

徐々に加えて振盪すると盛んに発泡して褐色固形物を析出, 全部加え終つてからなお20分間加温して50°に保つ, 冷後吸濾, 濾取した褐色の粗ニトリルをベンゼンで抽出, 硫酸ナトリウムで乾燥後ベンゼンを溜去し, 黒褐色残渣を水から再結晶, mp 96—98°の白色~淡黄色針晶40g (76%)を得た. 本物質はアルコール, エーテル, クロロホルム, ベンゼン易溶, 水およびリグロインには難溶.

(5) 3-Amino-*p*-tolunitrile (V) (IV) 20g, 氷酢 20g を混じ水浴上加温溶解後, 攪拌しながら冷却すれば微細な結晶が析出する. 濃塩酸 90cc を此の中へ入れ, 再び加熱して 55—60° を保ちながら, 葉状錫 200g を少量ずつ加えて攪拌を継続, (IV) は次第に溶解し褐色溶液となる. 錫が殆んど溶消, ニトリルが完全に溶解したときに吸濾, 濾液を倍量に蒸留水で稀釈する. 冷却しながら稀釈濾液に濃水酸化ナトリウム溶液を加えれば, 3-amino-*p*-tolunitrile は白沈として析出する故硝子フィルターで吸濾水洗, 充分乾燥後粉末となし, 円筒濾紙に詰めて Soxhlet 抽出器中に入れエーテルで6時間抽出した後, エーテル中に析出した mp 80—83° 粗結晶を吸濾, 30%アルコールから再結晶, mp 92—94.5°の白色板晶(精製品)の収量7g (43%). 本物質はアルコール, アセトン, ベンゼン, クロロホルム易溶, 水には難溶.

(6) 4-メチルアントラニル酸 (VI) (V) 10gに, 10%水酸化カリウム 50cc を加え油浴あるいは空気浴中2時間煮沸すれば(V)は全溶する. 全溶後更に5時間煮沸, NH<sub>3</sub> 臭を認めなくなつてから放冷し, 冷後稀酢酸で中和して酸性とする析出白沈を吸濾, 水洗し, アルコールから再結晶して mp 177—178°の白色柱晶7.5g (67%)を得た. 本物質のアルコール溶液は紫色の螢光を発する. なお10%水酸化カリウムと2時間煮沸で打切つて中和すると mp 144—147°白色板晶として 2-amino-*p*-toluamide を得る.

加藤好夫, 杉浦 衛, 山田鋪義: ビタミンCの安定性の研究 (第3報)

ビタミンC水剤の検討

Yoshio Katō, Mamoru Sugiura and Haruyoshi Yamada:

Studies on the Stability of Ascorbic Acid III.

On the Solution of Ascorbic Acid.

It is important that ascorbic acid solution should be preserved in stabilized conditions.

For testing of the stability of the solution meta-phosphoric acid, thiourea, sodium thioglycolate, sodium sulfite, sodium meta-bisulfite (0.2%), disodium EDTA (0.05%), methylparaben, ethylparaben and sodium dehydroacetate (0.02% ~0.2%) were added as the stabilizer to the ascorbic acid solution (100mg in 100ml) and analysed ascorbic acid in these solutions on elapsed days.

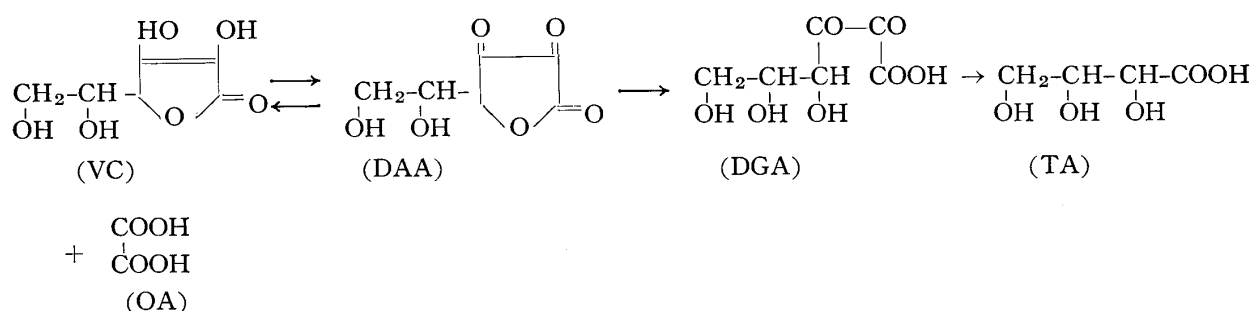
We examined further the relationship of pH and temperature to the stability of the solutions.

As the results of these experiments, we have found that EDTA, sodium meta-bisulfite and parabens were excellent stabilizers and that ascorbic acid solution was stable at pH of 5~6, at the temperature of less than 10°C and in 0.1% of the optimum concentration for EDTA.

著者等はさきにビタミンC (以下VCと略す) の散剤における微量金属の影響<sup>1)</sup>と顆粒中のVCの安定性<sup>2)</sup>について検討したが、本報においてはVC水剤の実用化を計るためにVC水剤の安定性について検討を加えることとした。

VCの結晶は空気中ではかなり安定であるが、光にあてると徐々に暗色となる。ましてその水溶液は急速に空気酸化を受けて次第に分解し、加温により無力化する。この反応は光、アルカリ、酸化剤および銅の存在にて一層促進される。VCはpH7またはそれ以下では自己酸化をしないがアルカリ性ではそれが起り、pHの大きくなるにつれてますます増大する<sup>3)</sup>。またこの酸化は銅が存在するとその触媒作用によつて促進され、1立中銅が46 $\gamma$ という稀薄濃度においてVCは強力に酸化される

神谷等<sup>4)</sup>はVC5mgを種々のpHのMcIlvain緩衝液20ccにとかし、銅塩 $10^{-6}M$ 加え、30°に4時間放置後のVCの残存量を定量し、例えばpH2~4においては総VC量として25mg%、pH7では13mg%とpHの相異により急激に酸化分解が促進されることを示している。VCの酸化により生成されたDehydroascorbic acid (DAA)はpH4以下ではかなり安定であるが、pH4.0以上では容易に酸化されて生物学的に無効な2,3-Diketoglonic acid (DGA)とさらにその酸化物であるL-Threonic acid (TA)およびシユウ酸(OA)となる<sup>5)</sup>。なおこの鋭敏な銅の触媒作用はメタリン酸、8-オキシキノリン、グルタチオン等により調節される。



田中等<sup>6)</sup>はVCの水溶液、酸性溶液およびアルカリ性溶液についてVCの残存率を調べ、例えば調製後3日目ではそれぞれ75%、88%および65%のVC量を示しVCは塩酸リモナーデに溶した水剤とすれば2日間位の投薬は可能としている。

かように不安定なVCの水溶液を安定化するためにはそのpH、温度および共存物質の影響を考慮するのは勿論、さらに適切なる抗酸化剤、防腐剤等を選択して用いることが望ましいように考えられる。

そこで抗酸化剤としてメタリン酸、チオ尿素、チオグリコール酸ナトリウム、キレート剤としてのEDTA、防腐剤としてのパラオキシ安息香酸メチルおよびエチルおよびデヒドロ酢酸ナトリウムを選び、これらがVCの安定性におよぼす影響について基礎的検討を加えた実験結果についてここに報告する。

本研究にあたり種々実験の激励と便宜をあたえられた宮道悦男学長に深甚の謝意を表す。

1) 加藤, 杉浦; 本誌 6, 59 (1956).

2) 加藤, 杉浦; 本誌 6, 62 (1956).

3) Barron, DeMeio *et al.*: J. Biol. Chem. 112, 625 (1936).

4) 神谷, 中林: ビタミン 13, 384 (1957).

5) Lyman, Schultze *et al.*: J. Biol. Chem. 118, 757 (1937).

6) 田中, 沢村: 薬剤部長会年報, 13, 64 (1954).

## 実 験 の 部

### (1) VC 検液の調製

日本薬局方の VC 結晶 100mg を精秤して蒸留水に溶解し, 抗酸化剤, 防腐剤 (以下これらを安定剤と称する) をそれぞれ下記の濃度に加えたものを全量 100ml とする. 検液 1 ml 中 VC 1 mg を含有する.

本検液を(A)群とする. また(A)群の②~⑨にさらに 0.2% メタリン酸を添加した検液を(B)群とする.

(A), (B)いずれの検液も気密容器に入れ, 室温平均 15.5°C に保存する.

#### i) 安定剤の濃度

下記の濃度に各安定剤を加えて 9 種の検体を調製する.

- |         |               |
|---------|---------------|
| ① 0.2%  | メタリン酸         |
| ② 0.2%  | チオ尿素          |
| ③ 0.2%  | チオグリコール酸ナトリウム |
| ④ 0.2%  | 亜硫酸ナトリウム      |
| ⑤ 0.2%  | メタ重亜硫酸ナトリウム   |
| ⑥ 0.05% | EDTA          |
| ⑦ 0.02% | メチルパラベン       |
| ⑧ 0.02% | エチルパラベン       |
| ⑨ 0.2%  | デヒドロ酢酸ナトリウム   |
| ⑩ 0.1%  | VC 水溶液 (対照)   |

(註) 上記①~⑨の番号はそのまま図表中の検体番号に通ずるものとする.

#### ii) 検液の pH

(A) 群の pH: Table 1. の pH 参照

(B) 群の pH: Table 2. の pH 参照.

### (2) VC 標準溶液

国立衛生試験所標準品 VC 50mg を精秤して蒸留水に溶解し, 全量 100ml とする. 本液 1 ml 中 VC 500 $\gamma$  を含有する.

### (3) 定量法

本実験においては種々の安定剤を使用するためこれらが定量の妨害物質にならないような定量法を採用せねばならぬ, そこで種々検討の結果 M. Schmall 等の<sup>7)</sup> 2-Nitro-4-Methoxy Anilin (NMA) 法を改良した河内,<sup>8)</sup> 笠原法が簡易精確であることを確認してこの方法を採用した.

#### i) 試 薬

アミノ試薬: NMA 400mg を精秤し, 氷酢酸 10ml に溶解して 10% HCl 10ml を加える.

ジアゾ試薬: アミノ試薬 0.1ml と 2% NaNO<sub>2</sub> 液 0.1ml を混和し, 後アルコール 50ml を加える. 用時調製して用いる.

#### ii) 操 作

検液 1 ml を 50ml のメスコルベンにとり, 上記のジアゾ試薬を加えて混和後, 10% NaOH 液 2ml を加え,

7) M. Schmall, C. W. Piffer *et al.*: Anal. Chem. **25**, 1486 (1953).

8) 河内, 笠原: 薬誌, **74**, 443 (1954); 和光時報, **24**, No.2, 7 (1955).



Table 2. Influence of Stabilizers on Ascorbic Acid Solution (Decomp. %)

Days→ pH↓ ↓ Samples						
	1	2	3	5	7	
2	2.4	6.7	9.1	12.4	17.3	18.9
3	3.5	7.2	10.4	16.0	18.0	20.6
4	6.3	8.6	12.6	18.2	19.6	24.4
5	2.8	7.9	9.9	10.1	12.4	15.5
6	2.5	5.4	8.2	9.1	12.3	12.8
7	2.3	2.4	2.8	6.5	13.2	17.8
8	2.4	4.8	5.3	6.6	15.1	17.2
9	4.0	2.8	4.4	9.2	15.0	22.1

検液(B)群は0.2%メタリン酸溶液にVCを溶解し、さらに各種安定剤を添加して2種の安定剤の協力化を計り、安定性を増大する目的で調製した検体である。Table2, および Fig. III に示すように前記(A)群の結果に比べれば一層の安定性を得、いずれの検液も分解率は7日後において25%以下に止り、(A)群において期待に反したパラベン類も著しい効果を示した。またキレート剤EDTAは(A)群と同様にVCの安定剤として良好なものといえる。

ii) 安定性と pH との関係

安定剤を添加しない単なるVC水溶液 (100mg in 100ml: pH=3.2) を5%クエン酸溶液 (pH=1.8), 5%クエン酸ナトリウム液 (pH=7.58) および5%炭酸水素ナトリウム溶液 (pH=8.1) を用いてpHを調整してpH2~8までの7種類の検液をつくり、経日におけるVCの分解度を定量した。

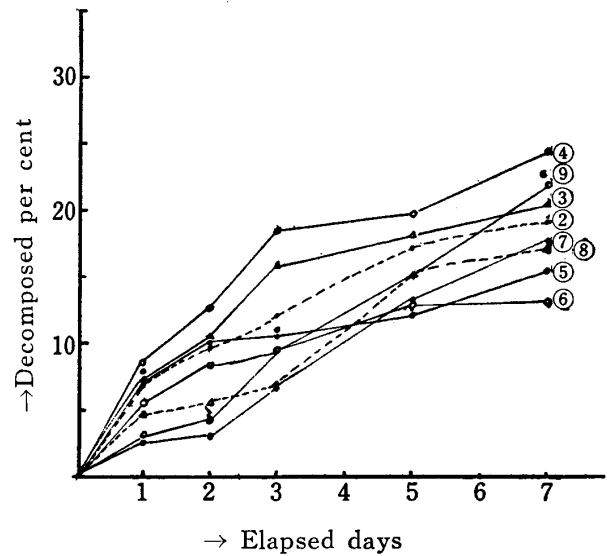
Table 3. に示されるように pH5~6が他に比較してすぐれた安定性を得ている。これは日本薬局方のVC注射液がアスコルビン酸ナトリウム溶液 (アスコルビン酸を炭酸水素ナトリウムにて中和) でpH 5.6~7.0とし、不安定であるのでさらにアンプル内を不活性ガスで置換してあるのに関連性がある。

VC溶液もpHのみを調整して最適にしても安定性は充分に得られず、やはり適当な安定剤の添加がなければ安定性を増強し難いことが前記 Table1, 2, および Fig. II, III を比較すればよくわかる。

Table 3. Relationship of pH to the Stability of Ascorbic Acid Solution, (decomp. %)

Days pH	1	2	3	5	7
2	12.0	20.2	29.7	38.3	53.2
3	9.4	10.4	29.4	42.2	52.6
4	9.4	9.5	10.8	17.7	32.1
5	11.8	14.8	15.3	16.5	19.6
6	8.8	8.8	10.7	13.6	17.3
7	10.0	15.8	33.0	43.0	56.9
8	13.8	26.2	39.9	56.2	62.6

Fig. III Change of Ascorbic Acid Solution added to Stabilizers and Metaphosphoric Acid on elapsed days.



iii) 安定剤の濃度

前記 i) の(A)群, (B)群においてEDTAがすぐれた安定性を示したのでこのEDTAについて最適濃度を検討した。なおVC溶液は5%クエン酸ナトリウム溶液にてpH6.0に調整したものにEDTAを0.05%, 0.1%, 0.15%の濃度に添加した3種の検液について7日間の安定度を定量するにTable4. に示すように0.1%使用の方が0.05%より7日後にては

約8%安定性を増大するが、0.1%と0.15%の間では1.5%増すだけの結果であり大した差はない。そこで0.1% VC 溶液の場合 pH 6.0 に調整すれば EDTA は最低0.1%濃度で使用すると VC 安定性が得られる。

Table 4. Optimum Concentration of EDTA Sodium for Ascorbic Acid Solution at pH 6.0. (decomp. %)

Days Concent.	1	2	3	5	7
0.05 %	4.5	8.1	10.1	12.5	12.7
0.1 %	1.7	1.9	2.8	3.2	4.7
0.15 %	0	0.4	1.0	1.3	3.1

Table 5. Relationship of the Temperature to Decomposed Degree of Ascorbic Acid Solution at pH 6.0 (decomp%)

Hours Temps.	1	2	3
30°C	5.1	12.1	14.0
20°C	1.2	6.7	8.0
10°C	0.6	2.4	3.2
5°C	0.6	1.8	2.2

#### iv) 安定性と温度

VC 水溶液は温度が高くなれば酸化分解が速くなるものであり、濃度が低いとその影響は著しい。そこで0.1% VC 水溶液を安定な pH6 に調整したものについて5°, 10°, 20°, 30°C の恒温に保存した4種の検体について、それぞれの VC の分解度を1時間毎に定量し、それらの結果を Table 5. に示した。この表によれば5°と10°との間の分解の差は3時間後で1%と大差はないが、20°と30°と温度が昇れば急激に分解が促進され、その差も6%と大きく開き、また10°を基準として20°と30°の分解度の差は4.8%と10.8%となり、30°になれば、特に VC の分解が速いことを示している。よつて VC 水溶液は10°C 以下の低温に貯蔵すれば安定であり、殊に安定剤等が添加されればその安定度は一層増強されるものである。

#### (6) 結 語

VC を水剤として安定な状態で利用するためには安定剤を加え、また pH, 温度の適正を得ることが最も重要である。これらの点に関して以上の実験の結果を次に総括する。

i) 実験に使用した9種の安定剤中比較的良好なものは抗酸化剤のメタ重亜硫酸ナトリウム、キレート剤としての EDTA, 防腐剤のパラベン類であり、殊に EDTA はすぐれた効果を顕はした。

ii) VC の安定性を保つ適正な pH は5~6 (15.5°C) であるが、実験が示すように pH の適正だけでは十分な安定性は期待できず、さらに安定剤の添加が必要である。

iii) 優れた安定性を示した EDTA についての使用最適濃度を検討するに常用の0.05%より0.1%が著しい効果を表わし、また0.1%以上においても大した増大はなく、使用濃度は0.1%が適当である。

iv) 保存の温度が昇れば水剤中の VC の分解は促進され、20°C に上昇すれば急に分解は増大し、10°C 内外に貯蔵すれば安定である。よつて冬期は室温に、夏期は冷蔵庫内に保存すれば安定である。