報 文

大豆中の銅およびカドミウムの限外ろ過^{*1}

(昭和 54 年 11 月 29 日受理)

田中 凉一^{*2} 吉田 精作^{*2} 檜 本 隆^{*2}

Ultrafiltration of Copper and Cadmium in Soybeans

(Chemical Form of Copper in Soybeans. I)

Ryoichi TANAKA, Seisaku YOSHIDA
and Takashi KASHIMOTO

(Osaka Prefectural Institute of Public Health: 3-69,
Nakamichi 1-chome, Higashinari-ku, Osaka)

As part of a series of studies to clarify the chemical form of heavy metals in food, the interaction between Cu (and Cd) and the water-soluble fraction of soybeans was investigated.

1. Of the total Cu and Cd in soybeans, 60% of each was extracted as water-soluble supernatant by ultracentrifugation ($\times 105,000G$).

2. The effect of pH on the extraction of the water-soluble fraction was studied. The amounts of Cu and Cd extracted at pH 4 or 5 were minimal. At pH 4 or 5, the amount of total nitrogen and the absorbance at 280 nm were also minimum. This suggests that Cu and Cd may bind to a protein(s) which precipitates at its isoelectric point, pH 4 or 5.

3. Ultrafiltration of the water-soluble fraction was carried out. Approximately 90% of Cd in the water-soluble fraction was retained in the highest molecular weight fraction (m.w. greater than 40,000). However, Cu was found in various molecular weight fractions (ca. 21% in m.w. greater than 40,000, ca. 28% in m.w. 40,000-10,000 and ca. 50% in m.w. less than 10,000).

(Received November 29, 1979)

緒 言

人体への重金属の取り込みは、そのほとんどが食品を介して行われると言っても過言ではない。食品中の重金属に関する量的な調査研究は多く行われているが、一方、質的な面に関する研究はいまだ数少ない。食品中の重金属の大部分が単純な無機塩で存在するとは考えにくく、重金属の毒性に関しても、その質的狀態の差異とともに論じる必要がある。

重金属を蓄積しやすい食品中には、重金属と結合しやすい成分が多種多量含まれていると考えられるが、重金属とそれらの結合狀態を解明し、その存在形態の差が生体に対しどのような影響をもたらすかを明らかにして行くことが必要である。

我々は、植物食品として重要であり、かつ古くから重金属の保持能力や金属の供給源としての特異性が知られている大豆に着目し、その中に多く含まれる銅について、その化学形態の解明を試みた。第1報として、限外ろ過を用いて大豆中の銅 (Cu) およびカドミウム (Cd)

^{*1} 大豆中銅の化学形態 (第 1 報)

^{*2} 大阪府立公衆衛生研究所: 大阪市東成区中道 1-3-69

の結合成分の分画を試みたので報告する。

実験方法

1. 試料および試薬

大豆 (高濃度 Cd 含有, 富山県産) は蒸留水で洗浄後水分を拭きとり, よく風乾し, 粉碎器により粉末にして使用した。

Cu 標準溶液は半井化学薬品 (株) 製金属 Cu (99.999%) を硝酸に溶解後蒸発乾固し, 再び硝酸を加えて溶解し, 蒸留水で一定量とし 1,000 ppm の原液を調製した。Cd 標準溶液も同様にして和光純薬工業 (株) 製金属 Cd (99.999%) を用いて調製した。

ウルトラフィルターは東洋濾紙 (株) 製 UH-1 (分画分子量 1,000), UK-10 (同 10,000), UP-20 (同 20,000), UK-50 (同 50,000), UK-200 (同 200,000) を使用した。その他の試薬はすべて特級, 超特級を用いた。

ガラス器具は使用前に温希硝酸で洗浄後, 蒸留水で洗浄したものを用いた。

2. 装 置

原子吸光分光光度計は Varian Techtron 社製 AA5 型, 低温灰化装置は International Plasma Corporation 製 1101B 型を使用した。超遠心分離機は (株) 日立製作所製分離用超遠心機 55P-2 型, 窒素分析装置は ANTEK 720 型を用いた。分光光度計は (株) 日立製作所製 139 型を使用した。限外ろ過器は東洋濾紙 (株) 製 UHP-25 および 43 を使用した。

3. Cu および Cd の定量

試料はサンプルボートに精秤し, 乾燥試料はそのまま, 液状試料は水浴上で乾固させた後, Radio frequency power 200 W, O_2 流量 100 ml/min の条件で低温灰化する。灰分を少量の希硝酸に溶解後, 水浴上で蒸発乾固させる。次に 0.5 N 硝酸を加えてよく溶かし, 5~10 ml に定容とし原子吸光分析に供する。

4. 総窒素量の測定

本分析に用いた機器は化学発光法を利用した窒素分析装置である。ここではその概略を示すが, 詳細については報文²⁾を参照されたい。Fig. 1 に装置の概略図を示す。検出器の原理は大気中の NO_x の自動測定に使用されている機器やニトロソアミン類の定性, 定量に用いられる TEA (Thermal energy analyzer) と同一である。機器は試料導入部, 熱分解炉部および化学ルミネセンス検出部に分かれる。試料は導入部で石英ウール付きボートにマイクロシリンジで注入し, 燃焼炉部に導入する。ここで 1000° 以上の過剰酸素状態におき, 試料中の N を NO に酸化する。次に検出部において NO とオゾンとの反応が起こり, 準安定状態に励起した NO_2^* を生成する。これが基底状態にもどる時に放出する近赤外領域の光 (650~900 nm) を光電子増倍管で検出する装置である。この装置の検出限界は非常に低く, 10 ngN/10 μ l あれば十分に測定可能であった。この量はロイシンで約

Fig. 1. Schematic diagram of total nitrogen apparatus¹⁾

94 ng, 牛血清アルブミンで約 65 ng に相当する量である。この装置を用いると使用するサンプル量も 10 μ l と少なく, また, 数十本という多くの試料について迅速な定量が可能になり窒素分析に非常に有効な手段になると考えられた。今回の測定条件は Ar: 100 ml/min, O_2 : 500 ml/min, inlet および center 温度: $1,000\sim1,050^\circ$, outlet 温度: 950° であった。試料用シリンジは Precision sampling corp. 製 Pressure Lok[®] シリンジ (25 μ l) を使用した。

5. 水溶性画分の抽出

大豆粉末 5 g に蒸留水 100 ml を加えてよく混和し, 室温で 3 時間静置する。次に, 4° 105,000 G で 60 分間超遠心分離を行うと試験液は 3 層に分離する。上層の脂肪皮膜, 下層の残渣が混入せぬように中間層の水抽出液を分取する。

pH による抽出効果の検討に際しては, 1 N 塩酸または 1 N 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を調整後同様の操作で抽出した。

6. 限外ろ過

抽出液 30 ml をろ過器に入れ, 窒素ガスを用いて加圧しろ過した。加えた圧力は UH-1, UK-10, UP-20, UK-50 では 2 kg/cm^2 , UK-200 では 1 kg/cm^2 であった。ろ過はろ液が 20 ml 得られるまで行った。

結果および考察

1. 水可溶画分中の Cu および Cd 量

原試料大豆中の Cu および Cd 濃度はそれぞれ 14.9 および 1.1 ppm であった。大豆中の Cu および Cd のバックグラウンド値²⁾は 3 検体平均で Cu は 15.5 ppm, Cd は 0.08 ppm であった。大豆粉末を蒸留水で 3 時間浸漬することにより抽出される Cu, Cd 量はそれぞれ原試料中の 59%, 62% と共に約 6 割であった。

2. Cu および Cd の溶出に対する pH の影響

大豆粉末を蒸留水で浸漬抽出する時の pH は約 6.5 であったが, pH を 1 から 12 まで変えて同様の抽出操作を行ったときの Cu および Cd の溶出量を Fig. 2 に示す。また, Fig. 2 には同時に測定した紫外部吸収および総窒素量の pH による変化も示す。

Fig. 2. Effect of pH on metal contents in water-soluble fraction of soybeans

△—△, Cu; ▽—▽, Cd; +—+—, total nitrogen; ○—○, OD₂₈₀

溶出される Cu および Cd の量は pH 4 および 5 で最も低く、pH 3 以下や中性、アルカリ性では抽出率は高くなっている。また、同時に測定した 280 nm における紫外吸収や総窒素量の pH による変化パターンも Cu, Cd の溶出量の変化と同様に pH 4~5 で最も低い値を示している。このことを考え合わせると、Cu および Cd は pH 4~5 で等電点沈殿を生じるタンパク質と結合しており、タンパク質が沈殿すると同時にタンパク結合状態のままで沈殿するのであろうと考えられた。

大豆タンパク質はその約 90% が水で抽出され、その抽出タンパク質の約 90% が pH 4~5 で等電点沈殿を生じる大豆グロブリン^{3),4)}であることが知られている。この大豆グロブリンと結合している Cu や Cd が pH 4~5 で沈殿するのであろう。大豆グロブリンは貯蔵型のタンパク質であり、その組成は沈降の性質や血清学的性質からほぼ明らかにされて来ている。しかし、これら大豆グロブリンの成分と重金属との相互関係についてはまだ研究されておらず、大豆の重金属保持能力を検討する上で重要な課題であると考えられる。

3. 限外ろ過による Cu および Cd 結合成分の分画

抽出液を分画分子量の異なる 5 種類のウルトラフィルターでろ過したときのろ液中に含まれる Cu, Cd 量および総窒素量を Fig. 3 に示す。図中 A は抽出液、B, C, D, E, F はそれぞれ UK-200, UK-50, UP-20, UK-10, UH-1 と順に分画分子量の小さくなるフィルターでろ過したろ液中の Cu 量, Cd 量および総窒素量である。

Cu 結合成分の分布を見ると、フィルターの分画分子量が B から F へと小さくなるにつれて Cu 量が減少していることがわかり、広い分子量範囲で Cu が分布していることが示された。しかし、Cd においては Cu の場合とは全く異なった分布パターンを示しており、B, C, D, E, F が同様に微量であり、Cd の結合している成分が UK-200 フィルターを通過できないことを示している。

Fig. 3. Contents of Cu, Cd and total nitrogen with ultrafiltration

A, soybean water extracts; B, permeate with UK-200; C, permeate with UK-50; D, permeate with UP-20; E, permeate with UK-10; F, permeate with UH-1

本実験に使用した各ウルトラフィルターの分画分子量は UK-200 が 200,000, UK-50 が 50,000, UP-20 が 20,000, UK-10 が 10,000 そして UH-1 が 1,000 となっているが、実際にフィルターを透過可能な分子量は UK-200 では約 40,000, UK-50 では約 10,000, UP-20 および UK-10 では約 1,000, UH-1 では約 300 と非常に小さい値となることが算出された。また、透過可能な分子量であっても、溶液に含まれるタンパク質間の相互作用により透過できない場合も多いと考えられる。したがって、UK-200 のフィルターを用いても分子量約 10,000 のタンパク質でさえかなり多く残存している可能性があると考えられる。

しかし、ここで一応タンパク質相互の作用を無視して透過可能な分子量から考えてみると、Cd の結合している成分の分子量はその約 9 割が分子量約 40,000 以上であり、残りは分子量約数百の大きさと考えられる。また Cu においては、分子量約 40,000 以上の成分に全体の約 21% の Cu が結合しており、次に分子量 40,000 から 10,000 の間の成分に約 28%, 分子量 1,000 前後から数百の成分に約半分の量の Cu が存在していると考えられる。

大豆グロブリンの主成分³⁾であり、合わせて約 70% を占める 11S および 7S 成分は、分子量がそれぞれ約 310,000 および約 180,000 と報告されており、これらは UK-200 フィルターを通過することのできない成分である。Fig. 3 の総窒素量の測定では、UK-200 フィルターにより阻止されたものは約 60% であるが、この画分に 11S および 7S 成分が含まれると考えられる。Cd においては、抽出された Cd の約 9 割がこの 11S あるいは 7S 成分と結合しているのではないかと考えられる。Cu においては抽出量の約 2 割がこれらの成分と結合していると考えられるが、約 3 割弱がさらに分子量の小さな画分、すなわち B と C の差で表される分子量約 40,000~10,000 の成分と結合していると考えられる。それらは総窒素量から見ると約 6% と少ない成分である。

また、Cu はその約半分量を低分子領域に溶出するのに対し、Cd はほとんど高分子成分に結合していると考え

えられ、このパターンの差は Cu と Cd の化学形態の差を推察させるものとして興味深い結果である。この Cu と Cd の存在形態の差が単に Cd の分子量 (112.4) が Cu の分子量 (63.5) の約 2 倍という分子量の差、粒子の大きさの差に基づくものか、Cu と Cd の化学的性質の差を示すものかは、今後の化学形態の研究を進める過程で解決されるものと考えられる。

本実験に使用した限外ろ過という手段は、溶質の濃縮を行う、あるいは非常に大まかな分画をするのに用いるには有用であるが、細かな分画という点では实际的に難点があり、今回の試みにおいても Cu と Cd の存在状態の差異は明らかになったものの、Cu の結合成分の分画には不十分であった。今後の細かい分画にはゲルろ過などの手法が使われることが必要であると考えられる。

要 約

大豆中の Cu および Cd の化学形態について、水抽出、限外ろ過により検討した。

1. 水抽出により Cu, Cd とともに約 6 割が抽出された。
2. 水抽出における pH の影響を検討した。Cu, Cd とともに pH 4~5 で最も抽出率が低かった。抽出液の紫外部吸収および総窒素量も同様に pH 4~5 で最も低い値を示した。これにより、Cu, Cd は pH 4~5 で等電点沈

殿を生じるタンパク質と相互関係があるように思えた。

3. 抽出液の限外ろ過を行った。Cd は分子量約 40,000 以上の画分に約 9 割が存在した。一方、Cu は分子量約 40,000 以上に約 21%, 分子量約 40,000~10,000 に約 28%, 分子量約 10,000 以下に約 50% と広い分子量範囲に分布し、Cd との存在形態の差異を示した。

終りに臨み、本研究を行うにあたり多大の御指導、御助言をいただきました国立衛生試験所内山 充部長、大阪大学薬学部近藤雅臣教授および当所国田信治副所長に深謝いたします。なお、本研究の一部は環境庁環境保全研究助成金の援助を受けたことを付記して深謝いたします。

文 献

- 1) 中村彰夫, 榎本 隆: A & R (Analysis and Research), 分析機器改題. 6, 248~252 (1978) 産業開発社。
- 2) 田中之雄, 池辺克彦, 田中凉一, 榎本 隆: 食衛誌. 18, 75~85 (1977)。
- 3) 越山育則: “植物酵素・蛋白質研究法” 別冊 蛋白質・核酸・酵素. 76:2, 456~464 (1976) 共立出版。
- 4) 越山育則, 福島男児: 栄養と食糧, 23, 297~311 (1970)。