

アスコルビン酸の減少に与える pH の影響について

静岡市立高等学校 科学探究科

3 年 竹内日和 稲葉惇 東理実優

1 研究動機

昨年度、ペットボトルお茶飲料に含まれるビタミン C（還元型アスコルビン酸：還元型 ASA と表記する）の減少について研究し、pH 約 6 のお茶飲料では 3 日間で 10 % 程度の還元型 ASA が減少したのに対し、pH 約 3 のヘルシアウォーターではまったく減少しないという結果を得た。よって本年度は、還元型 ASA の減少に与える pH の影響について研究することにした。なお、還元型 ASA 以外のカテキン等の影響を排除するために、実験では試薬アスコルビン酸のみを用いることにした。

また研究を進めるうちに、「還元型 ASA が減少したとしてもそれは酸化型に変わっただけであり、全 ASA 量は変化していないのではないかと疑問を持つようになった。このことについても研究することを本年度の目標とした。

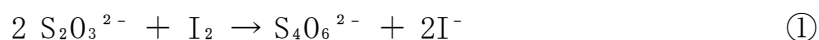
2 仮説

昨年度の実験結果から、「溶媒の pH が低いほど還元型 ASA は減少しにくくなる」と仮説を立てた。この仮説については実験 2、3 で検証し、さらに実験 4 以降では新たに「還元型 ASA は減少しても酸化型 ASA に変わるだけで全 ASA（還元型 ASA+酸化型 ASA）の濃度は変化しない」と仮説を設定して検証することにした。

3 実験 1 <様々な pH 環境下における還元型 ASA の減少について>

(1) ヨウ素滴定の原理

アスコルビン酸の濃度は、以下の②による「ヨウ素滴定」で求める。なお、ヨウ素ヨウ化カリウム溶液中における I_2 の濃度は、以下の①により、予め濃度既知のチオ硫酸ナトリウム水溶液で滴定して決定しておく。なお、終点はヨウ素デンプン反応により求めた。



(2) 滴定で使用した試薬

ヨウ素、ヨウ化カリウム、1.0 mmol/L チオ硫酸ナトリウム aq、1% デンプン aq

(3) 溶液の調整方法

- ① 塩酸と水酸化ナトリウム水溶液を使用し、pH メーターを見ながら、調整したい pH より pH が 1 大きくなるような溶液を 50mL 調製した。
- ② ①に、100mL で 6.5mmol/L になるように還元型 ASA を加えた。
- ③ pH メーターを見ながら、100mL ビーカーの 80mL でその pH になるように調整した。
- ④ メスフラスコに溶液を移し、イオン交換水で 100mL にした。

(4) 実験手順

- ① pH1, 4, 7, 9 となるように (3) の方法で還元型 ASA 溶液を調整した。(強アルカリ条件下ではヨウ素デンプン反応を示さないため、pH11、13 の試料は作成しないことにした。)
- ② 0, 2, 4, 6, 8 日後の①を、ヨウ素滴定を用いて定量した。各試料は、恒温器 30℃の中に放置した。

(5) 実験結果

pH の値を 8 日間にわたって保つことは難しく、特に pH 7, 9 に調整した溶液の pH は、2 日後以

降、大きく変わってしまった。表 1 中の blank には、6.5 mmol/L 還元型 ASA 水溶液（溶媒は水）の pH 変化を示した。溶媒を緩衝溶液に変更し、もう一度同じ実験をすることにした。

溶液のおおよその pH	1	4	7	9	blank
溶液調製直後の pH	1.12	4.77	6.25	9.17	3.46
8 日後の pH	0.97	3.39	4.40	6.54	3.24

表 1 各試料の pH 変化

4 実験 2 <様々な pH 溶媒（緩衝溶液）中における還元型 ASA の減少について>

溶媒を緩衝溶液に変え、実験 1 と同じ実験を行った。なお、実験は 3 回繰り返して実施した。

(1) 実験に用いた緩衝溶液

- ・pH 1.68 標準液 0.05 mol/L 四シュウ酸カリウム水溶液
- ・pH 4.01 標準液 0.05 mol/L フタル酸水素カリウム水溶液
- ・pH 6.86 標準液 0.025 mol/L リン酸一カリウム／0.025 mol/L リン酸二ナトリウム水溶液
- ・pH 9.18 標準液 0.01 mol/L ホウ酸ナトリウム水溶液

(2) 溶液の調整方法

緩衝溶液 pH1.69, 4.01, 6.86, 9.18 を溶媒に、6.5mmol/L ASA 溶液を調整した。

(3) 実験結果

① 試料の pH の変化

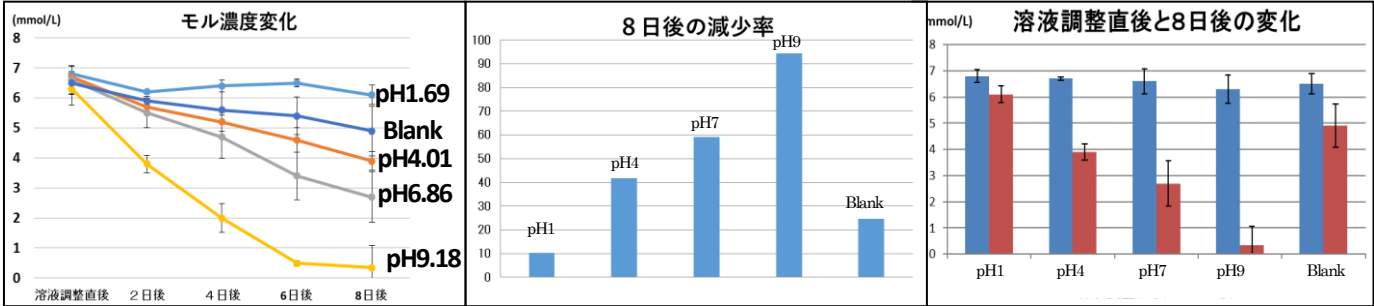
緩衝溶液を用いたことにより、8 日間、試料の pH をほぼ一定に保つことが出来た。

緩衝溶液の pH	1.69	4.01	6.86	9.18	blank
溶液調製直後の pH	1.35	3.79	7.50	10.18	3.29
8 日後の pH	1.74	3.74	6.44	8.01	3.18

表 2 各試料の pH 変化

② 還元型 ASA の濃度変化

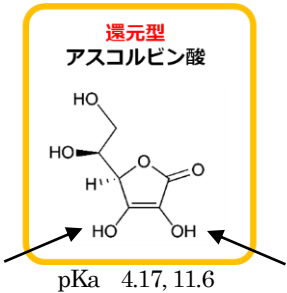
結果をグラフ 1 にまとめた。pH が高くなるほど ASA がより減少していることがわかる。ASA 水溶液 (blank) の pH は約 3 であるが、この試料の濃度変化が pH1.69 と pH4.01 のグラフの間にあることから、この実験結果は信頼できるものと考えられる。



グラフ 1 還元型 ASA の濃度変化

(4) 考察

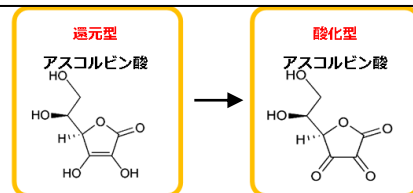
実験 2 では各試料の pH を保つことができ、かつ再現性のある結果を得ることができた。酸性環境下で還元型 ASA がよく保たれた理由について考察する。還元型 ASA の構造は右図のとおりであり、pKa の値も酢酸と同程度である。酸性条件下では矢印部のヒドロキシ基の H が溶媒の影響を受けにくい、塩基性条件下では、溶媒の影響を受けやすくなるのではないかと考えることが出来る。



さて、ここで気になるのは、還元型 ASA はその後、すべてが酸化型 ASA になっているのだろうか、ということである。2 仮説で述べたとおり、新たに次の仮説を立てて実験することにした。

仮説「還元型 ASA は減少しても酸化型 ASA に変わるだけで、全 ASA（還元型 ASA+酸化型 ASA）の濃度は変化しない」

ヨウ素滴定法では「還元型 ASA」しか定量できないので、「還元型 ASA」と「全 ASA」を定量できるヒドラジン法を用いて ASA を定量した。（還元型 ASA と還元型 ASA の合計を全 ASA と表す。）5に、ヒドラジン法の原理を説明する。



5 ヒドラジン法

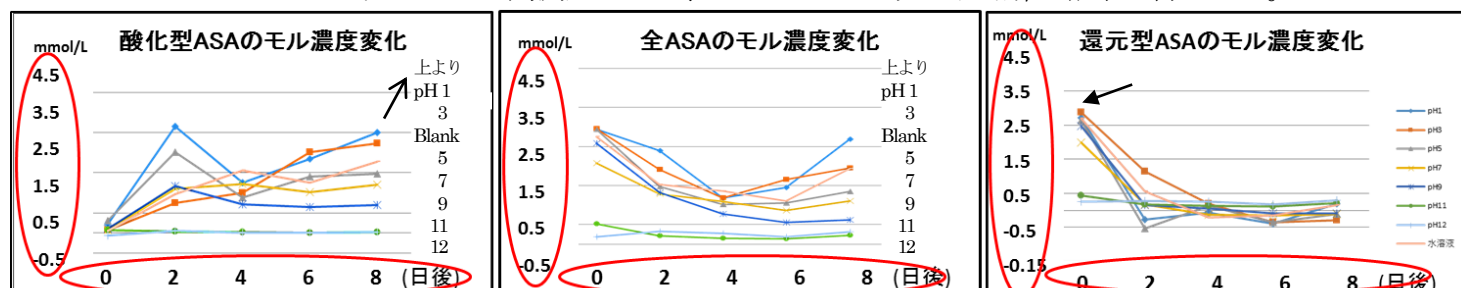
ヒドラジン法では、還元型 ASA を強制的に酸化させて酸化型 ASA に変えることにより、全 ASA 量と酸化型 ASA 酸量を定量することができる。還元型 ASA 量は、全 ASA 量から酸化型 ASA 量を引くことにより、間接的に定量することが出来る。

<実験手順>

- ① 0.65mmol/L ASA 溶液を調整した。（これまでの実験では 6.5mmol/L であったが、吸光度が大きすぎるため 1/10 の濃度に変更した。）
- ② ①の ASA 溶液 150 μ L を培養プレートのセルに入れた。
- ③ ②に、0.2%インドフェノール溶液 600 μ L を加えた。（色が消えなくなるまで滴下。）酸化型 ASA を定量する場合はこの操作を省いた。
- ④ ③に、2%チオ尿素 - メタリン酸溶液 600 μ L、DNP 溶液 300 μ L を加えた。DNP 溶液とは 2,4 ジニトロフェニルヒドラジンを 4.5mol/L の硫酸に溶かしたもので、インドフェノールによる酸化が進みすぎないように（ジケトグルコン酸で止めるために）加えた。
- ⑤ 60℃に設定した恒温器に 30 分間放置した後（色素の生成）、氷水中で冷却。
- ⑥ 濃硫酸 1.5mL を④に加えた後（色素を溶かす）、室温で 30 分放置。
- ⑦ 分光光度計 APEL PD-303S 500 nm で吸光度を測定。
- ⑧ 予め検量線を作成しておき、⑦の吸光度から濃度を求める。検量線には、0, 25, 50, 75, 100 μ g/mL の ASA-メタリン酸溶液を使用した。下線部は、還元型 ASA を 5%メタリン酸 aq に溶かした溶液のことである。

6 実験3<ヒドラジン法の確立に向けて>

実験2の方法で、緩衝溶液を溶媒にした 0.65mmol/L の還元型 ASA 溶液を調整し、実験5の手順に基づいてヒドラジン法にて8日間測定したが、グラフ2のような不可解な結果が得られた。



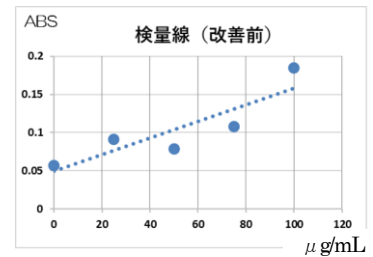
グラフ2 還元型 ASA の濃度変化（ヒドラジン法・改善前）

(1) 問題点

- ① 0.65 mmol/L になるように還元型 ASA 溶液を調整しているにも関わらず、溶液調整直後の還元型 ASA のモル濃度が 3.2 mmol/L と 10 倍近く大きい濃度になってしまった。
- ② 酸化型 ASA の測定値が、全 ASA の測定値より大きくなってしまった。結果として、還元型 ASA のモル濃度がマイナスの値になってしまった。

- ③ 吸光度が、時間を追うごとに下がってしまった。
 ④ 検量線を見直したところ、右図のように測定値にばらつきがあるにも関わらず、無理やり検量線を引いていた。

ヒドラジン法は食品に含まれるビタミンC量を定量するものであることから、食品を想定した試薬濃度や量が設定されていて、0.65mmol/LのASA溶液には適さない方法であることも考えられる。そこで問題点をひとつずつ検証し、この実験に適したヒドラジン法を確立することにした。

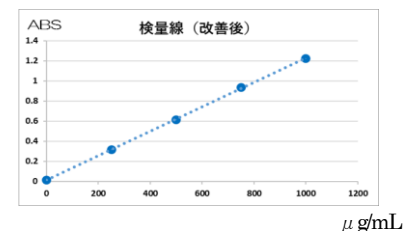


(2) ヒドラジン法の見直し

ASAを確実に色素に変えることがヒドラジン法のポイントである。これができていなかった可能性を考え、「恒温器ではなくウォーターバスによる加熱」「色素を完全に溶かすために、測定前に試料を超音波洗浄機にかける」ことを行った。また、何らかの異変に気付けるように、静岡大学の分光光度計を用いて測定波長が300 nm～1000 nmまでの連続スペクトルを測定することとした。さらに、検量線の濃度の見直しもはかった。ASAのモル濃度0.65mmol/Lは、1 mLあたりの質量に換算すると114 μg/mLであるが、私達は0～100 μg/mLの間で検量線を引いていた。検量線の濃度範囲にASAのモル濃度が含まれていないことに気付いたので、検量線の濃度を10倍し、0～1000 μg/mLに変更して検量線を引くことにした。

<改善後>

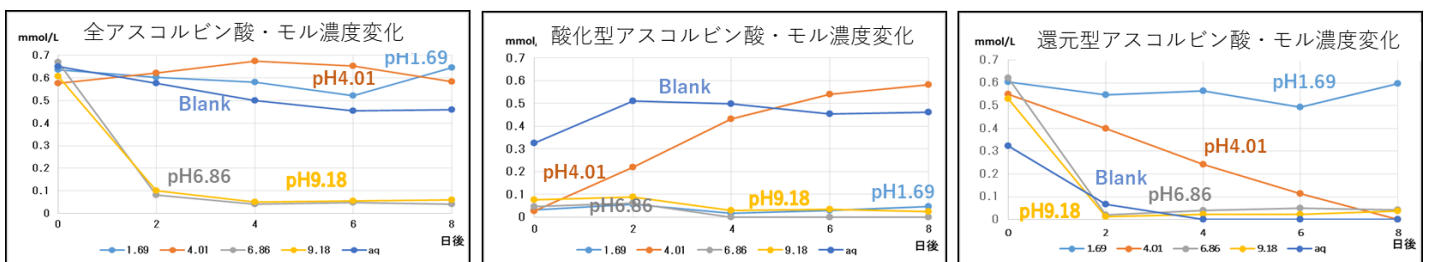
上記に述べた改善を行ったところ、右図のようにきれいな検量線(500nmでの値)を引くことができた。今後は、実験3での改善を加えて実験することにした。



7 実験4 <様々なpH環境下における還元型ASAの変化について>

実験3で確立したヒドラジン法を用いて、実験2と同様の実験を行った。還元型ASA溶液のモル濃度は0.65mmol/L、溶媒は各pH緩衝溶液である。

(1) 実験結果



グラフ3 還元型ASAの濃度変化（ヒドラジン法・改善後）

溶液調整直後の全ASA溶液の濃度が、ほとんどの試料で0.65mmol/L付近を示したことから、グラフ3の結果は信頼できるものと考えている。

- pH1.69では8日間を通して還元型ASAが維持され、酸化型ASAはほとんど生じなかった。
- pH4.01では、時間の経過と共に還元型ASAは酸化型ASAに変化した。
- pH6.86、9.18では還元型ASAが速やかに減少し、還元型ASA、酸化型ASAがともに消滅した。

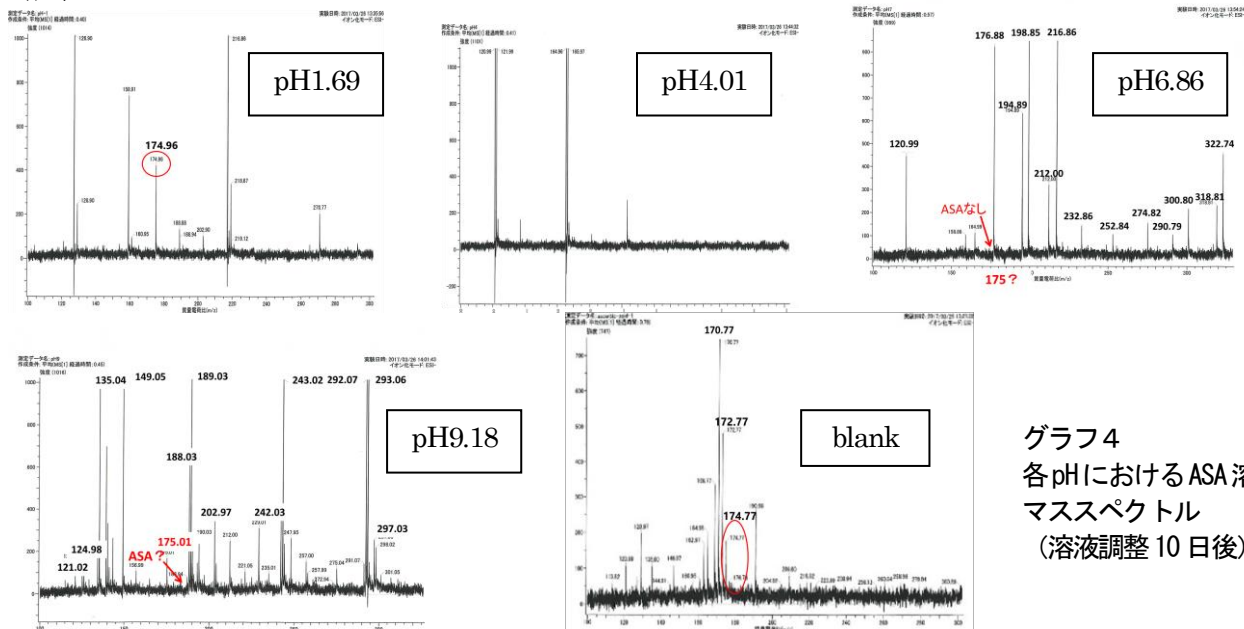
(2) 考察

pHが高い環境下(pH6.86, 9.18)では還元型ASAの速やかな減少が見られたが、酸化型ASAの濃度が上昇することもなかった。還元型ASAは、酸化型ASAとは異なる別の物質に変化したことが予想される。溶液中の還元型ASAは最終的にどんな物質に変化したのかを調べるために、マスペクトルを測定することにした。

8 実験5＜マススペクトル測定＞

実験4で作成した試料の、10日後の試料のマススペクトルを静岡大学にて測定した。

＜結果＞



グラフ4
各pHにおけるASA溶液の
マススペクトル
(溶液調整10日後)

＜考察＞

グラフ4より、pHが高い溶液中における還元型ASAは、分子量の大きい別の物質に変わったと考えられる。塩基性条件によりアスコルビン酸が分解した物質や、アスコルビン酸が開環して他の分子と新たに結合した物質などを想像して様々な文献を調査したが、グラフ4が示す分子量に一致する物質を見つけることはできなかった。緩衝溶液を構成する物質とアスコルビン酸とが結合した物質も検討したが、分子量を一致させることはできなかった。

9 結論

様々なpHの緩衝溶液中のアスコルビン酸の濃度が、時間の経過とともにどのように変化するか、ヨウ素滴定とヒドラジン法を用いて実験した。ヨウ素滴定で定量した実験2とヒドラジン法で定量した実験4では、最初に調整した還元型ASAのモル濃度が10倍違うので単純に比較することはできないが、双方とも、強酸条件下では還元型ASAは保たれることが分かった。またヒドラジン法を採用したことで、還元型ASAの構造変化について、次のことがわかった。

- ・pHが低い環境下において、還元型ASAは徐々に酸化型ASAに変化するが、その合計は一定に保たれている。
- ・pHが高い環境下において、還元型ASAは速やかに減少する。そして、還元型ASAは酸化型ASAとは異なる別の物質に変化している。

この研究から、様々なpH環境下におけるアスコルビン酸の挙動を推察することができた。還元型ASAは酸化防止剤として食品に添加され、栄養補助剤として医療の場面でも使用されているが、これらの保存にあたっては溶媒のpHに注意を払う必要があると言える。

10 謝辞

静岡大学 理学部 近藤満教授には多くのご教示をいただきました。感謝申し上げます

11 参考文献

- ・健康を考えた食品学実験 アイ・ケイコーポレーション