水産動物の L-アスコルビン酸に関する生化学的研究—I.

魚肉および内臓の L-アスコルビン酸定量法について

池田 静徳・佐藤 守・木村良太郎

(1963 年 3 月 6 日受理)

BIOCHEMICAL STUDIES ON L-ASCORBIC ACID IN AQUATIC ANIMALS—I. AN IMPROVED METHOD FOR ASSESSMENT

Shizunori IKEDA, Mamoru SATO, and Ryotaro KIMURA*

For assessment of L-ascorbic acid in fish, a hydrazine method based on the formation of 2,4-dinitrophenyl-osazone is now in use. Under the condition prescribed for this method, however, it was found that substances contained in extracts from fish tissues would form interfering osazones and thus affect assessment of ascorbic acid (Table 2).

Analysis revealed that major components of these impurities consisted of amino acids, and the rest were sugars and organic acids. Among the amino acids, histidine had the largest influence upon the osazone formation; tyrosine and tryptophan also affected the result of assessment (Table 3 and Fig. 2). Some of sugars and organic acids affected the assessment only when they were present at a relatively high concentration in the test solution. They were glucuronic acid, glucuronolactone, galacturonic acid, oxaloacetic acid, and pyruvic acid (Table 4).

As chromatography through an acid alumina column could thoroughly separate the interfering osazones, the use of the chromatographic treatment is proposed in order to improve the ascorbic acid assessment by the hydrazine method (Fig. 4).

L-アスコルビン酸 (AsA**) の定量法としては古くから数多くの方法が報告され、また改良されているが、そのなかで現在もつとも広く用いられているのはインドフェノール法とヒドラジン法である。前者は AsA の還元力を測定する方法で、魚類の AsA 含有量を測定した従来の研究のほとんどはこの方法を用いている (東秀雄総説¹⁾ 参照)。しかし、このインドフェノール法は魚肉および内臓の抽出液中に混在する他の還元性物質の影響をうけるため²⁾、後者のヒドラジン法に比しいちじるしく大きな値を示し適当とは思われない。他方、ヒドラジン法³⁾⁴⁾ は、AsA を酸化型とし一定条件下で 2,4-デニトロフェニールオサゾンを生じさせその硫酸溶液の呈する赤桃色を比色定量するもので、微量定量に適し、現在もつとも AsA の定量に適当と考えられているので、著者らはこの方法を用いた。ところが、種々検討の結果、魚肉および内臓の抽出液からこのヒドラジン法の条件下で生成したオサゾン中には、AsA 以外の夾雑物質に基づくオサゾンがかなり含まれることを認めた。したがって、現行の方法では真の AsA 値を測つたことにならないので、混在する定量妨害物質をしらべその除去法を工夫した。その結果、アルミナカラム処理を併用するヒドラジン改良法を設定することができたので報告する。

実験の部

供試魚: フナ *Carassius auratus* (LINNÉ) とコイ *Cyprinus carpio* (LINNÉ) は、京都近郊の養魚場

* 京都大学食糧科学研究所 (The Research Institute for Food Science, Kyoto University, Kyoto, Japan).

** AsA: L-ascorbic acid.

産の活魚を5月から7月にかけて実験に供した。ヘダイ *Sparus sarba* FORSKÅL は、近畿大学水産研究所白浜実験所で飼育中の活魚を2月に測定した。

試 薬: (1) 1% 塩化第1錫を含む5% メタリン酸溶液, (2) 2% または4% チオ尿素を含む5% メタリン酸溶液, (3) 飽和臭素溶液, (4) 9N-リウ酸に溶かした2% 2,4-ジニトロフェニールヒドラジン溶液, (5) 85% または50% リウ酸, (6) 酸性アルミナ (クロマトグラフィー用, activity grade 1), (7) 酢酸エチル, (8) 2% 酢酸を含む酢酸エチル溶液。

実験 1. AsA 定量値におよぼす夾雑物質の影響

普通のヒドラジン法によつて魚肉および内臓の AsA を定量する場合は、つぎのとおり操作した。組織 1~3g に氷冷5% メタリン酸 (1% 塩化第1錫を含む) 約 5ml を加え、氷冷しながら POTTER ERBEJEHM の硝子ホモゲナイザーで十分すりつぶし、同液にて 15~30ml 容とした。20 分後濾過し、濾液を2分して一方を臭素酸化した。ここで臭素酸化した濾液からは全 AsA (AsA+DAsA*+DKG**) 量が、臭素酸化しない濾液からは酸化型 AsA (DAsA+DKG) 量が測定される。これらの濾液それぞれ 1ml ずつを試験管にとり、5% メタリン酸 (2% チオ尿素を含む) 3ml および2% 2,4-ジニトロフェニールヒドラジン液 1ml を加え、37°C, 3時間放置した。生成したオサゾンに 85% リウ酸 5ml を氷冷しながら滴下したのち、常法とおり 530 mμ において比色定量した。

ところが、比色に供するこのリウ酸溶液がやや黄褐色を帯び、しかも内臓各器官によつて色調が少しずつ異なることに気付いた。緑葉などの植物組織では、特別なものを除き、少なくとも肉眼的には明りような赤桃色を呈するのが普通である。これより、魚肉および内臓の抽出液には、上記の実験条件下でオサゾンを生成する AsA 以外の物質がかなり混在すると考えた。

Fig. 1. Separation of dehydroascorbic acid-osazone from other interfering osazones by chromatography on acid alumina.

(a): before acid alumina column treatment.

(b): after the treatment.

(c): synthetic dehydroascorbic acid-osazone.

* DAsA: dehydro-L-ascorbic acid.

** DKG: 2,3-diketo-L-gulonic acid.

1例として、コイの腎臓抽出液から生成したオサゾンについて、そのリウ酸溶液の吸収スペクトルを測定したところ Fig. 1, (a) のとおりで、420 m μ 付近から紫外部にかけていちじるしい吸収がみられた。結晶 AsA からえたオサゾンの吸収スペクトルは同図、(c) のとおりで、370 と 528 m μ にピークを示す。したがって、このまま常法どおり E_{530} を測定したのでは真の AsA 量を求めることができない。

実験 2. AsA 定量値に影響する夾雑物質の除去

MAPSON⁵⁾ は、活性アルミナを用いて、植物組織の抽出液から生成した DAsA オサゾンと他の夾雑物オサゾンとを分別した。著者らは、この方法を動物組織に用いて、AsA 以外の夾雑物を分別除去しようと試みた。

魚の組織抽出液から生成したオサゾン沈でんを径 2 cm の円型濾紙に集め、蒸留水約 20 ml で洗い、沈でんを濾紙ごとビーカーに移し、酢酸エチル 3 ml ずつで 4 回溶出した*。溶出液を酸性アルミナカラム (7 g, 1.2 $\times$ 6 cm) に注入し、さらに酢酸エチル約 15 ml を流すと未反応ヒドラジンが残っている場合には最初に流出する。カラムには DAsA オサゾンが着色帯を形成し、大部分の不純物オサゾンはカラム上端に固く吸着された。つぎに、2% 酢酸を含む酢酸エチルを流すと約 25~50 ml の間で DAsA オサゾンのみが溶出された。

Fig. 1, (b) は、コイ腎臓抽出液からのオサゾン (同図, a) を上記のアルミナカラム処理後測定した吸収スペクトルである。これは純 DAsA オサゾン (同図, c) にほぼ一致し、不純物が除去されたことを示している。アルミナカラム処理前後の E_{530} から計算して、従来の方法では約 15% が AsA 以外の夾雑物質に基づく値であった。

Table 1. Effect of treatment with acid alumina column on estimation of ascorbic acid contents of fish organs.

Organ	フナ 'Funa' (F.L., 23cm; B.W., 250g)			コイ Carp (F.L., 39cm; B.W., 1070g)			ヘダイ Silver sea bream (F.L., 37cm; B.W., 860g)		
	Pro- cedure A (μ g/g)*	Pro- cedure B (μ g/g)*	Ratio of values ($\frac{B}{A} \times 100$)	Pro- cedure A (μ g/g)*	Pro- cedure B (μ g/g)*	Ratio of values ($\frac{B}{A} \times 100$)	Pro- cedure A (μ g/g)*	Pro- cedure B (μ g/g)*	Ratio of values ($\frac{B}{A} \times 100$)
Liver	56	41	73	65 ^{a)}	45 ^{a)}	69	92	58	63
Kidney	119	97	82	93	85	91	412	333	81
Heart	83	29	35	61	30	49	327	134	41
Brain	208	178	86	261	232	89	605	477	79
Eye	88	65	74	113	61	54	115	54	47
Spleen	125	88	70	156	128	82	256	183	71
Gall-bladder ^{b)}	117	29	25	62	16	26	178	29	16
Ovary	—	—	—	711	536	76	513	396	77
Testes	74	28	38	—	—	—	—	—	—
Muscle	38	22	58	35	16	45	121	40	33

Procedure A: the usual method proposed by ROE and KUETHER³⁾.

Procedure B: the improved method using acid alumina column treatment as in Fig. 4.

* Values are given as μ g of total-AsA per g of fresh tissue.

a): Hepatopancreas. b): Including bile. F.L.: fork length, B.W.: body weight.

'Funa': *Carassius auratus* (LINNÉ).

* 4 回以上溶出をくり返してもなお褐色を帯びた若干のオサゾンが溶出されずに残る場合がある。とくに魚筋肉でこれがいちじるしい。しかし、AsA からのオサゾンは 3 回でほとんど完全に溶出され、残るオサゾンは後記の夾雑物に基くものである。したがって、4 回以上溶出を行なう必要はない。

分画溶出した DAsA オサゾン、溶媒をいったん真空蒸発除去したのち、酢酸エチル 1 ml に溶かし、ついで 50% リウ酸 5 ml を加えると赤桃色に呈色するから、以下常法どおり E_{530} を測定して AsA 量を求めた。

フナ、コイおよびヘダイについて、内臓各器官の AsA 含有量を上記のアルミナカラム処理法(Procedure B とする)で測定し、従来の方法 (Procedure A) による測定値と比かくした結果を Table 1 に示した。同表より明らかとなっており、筋肉の AsA 含量は従来の方法による測定値の約半分またはそれ以下であることがわかった。その他、胆嚢、心臓および眼では夾雑物質の影響がいちじるしく、腎臓と脳では比かく的影響が少なかった。

実験 3. AsA 定量値に影響する夾雑物質

以上の実験結果から、魚肉および内臓にはヒドラジン法による AsA 定量値に影響する夾雑物質がかなり含まれていることが明らかとなつた。それでは、どのような物質が AsA の定量を妨害するかを知るためつぎの実験を行なつた。

アミノ酸の影響: コイ筋肉 15 g に 1% 塩化第 1 錫を含む 5% メタリン酸を加え氷冷しながらすりつぶ

Table 2. Effect of amino acids on estimation of ascorbic acid in carp muscle.

Fraction	AsA estimated from E_{530} ($\mu\text{g/g}$ of fresh wt.)	Percentage (%)
Total-AsA + Impurities	56.8	100
Amino acids	21.4	38
Total-AsA	mean 30.8	54
Sugars + Organic acids	4.6	8

AsA: L-ascorbic acid.

し、90 ml 容とした。20 分間放置後、10,000 回転で 15 分間遠心分離して上清をとり、その半量を臭素酸化して 'A 液' とした。他の半量は、カチオン交換樹脂アンバーライト IR-120(H⁺) カラムをとおしてアミノ酸を除去し、水で洗い、通過液を 120 ml に定容し、同じく臭素酸化して 'B 液' とした。'A 液' の Procedure A による測定値から '全 AsA + 全不純物' にもとづく AsA 相当値を、'A

Table 3. Effects of amino acids on estimation of ascorbic acid by the hydrazine method.

Amino acid	Conc. (mg/5 ml of test solution)	Degree of osazone-formation	E_{530}	AsA (μg) estimated from E_{530}
DL-Tryptophan	2	++	0.033	2.7
"	1	+	0.018	0.2
"	0.5	+	0	—
"	0.1	+	0	—
"*	2	—	—	—
L-Hydroxyproline	2	+	0.007	—
"	1	+	0.006	—
"*	2	—	—	—
L-Histidine-HCl	2	++++	0.149	22.0
"	1	+++	0.106	14.8
"	0.5	++	0.060	7.2
"	0.1	+	0.017	—
"*	2	—	—	—
L-Tyrosine	2	++	0.043	4.3
"	1	+	0.022	1.0
"	0.5	+	0.015	0
"*	2	—	—	—
L-Phenylalanine	2	+	0	—
"	1	+	0	—
"*	2	—	—	—

Negative compounds were DL-alanine, L-arginine, L-aspartic acid, L-cystine, L-glutamic acid, glycine, L-leucine, L-lysine, L-methionine, L-proline, L-serine, DL-threonine, DL-valine and L-cysteine.

* Not oxidized with bromine.

液'および'B液'の Procedure A による測定値の差からアミノ酸にもとづく AsA 相当値を, 'B液'の Procedure A および Procedure B による測定値の差から糖類および有機酸にもとづく AsA 相当値を, それぞれ求めた。また, 'A液'および'B液'の Procedure B による測定値(全 AsA 値)は誤差の範囲内で一致した。これらの結果から, 従来の方法による全 AsA 測定値に対するそれぞれの画分の影響を百分率で求め, Table 2 に示した。

Table 2 より明らかなとおり, コイ筋肉ではアミノ酸の影響が大きく, 従来の方法による定量値の 38 % を占めた。

そこで, アミノ酸 19 種類の結晶標品について, ヒドラジン法の測定条件下で, オサゾン生成の有無をしらべ, さらに, オサゾンを生成するものについてはリウ酸溶液の E_{530} を測つて AsA 値に対する影響を検討した。その結果は Table 3 に示したとおりで, ヒスチジン, チロシン, トリプトファン, ハイドロキシプロリンおよびフェニルアラニンが "0.1~2 mg/検液 5 ml" の濃度範囲でそれぞれオサゾンを生成したが, E_{530} 値に影響するのは前 3 者のみであり, とくにヒスチジンが最も大きく影響することがわかった。

これらのアミノ酸オサゾンの吸収スペクトルは Fig. 2 に示したとおりで, いずれも 530 m μ 付近にピークはないけれども, 検液中の濃度が大きくなるにしたがい E_{530} 値に影響する。

Fig. 2. Absorption spectra of amino acid-osazones. Concentration, 0.1 mg per 5 ml of test solution; solvent, 50 % H_2SO_4 .

なお, コイ筋肉抽出液をとおした IR-120(H^+) カラムに 2N-アンモニア水を通してアミノ酸を溶出し, 溶出液を真空濃縮して pH 5.0 の 0.1 M クエン酸緩衝液 5.0 ml に溶かした。その 0.5 ml を Dowex-50 W $\times$ 8 カラム (0.9 $\times$ 15 cm) にとおし, pH 5.0 の 0.1 M-クエン酸緩衝液および pH 6.8 の 0.1 M-リン酸緩衝液を通して, 順次溶出するこれらアミノ酸の濃度曲線を求めた結果は Fig. 3 のとおりで, AsA の定量に大きく影響するのはヒスチジンであることが確かめられた。

糖類その他化合物の影響: 糖類その他化合物の純結晶 23 種類について, オサゾン生成度と E_{530} におよぼす影響をしらべた結果は Table 4 のとおりであつた。試験したこれら化合物のなかで, D-グルクロン酸, D-グルクロノラクトン, D-ガラクトロン酸, オキザロ酢酸およびビルビン酸が, いずれもかなり高濃度(検液 5 ml 当り 2 mg 以上)においてのみ影響することがわかった。コイ筋肉抽出液では, 従来の方法

Fig. 3. Chromatography of amino acids in the carp muscle extracts by cation exchange.

Fig. 4. Procedures for the estimation of total ascorbic acid in fish tissues.

Table 4. Effects of sugars and other compounds on estimation of ascorbic acid by the hydrazine method.

Compound	Conc. (mg/5 ml. of test solution)	Degree of osazone- formation	E_{580}	AsA (μ g) estimated from E_{580}	Compound	Conc. (mg/5ml of test solution)	Degree of osazone- formation	E_{580}	AsA (μ g) estimated from E_{580}
D-Glucuronic acid	8	++++	0.071	9.0	L-Sorbose	8	+	0	—
"	4	+++	0.037	3.3	"	4	+	0	—
"	2	++	0.018	0.2	"	2	+	0	—
"	1	+	0.008	—	"	1	—	—	—
" *	4	+++	0.032	2.5	" *	4	+	0	—
D-Glucuronolactone	8	++++	0.097	13.3	D-Ribose	8	+++	0.004	—
"	4	+++	0.050	5.5	"	4	++	0	—
"	2	++	0.023	1.0	"	2	+	0	—
"	1	+	0.010	—	"	1	+	0	—
" *	4	+++	0.046	4.8	" *	4	++	0	—
D-Galacturonic acid	8	++++	0.032	2.5	Sucrose	8	+	0	—
"	4	+++	0.016	—	"	4	+	0	—
"	2	++	0.009	—	"	2	+	0	—
"	1	+	0.004	—	"	1	+	0	—
" *	4	+++	0.014	—	" *	4	+	0	—
D-Glucose	8	+	0	—	Oxaloacetic acid	8	++++	0.130	18.8
"	4	+	0	—	"	4	++++	0.090	12.1
"	2	—	—	—	"	2	++	0.054	5.7
" *	4	+	0	—	"	1	+	0.032	2.5
D-Fructose	8	++	0	—	" *	4	—	—	—
"	4	+	0	—	α -Ketoglutaric acid	8	++	0.007	—
"	2	—	—	—	"	4	+	0	—
" *	4	+	0	—	"	2	+	0	—
D-Xylose	8	++	0	—	"	1	+	0	—
"	4	+	0	—	" *	4	+	0	—
"	2	+	0	—	Pyruvic acid	4	++++	turbid.	—
" *	4	+	0	—	"	2	+++	0.017	—
D-Mannose	8	+	0	—	"	0.5	++	0	—
"	4	—	—	—	" *	8	++++	turbid.	—
" *	4	—	—	—					
D-Arabinose	8	++	0	—					
"	4	+	0	—					
"	2	+	0	—					
" *	4	+	0	—					

Negative compounds were D-gulonolactone, L-gulonolactone, D-gluconolactone, D-galactose, D-glucosamine-HCl, N-acetyl glucosamine, inosit, Na- β -glycerophosphate and glycogen.

* Not oxidized with bromine.

Fig. 5. Standard curve.

Abscissa: μg ascorbic acid per 5 ml of test solution.

Ordinate: extinction at 530 $m\mu$ in 1 cm cell.

ている L-アスコルビン酸 (AsA) の正確な含有量を知るために、2,4-デニトロフェニールヒドラジン法による定量法を検討し、次の結果をえた。

- (1) 魚肉および内臓の抽出液中には、ヒドラジン法の条件下でオサゾンを生じ AsA 定量値に影響する物質がかなり含まれ、その主なものはアミノ酸であることを知った。
- (2) アミノ酸の中では、ヒスチジンの影響がもつとも大きく、その他、チロシンおよびトリプトファンも影響することを知った。
- (3) 糖類および有機酸の中では、グルクロン酸、グルクロノラクトン、ガラクトン酸、オキザロ酢酸およびビルビン酸が比較的高濃度でのみ影響することを確認した。
- (4) AsA 定量値に影響するこれら夾雑物質のオサゾンは、酸性アルミナカラム処理によつて完全に分別除去できたので、同処理を併用するヒドラジン改良法を設定した。

文 献

- 1) H. HIGASHI: *Fish as Food*, Vol. 1. edited by BORGSTROM, Acad. Press Inc., N. Y. (1961), p. 411.
- 2) 稲垣長典・宿場博保・狩野明美: ビタミン, **16**, 234 (1959).
- 3) J. H. ROE and C. H. KUETHER: *J. Biol. Chem.*, **147**, 399 (1943).
- 4) 毛戸澄子・池田静徳・藤村吉之助: 栄養と食糧, **13**, 242 (1960).
- 5) L. W. MAPSON: *Biochem. J.*, **80**, 459 (1961).

* トリプトファンおよびビルビン酸のオサゾンは酸性アルミナに吸着されず溶出するが、DAsA オサゾンと溶出速度および吸着帯の色調がちがうので容易に分別することができる。他のアミノ酸および糖類のオサゾンはテストした限りでは、アルミナに固く吸着され溶出されない。

による測定値の8%がアミノ酸以外の化合物に基づくものであった (Table 2)。ただし、これら糖類のオサゾンは大部分アルミナに固く吸着し、DAsA オサゾンと容易に分別できるので、その影響は全く除去することができる*。

実験 4. 魚肉および内臓の AsA 定量法 (アルミナカラム処理を併用するヒドラジン改良法)

上記の各実験結果から、魚肉および内臓の AsA 定量法として、酸性アルミナカラム処理を併用するヒドラジン改良法を設定し、その操作の要を Fig. 4 に示した。標準曲線は Fig. 5 のとおりである。

要 約

魚の筋肉および内臓各器官に含まれ