薄層クロマトグラフィーによる肉類の簡易 迅速鮮度判定法

A Simple and Rapid Method for Estimating the Freshness of Muscle by Thin-layer Chromatography

(昭和 44 年 11 月 8 日 受 理)

田 中 ツ ネ* 新 井 健 一** 斎 藤 恒 行**
(Tsune Tanaka) (Ken-ichi Arai) (Tsuneyuki Saito)

It was devised to estimate the freshness of muscle by thin-layer chromatography, using K value which has been proposed by T. Saito *et. al.*, in 1959.

$$K = B/A \times 100$$

A: original optical density of perchloric acid extract of muscle

B: sum of optical densities of inosine and hypoxanthine eluted

Separation of inosine and hypoxanthine from nucleotides in acid extract of muscle was made on thin-layer chromatography and elution from it was in excellent recovery.

This technique is found to be more convenient than that of ion exchange chromatography. For the application of this method, only a little amount of muscle extract (0.016~0.024 ml of equal volume acid extract of wet muscle) was proved to be sufficient, and the K value estimated by thin layer chromatography was also proved to coincide with that of ion exchange chromatography.

The freshness of various kinds of muscle was successfully estimated by this method.

緒 言

核酸関連化合物の薄層クロマトグラフィー (TLC と略) に関しては, 1965年に Randerath ら¹⁾が Cellulose powder MN 300 を使用して, ヌクレオチドの定量を試みており, さらにそれ以来きわめて多くの試みがなされている。著者らは ECTEOLA-Cellulose を使用して 4 時間程度で完全に測定を完了し得る方法を確認し, 先に報告²⁾したがこの方法によると蒸溜水によってヌクレオチド (原点に留まる) とヌクレオシド, ベースが分離可能でしかも溶出の回収率は 95%以上という良好な結果であった。

一方肉類の鮮度判定については, 1959年に斎藤³⁾は K 値による測定法を提唱している。この場合 K 値は次式によって求められる。

$$K = \frac{B}{A} \times 100$$

A: 肉類の HClO₄ 抽出液の 260 または 250 mμ の吸光値

B: 同上液中のイノシン, ヒポキサンチン画分の吸光値

この方法はその後多くの研究者 (Jones ら⁴⁾⁻⁶⁾, 藤井⁷⁾, 江平⁸⁾, Fraser ら⁹⁾) によって, 実際に検討さ

れ実用面で (例えば Cold chain など) 広く応用されようとしているが, 測定法の煩雑さが, 現場での実施を困難としており, 更に簡易化と, 迅速性が熱望されているところである。そこで著者らは先にのべた TLC を使って K 値の測定を試みた。肉類としては市販のヒラメ, ホッケ, エビ, クジラ, イカ, ニジマス, アジ, コイ, 牛肉, とり肉について行ない本方法が K 値の測定 (鮮度判定) に非常に便利に使用できることがわかったのでここに報告する。

実 験

A 試料の調整

市販の肉類 1 g を 6% HClO₄ 10 ml で擂潰, 濾過し, 濾液 5 ml を NH₄OH で pH 8~10 として H₂O で 40 cc にメスアップし, イオン交換クロマトに供した。

また市販の肉類 2 g を 6% HClO₄ 2 ml で擂潰抽出し, 遠心分離機 3000 r. p. m. 10 min. にて得た上澄液を TLC の試料とした。

B 薄層クロマトグラフィー

1. 実験材料

薄層吸着剤として 2 M-NaCl, 1 M-NaOH および蒸溜水でよく洗滌し, 紫外線吸収物質を除去し, 更に 1 M

* 函館短期大学

** 北海道大学水産学部

CH₃COOHで酢酸型とした ECTEOLA-Cellulose (生化学工業株式会社製)を使用した。

2. 薄層作成

クロム硫酸混液, 蒸留水で十分洗滌し乾燥させたクロマト用ガラスプレート (5×20cm) にECTEOLA-Cellulose を10g 当り (水洗後吸引濾過した時の重量) およそ 15ml の蒸留水を加えて数分間マグネチックスターで均質に懸濁させ, これをガラスプレートの上に250mμの厚さに塗布し80~85°Cで1時間乾燥させた。

3. 試料の塗布および展開

プレートの下端 2 cm のところにウルトラマイクロペット (常光産業株式会社製) にて試料を 0.008ml~0.024 ml を帯状に塗布した。展開は密閉容器中で上昇法によって行なった。展開剤は蒸留水, 展開距離 10~12cm で展開時間は30分要した。

4. 溶出

展開後のプレートは65°C 15分乾燥後, 紫外線ランプでスポットの位置を検出し, 紫外線吸収域をミクロスパチュラでかきとり 0.15M-NaCl 4 ml にて1時間溶出した。後遠心分離によって得た上澄液を分光光度計で 250 mμの吸収を測定しこれをBとした。また別に1mlを50mlにH₂Oでメスアップし250mμの吸収を測定しこれをAとしてK値を測定した。

C イオン交換クロマトグラフィー¹⁰⁾

イオン交換樹脂はアンバーライトIRA-400 をφ1.0×10cmの長さにつめ, pH 8~10 とした試料をカラムに通した。pH10 の稀 NH₄OH80ml で洗滌し次いで 0.02M-NH₄Cl 240ml を流出してこの区分の 250mμ の吸収を測定した。この吸光値の合計をBとし, また別に試料 2ml を50mlにH₂Oでメスアップしこの 250mμ の吸光値をAとしK値を測定した。

結 果

まず, 市販のクジラ肉の抽出液を試料としてこれを薄層クロマトした結果, 分離, 溶出したイノシン, ヒポキサンチン区分の吸収と塗布した試料量との関係をしらべ Fig. 1 に示した。Fig. 1によると試料量0.016mlと0.024 ml の塗布の結果は溶出するイノシン, ヒポキサンチン画分の吸収値と比例的によく一致しており, これから算出したK値は, 試料量 0.016mlおよび 0.024ml については, 72%と72%, その他ヒラメでは46%と46%, エビでは30%と31%, ホッケでは11%と12%となりかなりよい正確度であることがわかった。0.008ml 塗布ではK値にバラツキがみられ, これは試料が微量にすぎためにおこる誤差のためであると思われるので使用しない方がよい。

Fig 1. 試料の塗布量と展開後の溶出液の吸光値の関係

次に同一の試料について TLCを 2 回行ないくりかえしによるK値の変動をみた。その結果を Table 1 に示す。Table 1 によれば TLC によるK値の測定には, かなりの再現性があり 0.008ml 塗布の場合を除けばK値として3%の変動がみられるだけであつたので, 実際の目的には十分利用できるものであることがわかる。

Table 1. TLC法によるK値の測定 (塗布した試料液量とK値の関係)

試 料	A	塗 布 量 (ml)					
		0.008		0.016		0.024	
		B	K (%)	B	K (%)	B	K (%)
クジラ	0.860	0.069	80	0.136	79	0.211	82
		0.060	70	0.136	79	0.210	82
ホッケ	1.220	0.080	66	0.146	60	0.220	60
		0.082	67	0.146	60	0.210	57
イカ	1.500	0.070	47	0.152	51	0.220	49
		0.070	47	0.153	51	0.220	49

A 試料原液の総吸光値

B 溶出したイノシン, ヒポキサンチン区分の吸光値

更に淡水産魚としてニジマス, コイ, 海水産魚としてアジ, ホッケ, 特殊な場合として軟体動物のイカ, 陸上動物として牛, ニワトリの市販の肉類を用いて TLC 法およびイオン交換法によるK値の測定を行なって Table 2 に示した。Table 2 の結果によれば, 従来広く利用されているイオン交換法によるK値の測定と今回著者が試みた TLC 法によるK値の測定の結果は非常によく一致しており, TLC 法が十分な信用のおけるものであるこ

Table 2. TLC法とイオン交換法によって測定したK値の比較

T L C 法									イオン交換法		
試料	A	塗 布 量 (m l)						A	B	K (%)	
		0.008		0.016		0.024					
		B	K (%)	B	K (%)	B	K (%)				
ニ ジ マ ス	1.190	0.066	56	0.150	63	0.225	63	2.700	1.663	62	
ア ジ	1.590	0.051	32	0.113	35	0.168	35	3.340	1.169	35	
コ イ	1.020		0		0		0	2.250	0.129	<1	
イ カ	1.500	0.070	47	0.152	51	0.217	48	7.250	3.443	48	
ホ ッ ケ	1.120			0.025	11	0.040	12	4.600	0.441	10	
牛 肉	1.010	0.060	60	0.132	65	0.202	67	2.030	1.294	64	
と り 肉	1.250	0.040	32	0.085	34	0.140	37	2.740	1.041	38	

A 試料原液の総吸光値

B 溶出したイノシン、ヒポキサンチン区分の吸光値

とが示されている。

考 察

TLC 法によるK値の測定法は、試料が非常に微量ですむということおよび薄層プレートに先に作成して保存してさえおけばK値算出までの時間がきわめて短いということから従来使用されているイオン交換法、あるいは酵素法などよりはるかに簡便で、迅速な特徴をもっている。すなわち HClO_4 で攪漬抽出後中和することなく、直ちにプレートへ塗布しその後蒸留水での展開は僅か30分、溶出後ただちに（本実験では1時間要したが実際はさらに短時間でよい）紫外線の吸収を測定すると良いのである。なお使用済の ECTEOLA-Cellulose の再生も簡便で迅速に終る²⁾。本方法の実施の中でウルトラミクロピペットを使用する操作のみがやや困難なことであるが、これは数回の練習によって慣れることができる。

なお、著者らは本法を利用して一般に市販されている肉類の調理に使用される前の扱い（主として貯蔵法など）によってK値がどのように変動するかをみていたが、その結果は次報にゆずる。

要 約

1. TLC 法によってヌクレオチド区分からヌクレオシド、ベース区分を分別しその量を測ることによってK値（鮮度判定恒数）を測定しようとした。

2. TLC 法によれば、ごく少量（筋肉の等量の HClO_4 抽出液0.016～0.024ml）の試料があればK値の測定がで

きる。

3. TLC 法によって得たK値は、従来用いられていたイオン交換クロマト法による鮮度判定のK値と非常によく一致した。

4. K値の測定に要する時間は2時間たらずであってイオン交換法に比較するとはるかに迅速、簡便であり、かつ酵素法よりも経済的である。

5. 市販の肉類10種についてK値を測定した。

イオン交換の分析にご協力くださいました函館短期大学の川美弥子さん、相馬すがさんに感謝いたします。

文 献

- 1) Randerath, E. & Randerath, K.: *Anal. Biochem.*, **12**, 83 (1965)
- 2) 田中ツネ, 西田清義: 函館短期大学研究報告, **15**, 13 (1968)
- 3) Saito, Arai, & Matsuyoshi: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **24**, 749 (1959)
- 4) Jones, N.R. & Murray, J.: *J. Sci. Food Agric.*, **15**, 684 (1964)
- 5) Jones, N.R. & Murray, J.: *J. Sci. Food Agric.*, **15**, 763 (1964)
- 6) Jones, N. R., Murray, J. & Burt, J. R.: *J. Food Sci.*, **30**, 791 (1965)
- 7) 藤井 豊, 内山 均, 江平重男, 野口栄三郎: 日水誌, **32**, 410 (1966)
- 8) 江平重男, 内山 均: 日本水産学会年会講演要旨 P. 67 (1967)
- 9) Fraser, D. I., Pitts, D. P. & Dyer, W. J.: *Fish. Res. Bd. Canada*, **25**, 239 (1968)
- 10) Saito & Arai: *Nature*, **179**, 820 (1957)