

血液中 Ascorbic acid 의 Gas-Liquid Chromatography 에 의한 微量定量

李 中 姬

聖心女子大學 食品營養學科

(1975. 2. 20 受理)

The Microdetermination of Ascorbic acid in Blood by Gas-Liquid Chromatography

Joong-Hee Lee

Dept. of Food and Nutrition, Sung-Shim Woman's College

(Received, February 20, 1975)

SUMMARY

A microdetermination of Ascorbic acid (AsA) in blood by Gas-Liquid Chromatography (GLC) was studied. AsA was applied on GLC after the conversion into trimethylsilyl derivative (TMS) and the GLC was available for the only reduced form of AsA.

A calibration curve is made by GLC of TMS-AsA as the internal standard of n-docosane. The minimum amount of AsA required for the determination was 0.5ml of 1 mg% pyridine solution.

Prior to the conversion of AsA in serum into TMS derivative, serum was lyophilized and then it was allowed to stand at room temperature with TMS reagents for 48 hr. On injection of the supernates of TMS derivative to GLC the peak corresponding to AsA was not detected. Its reason why the concentration of AsA in serum is 0.5mg~0.8mg% in general, and it is less than minimum concentration of GLC.

In case of L-AsA 1 mg was added to 1ml of serum, which was followed by lyophilization, silylation and GLC. The recovery of AsA added was 98 percentage.

緒 論

小動物에 있어서 AsA^{*1)}의 代謝實驗을 할 경우 試料로서 사용되고 있는 臟器나 血液의 量이 一般的으로 小量이므로 Roe²⁾法 定量을 할 경우 Meta-phosphoric acid 抽出液이 1ml 程度일 때가 있다.

특히 AsA의 量에 差異가 있는 飼育한 動物血液 中の AsA를 測定할 때 採取한 血液中 AsA 量이 定量限界인 最低必要量인 때가 있다.

辻村^{1,2)} 등은 Rats의 血液中 AsA 量을 Roe 法の

變法으로서 最低 AsA 濃도가 約 0.08mg%까지의 微量定量法을 報告했다.

또한 J.H. Allison⁴⁾ 등은 Rats의 腦中 AsA를 凍結乾燥處理하여 GLC^{*2)}法으로 最低 AsA 濃도 10 mg%까지 定量하였다. 그러나 같은 試料를 Roe 法으로 定量하여 比較한 結果 GLC 法이 多少高濃度 (AsA 1.58mg/100g wet wt.)임을 나타낸 것으로 報告되었다.

*1) AsA=Ascorbic acid

*2) GLC=Gas-liquid chromatography

梶田³⁾는 L-AsA, EA^{*3)}, TR^{*4)}에 대하여 GLC 법으로 最低 100mg%까지 定量하였다.

一般的으로 널리 使用되고 있는 Roe 法은 AsA의 最低濃도가 0.5mg%까지 定量이 可能하나 GLC 法에 依한 從來의 報告로서는 最低 AsA 濃도가 10 mg%가 限界值로서 알려져 있다.

本實驗에서는 GLC로서 Rat, Rabbit의 血液을 試料로한 경우 最低 몇 mg%濃도까지 微量定量이 可能할 것인가에 對하여 檢討해 보았다.

實驗方法

1) 試藥

모든 試藥은 特級으로 Ascorbic acid는 第一化學藥品株式會社(日本), 內部標準物質인 n-Docosane은 西尾工業株式會社(日本)製品, TMS 試藥으로서 Hexamethyl disilazane(HMDS), Trimethylchlorosilane(TMCS), Pyridine은 Potassium hydroxide(KOH)를 넣어 1週日쯤 室溫에서 放置한 후 完全 脫水하여 使用하였다.

2) 血液

實驗動物用으로 體重 2.5~3kg 程度의 Rabbit(日本生物材料椎橋株式會社)와 Rat(日本クレア株式會社)는 Sprague Dawley 系의 수컷으로 9週齡의 體重 250~270g의 것을 사용하였다.

3) 血液中 AsA의 抽出 및 TMS化^{*5)}

Rabbits는 頸動脈으로부터 Rats는 心臟으로부터 血液을 採取한 即後 1°C에서 3,000rpm으로 10分間 遠心分離하여 그 上澄液(血清) 1ml을 Acetone dry ice에 凍結시켜 24時間동안 凍結乾燥⁴⁾시킨다.(이때 添加實驗用 試料에는 AsA를 添加시킨 후 凍結乾燥함)

凍結乾燥가 끝난 試料에 TMS 試液⁴⁾(無水 pyridine:HMDS:TMCS=10:2:1, (v/v)의 比로 混合 5ml을 넣어 室溫에서 48時間동안 放置하여 反應시킨다. 이 試料를 잘 混合하여 3,000rpm에서 20分間 遠心分離한 후 上澄液에 內部標準物質을 넣어 試料로 使用한다. 남은 試料는 密封하여 -20°C 以下에 보관하여 必要時 定量에 使用할 수 있도록 한다.

4) GLC의 測定條件

GLC에 의한 AsA의 定量法⁶⁾에서의 測定條件은 高濃度(10mg%)의 條件이므로 低濃度(0.5~1mg

%)의 微量定量을 위하여 Table 1의 條件下에서 測定하였다.

Table 1. Experimental condition of GLC

Model	JGC-750 FID
Column	Glass 3m I.D. 3mm
Liquid phase	2.5% Silicone OV-17
Support	Chromosorb AW
Mesh	60~80
Column temperature	210°C
Injection temperature	280°C
Detector temperature	300°C
Carrier gas	N ₂ 48ml/min
H ₂	35ml/min
Air	700ml/min
Attenuator	x1
Chart speed	10mm/min

實驗結果

1) AsA의 Chromatogram

Table 1의 條件에 의하여 測定한 結果 AsA와 n-docosane의 Chromatogram을 Figure 1에 表示한다. Fig. 1은 3m의 glass column으로 充填劑는 2.5% Silicone OV-17, Column溫度 210°C에서 AsA는 保持時間 6分30秒, n-docosane은 12分30秒로서 peak 1은 溶媒, peak 2는 AsA, peak 3은 n-docosane으로 만족한 peak를 얻었다.

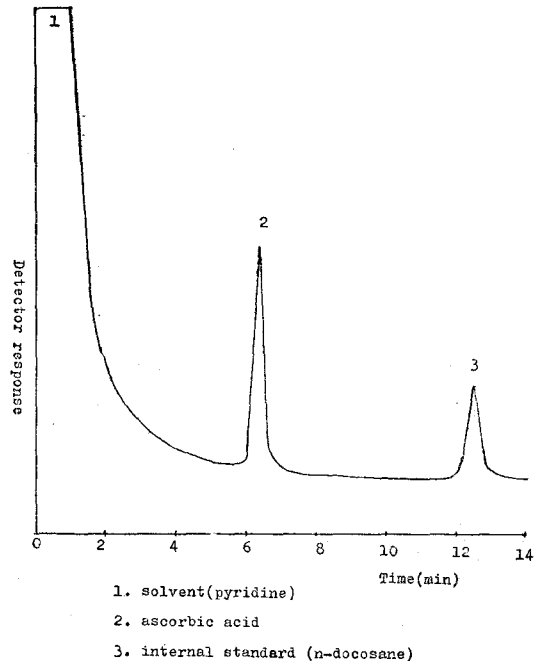


Fig. 1. Gas chromatogram of AsA

*3) EA=Erythorbic acid

*4) TR=Trose reductone

*5) TMS化=trimethylsilyl化

2) 檢量曲線

TMS-AsA 의 最低濃度가 0.5mg%로 標準 AsA와 n-docosane 의 重量比가 0.25~3.0까지 7단계로 나누어 Table 1의 條件으로 測定한 結果 Figure 2에 表示한바와 같이 0點을 通하는 直線의 檢量線을 얻었다

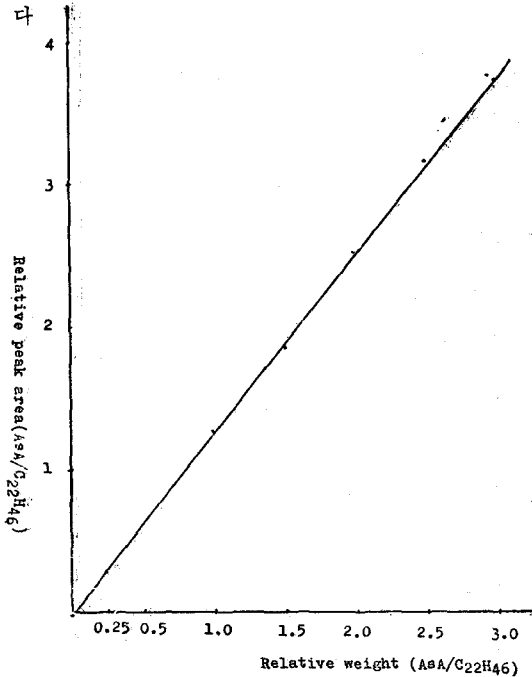


Fig. 2. Calibration curve of AsA

3) 血清中 AsA 의 定量

凍結乾燥를 終了한 血清中 AsA 의 TMS反應의 0, 24, 48, 時時동안의 time course 를 두고 反應시켜 測定한 結果 Table 2와 Figure 3에 表示한 바와 같다.

血清中 AsA 는 室溫에서 48時間동안일때 TMS反應이 完全히 끝나 chromatogram 에는 痕迹만 나타나고 AsA(1mg) 添加試料만이 98%以上의 回收率을 나타냈다.

Table 2. Recovery of AsA in serum

Reaction time(hr)	Samples	Recovery	
		AsA	Addition of 1mg AsA
0	Rabbit serum	0	90
	Rat serum	0	93
24	Rabbit serum	0	95
	Rat serum	0	95
48	Rabbit serum	trace	98
	Rat serum	trace	97

Figure 3의 peak 1은 溶媒, 2는 α -glucose, 3은 β -glucose, 4는 血清中 AsA 와 血清에 添加된 AsA., 5는 n-docosane 으로서 本條件에서는 完全分離된 peak 로 나타났다.

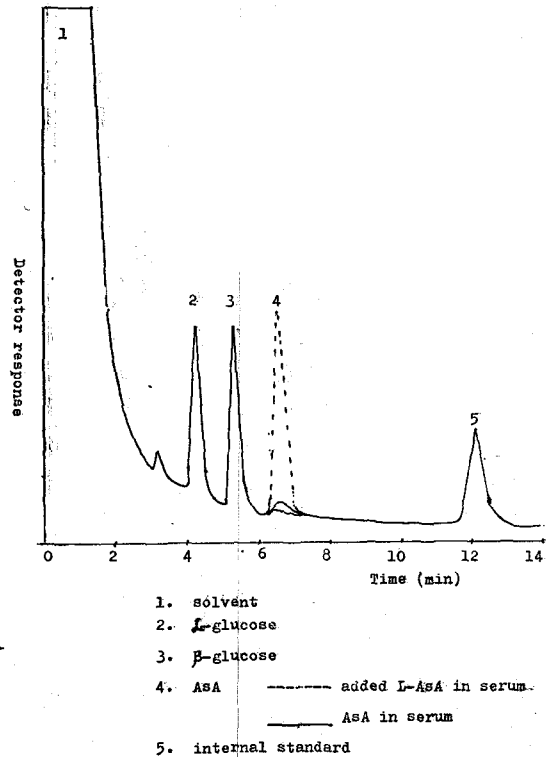


Fig. 3. Gas chromatogram of AsA in serum

考 察

血清中 AsA 定量은 3m의 glass column (I.D. 3mm)에 25% Silicone OV-17을 使用하여 Table 1의 條件下에서 GLC로 測定한 結果 最低 0.01mg/ml(1mg%濃度)가 定量可能值로서 Roe變法(最低濃度 0.08mg%)보다는 高濃度이나 1回測定에 必要한 試料의 量(volume)으로 볼 때 Roe法은 1ml(그中 AsA 0.8 μ g), GLC는 10 μ g(그中 AsA 0.1 μ g)으로 實際含有된 AsA量에 있어서는 GLC가 보다 微量을 測定할 수가 있었다.

특히 本條件下에서 血清 1ml에 AsA 1mg을 添加한 試料는 Table 2에서 보는바와 같이 98%의 回收率을 보였으며 血清中 AsA가 trace로만 나타난 것은 血清中 AsA濃도가 一般的으로 0.5~0.8mg%(Roe法測定)로 本條件의 GLC 定量可能한 最低濃度인 1mg%에 비해 絕對濃度の 부족에 있다고 본다.

또한 試料의 抽出 및 TMS化에 있어 凍結乾燥

後 TMS 混合試料中 室溫에서 48시간동안 反應시켜 抽出과 TMS 化를 同時에 시키는 것이 重要하다. (標準 AsA 의 경우 TMS 試藥 3가지를 順序로 넣어도, TMS 混合試液中에 同時에 反應시켜도 같은 結果를 나타냄)

要 約

- 1) 本實驗條件에서 GLC 에 의하여 AsA 의 最低濃度 1mg%까지 定量可能하였다.
- 2) TMS 反應條件으로서 凍結乾燥試料에는 반드시 TMS 混合試液中에서 抽出과 TMS 化를 同時에 시켜야만 98% 以上の 回收率을 얻을 수 있다.
- 3) AsA 濃도가 1mg%以上인 試料에 對하여 GLC 에 의한 微量定량을 確立하여 特히 妨害物質이 많은 一般食品의 定量에 適用이 可能하도록 하였다.
- 4) 本實驗에 使用한 日本電子의 750型의 electron meter 의 性能보다 感도가 300倍인 20K 型을 使用한다면 血清中 AsA 의 定量 및 그 以下の 濃度인 微量定량도 充分히 可能하리라 생각된다.

文 獻

1. 辻村 卓: Vitamins(Japan) 44, (4) (1971)
2. 辻村 卓: Vitamins (Japan) 43, (4) (1971)
3. Roe, J.H, M.B. Osterling, M.T. Dameron.: J. Biol. Chem. 174, 201 (1948).
4. J.H. Allison, M.A. Stewart: Analytical Bio. Chem. 43: (1971).
5. 梶田武俊: Vitamin C 의 定量法(博士論文中)
6. 李 中姬: GLC 에 依한 AsA 의 定量法. 聖心女子大學 論文集 (1974).
7. Sweeley, C.C.: J. Ame. Chem. Soc. 85, (1963).
8. 實驗化學講座(日本化學會編): 9. ガスクロマトグラフィー(丸善) (1965).
9. Alvin, H. Weiss, Huseini, Tambwaala: J. of Chroma, Sci. 10, (1972).