 37°C で7時間を要することを認め、その途中の時点であることから反応は正確に実施して、確かな反応停止を必要とし、氷水冷却10分で行い40分を限度と認めた。

2) オサゾンの移行

酢酸エチル 5ml の1回添加処理によるオサゾン移行を検討して表1に示した結果により、検量範囲では、96.9~98.7%、またその芒硝脱水後の残存率は表2に示した結果より、99.6~99.7%を認めた。これらの結果から氷冷したヒドラジン反応終了液に酢酸エチル 5ml を一度に低温添加して、強振1分によりオサゾンを移行後、スポイドにて別の共栓試験管に移して、蒸発を防止しつつ芒硝脱水し、そのまま上層を薄層板添付の試料とし、原法⁴⁾の乾固後溶解の操作を省略した。この結果乾固に要する定量操作の合理化と所要時間を短縮することができた。

3) 薄層展開

薄層板は分析用キーゼルゲルプレート 60F 254 (メル

ク社製) を使用して、ドライヤー冷風使用下でマイクロシリンジにて、100 μl を限度に迅速に多重添付を行う。横長型添付 (3×6mm) もテーリングが少なく優れていた。展開溶媒は原法⁴⁾に従い、展開温度を $-1^\circ\text{C} \sim 32^\circ\text{C}$ で検討し、結果を図2に示した。クロマトグラムは、低

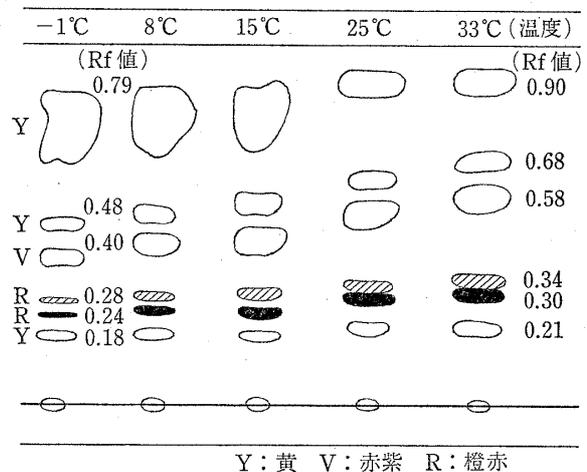


図 2. 展開温度と薄層クロマトグラム
L-アスコルビン酸: 10 μg

温展開の分離が良好で、温度の上昇によりスポットが広がり接触に至ることもあり、条件を一定にするため、冷蔵庫内の下段 ($8 \sim 10^\circ\text{C}$) で原法通り 13cm 展開 (所要時間約 50分) の実施を適当と認めた。このあと風乾を行うが、この時、後述の定量操作の分断の検討により 47 時間の中断可能を認めた。

4) 画分溶解

風乾した薄層板のビタミンC相当画分を金属スパテル

食品中のビタミンCの安定性に関する基礎的検討

表1 酢酸エチル 5ml 1回添加によるオサゾンの移行率

ビタミンC		吸光度		オサゾン 移行率 (%)
検液 5ml 中(mg)	添付量 0.1ml 中 (μg)	酢酸エチル 5ml 1回添加移行	残留合計	
0.30	6	0.157	0.005	96.01
0.50	10	0.246	0.007	97.02
0.70	14	0.355	0.005	98.61
1.00	20	0.490	0.007	98.59
1.20	24	0.588	0.008	98.66
1.50	30	0.706	0.019	97.38

表2. オサゾン移行した酢酸エチル溶液の芒硝脱水後残存率

ビタミンC		吸光度		オサゾン 残存率 (%)
検液 5ml 中(mg)	添付量 0.1ml 中 (μg)	対 照	芒硝脱水後	
0.50	10	0.247	0.246	99.6
0.75	15	0.388	0.387	99.7
1.00	20	0.494	0.492	99.6

にて剥離し葉包紙に集め、乳鉢に移して磨砕し、50%硫酸5mlを加えて丁寧に溶解し、15分放置により充分浸出させる。ガラス棒の潰し溶解は不十分であった。硫酸濃度については、Roe⁶⁾のヒドラジン法比色時の最終硫酸濃度^{6,7)}に近い50%を使用して原法⁴⁾の85%と比較検討した結果、図3に示した検量線により、オサゾン

カゲルの除去は、硫酸との比重差が少ないために、遠心分離よりも乾燥ガラスフィルター3G4の使用により容易に上清を得た。なお、ガラスフィルターには超音波洗浄が優れていた。

5) クロマトグラムの画分吸収とビタミンCの二画分薄層展開によるクロマトグラムと各画分の吸収曲線を図4に示した。ビタミンC由来の画分として524nmに最大吸収をもつ橙赤色のRf値0.28付近の主画分と、その上に隣接の0.3付近の副画分の二画分³⁾を得た。また、主画分に対する副画分比率は表3に示した結果により、標準ビタミンCでは各濃度で約5%であったが、牛

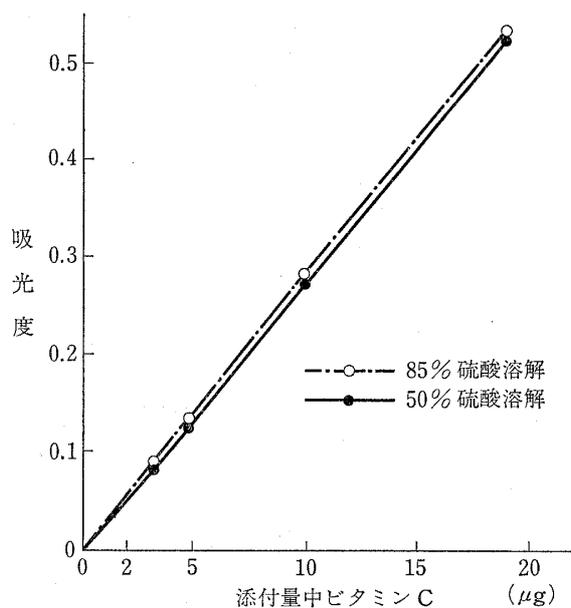


図3. 薄層クロマトグラフ法によるビタミンC検量線
波長: 524nm 標準: L-アスコルビン酸

の十分な溶解を認め、いずれも安定した検量線が得られたので以後は、50%硫酸の使用とした。剥離したシリ

表3. ビタミンCの二画分比率

添付試料 (μg)	吸光度			副画分 比率 (%)
	主画分	副画分	合計	
L-アスコルビン酸				
10	0.187	0.009	0.196	4.6
15	0.302	0.014	0.316	4.4
20	0.374	0.020	0.394	5.1
25	0.472	0.024	0.496	4.8
10 (牛乳添加)	0.229	0.020	0.249	8.0
カリフラワー	0.142	0.020	0.162	14.1
"	0.169	0.031	0.200	18.3
"	0.200	0.038	0.238	19.0

乳添加により8.0%に増加し、カリフラワーでは濃度によって14.1~19.0%と高比率を示した。以上の結果から、同一吸収波形を示して524nmに最大吸収をもつ二画分を合せて硫酸溶液として、50分以内に524nmにて比色定量を実施することを適当と認めた。

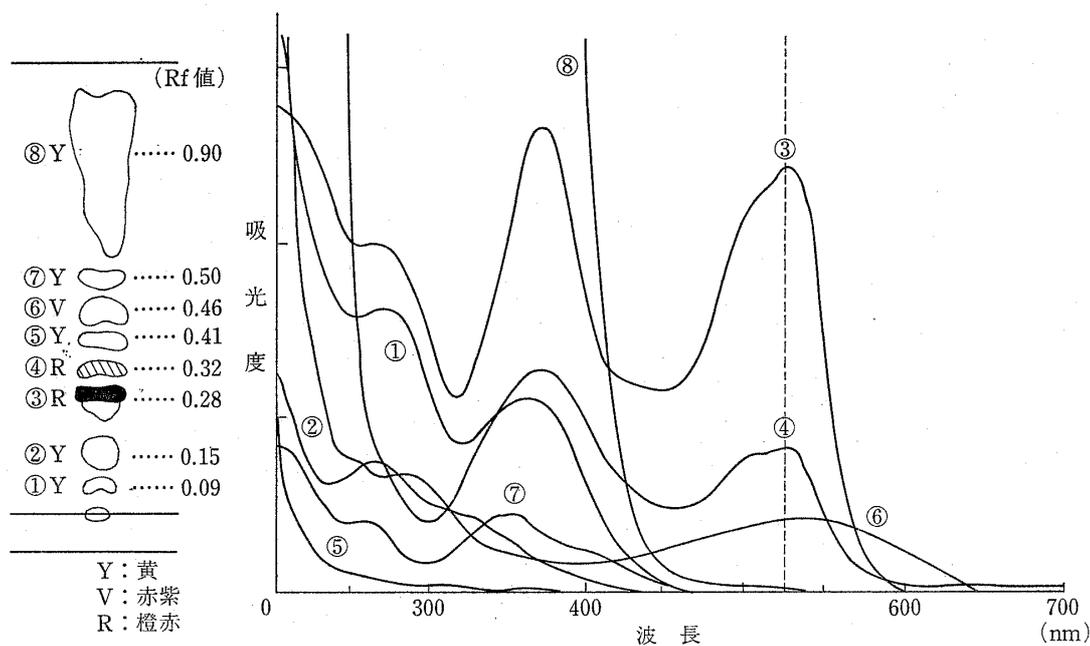


図 4. カリフラワーのクロマトグラムと各画分吸収

6) 比色定量

i. 盲検

食品の盲検値比率を調べて表4に示した結果から、標準ビタミンCとキャベツ、ピーマンでは約1%であったがカリフラワーでは5.0%、シュンギクでは11.7%と多

表 4. 食品中のビタミンC定量での盲検値比率

試料	主検に対する盲検値比率 (%)		
	総C	酸化型	DKG
L-アスコルビン酸 1 μ g	4.8	0.0	0.0
5	1.0	0.0	0.0
10	0.6	0.0	0.0
15	1.1	0.0	0.0
20	0.6	0.0	0.0
30	0.4	0.0	0.0
カリフラワー	5.0	9.8	0.0
キュウリ	3.9	4.5	32.5
トマト	7.7	25.0	28.6
ピーマン	1.1	0.9	0.0
キウイフルーツ	3.9	38.9	39.6
カボチャ	5.1	8.1	11.2
キャベツ	0.8	2.8	8.3
イチゴ	2.5	11.3	31.8
シュンギク	11.7	11.8	22.6

くの食品で高値を示し、分別定量では低濃度域近くで測りとりことの多い酸化型やDKGの場合の盲検値の影響が大きいことから、複雑な定量操作にあっても食物試料

の盲検の省略はできないことがわかった。

ii. 添加再検率

カリフラワー汁液にL-アスコルビン酸の添加回収試験により検量範囲では、98.9%と良好な結果を認めた。

iii. 添加物共存の影響

検液中に100mg%の糖、5mg%のアミノ酸、1%の調味料等の単独添加によるビタミンC定量値の変動を調べ表5に示した。吸光度比率では-6.0~2.6%の変動を認めた。また、図5に示した吸収曲線により、添加調味料による吸収妨害は認めず、本定量法が調味食品の定量にも適することを認めた。

iv. ヒドラジン法による定量値との比較

ビタミンC標準試料と13食品について、同一試料を同時採取して二法による定量を行い結果をまとめて比較し、表6および図6に示した。これらの結果から、二法による定量値の差を認め、柿とキャベツでは薄層クロマトグラフ法による値がやや高いが、それ以外はヒドラジン法値が全般に高く、抹茶では約1.8倍の高値を示した。また、吸収曲線について、標準ビタミンCでは、二法いずれも最大吸収524nmで、同一波形を示した。一方食品ビタミンCのヒドラジン法では、524nm最大吸収波型の変形が多く多くの食品で認められ、山がなだらかとなり、440nm付近の吸収の影響を認める場合があり、特にヒドラジン法で高値を示した抹茶では460nmの最大吸収の下降線が明らかに524nmの吸収を妨害して過大値の原因となったことを示していた。

食品中のビタミンCの安定性に関する基礎的検討

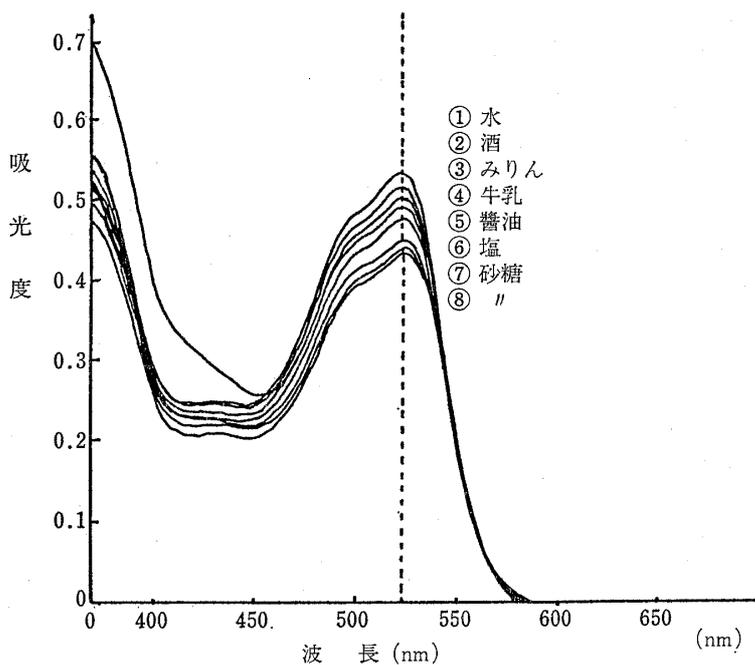


図 5. カリフラワーの調味料添加の吸収比較 添加量: 5%

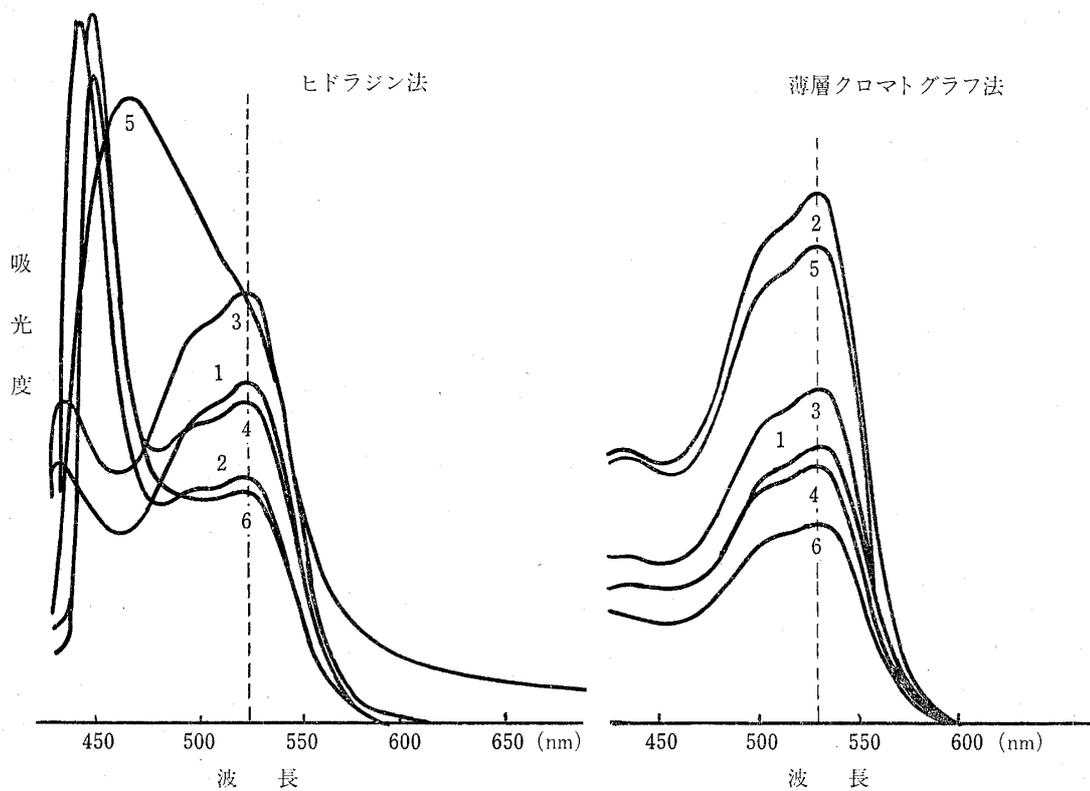


図 6. 薄層クロマトグラフ法とヒドラジン法による吸光度比較

- | | | |
|--------------|-----------|--------|
| 1. L-アスコルビン酸 | 3. ホウレンソウ | 5. 抹茶 |
| 2. キャベツ | 4. ダイコン | 6. トマト |

表 5. 薄層クロマトグラフ法によるビタミンC定量における共存物質の影響
 対照 (無添加): L-アスコルビン酸 10 μ g

吸光度比率 (%)					
糖 添加量: 100 mg %		アミノ酸 5 mg %		調味料 1%	
対照 (無添加)	100.0	対照 (無添加)	100.0	対照 (無添加)	100.0
グルコース	102.6	チロシン	97.6	食酢	101.2
アラビノース	100.9	リジン	97.6	みりん	101.2
マンノース	100.4	ヒスチジン	96.8	塩	100.0
キシロース	99.1	グルタミン酸	96.0	醤油	98.8
ラフィノース	98.3	アスパラギン酸	96.0	砂糖	98.1
麦芽糖	97.4	アルギニン	94.4	酒	97.3
乳糖	97.4	フェニルアラニン	94.0	牛乳	96.9
果糖	95.7				
ショ糖	95.3				
ガラクトース	94.9				

表 6. 薄層クロマトグラフ法とヒドラジン法による
 定量値比較

食 品	総C値 (mg %)		ヒドラジン法値/ 薄層クロマトグ ラフ法値 (%)
	薄層クロマト グラフ法値	ヒドラジン 法値	
柿	15.0	14.5	96.7
"	47.6	40.3	84.7
キヤベツ	34.4	31.9	92.7
バナナ	12.0	12.4	103.3
ミカン	26.4	27.4	103.8
キュウリ	15.8	16.4	103.8
ホウレンソウ	85.9	91.5	106.5
トウガラシ	69.0	74.0	107.2
タマネギ	5.9	6.7	113.6
ダイコン	11.5	14.1	122.6
パレイショ	8.2	11.1	135.4
抹茶	60.9	108.8	178.7
アサリ	3.7	4.1	110.8
牛レバー	19.5	23.3	119.5
鶏レバー	11.7	17.5	149.6

7) 定量操作の分断

以上より、本定量法では長時間に亘る操作を必要とするため、定量途中の中断可能カ所について、表7に示した五つの時期で検討した。その結果より、薄層展開後の風乾放置の時に限り、47時間中断の可能を認めた。本定量法により分別定量を実施するためには、総C用の主検と盲検、酸化型C用の主検と盲検、DKG用の主検と盲検について行う必要があり、図7により1試料6検液の定量所要時間は5時間30分、5試料の30検液では約13時間30分を要するが、2日間中断可能により、試料の調製や実験調理などの時間計画に貢献できるものと考察した。

表 7. 薄層クロマトグラフ法定量操作の中断の影響

中断時期	吸光度比率 (%)
対照 (中断なし)	100.0
1. オサゾンの酢酸エチル移行 (オサゾン生成後 20時間)	114.4
2. 薄層板添付 (酢酸エチル溶解後 22時間)	104.3
3. 展開 (添付後 21時間)	95.6
4. 画分剥離 (展開後の風乾 18時間)	100.0
(" 22時間)	100.1
(" 45時間)	100.0
(" 47時間)	100.0
5. 比色 (硫酸溶解後 24時間)	97.1

8) 機器磨砕による定量検液の調製と保存

i. ビタミンC定量用検液

食物試料を5%メタリン酸および試料と同量の10%メタリン酸を使用してビタミンCが2~20mg%の範囲に希釈して終濃度5%メタリン酸に抽出する。磨砕は常法の乳鉢磨砕の他、試料の量により、多量食物の磨砕抽出にはホモジナイザーまたはブレンダーまたはミルサーなどの機器使用によって行い、至適な条件で実施するために、試料に対応して、乳鉢磨砕を対照に、磨砕機器の性能にあわせた使用条件の検討が必要となる。本研究では標準ビタミンCとカリフラワーを用いて乳鉢磨砕と一致する機器磨砕の使用条件を検討し、結果を総括して図8に示した。試料25g以下の磨砕全容が100ml以下ではオートホモジナイザー使用で回転スピード7(回転数: 130×100 RPM)で10分運転とした。また試料25g

食品中のビタミンCの安定性に関する基礎的検討

(操作過程)	(所要時間)	
	1 試料 (6機)	5 試料 (30機)
試料採取より、磨砕浸出検液調製と その一部でジケトグルン酸分別還元処理検液 の調製	1時間30分	5時間00分
ヒドラジン反応とその停止、オサゾン移行、 薄層展開、風乾	3時間30分	6時間00分
4.7時間までの中断可能		
面分割離、硫酸溶解、比色定量	30分	2時間30分

注*) アスコルビナーゼ非分布性食品と加熱調理食物に限り24時間の中断による影響は
僅かのため、実験目的により中断を可能とする。

図 7. 食物試料より検液調製し、薄層クロマトグラフ法 (一部改良) にてビタミンC分別定量に至るまでの所要時間

『試料食物』 『採取』	食品切片など 小試料 10g以下	調理食物など 部分試料 25g以下	献立調理食物など 大量食物 25g以上
『浸出』	検量範囲の2~20mg%に終濃度5%メタリン酸に適量希釈浸出		
『磨砕』	乳鉢	オートホジサイザ- (ニッケイ、ガラス製カッパ型)	ブレンダー (サンビーム製、ミキサー型)
	常法	ダイヤル7で10分 (回転:130X100RPM)	ダイヤル7で5分
『全容調整』	5%メタリン酸にてメスフラスコ使用で50ml以上必要		
『抽出』	放置	スターラー低速攪拌	
	室温 15分		
『上清分離』	ひだ付きろ紙ろ過、又は遠心分離		
『還元』	10ml		
	←2%チオ尿素5%メタリン酸検液10ml(同量) 《硫化水素通気25分、30℃以下》 《二酸化炭素通気約5分》		
『調製検液』	総C、酸化型C定量用検液 (25ml以上必要)	ジケトグルン酸分別定量用検液 (15ml以上必要)	

図 8. 食物試料より、薄層クロマトグラフ法 (一部改良) のビタミンC分別定量用検液調製の手順

以上の磨砕全容が100ml以上では、ミキサー型ブレンダーにより速度切替えダイヤル7で5分を磨砕抽出の条件とした。フーズミルサーについても30秒運転を適当と認めたが、多数試料の連続使用には性能に限界を認めた。5%メタリン酸を用いてメスフラスコにて定容後、低速の電磁攪拌抽出を15分の実施により、酸化型CとDKGの増加がなく良好な条件と認めた。ひだ付乾燥ろ紙によるろ過または遠心分離により上清部40mlが必要である。次にこの調製検液の保存(8℃)による安定度を検討し、結果を表8に示した。標準ビタミンCでは5日間の安定を認めたが、キウイは僅かな減少を示し、他の食品では総Cの減少と酸化型CおよびDKGの経日による増加を認め、酵素作用などの影響が考えられ、調製した検液の保存は避けて即日中に薄層クロマトグラフ法

の定量に供する必要を認めた。

ii. DKG 分別定量用検液

DKG 分別用の還元検液の調製については田村ら³⁾の詳細な検討結果に準じて実施し、硫化水素通気中は温度上昇も容量変化も殆どなく、夏季もドラフト中室温で進行でき、勢い良く通気25分を守ることでばらつきは認めなかった。また、この還元検液についても保存の影響を調べた結果、時間の経過により非加熱試料では再び還元型Cから酸化型CおよびDKGへの進行を認め、この戻り酸化を避けるために即日中に引き続いて定量を行う必要を認めた。

9) 薄層クロマトグラフ法による食品中ビタミンCの分別定量条件の総括

以上の検討結果より藤田ら⁴⁾薄層クロマトグラフ定量

表 8. 調製検液の安定性

検液試料	総C		対総C比率 (%)			
	(mg%)	残存率 (%)	還元型	酸化型	DKG	
キウイ	調製時	106.46	100.0	93.4	6.6	0.5
	1日後	106.14	99.7	93.0	7.0	0.8
	2日後	105.64	99.2	92.8	7.2	0.8
トマト	調製時	12.28	100.0	83.5	16.5	4.8
	1日後	11.78	99.0	84.9	15.1	8.2
	2日後	11.14	96.1	84.0	16.0	11.1
カボチャ	調製時	17.52	100.0	86.5	13.5	5.9
	1日後	16.90	96.5	85.2	14.8	8.0
	2日後	16.90	96.5	83.1	16.9	8.0
ピーマン	調製時	111.05	100.0	47.7	52.3	5.8
	1日後	94.10	88.5	39.3	60.7	10.5
	2日後	90.25	86.0	32.7	67.3	11.9

法に一部改良を加えた総括図を作成して図9に示した。

i. 一部改良を加えた薄層クロマトグラフ法による定量条件

検液 5ml (ビタミンC範囲 0.1~1mg) に 0.3% インドフェノールを用いて確実に酸化し、2% チオ尿素メタリン酸混液 2ml と、2% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン溶液 2ml を使用して、正確に 50°C にて 90 分の反応後、水冷 10 分~40 分により反応を停止する。オサゾン移行の酢酸エチルは 5ml を一回の低温添加で強振 1 分で行い、乾固は省略して、芒硝を加えて脱水し、そのまま静置して薄層板添付試料とする。薄層板は添付量 0.1ml, 検量範囲 2~20 ug, 展開剤は原法⁴⁾ 通りトルエン:アセトン:酢酸 (2:1:1) 容量比の混和上層を使用して、冷蔵庫内下段で 13cm 展開して風乾する。この後二日間の放置中断が可能である。同一吸収曲線を持つ Rf 値 0.28 付近の主画分と 0.3 付近の副画分の橙赤色の二画分をあわせて剝離し、乳鉢に移して磨砕して 50% 硫酸 5ml を加えて溶解後、3G4 グラスフィルター⁵⁾ 通過によりシリカゲルを除去して、524nm にて比色して、盲検値を差引いた値で検量算出した。

ii. 分別定量^{5,8,9)}

図9の総括図により先ず食物中の還元型Cを迅速確実なインドフェノールにより酸化型Cにして定量するが、この定量値に共存した酸化型Cとともに共存のDKGとの合計値を測ることとなる。一方、酸化型Cについては直接定量するが、この時も同様に共存したDKGを含む合計値を測ることとなる。したがって、共存したDKGは分別してこれらの定量値から減じる必要がある。DKGの定量は硫化水素の通気還元により、既に共存した酸化型Cを還元型Cに戻しても残存するDKGを直接定量

する。最後に、この分別定量値に対して分子量比と縮合比率による補正計算⁹⁾を必要とし、図9に示した田村ら法⁸⁾により、算出を行う。

以上の薄層クロマトグラフ法の定量条件の検討により、一部改良を加え、以下の事項に貢献できたものと考察した。

まず、DKGの分別定量によりDKGを含まないビタミンC値を測りとることが可能で、食品中ビタミンCの真値に一歩近づくことになるものと考察した。また、定量操作の一部改良により、試薬条件などの影響で吸光度が約15%向上した検量線が得られ、分別定量における低濃度領域の測定に寄与するものと考察した。また、硫酸濃度を50%に下げることで試薬の節約に貢献できた。定量操作の一部改良により酢酸エチルオサゾン溶液の乾固の省略と、シリカゲルのガラスフィルター分離により操作と時間が合理化できた。また、定量途中二日間の中断可能により、実験計画が合理化され多数試料の分析が容易になることが考えられた。

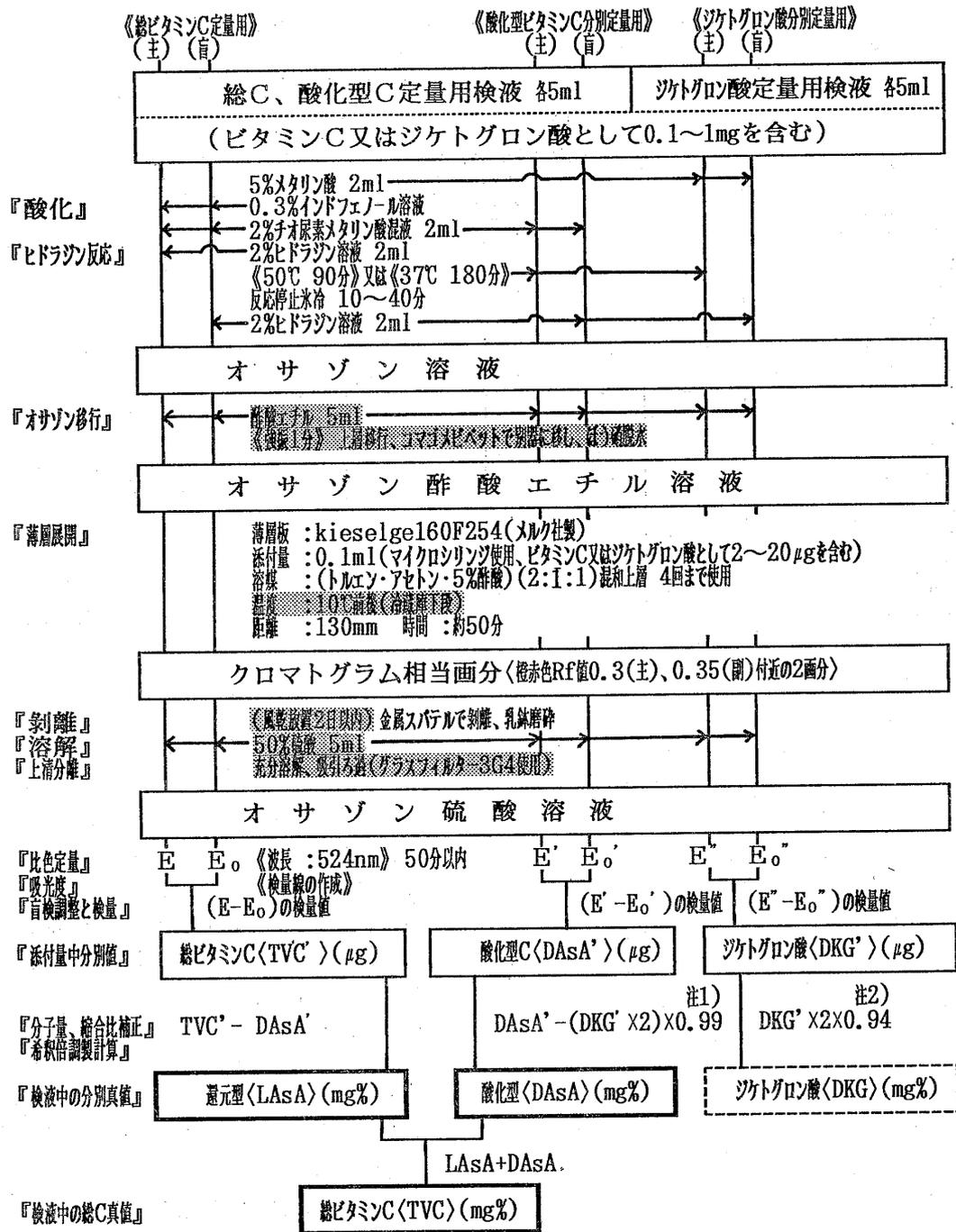
また多量食物試料の機器磨砕抽出により、調理科学の立場から役立つものと考察した。

2. 野菜、果実汁液中ビタミンCの基礎的調理条件に対する安定性

1) 非加熱における安定性

野菜、果実生汁液中の総C値とその還元型Cと酸化型CおよびDKGの分別比率、また、汁液の冷蔵(8°C)24時間後の残存とその比率定量結果をまとめて比較し表9に示した。これらの結果より、まず、汁液調製時ではアスコルビナーゼ非分布性食品のレモン、イチゴ、ダイコン、キウイ等では還元型比率が95%以上の高比率を示し、DKGは0~0.6%と僅少であった。また、ア

食品中のビタミンCの安定性に関する基礎的検討



注 1) 0.99 は、分子量比 (LAsA: DAsA) (176.127: 174.111) の補正值である。
 注 2) 0.94 は、分子量比 (LAsA: DKG) (176.127: 192.126) の補正值1.09に、ヒドラジン反応の縮合率 DAsA の80%を1としたとき DKG は93%で、その分子縮合比率0.86を乗じた数字である。
 なお、上記分子量比の補正による差は、僅少のため通常はこの補正を省略して以下の式によって算出する。
 注 1) DAsA = DAsA' - (DKG' × 2)
 注 2) DKG = DKG' × 2 × 0.86 と適宜希釈倍調整

図 9. 薄層クロマトグラフ法 (一部改良) によるビタミンCの分別定量総括図

スコルビナーゼ分布性のトマト、カボチャ、キャベツ、ブロッコリー、ニンジン、ピーマン、シュンギク、キュウリなどでは還元型は 23.2%~86.5% と低率で、DKG は 0~9.6% を認めた。

ためにまとめて図 10 に示した。この結果より、野菜、果実の種類により、残存とその分別比率の推移の違いから食品毎のビタミンCの非加熱の安定性の違いを認めた。その結果アスコルビナーゼ非分布性食品のダイコン、キウイ、レモン、イチゴと標準ビタミンCでは表 9 により

次に食品毎の経時分別残存図を作成して傾向の比較の

表 9. 食品汁液中ビタミンCと非加熱24時間後の残存

	ビタミンCとジケトグルン酸							
	総C値 (mg%)	調製時			24時間後 於8°C			
		対総C分別比率 (%)			総C 残存率 (%)	対総C分別比率 (%)		
		還元型	酸化型	ジケトグルン酸		還元型	酸化型	ジケトグルン酸
L-アスコルビン酸 (標準)	38.0	100.0	0.0	0.0	82.0	84.6	15.4	2.6
レモン	40.5	98.5	1.5	0.0	77.0	90.3	9.7	5.6
イチゴ	64.4	97.0	2.7	0.6	64.2	89.5	10.5	4.2
ダイコン	12.3	99.1	0.9	0.0	78.1	99.8	0.2	5.6
キウイフルーツ	106.5	93.4	6.6	0.5	76.5	93.4	6.6	3.2
カボチャ	17.5	86.5	13.5	5.9	53.5	55.0	45.0	27.8
トマト	24.6	83.4	16.6	4.8	69.7	48.5	51.5	23.1
キャベツ	38.5	57.5	42.5	1.3	46.9	36.3	63.7	40.2
ブロッコリー	123.5	55.5	44.5	0.0	44.5	5.5	94.5	58.2
ニンジン	4.2	52.4	47.6	0.0	0.0	0.0	0.0	106.4*
ピーマン	111.1	52.3	47.7	5.8	37.9	5.9	94.1	140.0
シュンギク	7.6	29.7	70.3	9.6	48.3	0.0	100.0	89.3
キュウリ	9.7	23.2	76.8	8.1	13.5	19.1	80.9	167.2

*対調製時総C比率

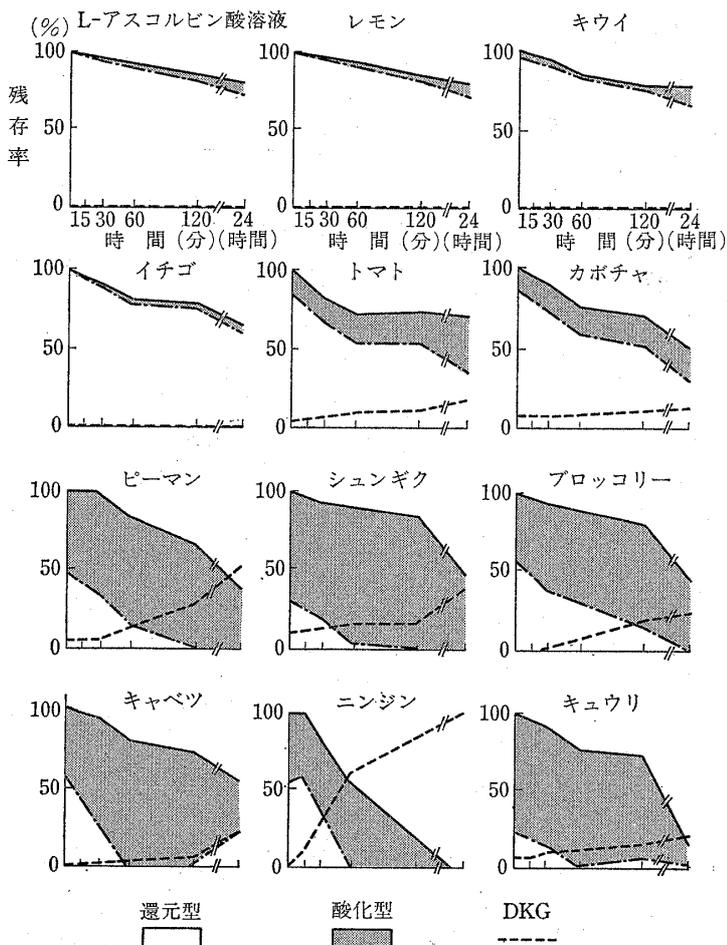


図 10. 野菜、果物汁液中ビタミンCの経時分別残存図 (於10°C)

24時間後の残存率が64.2~82.0%と高く、また還元型も高比率で、酸化型CおよびDKGの生成が少なく推移する残存パターンを示し、これらの食品中のビタミンCでは非加熱において安定性が高い傾向を認めた。一方、アスコルビナーゼ分布性食品のキャベツ、ブロッコリー、ニンジン、キュウリ、ピーマン、シュンギク、トマト、カボチャなどでは、経時的に残存率の低下が著しく、24時間後残存率0~69.7を示し、酸化型Cの増加とDKGを生成し、24時間後は残存C値の0~55.0%とその大半を酸化型Cが占める比率に至る傾向を認めた。特にニンジンではDKGの顕著な増加を示した。以上より、これらの食品中のビタミンCは不安定な状態にあり、分布するアスコルビナーゼの酵素活性がこれらの残存を支配し、食品中ビタミンCの安定性に関するものと考えた。

2) 100°C加熱における安定性

食品汁液の100°Cで210分までの加熱中のビタミンC定量結果から、経時分別残存図を作成して、食品による残存パターンの比較のために並べて図11に示した。これらの結果より、先ずアスコルビナーゼ非分布性の食品では100°C 210分加熱後に標準ビタミンC溶液では消失を認めたが、レモンでは、なお36%が残存し、ダイコンも180分で52%が残存した。その間DKGの存在も認めたが、蓄積されることなく、酸化型Cについても同様に、蓄積はなく消失を示していた。これらの食品中ビタミンCは

食品中のビタミンCの安定性に関する基礎的研究

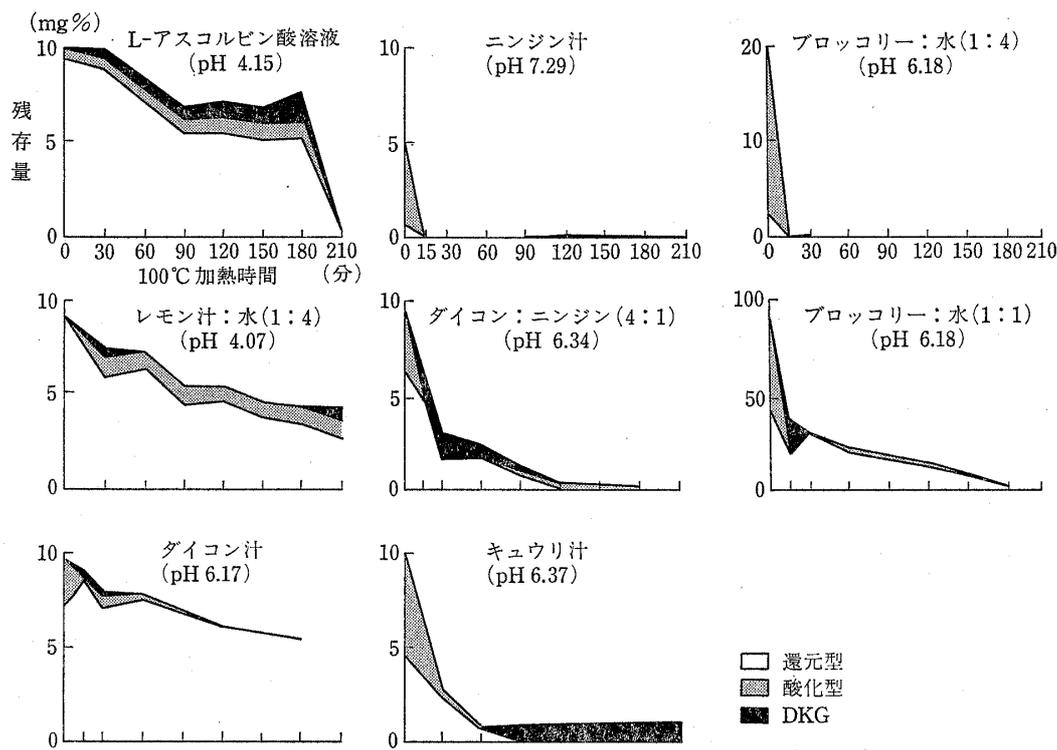


図 11. 野菜、果物汁液の100°C加熱中のビタミンC分別残存比較図 (pH無調整)

100°C加熱中は常に還元型Cが高比率で推移し、最終は急激に消失に至るといった経過を示していた。一方、アスコルビナーゼ分布性の食品の場合、ニンジンでは15分では0%、キュウリは60分で48%まで低下して90分では0%、ブロッコリーも15分では0%を認めたが、高濃度ではその時22%の残存があり180分で0%に至った。また、これら食品では、加熱の初期に急激なビタミンCの減少があり、あとは低残存で推移し、図12に示した一括比較により標準ビタミンC、レモン、ダイコンでは180分の加熱後もビタミンCの50%以上が残存したが、ブロッコリー、キュウリ、ニンジンでは100°C

加熱の初期15分間に激減して0~30%となり、180分後には消失を認め、残存傾向の明らかな違いを認めた。この初期加熱時のビタミンCの激減は温度上昇の過程でアスコルビナーゼ活性の至適温度37°C付近通過時の酵素作用の影響によるものと考察した。また、ブロッコリーの結果から、ビタミンC高濃度の原液が経時残存率が高く、稲垣ら¹⁹⁾により明らかにされている、高含有食品の利用が100°C加熱調理においても優れていることを認めた。

次に各種食品汁液の100°C30分加熱によるビタミンCの残存とその分別定量結果をまとめて表10に示した。これらの結果から、総Cの残存率がアスコルビナーゼ非分布性食品では73.7~91.3%に対し、分布性食品では0~35.6%と低いが、加熱後は還元型C比率は共通して80%以上となり、アスコルビナーゼ分布性食品であっても100°C加熱後は、酵素の失活により、非分布性食品の残存パターンに転じたものと考察した。

3) pHの変化に対する安定性

4食品の汁液について各pH3, 5, 7, 8に調整別にビタミンC経時残存の推移を比較して図13に示した。この結果より食品によるpHの影響の違いを認めた。まず、アスコルビナーゼ非分布性の非加熱ダイコン汁ではpHの変化にも変動の少ない推移を示した。一方、アスコルビナーゼ分布性食品の非加熱ブロッコリー汁とニン

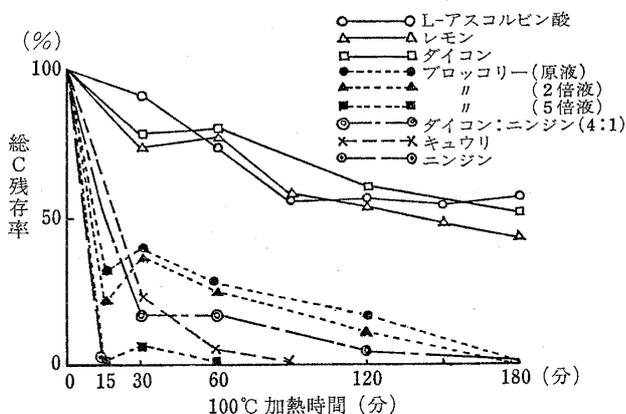


図 12. 野菜、果物汁液中の100°C加熱中における総C残存図

表 10. 食品汁液中ビタミンCと100°C 30分加熱による残存

	ビタミンCとジケトグルン酸							
	総C値 (mg%)	非加熱調製時			総C 残存率 (%)	100°C 加熱30分後		
		対総C分別比率 (%)				対総C分別比率 (%)		
		還元型	酸化型	ジケトグルン酸		還元型	酸化型	ジケトグルン酸
L-アスコルビン酸 (標準)	10.0	100.0	0.0	0.0	91.3	94.1	5.9	8.2
レモン	40.5	98.5	1.5	0.0	89.6	95.3	4.7	7.0
レモン:水 (1:4)	8.1	100.0	0.0	0.0	73.7	86.6	13.4	11.1
ダイコン	11.6	99.1	0.9	0.0	77.8	92.7	7.3	5.3
ピーマン	130.0	89.2	10.9	1.2	35.6	83.5	16.5	2.5
ブロッコリー	83.2	47.6	52.4	15.6	32.8	96.3	3.7	2.2
"	88.5	87.6	12.4	0.7	35.0	91.1	8.9	1.6
ブロッコリー:水 (1:1)	41.2	56.7	43.3	39.1	26.1	97.6	2.4	6.0
" " (1:4)	15.5	14.2	85.8	19.0	6.4	100.0	0.0	0.0
トマト	13.3	91.4	8.6	3.2	25.5	91.2	8.8	17.7
キャベツ	38.5	57.5	42.5	1.3	23.0	81.2	18.8	20.6
キュウリ	10.4	46.0	54.0	0.0	22.9	89.5	10.5	0.0
ダイコン:ニンジン (4:1)	8.6	68.1	31.9	0.0	16.9	100.0	0.0	101.4
ニンジン	3.9	22.6	77.4	5.6	0.0	0.0	0.0	0.0

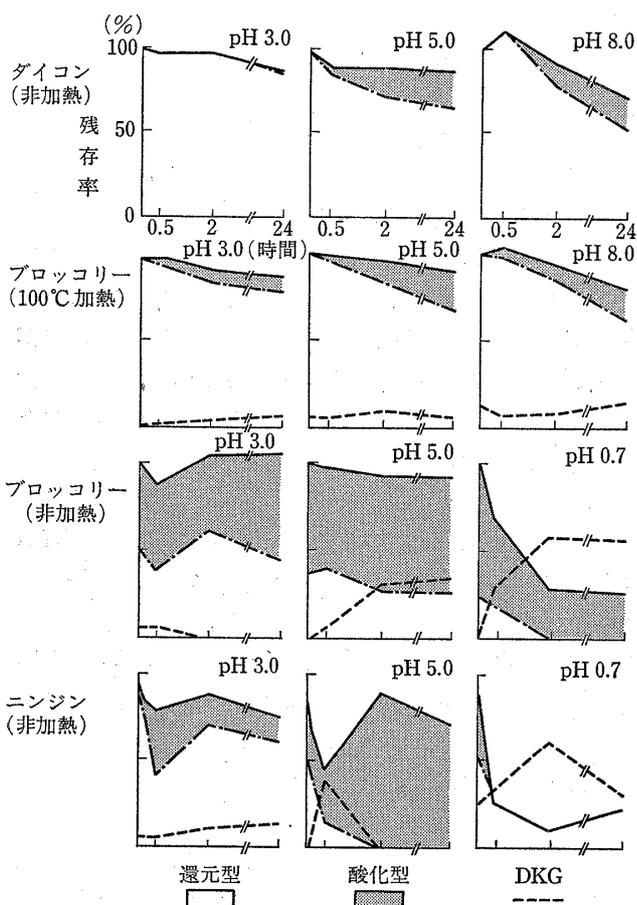


図 13. pH 調整した野菜汁のビタミンCとジケトグルン酸の経時残存 (McIlvaine Buffer 使用)

ジン汁では pH の影響を大きく受けて pH 7 では残存率の激減と、DKG が著しく増加する経時残存パターンを

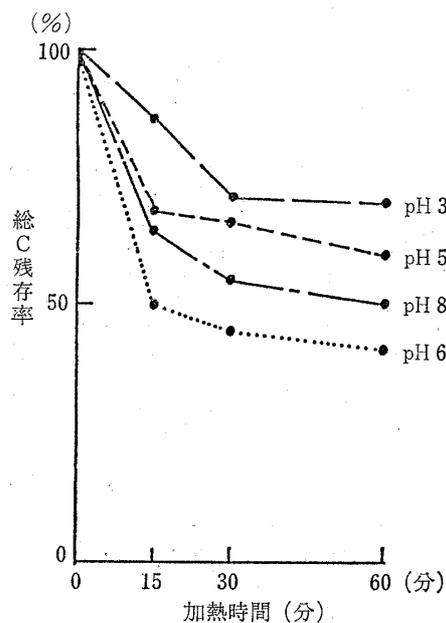


図 14. ブロッコリー汁液の pH 調整別 100°C 加熱における総Cの経時残存

McIlvaine's Buffer 使用

示し、pH 5 では酸化型C比率の顕著な増加を認めた。また、100°C 10分加熱後のブロッコリー汁では、アスコルビナーゼの失活により、非分布性のダイコンと同様の残存パターンに転じたことを認め、ブランチング効果を示すものと考察した。稲垣ら^{19,20)}によりアスコルビナーゼの至適 pH は、McIlvaine 緩衝液では 5.6 とされ、pH 3 では酵素作用が抑制されるが、pH 5 と pH 6 の近くでは酵素活性の働きで酸化型Cが増加し、pH 7 では加水分解の進行により DKG 生成が

食品中のビタミンCの安定性に関する基礎的研究

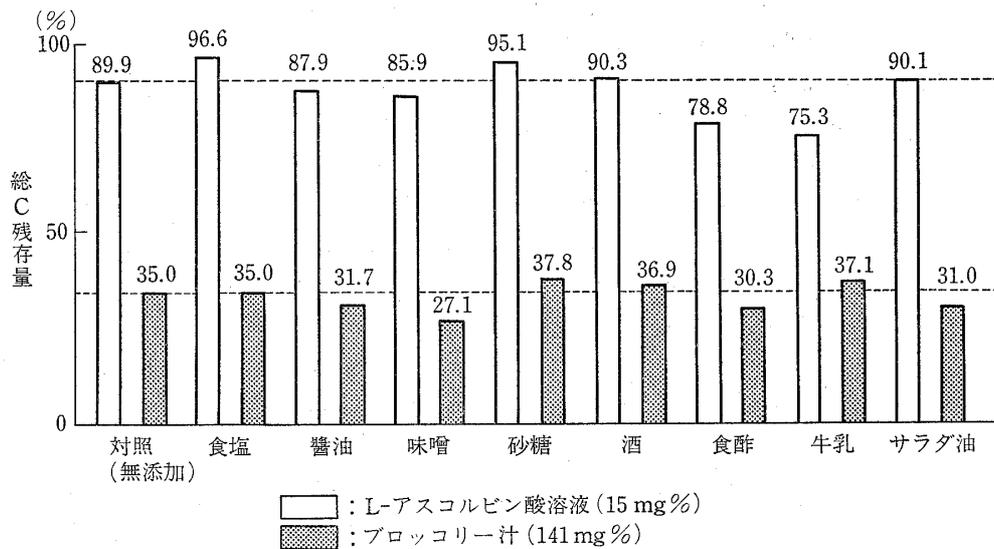


図 15. 調味料添加毎 100°C 30 分加熱後の総 C 残存率 (添加量: 塩 1%, その他 5%)

増加したものと考察した。そして、また、先に 2) により、加熱初期のビタミンCの激減が初期温度のアスコルビナーゼ活性の影響によることを考察したが、更に図 14 の結果より、至適 pH 5.6 に近い pH 6 が 100°C 加熱の初期温度の酵素活性に重ねて影響してブロッコリー汁のビタミンC残存低下の促進を支配したものと考察した。これらの結果からビタミンCに対する食品中のアスコルビナーゼの影響については、もみじ卸し^{14,21)} や果汁などの非加熱調理¹⁸⁾ では既に明らかにされているが、100°C 加熱調理においてもその初期加熱の時期に、また至適 pH の影響を認め、アスコルビナーゼの分布が食品利用のうえで、非加熱、加熱、pH など調理上の基礎的な条件に亘って食品中ビタミンCの安定性に広くかわるものと考察した。

4) 調味料添加に対する安定性

ブロッコリー汁と標準ビタミンC溶液に、基本的調味料など 8 種類について食塩 (精製塩) は 1%, その他 (濃口醤油, 信州産中味噌, 清酒, 米酢, サラダ油, 市乳) は 5% の通常調理濃度で単独添加して、100°C 30 分加熱により、無添加を対照にしてビタミンC残存率への影響を検討して結果を図 15 に示した。これより、ブロッコリーでは食塩の影響は認められなかったが、味噌, 食酢, 醤油, サラダ油などではビタミンC値の残存率をやや低下させ牛乳, 砂糖, 酒などは、やや高残存傾向を示した。無添加の残存に対し変動幅 10.7% を認め、標準ビタミンC溶液では 21.3% であった。なお、酸化型 C, DKG の増加にも著しい傾向は認めなかった。また、これら調味料の共存によって、ビタミンC定量値がやや変動し、食酢では常に高く、食塩, 醤油, 味噌, 砂糖では濃度による違いはあるが、やや低値を示す傾向を認め

た。これらの結果も含めて、調味食品中のビタミンC定量値には複雑な要素が重なり、多彩な実際調理では、調味料の種類と量, 添加方法ともに多様な条件下で複雑に行われて、傾向は充分の把握に至らないが、これら調味料の通常濃度の単独使用で加熱 30 分により約 10% の変動幅を示したことは、調理食品の定量値に関する基礎資料の一つになるものと考察した。

総括

1. 食品中のビタミンCを薄層クロマトグラフ法を用いて DKG を分別して定量するために、藤田らの薄層クロマトグラフ法⁴⁾ の定量条件を検討して、結果から若干の改良を加えた。即ち、試薬条件を Roe らの方法^{6,7)} の条件に近く改良し、オサゾンの移行は、酢酸エチルに 1 回移行によって行い乾固操作を省略した。薄層展開は、冷蔵庫の下段で行い、展開後の薄層板は 2 日間までの放置中断が可能であった。剝離したビタミンC画分は 50% 硫酸で溶解して支障はなかった。シリカゲルはガラスフィルターにより分離した。以上により、反応条件が整い吸光度が約 15% 向上し、定量操作と所要時間が合理化でき、多数試料の分析が可能と考えられた。本研究では、この改良法を用いて田村らの分別法⁸⁾ に準じて DKG を別に定量して、通常のビタミンC値からこの DKG 値を減じて食品中のビタミンC値とした。

2. 野菜, 果実汁液中のビタミンCの基礎的調理条件に対する安定性を検討し、レモンなどのアスコルビナーゼ非分布性食品では、還元型 C が高比率で、その非加熱では経時の変化も少なく、高残存率を示した。また、100°C 加熱によっても高残存で、pH の変化による変動巾も少なく、高い安定性を認めた。

一方、ブロッコリーなどのアスコルビナーゼ分布性の食品では、酸化型Cの比率が高く、非加熱時のビタミンC経時残存は著しく低下し、また、100°C加熱によってもその加熱初期の段階で著しい低下を示して残存が低く、またpHの影響を受けて大きく変動し、これらの食品ビタミンCでは不安定性を認めた。また、このアスコルビナーゼ分布性食品も100°C加熱後は非分布性食品の残存パターンに転じ、ブランチング効果の一面を示すものと考察した。以上の結果より食品中に分布するアスコルビナーゼの存在により、非加熱調理に限らず、100°C加熱、pHの変化などに対しても、食品中ビタミンCの安定性を支配することを認めた。また、これら調味料の通常濃度の添加加熱30分により対照の残存に対してブロッコリー汁では、約10%のビタミンC値の変動を認めしたが、調味料による著しい不安定性は認めなかった。

本稿の一部は、1989年5月の日本家政学会第41回大会、および1991年5月の同第43回大会において講演した。

終りに、本実験に協力された中村昌代、田中由美子、山内優理恵の諸氏に対し、謝意を表する。

文 献

- 1) Penney, J. R., Zilva, S. S. et al.: *Biochem. J.*, **37**, 403 (1943)
- 2) 辻村 卓, 渡辺早苗, 道中克子, 徳久佐知子, 藤田秋治: *ビタミン*, **45**, 136 (1972)
- 3) Mapson, L. W.: *Biochem. J.*, **80**, 459 (1961)
- 4) 藤田秋治, 広瀬福子, 内山由子: *ビタミン*, **40**, 17 (1969)
- 5) 藤田秋治: *ビタミン定量法*, p. 535~616, 南江堂 (1955)
- 6) Roe, J. H. and Kuethen, C. A.: *J. Biol. Chem.*, **152**, 511 (1944)
- 7) Roe, J. H., Millus, M. B. Oesterling, M. J.: *J. Biol. Chem.*, **174**, 201 (1948)
- 8) 田村太郎, 鈴木繁男: *濃化誌*, **29**, 492 (1955)
- 9) 照内淳也, 島田よね子, 中村恵美子: *ビタミン*, **7**, 508 (1954)
- 10) 木村敬子, 梶田武俊: *家政学研究*, **31**, 156 (1984)
- 11) 長谷川千鶴: *家政誌*, **1**, 8 (1950)
- 12) 小山セイ: *弘前大教育紀要*, **51**, 79 (1984)
- 13) 宮川久邇子, 奥村善子, 村田希久: *栄養と食糧*, **12**, 261 (1959)
- 14) 山田 晃, 東矢 直: *栄養学雑誌*, **10**, 48 (1952)
- 15) 田坂重元, 小林節子: *栄養と食糧*, **9**, 194 (1956)
- 16) 小林安子, 青木純子: *栄養と食糧*, **12**, 190 (1959)
- 17) 元山 正: *調理科学ノート*, p. 100, 第一出版 (1972)
- 18) 森本喜代, 足利千枝, 林 淳三: *調理とビタミン*, p. 112~168, 建帛社 (1971)
- 19) 稲垣長典, 福場博保, 榎本利子: *栄養と食糧*, **6**, 222 (1954)
- 20) 稲垣長典: *三訂ビタミン*, p. 203, 光生館 (1980)
- 21) 林 宏子: *調理科学*, **23**, 361 (1990)

(平成4年4月13日受理)