フ ィ チ ン の 研 究 (第 2 報)

Studies on Phytin (Part 2)

フ ィ チ ン 態 リ ン の 定 量 法 に つ い て (I)

On the determination of phytin-phosphorus (I)

(昭和 41 年 5 月 1 日 受 理)

森 治 夫
(Haruo Mori)

The pure inositol hexaphosphate was prepared by column chromatography using Dowex 2 (Cl⁻) from 0.5 N HCl extract of rice bran. After adjusting pH to 3.6, it was hydrolysed by heating in the boiling water bath. The hydrolysates were absorbed in the column of Dowex 2 (Cl⁻), washed and eluted stepwise by 0.03, 0.08, 0.2, 0.32, 0.5, 0.72, and 1.0 N HCl.

After being precipitated as Ba salt and purified by recrystallization, total P and phytin P (by the modified McCance method) in inositol phosphates in each fraction were determined, and phytin P/total P(I) calculated. In inositol phosphates higher than triphosphate I were more than 90%, in two isomers of diphosphates 58.8% and 28.6% and in monophosphate I was zero.

緒 言

フィチン酸は inositol hexaphosphate (IHP とする) とされて来たが、近年の研究により自然界には inositol の lower phosphates (ILP とする) も広く存在することが考えられるようになった。すでに永井¹⁾、米ぬか中に、Preece は²⁾ 大麦中に ILP の存在を証明している。また、フィチンが酵素の作用を受ける時は(例: 麦芽³⁾) ILP が常に生成している。従来一般に用いられて来たフィチン態 P 定量法は、IHP のみならず、ILP も同時に定量していることは十分予想されまた示唆されてもいる⁴⁾。そして種々の ILP 中の P がどの程度までフィチン態 P 定量法に関与するかを明にすることは、フィチン研究上の矛盾した事実、一致しない意見を解明する上に極めて重要で、栄養学、家畜飼養学、植物生理化学などにおけるフィチンの研究に大きな意義があると考えられる。著者は米ぬかより IHP を純粋に分離しこれを酸分解した後、生成した各種の ILP を Dowex

-2 [Cl⁻] を用いてカラムクロマトグラフィーにより分別し、その各フラクションについてその P が普通行なわれているフィチン態 P 定量法によりどの程度まで定量されるかを定めたので報告する。

実 験 方 法

〔I〕 米ぬかより IHP の調製……(a) 米ぬか 75 g より第 1 図の如くして IHP 溶液を得た。収量 360 mg P。(これは試験 1 および 2 に用いた。)

(b) なお後記の如く実験の一部をさらに精査する必要を生じたので(試験 3)、別に米ぬか 100 g より同様に IHP 溶液を得た。収量 507.6 mg P。

〔II〕 酸分解……〔I〕 (a) により得られた IHP の溶液は 100 ml に充たし 360 mg P を含む。これより試験 1 では 34.7 ml (125 mg P) を、試験 2 では 55.5 ml (200 mg P) をとり試料とした。また試験 3 では〔I〕 (b) で得た試料全部 (423 ml, 507.6 mg P) を用いた。試料を 50 あるいは 100 ml フラスコに入れ、5 N NaOH

第 1 図

- *1. カラムは 2.5×20cm. Dowex 50 は 50~100 mesh
 *2. カラムは 2.5×20cm. Dowex 2 は 200~400 mesh
 *3. 0.72N 溶出液は 溶出した全 P の 71.1% に相当する P を含むのでこれを IHP とした。

を加えて pH 3.6 とし, 倒立管を附し煮沸湯浴中で熱した。ときどき溶液の一部をとり, 無機 P / 全 P を定量して分解度を検し, 試験 1 では 32.8% (9 時間半), 試験 2 では 64.4% (18 時間), 試験 3 では 65.6% (15 時間)

の分解度に至らしめた。なお試験 2 および試験 3 では濃度の高い方が分解がよく進むかと考え, 試料を pH3.6 とした後減圧濃縮してそれぞれ 30 ml および 85 ml とした後分解した。

〔Ⅲ〕カラムクロマトグラフィー……酸分解によって生じた ILP は Schormüller の方法⁵⁾ に準じて Dowex-2 [Cl⁻] 200~400 mesh のカラムで分別した。試験 1 および 2 では 2.5×20 cm のカラム, 試験 3 では 3×38 cm のカラムを用いた。分解液を中和後カラムに吸着させ, 水洗し, 0.03 N, 0.08 N, 0.2 N, 0.32 N, 0.5 N, 0.72 N, 1 N および 1.2 N HCl で段階的に溶出した。

〔Ⅳ〕フィチン-P / 全 P の定量……各フラクションより 3~4 mg P に相当する溶出液をとり pH 7 まで中和し減圧濃縮し (低級の ILP に於いては加熱により分解する恐れも感じたので減圧濃縮を避け試験液より直に Ba 塩を沈殿せしめた), 20% 酢酸バリウムを加え, 2, 3 時間以上放置して Ba 塩を沈殿せしめ, 遠心分離し, 水洗し, 2.5~4 ml の水に懸垂しちょうど溶解するだけの 0.5 N HCl を加えて溶かし, 等容のアルコールを加え一晚冷蔵し Ba 塩を析出せしめた。(試験 3 の (1) -b および (2) では低級の ILP の Ba 塩は余り濃厚でないアルコールには溶け易いとされているので 3 倍容のアルコールを用いた。)

これを今一度反覆した後遠心分離し, 水 20 ml とちょうど溶けるだけの 0.5 N HCl とに溶かし, Dowex-50 [Na⁺] 1.2 g を加えて 30 分攪拌, 上清を傾瀉して 50 ml メスフラスコに入れ, 樹脂は 10 ml 宛の水で 5 分宛攪拌すること 3 回, 洗液は上清と合して 50 ml に充たす。

(a) 全 P……1 ml を標線付試験管にとり 0.2 ml の HClO₄ (60%) を加えて煮沸し発烟後 2 分分解し 10 ml に充たしこの一部分をとり Gomori 法⁶⁾ により全 P を定量した。

(b) フィチン-P……フィチン-P の定量法は種々あるが普通用いられている方法は McCance 法⁷⁾ に基づき多少の改良をした物であるので, 本研究でも同法に準じて次の如く行なった。

15 ml をとり微酸性まで中和し 2 ml の 10% Na₂SO₄ と 3 ml の水を加えた後 FeCl₃ の HCl 溶液 (FeCl₃ を 1 N HCl に溶かし Fe 0.5 mg/ml の濃度とす) 4 ml を加えて 15 分煮沸湯浴中に熱し (5 分に 1 回沈殿管を廻転して攪拌する) 放冷後遠心分離し, $\frac{N}{6}$ HCl 5 ml で洗い, 遠心分離し, 2 ml の水と 2 ml の 2% NaOH を加えて 15 分煮沸湯浴中に熱し, ケールダール分解液中に汙過して Fe(OH)₃ を分ち熱水で洗い, 2 ml の HClO₄ (60%) を加え煮沸濃縮して発烟するに至らしめた後 15

第 2 図

第 3 図

第 1 表

		試 験 1		試 験 2		(4)	0.32	0.82	0.65	1.50	0.75																				
		32.8%分解		64.4%分解								(5)	"	6.10	4.88	5.06	2.53														
フ ラ ク シ ョ ン 番 号	溶 出 塩 酸 濃 度	Pmg	試料の P に対する %	Pmg	試料の P に対する %	(6)	"	5.57	4.46	5.13	2.57																				
												(7)	"	4.23	3.38	4.40	2.20														
																		(8)	"	0.5	6.82	5.46	2.66	1.33							
																									(9)	"	0.72	21.12	16.90	11.68	5.84
(A)	0.03N	37.91	30.32	120.79	60.40	(11)																									
(B)	0.08	0	0	0	0																										
(1)	0.2	4.86	3.89	13.57	6.79																										
(2)	"	8.33	6.66	3.39	1.70			117.07	93.65	184.76	92.42																				
(3)				9.33	4.67																										

* 試験 1 の (2), (3) および (8), (9) は過って 1 つのフラクションとした。

第 4 図

第 2 表

試験 3, 65.6% 分解			
フラクシ ョン番 号	溶出塩 酸濃 度	Pmg	試料の P に対する %
A	0.03N	316.80	62.40
1	0.2	36.52	7.19
2	"	8.29	1.63
3	"	23.09	4.55
4	0.32N	2.59	0.51

〔V〕Ba 塩の C : P の定量……〔IV〕と同様にして調製し 2 回再結した Ba 塩を遠心分離しアルコールで洗い減圧で乾燥した後、C は元素分析により、P は Gomori 法により定量した。

なお後記の如く (A'), (1)—a は Pb 塩として得られるが同様にアルコールで洗い減圧乾燥し同様に C と P を分析した。

実験結果および考察

分加熱し放冷し 50 ml メスフラスコ中に洗い込み 50 ml に充たしその一部をとり Gomori 法で P を定量した。

〔I〕カラムクロマトグラフィー……〔i〕試験 1 およ

び2のクロマトグラムは第2図と第3図に各フラクションのPの量は第1表に示す。各フラクションはそれぞれ同一の物質であると考えてよいと思う。故に相当するフラクションを合して〔II〕の試験および分析用Ba塩の調製に用いた。

〔ii〕試験3……試験1および2の相当するフラクションを合して〔II〕の試験を行なったがフラクション(1), (2), (4)は試料不足などの理由で満足するに足る結果を与えなかったので、この部分を再試するため試験3を行なった。故に0.03 N HClで無機Pを洗い去った後、0.2 N および 0.32 N HCl で(1), (2), (3), (4)のみを溶出した。クロマトグラムは第4図に各フラクションのPの量は第2表に示す。Pの溶出する状態は〔i〕とよく似ていてそれぞれ同一物質と思われる。

〔II〕フィチン-P/全P……フラクション(A'), および, (1)-a, (1)-b, (2), (4)は試験3によって得た物を用いた。

フラクション(1)は〔IV〕に記した方法でBa塩を沈殿せしめた上清にお多量のILPを含むのでこれを次の如くPb塩として分離した。不溶性Ba塩として沈殿する部分を(1)-bとし、Pb塩として沈殿する部分を(1)-aとする。

フラクション(1)-aの試験法……フラクション(1) 100 ml (12 mg P) よりBa塩を分離した上清より50 ml をとり水150 ml を加え、20% 酢酸鉛を加えPb塩を沈殿せしむ。静置、遠心分離、水洗し、3 ml の水とちょうど溶けるだけの6 N HNO₃を加えて溶かしアルコール3 ml を加え一晚冷蔵して再結する。これを今一度反覆した後、遠心分離し水20 ml とちょうど溶けるだけの6 N HNO₃とに溶かし、Dowex-50 [Na] 1.2 g と〔IV〕に記したと同様の方法で処理して脱鉛し50 ml に充たし、〔II〕の試験に用いた。また(1)の残りより同様に分析用試料を調製した。

また0.03 N HClにて溶出するフラクション(A)は無機P 316.8 mg 以外に有機P 14 mg を含むが、この有機PはIMPと想像し、Hübscherらの方法⁹⁾により分離した。これを(A')とする。

フラクション(A')の試験法……(A)の半容をとり5 N NaOHで中和、減圧濃縮し、20% 酢酸バリウムを加え大部分の無機PをBa塩として除いた後、Dowex-2 [酢酸型] カラム 1.5×20 cm. に吸着せしめ、水洗し、2 N HCOOHで溶出する。クロマトグラムは第5図に示す。フラクション(A')は全部有機Pよりなり、(A'')は全部無機Pよりなることを知り、(A')を中和

後前と同様Pb塩を経て〔II〕の試験用の溶液を作り、また(A)の残りより同様に分析用試料を調製した。

第 5 図

Fraction A

結果は第3表に示す。全Pおよびフィチン-Pの値は皆3回の分析値の平均であり、その3個の値は互によく一致している。

第 3 表

フラクション番号	溶出液濃度N	全P mg	フィチン-P mg	フィチン-P/ 全P %	Ba塩の C:P *1
(A')	0.03	1.675	0	0	6.00:0.86
(1)-a	0.2	3.408	2.077	58.8	6.00:1.83
(1)-b	"	3.158	2.903	28.6	6.00:1.88
(2)	"	3.562	3.333	93.6	6.00:2.84
(3)	"	3.625	3.521	97.1	6.00:2.91
(4)	0.32	2.368	1.937	81.7	—
(5)	"	3.521	3.445	97.8	6.00:3.33
(6)	"	3.646	3.388	92.9	6.00:3.46
(7)	"	3.437	2.250	92.3	6.00:3.03
(8)	0.5	2.250	2.208	98.1	—
(9)					
(10)	0.72	4.125	3.777	91.6	6.00:4.93
(11)	1.0	4.062	3.833	94.3	6.00:5.70

*1 A および 1-a は Pb 塩の C:P

(2)以上のフラクションは唯一つの例外である(4)を除いては皆全Pの90%以上がフィチン-Pとして定量されるが、(1)-aおよび(2)-bではそれぞれ全Pの58.8%および28.8%がフィチン-Pとして定量にかかって来るに過ぎない。さらに(A')はFe塩の沈殿を全く与えず、フィチン-Pの値は0である。

Ba塩およびPb塩のC:Pの値より考察すると(A')はC:Pの値は理論数を少し違さかっているが、その

溶出状態および分離法よりして IMP と考えられ、(1) -a および (1)-b は IDP, (10) は IPP, (11) は IHP と考えてさしつかえないと思われる。(2) より (7) までは皆 ITrP と考えてよいか否か解らない。ITrP は化学的分解では ITeP より早く分解するので容易に単離し難いとか、ITrP と ITeP は同じ Ba 塩に混合物となって析出し分離し難いなどといわれているし、(5) (6) においては C:P は理論数より少し離れているから、これらのフラクションも或いは両者の混合物かも知れない。しかしともかく (1) と (2) 以上とは明に差があり、ITrP 以上に於いてその P は殆んど全部フィチン態 P 定量法によって定量されると考えてさしつかえないと思う。

しかしこれは IHP の前記の如き方法による化学的分解によって生じた ILP についての結果であって、酵素的分解によって生じた ILP についてはその際は化学的分解とは異なった異性体が生ずるとされている故、どのような結果になるか解らない。そして動植物体および食品などに存在している ILP は一般に酵素的分解により生じた物であるからこれは次の報告で取り扱いたいと思う。

何れにせよイノシットールリン酸化合物はそのリン酸基の数および化学構造によりその生理的および栄養的意義が異なると考えられるから、フィチン態 P 定量法の問題も確実に説明されねばならない。

要 約

米ぬかより純粋に分離した inositol hexaphosphate

(注) 次の如く略記する。

IMP.....inositol monophosphate, IDP.....inositol diphosphate, ITrP.....inositol triphosphate, ITeP.....inositol tetrachosphate, IPP.....inositol pentachosphate.

を pH 3.6 にて分解し生成した inositol phosphates を分別し、精製し、フィチン態 P を定量し、全 P の中どれだけがこの定量法により定量されるかを定めた。

(1) inositol triphosphate 以上の高級リン酸化合物は、その P の 90% 以上がフィチン態 P として定量された。

(2) 分離された inositol diphosphate の 2 個の異性体はその P のそれぞれ 58.8% および 28.8% がフィチン態 P として定量された。

(3) inositol monophosphate の P は全くフィチン態 P 定量法によって定量されなかった。

終わりに貴重なご助言を賜わり、かつ実験に種々便宜を与えられた日本配合飼料株式会社永井康豊博士に深謝する。実験操作についてご教示をいただいた東北大学農学部永沢信博士に感謝し、また元素分析を担当された東京大学農学部農芸化学科および東北大学理学部化学科の元素分析室に謝意を捧げる。

(本研究は第20回日本栄養・食糧学会総会において発表した。)

文 献

- 1) Y. Nagai and S. Funahashi: *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 794 (1962)
- 2) A. Preece et al.: *J. Inst. Brewing*, **66**, 487 (1960)
- 3) R.E. Essery: *J. Inst. Brewing*, **57**, 125, 170 (1951)
- 4) R.J. Marrese et al.: *Crop. Sci.*, **1**, 80 (1961)
- 5) J. Schormüller and G. Bressau: *Z. Lebensm.-Untersuch. u. Forsch.*, **113**, 387 (1960)
- 6) Gomori: *J. Lab. Clin. Med.*, **27**, 955 (1942)
- 7) McCance and Widdowson: *Biochem. J.*, **29**, 2694 (1935)
- 8) G. Hübscher and I.N. Hawthorne: *Biochem. J.*, **67**, 523 (1957)

(東北大学教育学部)