

ビタミンCに関する研究（第1報）

各種の花及び葉のうちのビタミンC量に就いて⁽¹⁾

近藤研究室

農學士 満田久輝

I. 緒言

植物體は各種のビタミンを自體內にて生産して、之を代謝作用遂行の爲に利用するのである。従つて代謝作用が最も活潑に営まれる部位に於て各種のビタミンが多量に存在することは想定するに難くない。

花及び葉は植物體にとりて主要なる代謝作用が活潑に営まれる部位である。

筆者は植物體の此の部位に於けるビタミンCを定量してみた。その結果によれば、ビタミンCは花にありては雄雌蕊又は萼のうちよりも花瓣のうちに多く、葉にありては成葉よりも若葉のうちに多く存在して居る。又同一植物の花又は葉にありても色彩の變異に應じてビタミンCの含量が著しく異なることを知り得たのである。次に筆者は花及び葉のうちからビタミンCを完全に抽出し、之を出来るだけ精確に定量する爲に2~3の考案を試みて好結果を得たと思ふ。故に先づ筆者が考案した改良方法を紹介し、然る後定量結果を記載する次第である。

II. ビタミンCの定量方法

生物組織内のビタミンCを定量する方法は多數に提案せられて居るが、之を大別すれば、物理的（吸収スペクトル法）、生物學的（主として豫防治療試験）、及び化學的（主として比色法）の三法となる。何れも一長一短の得失を有して居るが、方法の簡單なのは化學的定量方法である。此の方法も亦提案せられたものが多數あるが、最もよく利用せられて居るのは、2,6-Dichlorophenolindophenol⁽²⁾⁽³⁾法、及び沃度法⁽⁴⁾である。而して此の兩方法を實施するに當りても、生物組織中からビタミンCを抽出する場合には、Trichloroacetic acid⁽⁵⁾、Metaphosphoric acid⁽⁶⁾、Sulfosalicylic acid⁽⁷⁾、又はそれらの混合液が應用せられて居る。

筆者は既報の實驗成績に徴して藤田氏及び山本氏等⁽⁸⁾に倣つてNa-Metaphosphateと硫酸との混合液を用ゐて除蛋白を行つたのであるが、抽出液の調製と比色法とを改良して極めて好都合

に實驗を行ひ得たのである。

(A) 試 薬 の 調 製 と 検 定

(1) アスコルビン酸標準液：—— 100 mg の市販アスコルビン酸 (Ch 929 Chinoin 製) を再溜水に溶解して 100 c.c. とす。

(2) 2:6-Dichlorphenolindophenol 液：—— 色素 48.4 mg を 130c.c. の蒸溜水に溶解し度々振盪しながら一夜氷室中に放置後濾過し、不溶解の色素 (殆ど無し) は 60c.c. の Sørensen 氏 磷酸緩衝液 ($\frac{1}{15}$ mol $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 40c.c. と $\frac{1}{15}$ mol KH_2PO_4 20c.c.) を加へて溶解せしめ、是を前記の濾液に合し水を加へて 200c.c. に満たす。

此の色素液 1c.c. は上記のアスコルビン酸標準液 0.108 c.c. によつて褪色したが、此のアスコルビン酸標準液中のアスコルビン酸の眞の量は沃度法によつて定量しておく必要があることは云ふ迄もない。其の爲には次の如き實驗を行つたのである。

市販アスコルビン酸の 15mg% 水溶液 5c.c. に N/200 KJO_3 2c.c. を加へ30分間放置して、 KJO_3 とアスコルビン酸とを充分に反應せしめたる後過剰に残存せる KJO_3 を次の如くにして定量したのである。即ち此の反應液に10%硫酸 1c.c. , 5%KJ. 0.5c.c., 可溶澱粉を少量加へて、N/200チオ硫酸曹達液にて滴定した。然る時は KJ. が KJO_3 の存在に於て、硫酸酸性の時沃度を遊離す。

此の沃度をチオ硫酸曹達で滴定するのである。⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾ 滴定の結果 N/200 チオ硫酸曹達 Xc.c. を要したとすれば、供用したアスコルビン酸の15mg%水溶液1c.c. 中のアスコルビン酸のmg數は $\frac{(2-X) \times 0.44}{5}$ となる。但し N/200 KJO_3 液 1c.c. は 0.44mg のアスコルビン酸と反應するのである。

筆者の實驗に依れば $X=0.45$ c.c. であつた。故に供用したアスコルビン酸の 15mg% 水溶液 1c.c 中のアスコルビン酸の眞の量は次の如くにして求め得られる。

$$\frac{(2-0.45) \times 0.44}{5} = 0.1364\text{mg}$$

夫故に此の實驗に供用した市販アスコルビン酸の純度は次の如くである。

$$\frac{0.1364}{0.15} \times 100 = 90.933\%$$

従つて此の實驗に於て用ふる色素液 1c.c. を褪色せしめるアスコルビン酸の量は、 $0.108\text{mg} \times 0.9093 = 0.0976\text{mg}$ である。以後は此の数値を利用して供試液中のアスコルビン酸量を算出

するのである。

(B) 定 量 方 法

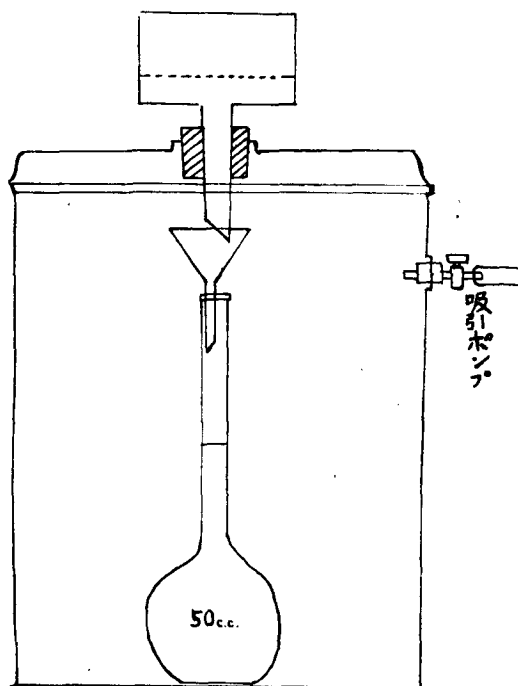
(1) 供試液の調製：—— 自然物料からヴィタミンCを抽出する爲には従来種々なる方法が試みられて居た。例へば Tillmans⁽²⁾ は 2.5% 硫酸を用ひ窒素瓦斯中にて、10 分間煮沸して抽出を試みた外、Birch, T.W., Harris, L.G. & Ray, S.N.⁽⁵⁾ は材料に砂を加へて能く磨碎し後適量の 20% 三鹽化醋酸液を加へて抽出を行つた。又 Otto. A. Bessey & C.G. King⁽¹⁰⁾ は材料に、三鹽化醋酸（動物材料）、又は熱醋酸（植物材料）を加へ洗砂と共に乳鉢中にて磨碎し後遠心分離法によつて抽出液を得たのである。然るに筆者は第1表に示すが如くに、アスコルビン酸は比較的濃厚な醋酸液中にて30分以上放置せられるとも安定であることを知り得たが故に、次の如くにして自然物料からアスコルビン酸の抽出を試みたのである。即ち試料 10g. を乳鉢中に採り洗砂と共に 0.1N 醋酸約 40c.c. を加へ充分に磨碎抽出す。然る後乳鉢中のすべてを第一圖の如く装置した Buchner's funnel 中に移し、尙充分混和して抽出に努む。然る後吸引濾過して抽出液すべてを豫め連結せる 50c.c. メスコルペンに移す。更に 0.1N 醋酸にて洗滌抽出を繰り返して全液を 50c.c. に満たす。

第1表 ヴイタミンCの醋酸中に於ける安定性

0.05% アスコルビン酸液 5c.c. 0.1N. 醋酸 5c.c. 混合後の経過時間 (分)		色素 1 c.c. を褪色するに 要せし c.c. 数
1.	5 % メタ磷酸曹達	0.67
5.	N/2硫酸等量混液	0.67
10.	5c.c. を加へ10分後	0.68
20.	滴定	0.68
30.		0.67

レモン汁 10c.c. 0.1N醋酸 40c.c. 混合後の経過時間 (分)		色素 1 c.c. を褪色するに 要せし c.c. 数
5	5 % メタ磷酸曹達	2.48
10	N/2硫酸等量混液	2.48
20	を等量加へ10分後	2.50
30	滴定	2.50
60		2.50

第 一 圖



(2) 還元型ビタミンCの定量法：—— 上記の如くにして求めた抽出液は蛋白其の他の膠質物並に色素等を含んで居るのが普通である。之等の夾雜物を除去する爲に種々なる方法が試みられて居るが、筆者は上記の如くにして調製した抽出液から a c.c. を採り、之に5%メタ磷酸曹達液とN/2の硫酸との等量混液 a c.c. を加へ、10分間室温に放置すれば蛋白類は沈澱し、アスコルビン酸は安定するが故に濾過後色素液を用ゐてアスコルビン酸を滴定するのである。然るに此の濾液は着色して滴定を明瞭ならしめざる場合が屢々である。斯かる場合には除蛋白と共に脱色することが肝要である。それには従来様々の工夫が試みられて居るが未だ簡明な方法がなかつたのである。

然るに筆者は第2表に示すが如くに種々の脱色剤を試用した處、酸性白土を用ふればアスコルビン酸は安定であつて而も脱色の目的を能く達し得ることを發見したのである。故に自然物料から醋酸を用ゐて抽出した液が着色して居る場合には、その a c.c. に對して5%メタ磷酸曹達液とN/2硫酸との等量混液 a c.c. と少量の酸性白土とを加へて攪拌し10分間放置後吸引して其の濾液について0.001N 2:6-Dichlorophenolindophenol 液を滴定すれば還元型のビタミンCを定量し得ることとなる。

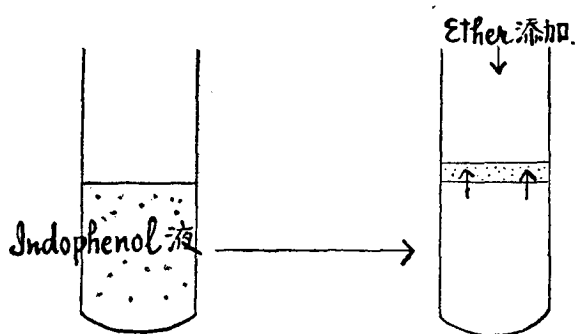
第2表

0.05% アスコルビン酸液 5c.c. 5% メタリン酸曹達液 5c.c. 5% 珪酸 等量混液 5c.c. (植物色素)						
両液混合 (十分間室温放置)						
酸性白土	ノリット	血炭	カオリン	白陶土	珪藻土	対照液 (植物色素不含)
(吸引濾過)						
無色透明	無色透明	無色透明	褐色	褐色	褐色	無色透明
0.001N Indophenol 1c.c.を褐色す時に要せし濾液のcc数	0.44cc.	酸化型となる			滴定不可能	0.43cc

(3) 酸化型ビタミンC定量法：——ビタミンCには還元型と酸化型(Dehydroascorbin酸)の兩型が存在することは既に知られた事實であつて、兩型ともほぼ同一程度の抗壞血病力を有するが故に此の兩型のビタミンCを定量する事は當然必要となつて來たのである。(11) Emmerieは硫化水素に依り酸化型を還元型に變じて兩型のビタミンCを定量する法を提案し、斯界に多大の貢獻をなしたが、筆者は一部は藤田氏(12)に従つて次の如くにして兩型のアスコルビン酸を定量したのである。即ち試料 8g.に 2N 鹽酸 10c.c.を加へ、更に 20% 醋酸第二水銀液 14c.c.水 6c.c.を加へ乳鉢中で洗砂と共に充分粉碎し、速かに其のすべてを Buchner's funnel 中に移し、吸引濾過し濾液 9.5c.c.に 50% 醋酸曹達液 4c.c.と醋酸鉛液 (20.35g 醋酸鉛を水に溶解して 100c.c.となす) 0.5c.c. とを加へ、速に硫化水素を通ずる事 1時間 (以上で 7 倍稀釋)。密栓して氷室に一夜放置し、其の濾液に窒素瓦斯 (又は炭酸瓦斯) を 1 時間通じたる後 (醋酸鉛紙にて檢定)、之に磷酸鹽緩衝液 (pH 1.43) を等量加へ、速に 0.001N の 2:6-Dichlorophenolindophenol 液に對して滴定す。然る時は兩型のアスコルビン酸の含量を定量し得ることとなるが故に、そのうちより先に定量した還元型のアスコルビン酸量を差し引けば酸化型アスコルビン酸の量となる。

(4) 比色滴定操作の一改良：——Indophenol 指示薬を用ゐてビタミンCを定量するに際し、指示薬の褪色點を明確に讀み取る事は甚だ難事である。特に供試液が着色してゐる時は—

層不精確となるのであるが、筆者の方法に従つて酸性白土を用ゐて脱色しても尙且つ滴定の最適點を明知することは困難である。筆者は Indophenol が水よりもエーテルの方に易く溶解する事實を知り、之を比色滴定に應用すれば従來種々考案せられてゐる複雑なる比色裝置を使用



するよりも遙に簡便に最終滴定點を正確に認め得ることを知つた。即ち終末に近い Indophenol 液に少量のエーテルを添加して振盪後靜置すれば、猶殘存せる色素は直にエーテル層に移行して上昇する。之によつて滴定の完否を極めて正確に知り得るのである。

Ⅲ 實 驗 成 績

(a) 各種花の中のビタミンC量

上記の定量法を應用して各種の花のうちのビタミンCを定量したのである。その結果を表示すれば第3～5表の通りである、第3～4表に示した結果について見れば、花のうちにはビタミンCが可なり多量に存在して居ることがわかる。就中油菜、牡丹及び燕子花の花のうちには多いのみならず、特に花瓣のうちに多量に存在して居ることは植物體自身にとりて意義あることと思ふ。又第5表の結果によれば花の色彩とビタミンC量との間に相關關係を見出し得るのである。即ち、スキートピー、三色堇、カンナ、及び鶏頭等に於ては花の色彩が相違しても

第3表 各種花のうちの還元型ビタミンC量

試 料	還元型ビタミンC量(mg%)
アブラナ 花 瓣 雌雄蕊と萼	Brassica chinensis, L.var. oleifera, Mak. 39.84 65.95 22.31
大 根	Raphanus sativus, L.var. macropodus, Mak. 32.78
豌豆	Pisum sativum, L. 37.65
八 重 櫻	Prunus. 14.90
苺	Fragaria Grandifolia, Ehrh. 26.38
薔 薇 白花 黄花	Rosa centifolia, L. 22.18 26.44
牡丹 花瓣 雌雄蕊と萼	Paeonia Moutan, Ait. 106.90 47.04
チューリップ	Tulipa Gesneriana, L. 61.04
紫 藤	Wistaria chinensis, var multiguga. 15.62

(尙材料は採集後速かに定量に供せり。)

デジタリス (*Digitalis purpurea*, L.), 梨 (*Pirus serotia*, Rehd.), 蒲公英 (*Taraxacum platycarpum*, Dahlst.), 中の還元型ヴィタミンC量は痕跡的なり。

第4表 各種の花のうちのヴィタミンC量 (mg%)

試 料	種ヴィタミンC	還元型	酸化型
南 瓜 <i>Cucurbita pepo</i> , L. var. Makino.	46.16	10.82	35.34
百合(白) <i>Lilium</i> .	44.08	2.44	41.64
サ ツ キ <i>Rhododeudron latelitium</i> . Planch.	36.15	11.48	24.67
ダリヤ(赤) <i>Dahlia</i>	19.52	3.05	16.47
アヤメ(淡紫) <i>I. Sibirica</i> . L. var. <i>Orientalis</i> Maxim.	42.04	37.54	4.51
菖蒲(桃色) <i>Iris Kaempferi</i> . Sieb.	55.54	9.76	45.78
燕 子 花 <i>I. laevigata</i> , Fisch.	85.40	68.25	17.15
アデサキ(藍色) <i>Hydrangea opuloides</i> , Steud. var. <i>Thunbergii</i> , Mak.	48.45	2.57	45.88
朝顔(淡紫) <i>Pharbitis Nil</i> . Chois.	26.03	3.25	22.77
ノウゼンカズラ <i>Campsis chinensis</i> , Voss.	47.44	0	47.44
菊 (白) <i>Chrysanthemum sinensis</i> , Sav.	32.61	2.27	30.34
アブラナ <i>Brassica chinensis</i> , L. var. <i>oleifera</i> , Mak.	86.48	39.84	46.64

第5表 花の色彩とヴィタミンC量(mg%)

種類	色 彩	種ヴィタミンC量	還 元 型	酸 化 型
スキートビー	白	56.00	20.02	35.98
	淡 紫	58.64	4.59	54.05
	濃 紫	60.73	0	60.73
	赤	70.43	0	70.43
三色堇	黄	133.96	114.82	19.14
	白 紫	122.00	83.42	38.58
	紫	106.75	46.48	60.27
カンナ	黄	35.22	1.78	33.44
	赤	44.08	1.22	42.86
鶏 頭	赤	89.89	6.73	83.16
	黄	89.31	7.23	82.08
	ピンク	91.09	10.17	80.93
	橙	75.91	6.10	69.81

総ヴィタミンC量には著しい差異を見出し得ないが、上記の花を通じて色彩が赤又は紫になれば

ば酸化型が増加して還元型が減じ、之に反して白又は黄になれば酸化型が減じて還元型が増加して居る。而も斯くの如く色彩の變異に應じて兩型のビタミンCが拮抗的に増減するけれども兩型の總和は色彩の變異に據らずに略々相同じきことは花瓣のうちの酸化、還元が色彩の變異に密接なる關係あることを物語る事實であつて、植物生理化學上眞に興味あることと思はれるのである。

(b) 各種の葉のうちのビタミンC量

茶葉又は葉菜のうちにビタミンCが多量に存在することは既知の事實であるが、筆者は食用又は嗜好用に供せられざる葉についてもビタミンCを定量して第6~8表に掲げるが如き結果を得たのである。之を通覽するのに葉のうちに總じて花のうちよりも多量にビタミンCが存在してゐることがわかる。第6表に示す如く、玉露又は紅茶に於てC量は著しく少い。之は玉露にありては日光の直射を防ぎたる覆下茶を原料となすため、原料そのもののうちのC量が少ないことに原因し、(之に關しては果實中のC量と日照との關係についての拙著を續報して詳論する豫定である。)紅茶にありては製造中 Ascorbic acid oxydase を破滅する機會なきためにビタミンCが消滅することに原因するのである。之に反して煎茶、番茶には茶の生葉(第7表参照)中のC量に劣らざる量に於てCが存在して居る。之は製造の初工程に於て蒸熱して茶葉中の Ascorbic acid oxydase を死滅せしめる結果としてビタミンCが消滅せずに残存するからである。

第6表 茶のうちのビタミンC量(mg%)

種 類	總ウイ タ ミ ン C	還元型	酸化型
煎 茶	148.52	17.75	130.77
玉 露	25.30	8.56	16.74
番 茶	119.86	102.74	17.12
紅 茶 (リアトン)	15.44	0	15.44

第7表のうちの藤の葉についての實驗に

よれば若葉は成葉に比して遙に多量のCを含有して居ることがわかる。もとより此の種の實驗をば別種の植物葉について反復證明すべきであるが此の藤の葉についての結果によつてもビタミンCが植

第7表 各種の葉のうちのビタミンC量(mg%)

種 類	種 類 名	總ウイタ ミ ン C	還 元 型	酸 化 型
鶏 頭	Celosia cristata, L.	136.64	16.05	120.59
ヒ ャ	Amaranthus mangostanus, L.	148.52	43.57	104.95
茶 生 葉 (天葉)	Thea sinensis, L.	145.36	65.72	79.64
ア ブ ラ ナ	Brassica chinensis, L. var. oleifera, Mak.	108.44	32.53	75.91
藤 (若 葉 成 葉)	Wistara chinensis, var. Multiguga.	270.03 142.33	166.55 69.22	103.48 73.11

※其の他薔薇のうちには還元型Cが21.64mg%存在することを見出したが、八重櫻、デジタリスの葉のうちには還元型Cを痕跡的に見出したに過ぎない。

物の生長促進作用に對して密接な働を營むことが相像せられて Synnöve v. Hausen⁽¹⁴⁾ の所説即ちビタミンCが高等植物に對して成長促進作用を擔ふことを認容し得られるわけである。

又第8表に示してある雁來紅についての實驗によればビタミンCに關して幾多の興味ある事實を指摘し得るのである。雁來紅は各種類を通じて葉のうちに特に多量のCを含有して居る。而も何れも還元型よりも酸化型のCを多量に貯へて居るのである。又雁來紅は成育につれて色彩を變異するのである。一枚の葉について觀察すれば色彩の變異は葉の基部から始まつて次第に先端部に及び、一本の雁來紅全體について見れば色彩の變異は上端部から始つて次第に下端部に及ぶのである。例へば濃紅種にありては濃紫色の葉は成育が進むにつれて上端部の葉から赤變して次第に下端部に及び、而も一枚の葉の色彩變異は基部から先端部に及ぶことは前言の通である。

第8表 雁來紅 (*Amarantus tricolor*, L.)
のうちのビタミンC量(mg%)

而して此の色彩の變異と共にC量も亦變異(減少)することは第8表が示す通である。

雁來紅の色彩の變異は Chlorophyll の減少に基くのであつて、色彩が變異した葉の部分は葉細胞の活作用が減退して居るわけである。斯かる葉の部分にC量が減少して居ることは、一面に於てビタミンCが植物細胞の活作用に對して如何に有意義であるかを物語つて居ることと思ふ。

種 類		總ウイ タ ミ ンC	還 元 型	酸 化 型	
紫（濃紅種）		216.88	33.66	183.22	
綠（黃色種）		155.27	45.40	109.87	
三 色 種		284.66	80.00	204.66	
淡紫(有穗種)		200.44	72.30	128.64	
紅色ヤナギバ		216.88	90.37	126.51	
濃 紅 種		244.00	92.95	151.05	
		170.80	59.15	111.65	
黃 色 種		248.43	85.61	162.82	
		203.94	71.24	132.70	
三 色 種		195.20	99.59	95.61	
		131.38	75.66	55.73	
濃 紅 種		赤	148.52	42.81	105.71
		紫	187.17	84.14	103.03

要 約

- (1) 自然物料からビタミンCを抽出するに當り醋酸を用ふれば効果的であることを證明した。
- (2) 除蛋白にはメタ磷酸曹達と硫酸との混液を用ゐたが、供試液の脱色のためには、酸性白土を用ふればビタミンCを安定に保ちながら充分よく脱色の目的を達し得ることを發見した。
- (3) Indophenol 液に C液を滴定する場合に滴定の終末を明知する爲には、微量のエーテルを用ふることとした。即ち滴定が終結したと思へる Indophenol液に微量のエーテルを注加すれば、残存せる Indophenol はエーテル層に移行するが故に滴定の未完を知り得るわけである。

(4) 各種の花のうちには何れも多量のビタミンCが存在して居ることを明にし、就中花瓣の中に特に多量に存在することを知つた。

(5) 同一植物の花にありては花瓣の色彩の變異と兩型のビタミンC量との間に拮抗關係があることを見出した。

(6) 各種の植物の葉のうちには花に比して遙に多量のビタミンCが存在することを明にした。

(7) 就中若葉中には成葉中よりも多量にCが存在することを藤の花について證明し、Cが植物に對して生長促進作用を營むことの一例證となした。

(8) 玉露並に紅茶のうちにCが少く、煎茶並に番茶のうちにCが多量に存在する理由を Ascorbic acid oxydase の機構と日照と ビタミンCの關係より解明した。

(9) 篤來紅のうちにはCが特に多量に含まれて居ることを實驗し、且つ色彩の變異とC量との間に相關關係があることを見出し、其の成因を明にした。

終りに臨み終始御懇雁なる御指導を賜りし近藤金助教授、並に材料提供に多大の利便を與へられし木原均教授に深甚の謝意を表す。

V 文 獻

- (1) 第十三回日本生化學總會 (昭和12年10月26日) に於て講演
- (2) Tillmans, Z. unt. Lebensmitt. **60**, (1930)34, **63** (1932)1, 21, 241, 267, 276,
- (3) Harris. L.G. & Ray. S.N., Biochem. J. **27**, (1933)303, 580,
- (4) Szent-Györgyi, Biochem. J. **22** (1928)1387,
- (5) Birch. T.W., Harris. L.G. & Ray. S.N., Biochem. J. **27** (1933)590.
- (6) 藤田, 岩竹, 東京醫事新誌 **2892** 1,(昭和9年)
- (7) 藤田, 海老原, " **3010** 1,(昭和11年)
- (8) 古武, 山本, 辻本, 政山, 大阪醫學會雜誌 **33**下 (昭和9年)3529
- (9) 山本, 西垣, " **33**上 (昭和9年)1033
- (10) Otto. A.Bessey & C.G. King, J. Biol. Chem. **103**, (1933)687,
- (11) Hirst. E.L. & Zilva. S.S., Biochem. J. **27**, (1933)1271
- (12) Emmerie. A. & Eekelen. M., Biochem. J. **28**, (1934)268, 1153, **30** (1936)25,
- (13) 藤田, 海老原, 東京醫事新誌 **3011** (昭和11年)1.
- (14) Synnöve. v. Hausen, Biochem. Z. **288**, (1936)378,

(昭和13年7月1日)