

## 酵素反応を利用したビタミンC定量法の改良

須田郁夫・西場洋一・古田 収 (九州農業試験場)

IKUO SUDA, YOICHI NISHIBA and SHU FURUTA : Modified Enzymatic Assay for Vitamin C in Foods

農産物・食品中の還元型アスコルビン酸 (AsA) 及び総ビタミンC (還元型AsA+酸化型AsA) 含量は、一般的にはヒドラジン比色法により測定されるが、本法は長時間にわたる煩雑な前処理操作を必要とし、かつ共存物質の影響を受けやすいなどに問題がある。HPLC法は共存物質の影響が少なく正確ではあるが、装置を必要とし、またカラム劣化の問題があるため、経費のかかる測定になりやすい。これらの点を改善した方法として、Tsumura<sup>1)</sup>の酵素 (Peroxidase) 反応利用還元型AsA比色法があるが、農産物・食品に適用する場合には、試料前処理時に使用するメタリン酸の濃度が低いために試料によっては酸化防止効果が弱い、あるいは総ビタミンC含量が測定できないなどの問題点がある。そこで筆者らは酵素反応利用測定法を改良し、極めて簡易・迅速・高感度なビタミンC測定法を開発したので報告する。

### 1. 測定方法

第1図、第2図に示すプロトコールに従って、還元型AsA及び総ビタミンCの測定を行った。

### 2. 結果及び考察

#### 1) 前処理法の検討

ビタミンC測定用の試料調製法としては、ケイ砂と共に5%メタリン酸で磨砕する方法が最適であった。2%チオ尿素-5%メタリン酸や2.5%SnCl<sub>2</sub>-5%メタリン酸による抽出では、測定値が低くなるため、使用を避けるべきである。

#### 2) 還元型AsAの測定

5%メタリン酸で抽出した分析試料は適当に希釈された後、分光光度計キューベット中で、りん酸Buffer、西洋ワサビperoxidaseと混和された (第2図)。1~3分間のベースライン測定後、50mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10mM : A<sub>234</sub> = 0.18を用いて調製) を添加し、265nmの吸光度変化がなくなるまで測定を行った。第2図は6mg%還元型AsA 0.3mlを使用した例である。既知濃度の還元型AsA (0-10mg%) を用いると、分析試料中の還元型AsAとΔA<sub>265</sub>と間に直線的な標準曲線が作成できた。なお本法の測定誤差は小さいので、実際には2ポイント測定により標準曲線が作成可能である。本法では標準還元型AsAの測定には時間を要するが、農産物試料の測定の場合にはその反応は1分以内に終了する利点を持っている。

### 3. 総ビタミンCの測定

総ビタミンC測定のための分析試料は第1図のプロトコールに従って調製され、第2図に示した還元型AsAと同じ測定系により測定された。操作上注意すべきことは、NaSH添加後、溶液のpHがpH6~7であること (Na<sub>2</sub>P

O<sub>2</sub>添加量で調整) と、臭いが少なくなるまでN<sub>2</sub>ガスを吹き付けること (これを怠ると測定にかなり時間を要する) である。測定は数分以内に完了した。

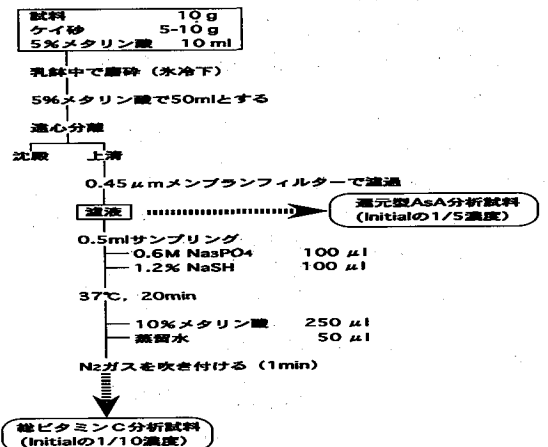
### 4. HPLC法との比較

農産物・食品のビタミンC測定法として最も信頼できるHPLC法との比較実験を行ったところ、HPLC法とほぼ同じ測定値を得ることができた。

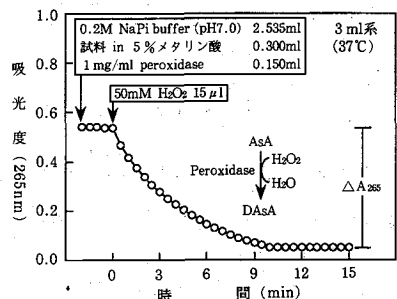
以上の結果から、本報で改良した酵素反応利用測定法は、農産物・食品中の還元型AsA及び総ビタミンC量を正確に、かつ簡易迅速に測定できると考えられた。

### 引用文献

- 1) Tsumura, F., Y. Ohsako, Y. Haraguchi, H. Kumagai, H. Sakurai and K. Ishii, *J. Food Sci.* 58:619-623, 1993.



第1図 Peroxidaseを利用した還元型AsA及び総ビタミンC測定のための試料調製法



第2図 Peroxidase法による還元型AsAの測定