

# ホウレンソウに含まれるアスコルビン酸の定量方法の確立

愛媛県立松山南高等学校 ビタミンC班

河瀬茉結 黒田耕生 澤原仁愛 富田晃宏 指導教諭 目見田拓

## 1. はじめに

伊藤ら (2019) によって、異なる光条件下で培養したシアノバクテリアに含まれる AsA の定量結果から、AsA 生合成に光が関与していることが示唆された<sup>1)</sup>。近年、サプリメントなどから栄養を摂取している人が多くみられる<sup>2)</sup> (図1)。

その一方で、新型コロナウイルス感染拡大により、食生活で野菜や果物を食べることへの意識が高まっている<sup>3)</sup> (図2)。

そこで、先行研究の結果を野菜に応用し、栄養価を高めた野菜の栽培を行うことで、青果からのより効率的な栄養摂取を可能にし、脱サプリメント社会を実現したいと考えた。応用実験の中で必要になる AsA の定量方法には、伊藤ら (2019) と同様にヨウ素滴定を用いようとしたが、抽出液に細胞片が漂い、吸光度が上手く測定できないことや、溶液に色がついていて、滴定終点の判断が困難であること (図3) などが問題となった。そのため、本研究では、野菜の抽出液に含まれる AsA の定量方法の確立を研究の目的とした。

## 2. 研究方法

### (1) 本研究で用いた試薬

- 10%塩化ナトリウム 10ml
- $1.6 \times 10^{-3}$  mol/L ヨウ素溶液

(ヨウ素 0.45g、ヨウ化カリウム 0.9g をエタノール 24ml に溶解し、100ml にメスアップして作成したヨウ素溶液を 10 倍希釈したものを、デンプン溶液 10ml と 0.01mol/L のチオ硫酸ナトリウム水溶液 10ml の混合液に滴下し、酸化還元滴定により濃度を特定した。)

### (2) 試料の検討

栽培、破碎が容易であり、AsA 含有量の高い野菜を食品標準成分表<sup>4)</sup>をもとに検討し、ホウレンソウを研究対象として選んだ。冬採れのホウレンソウに含まれる AsA は一般的なレモンの果汁に含まれる AsA の約 1.2 倍である (図4)。

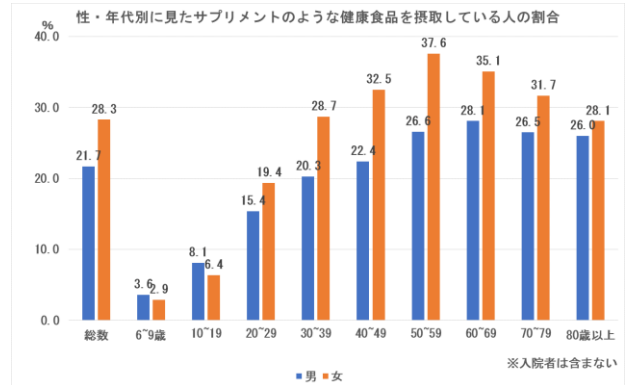


図1 サプリメントの摂取量の変化

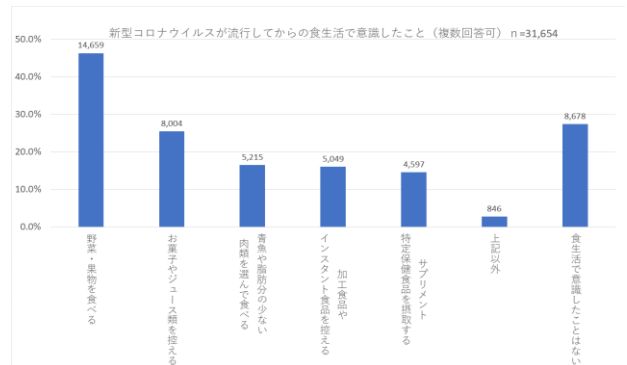


図2 食生活で意識したことのアンケート結果



図3 ホウレンソウ抽出液

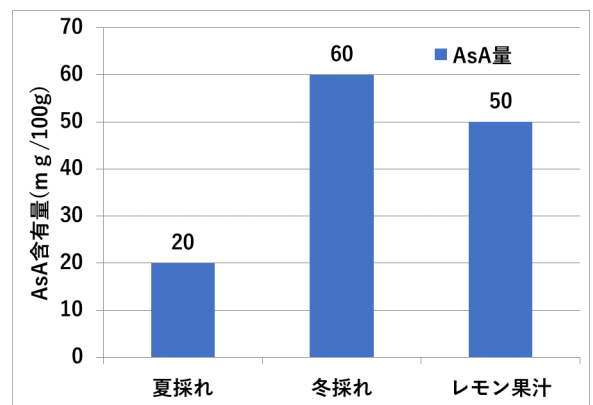


図4 ホウレンソウ (夏採れ・冬採れ) 100g とレモン果汁 100g に含まれる AsA 量の比較

### (3) 定量方法の検討

伊藤ら (2019) の AsA 定量方法を参考に以下の方法でホウレンソウ中の AsA の定量を試みた。

葉脈を取り除き、1cm 角にちぎったホウレンソウの葉 2, 3 枚 (10g 程度) に 10%NaCl 水溶液 10ml を加え、乳鉢と乳棒を用いて破碎を行った。次に、ろ過を行い、AsA を抽出した (図 5)。その後、抽出した AsA 溶液にビュレットを用いて  $1.6 \times 10^{-3}$  mol/L のヨウ素溶液を滴下し、ヨウ素デンプン反応によって AsA を定量した。

実際にこの方法で定量実験を行ったところ、すでに抽出液にホウレンソウの緑色がついているため、目視による反応終点の判断が難しいことが分かった (図 6)。また、滴下するヨウ素溶液の濃度が薄く、ビュレットでの細かな操作による滴下では、終点が安定しないことも分かった。(図 7)

そこで、私たちは反応前後の色の変化に注目し、分光光度計 (日立 U-2001) を用いて、ヨウ素溶液滴下前後の溶液の吸収波長の違いを調べることで、終点判断の基準となる波長を決定した。(結果②)このとき、抽出液に細胞片が漂っていて、吸光度が上手く測定できなかったため、ろ過を行った後に遠心分離 (VS-100N) を行うこととした。(結果①)そして、マイクロピペット (ケニス BDL-1000) を用いて 500 $\mu$ L ヨウ素溶液を滴下するごとに (結果③)、分光光度計を用いて終点における波長の吸光度変化を測定し、吸光度が変化するまでに滴下したヨウ素溶液の量からホウレンソウに含まれる AsA 量を求めることにした (結果④)。ただし、吸光度を測定するごとに、試料はコニカルビーカーに戻した。



図 5 ヨウ素溶液滴下前のホウレンソウ抽出液

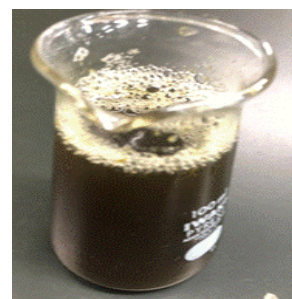


図 6 ヨウ素溶液過剰滴下後のホウレンソウ抽出液

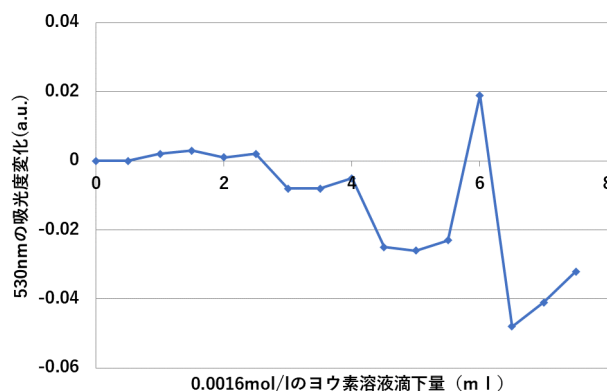


図 7 ヨウ素溶液滴下量と吸光度の変化

## 3. 結果

### (1) 細胞片の除去

遠心分離をすることで、細胞片が沈殿し、上澄みだけを抽出できた (図 8 ~ 図 11)。

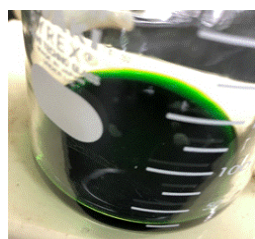


図 8 遠心分離前のホウレンソウ抽出液



図 9 遠心分離



図 10 遠心分離後のホウレンソウ抽出液と沈殿した細胞片



図 11 遠心分離後のホウレンソウ抽出液の上澄み

## (2) ヨウ素滴定における終点判断基準の確立

ヨウ素溶液を滴下する前のハウレンソウ抽出液と、 $1.6 \times 10^{-3}$  mol/L のヨウ素溶液を過剰量滴下しヨウ素デンプン反応により青紫色を示すハウレンソウ抽出液について、350nm から 800nm における吸収スペクトルを調べた (図 12)。そこで、2つの溶液における吸収波長の差に注目し、ヨウ素デンプン反応による青紫色の極大吸収波長が 530 nm であることがわかった。

## (3) ビュレットを用いたヨウ素滴定の結果

図 13 に示すように、ビュレットを用いて  $500 \mu\text{L}$  ずつ  $1.6 \times 10^{-3}$  mol/L のヨウ素溶液をハウレンソウ抽出液に滴下した際は、ヨウ素溶液を過剰量加えても吸光度が変化せず、正しい滴定を行うことができなかった。

そこで、滴下するための器具をビュレットからマイクロピペットに変更し、一定量のヨウ素溶液を正確に素早く滴下できるようにした。すると、2.0 mL 滴下したところで、吸光度が変化した (図 14)。

## (4) 吸光度変化を用いたヨウ素滴定の結果

図 13 に示すように、デンプン溶液ではヨウ素溶液滴下直後から吸光度が変化したのに対し、ハウレンソウ抽出液では、 $1.6 \times 10^{-3}$  mol/L のヨウ素溶液を 2.0 mL 滴下するまで吸光度の変化が見られなかったため、この実験では  $1.6 \times 10^{-3}$  mol/L のヨウ素溶液を 2.0 mL 滴下した所を反応の終点とした。

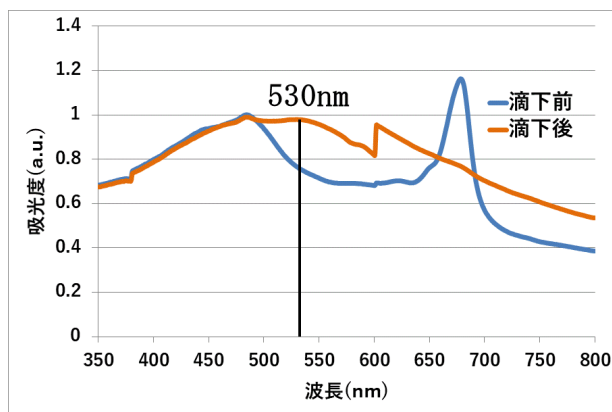


図 12 ヨウ素溶液滴下前後の吸光度変化

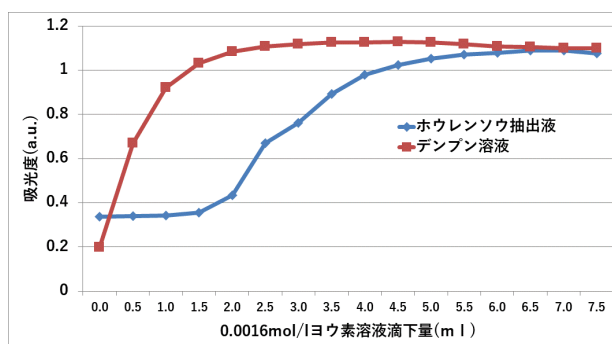


図 13 マイクロピペットによるヨウ素滴定

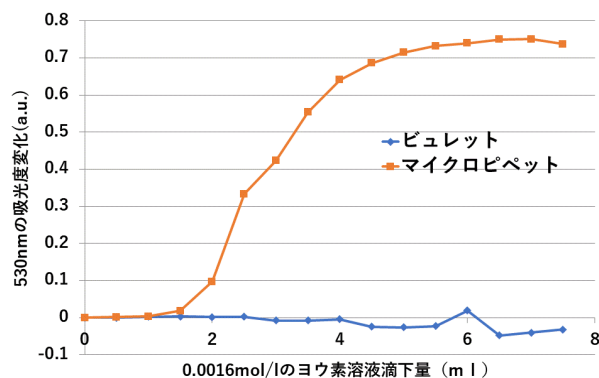


図 14 ヨウ素溶液の滴下量と 530nm の吸光度変化

## 4. 考察

ヨウ素溶液過剰滴下後の溶液では、530nm に極大吸収波長が認められたため、この波長をヨウ素デンプン反応による青紫色の波長と定めた。ヨウ素溶液の滴下による 530nm の吸光度変化を測定することで、反応の終点を判断することができる。

ビュレットを用いた従来のヨウ素滴定では、ヨウ素溶液を過剰に滴下しても吸光度が変化することがなかった。これは、実験に用いたヨウ素溶液の濃度が、 $1.6 \times 10^{-3}$  mol/L と非常に薄いため、紫外線による影響を受けやすく、数滴ずつの滴下が必要なビュレットを用いる方法では、結果が安定しないと考えられる。そこで、操作が単純で、再現性が得やすいマイクロピペットを用いて、 $500 \mu\text{L}$  ずつ滴下することで、光や時間経過によるヨウ素溶液濃度変化への影響を少なくすることができた。

その結果、図 14 が示すように、ヨウ素溶液を 2.0 mL 滴下するまではハウレンソウ抽出液では、吸光度の変化が抑えられている。これは、ハウレンソウに含まれる AsA が還元剤として働いたことを示唆している。今回の方法を用いることで、ハウレンソウに含まれる AsA の定量が可能となった。

## 5. 今後の課題・展望

私たちは、ホウレンソウなどの高等植物においても先行研究<sup>1)</sup>と同様に、光の強度とその照射時間を変化させることでAsA含有量を意図的に変動させることができるのではないかと考えている。

今回の実験では、検量線(図15)を用いてAsAを定量しようとした。しかし、ホウレンソウには様々な成分が含まれているため、AsA以外の抗酸化物質も含まれているのではないかと考えられる。したがって、すべての還元物質が反応するヨウ素滴定では

AsA以外の抗酸化物質も反応してしまい、AsAの濃度を検量線で特定することは困難であると思われる。

そこで、今後は、ヨウ素溶液と反応するすべての抗酸化物質を機能が同じものであると考え、ヨウ素滴定時のヨウ素溶液滴下量の違いから相対的な抗酸化物質の量の変化を見る。

この方法を用いて、野菜の持つAsA量を増加させるための光条件の検討を進めていきたい。そして将来的には、栄養価の高い野菜の栽培や輸送・保存方法の確立を目指したい。

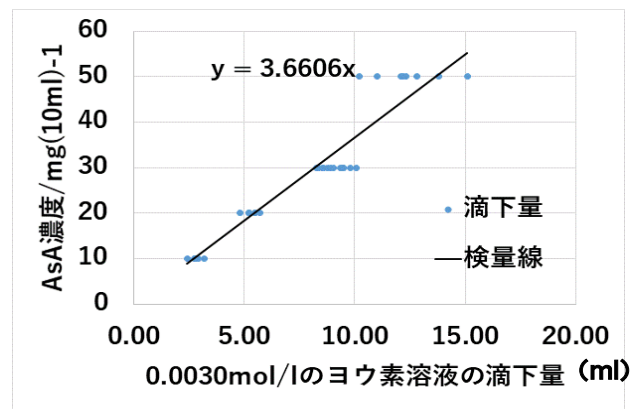


図15 AsA 検量線

## 6. 参考文献

- 1) 伊藤祐希・藤原諒(2019)「異なる光条件下におけるシアノバクテリアに含まれるアスコルビン酸量に関する研究」愛媛県立松山南高等学校
- 2) 厚生労働省(2019)「国民生活基礎調査の概況 III 世帯員の健康状況」
- 3) 住友生命保険相互会社(2020.8.5)「With コロナに高まる健康意識」
- 4) 文部科学省「日本食品標準成分表 2015年版(七訂)追補 2018年」