軟体動物成分に関するポーラログラフ的研究—Ⅶ.

‘するめ’肉より分離されたポーラログラフ還元波
塩基成分 (ホマリン) の同定について

福 島 清

(1962 年 4 月 5 日受理)

POLAROGRAPHIC STUDIES ON THE MOLLUSCAN MEAT—VII.
IDENTIFICATION OF A POLAROGRAPHICALLY REDUCIBLE
BASE (N-methyl picolinic acid betaine, Homarine)
ISOLATED FROM DRIED SQUID MUSCLE.*

Kiyoshi FUKUSHIMA**

Succeeding to the experiment in the previous paper¹⁾, comparative studies were carried out on the following attempt to establish that the PRB (polarographically reducible base) isolated from the extracts of dried squid muscle is homarine (N-methyl picolinic acid betaine):

1. PRB-HCl derived from its chloraurate.
2. Synthetic homarine-HCl prepared by the methylation of picolinic acid.
3. Trigonelline, a commercial specimen (N-methyl nicotinic acid betaine, an isomer of homarine).

The comparison of the PRB-HCl was made with synthetic homarine-HCl and trigonelline in regard of their absorption spectra, half wave potentials and paperchromatographic behaviors (Tables 1~3 and Figs. 1~4).

The result showed that the PRB-HCl and the synthetic homarine-HCl are intirely same in these properties.

Also, as the results of elementary analysis of the PRB-chloraurate (in Table 4), the PRB isolated from the extracts of dried muscle was identified as homarine.

緒 言

著者が前報¹⁾において単離したポーラログラフ還元波成分 (以下“PRB 成分”と略す) のペーパクロマトグラフィーの結果、トリゴネリンと R_f 値が非常に近似すること、ならびに本成分塩化金塩の融点測定値等から、これが1933年 KUTSCHER および ACKERMANN²⁾ 等が *Arca noae* の浸出液より、同年相次いで HOPPE-SEYLER³⁾ が *Homarus* の筋肉より分離しその構造を確定したホマリンであることがほぼ明らかとなった。これをさらに確認するため、本報ではピコリン酸を N-メチル化して得た合成ホマリン塩酸塩と、前報¹⁾において得た PRB 成分塩酸塩とを紫外線吸収スペクトル、ポーラログラフ半波還元電位、ならびにペーパクロマトグラフィー R_f 値等により比較し、両者の完全な一致を認めた (Tables 1, 2 and 3; Figs. 1, 2, 3 and 4)。

また、前報¹⁾において得た PRB 成分の塩化金塩の元素分析値 (Table 4) より、‘するめ’肉を始め、多くの軟体動物、および甲殻類動物筋肉ならびに組織中にほとんど必ず見受けられる PRB 成分はホマリンであることを確認した。

実 験 の 部

試料の調整

合成ホマリン塩酸塩; TURNAU⁴⁾の方法によつて、ピコリン酸を炭酸カリウム微アルカリ性-80% エタノ

* 日本水産学会 昭和 36 年度秋季大会 (鹿児島) にて発表。

** 味の素株式会社 食品研究室 (Food Research Laboratory Ajinomoto Co. Ltd., Chuō-ku, Tokyo Japan).

ール溶液に溶かし、ヨウ化メチルと加熱し、アルコールを大半溜去した後、硫酸銀と処理し、さらに過剰の銀を硫化水素で除去する。硫化銀および硫化水素を除いた液をエーテルと共に数回振盪し、溶液中に残存する沃化メチルを抽出除去する。この液を前報¹⁾記載のリンタングステン酸沈澱法により処理して、ホマリン塩酸塩を精製分離した。なお、ピコリン酸とヨウ化メチルの反応モル比は 1:8 とし、反応温度および時間は 60°C, 18 時間とした。精製分離せる合成ホマリン塩酸塩の全窒素測定値は 8.06% で、理論値 (8.08%) によく合致した。

抽出 PRB-塩酸塩; 前報¹⁾において得た PRB 成分塩化金塩より調製した塩酸塩の結晶を用いた。

トリゴネリン; 市販特級品 (東京化成製) を用いた。

実験 I. 酸およびアルカリ溶液中における合成ホマリン塩酸塩, 抽出 PRB-塩酸塩およびトリゴネリンの紫外外部吸収曲線の比較

GASTEIGER⁵⁾等の方法により、0.5M-HCl および 0.3M-NaOH 溶液中におけるそれぞれの紫外外部吸収

Fig. 1. Comparison of the absorption spectra of synthetic homarine, trigonelline and isolated PRB-HCl in acidic and basic solution.

A and A', synthetic homarine-HCl; B and B', trigonelline; C and C', PRB-HCl isolated from 'Surume' (dried squid muscle).

—, in 0.3M NaOH; ----, in 0.5M HCl.

曲線を記銀し Fig. 1 のような結果を得た。測定物質の濃度は合成ホマリン塩酸塩, 6.4×10^{-5} M; トリゴネリン, 1.6×10^{-4} M; および抽出 PRB-塩酸塩, 6.0 mg/l の濃度とした。

Fig. 1 の結果から明らかなように, 合成ホマリンおよび抽出 PRB の吸収極大波長は酸およびアルカリ溶液中において, 270 および 272 m μ で両試料の完全な一致を認めた。

また, 一方, ホマリンの異性体であるトリゴネリンの吸収極大波長は 265 m μ で 268~272 m μ の波長範囲に肩を有することが特異的である。これ等については, すでに WELSH⁶⁾等の報告が見受けられるが, PRB 成分の中性溶液中での吸収極大波長が 272 m μ であることは著者⁷⁾が前報においてすでに指摘しており, この事実と本実験結果とよく一致する。

実験 II. ポーラログラフ半波還元電位による合成ホマリン塩酸塩, 抽出 PRB-塩酸塩およびトリゴネリンの比較

Table 1 および 2 の様な各種非緩衝液ならびに緩衝液を支持電解質として, それぞれのポーラログラム

Table 1. Comparison of the half wave potentials ($E_{1/2}$, vs. S. C. E.) of synthetic homarine-HCl, isolated PRB-HCl and trigonelline in various supporting electrolytes.

Supporting electrolytes	pH	Mark	Synthetic homarine-HCl	Mark	Isolated PRB-HCl	Mark	Trigonelline
0.5M-Sodium citrate.	8.26	A	-1.26 V	A'	-1.28 V	a	-1.48 V
0.1M-Potassium phosphate	7.28	B	-1.32	B'	-1.32	b	-1.40
0.1M-Potassium phosphate	7.86	C	-1.24	C'	-1.23	c	-1.41
0.5M-Sodium acetate	7.31	D	-1.18	D'	-1.17	d	-1.41
0.5M-Sodium bicarbonate	8.84	E	-1.26, -1.47	E'	-1.25, -1.47	e	-1.40
0.1M-Sodium borate	8.85	F	-1.30	F'	-1.30	f	-1.41
0.2M-Potassium phthalate	5.10	G	-1.11	G'	-1.12	g	-1.26
0.2M-Potassium phthalate	3.17	H	-1.03	H'	-1.06	h	-1.13

Synthetic homarine-HCl, 0.8×10^{-4} M; Isolated PRB-HCl, 3.8 mg%; Trigonelline, 8×10^{-4} M

Table 2. Comparison of the half wave potentials ($E_{1/2}$ vs. S. C. E.) of synthetic homarine-HCl, isolated PRB-HCl and trigonelline in McIlvaine's buffer of various pH and in 1N-H₂SO₄.

Supporting electrolytes	pH	Mark	Synthetic homarine-HCl	Mark	Isolated PRB-HCl	Mark	Trigonelline
McIlvaine's buffer.	8.10	I	-1.24 V	I'	-1.22 V	i	-1.44 V
" "	7.10	J	-1.17	J'	-1.15	j	-1.25
" "	6.17	K	-1.17	K'	-1.12	k	-1.35
" "	4.88	L	-1.10	L'	-1.13	l	-1.16
" "	4.18	M	-1.04	M'	-1.09	m	-1.19
" "	3.27	N	-1.00	N'	-1.01	n	-1.07
" "	2.10	O	-0.93	O'	-0.95	o	-1.11
1.0N-H ₂ SO ₄	—	P	-0.75	P'	-0.77	p	—

Each concentration is the same as in Table 1.

を記録した (Figs. 2 and 3)。また、ポーログラム半波還元電位の測定は飽和甘汞電極を規準としそれらの測定値を Table 1 および 2 に示す。

Fig. 2 および 3 に合成ホマリンおよび抽出 PRB-塩酸塩を Fig. 4 にトリゴネリンのポーログラムをそれぞれ示す。また、各物質の濃度は抽出 PRB 塩酸塩, 3.8mg%; 合成ホマリン塩酸塩, $0.8 \times 10^{-4} M$; トリゴネリン, $8 \times 10^{-4} M$ とした。

合成ホマリンおよび抽出 PRB-塩酸塩共に各種支持電解液中で全く相似たポーログラム波形を示し、またそれ等の半波還元電位も相互によく一致した値が得られた。一方、トリゴネリンのポーログラム波形は pH 7.0 以上の非緩衝液 (a~f) または緩衝液 (i~j) を支持電解質とした時の方が限界電流値一定に達してをり、酸性溶液を支持電解質として用いるよりも明瞭な還元波電流が得られる。ホマリンの場合には、むしろ酸性側の緩衝液または非緩衝液 (G~O) 中において、良好なポーログラム還元液 (第 1 波) が認められ、

Fig. 2. Comparison of the polarographic waves of synthetic homarine and isolated PRB-HCl in various supporting electrolytes.

Marks of A~H and A'~H' are the same as those in Table 1.

Fig. 3. Comparison of the polarographic waves of synthetic homarine and isolated PRB-HCl in McIlvaine's buffer of various pH and in 1.0N-H₂SO₄. Marks of I~P and I'~P' are the same as those in Table 2.

K-1; 0.05% of gelatin was added to the buffer, K.

Fig. 4. Polarographic waves of trigonelline in various supporting electrolytes. Marks of a~p are the same as those in Tables 1 and 2.

この場合第2波については極大波を示す傾向がある。以上の諸点においてはホマリンはトリゴネリンと対照的な挙動を示し、半波還元電位 ($E_{1/2}$) も、後者の方がやや負電位の値を示す (Table 1)。

すなわち、アルカリ性溶液を支持電解質とした場合 (A~F and a~f in Table 1) には約 $-0.1 \sim -0.2V$ の半波還元電位の差が見られる。

また、Fig. 2 および 3 の結果から緩衝溶液 (pH 8.10~3.27) 中において、ホマリンの第2波が明らかな極大波を示したので、pH 6.17 の Mc Ilvaine 緩衝液を支持電解質とし、ゼラチン濃度 0.05% となし、そのポーログラムを記録したところ Fig. 3 中 K-1 のような還元波電流を得、第2波の極大波を消失した。しかしゼラチン添加の効果は極大波を抑制するが、この場合第1波および第2波の合波となり完全なS字型曲線を得ることができなかった。

しかるに pH 3.2 の強酸性側の支持電解液 (N in Table 2 and Fig. 3) に同濃度のゼラチンを添加した場合の効果は、K-1 のように合波とならず、二者の波が完全に分離した。またゼラチン添加時の還元電流値は、第1波についてはゼラチン無添加の場合と全く同一であることを確認した。

実験 III. 2 種溶媒系による合成ホマリンおよび抽出 PRB-塩酸塩のペーパークロマトグラム R_f 値の比較

合成ホマリンおよび抽出 PRB-塩酸塩、トリゴネリンおよびグリコールベタインの4者につきペーパークロマトグラフィーを行い、2 種溶媒系において R_f 値を比較し Table 3 のような結果を得た。検出はドラゲンドルフ試薬噴霧ならびに紫外線吸収鑑別法により行つた。

抽出 PRB-塩酸塩ならびに塩化金塩は何れも合成ホマリン塩酸塩の R_f 値と全く一致した。

以上の実験結果より、著者が「するめ」肉より分離せる抽出 PRB-塩酸塩と合成ホマリン塩酸塩の完全な一致を認めた。なお、前報¹⁾ において単離した抽出 PRB の塩化金塩の元素分析値 (Table 4) より「するめ」肉中の PRB 成分がホマリンであることを同定した。

Table 3. Comparison of the R_f values of synthetic homarine, isolated PRB and trigonelline on the paperchromatogram with two solvent system.

Solvent No.	I *	II **
Samples		
Trigonelline	0.13	0.31~0.33
Synthetic homarine-HCl	0.23	0.54
Glycol-betaine	0.14~0.16	—
Isolated PRB-HCl	0.23	0.54~0.56
Isolated PRB-HAuCl ₄	0.23	0.54~0.56

* I, n -BuOH-dioxane-H₂O (4:1:5)⁶⁾

** II, 95% EtOH-28% NH₄OH (95:5)⁶⁾

Table 4. Elementary analysis of homarine chlorauate isolated from 'Surume' (dried squid muscle).

$C_7H_7NO_2$ HAuCl ₄ , Calcd.:	C, 17.63; H, 1.69; N, 2.93; Au, 41.30%
Found:	C, 17.81; H, 1.70; N, 3.25; Au, 41.26%

要 約

前報¹⁾において‘するめ’肉より単離せるポーログラフ還元波成分 (PRB 成分) 塩酸塩を、ピコリン酸を N-メチル化して得た合成ホマリン塩酸塩およびトリゴネリン市販品と比較し、下記の通りの結果を得、また、本 PRB 成分の塩化金塩元素分析値より著者がこれまでに追究してきた PRB 成分はホマリン (N-methyl picolinic acid betaine) であることを確実に同定した。

1) 酸およびアルカリ溶液中において、本 PRB 成分塩酸塩は 270~272 m μ の波長に吸収極大を有し、合成ホマリン塩酸塩との完全な一致を認めた。一方、トリゴネリンの吸収極大波長は酸性溶液中で 265 m μ であつた。

2) ポーログラフ法による比較では、本 PRB 成分塩酸塩および合成ホマリン塩酸塩共に同一挙動の還元波を表わし、たとえば、酸性溶液を支持電解質とした場合に、2 段波となり第 2 波は極大波を示す。ゼラチン添加によつて極大波は抑制されるが第 1 波の波高 (電流値) に影響をおよぼさない。

3) 半波還元電位 ($E_{1/2}$) は、PRB 成分および合成ホマリン塩酸塩共に各種支持電解液を用いて完全な一致を認めた。pH 2.1~8.1 の支持電解液中で、両者の示す $E_{1/2}$ は -0.93~-1.24V の範囲であつた。一方、トリゴネリンの $E_{1/2}$ は各 pH 段階でホマリンの $E_{1/2}$ より約 -0.1~-0.2V 負の電位に認められた。

4) ペーパークロマトグラフィーにより本 PRB 成分の塩酸塩ならびに塩化金塩の R_f 値と、合成ホマリン塩酸塩の R_f 値とは 2 種溶媒系で完全に一致した。

5) 前報¹⁾で‘するめ’肉より単離した PRB 成分塩化金塩 (M. P., 188~189°C) の元素分析値から、本 PRB 成分がホマリンであることを明らかに同定した。

終りに臨み、本研究を行うに当り終始懇篤なる御指導を賜つた京都大学教授館勇博士、東京水産大学教授岡田郁之助博士、味の素株式会社食品研究室顧問戸井文一博士および食品研究室長小原正美氏に深甚の謝意を表す。また、元素分析の御便宜をたまわりました東京大学助教授山下恭平博士に厚く御礼申し上げる。

文 献

- 1) 福島: 本誌, 28, 810 (1962).
- 2) KUTSCHER, F. and ACKERMANN, D.: *Z. Physiol. Chemie*, 221, 33 (1933).
- 3) HOPPE-SEYLER, F. A.: *Z. Physiol. Chemie*, 222, 105 (1933).
- 4) TURNAU, R.: *Monatshefte für Chem.*, 26, 537 (1905).
- 5) GASTEIGER, E. L., HAAKE, P. C. and GERGEN, J. A.: *Annals of the New York Acad. of Sci.*, 90, 622 (1960).
- 6) WELSH, J. H. and PROCK, P. B.: *Biol. Bull.*, 115, 551 (1958).
- 7) 福島・岡田: 本誌, 26, 1222 (1960).