短 報

チアゾリルブルーテトラゾリウムブロ
ミド (MTT) を用いる鮮度指標
K 値の比色測定法根岸 栄, 渡辺悦生
(1986 年 1 月 8 日受理)Colorimetric Determination of Freshness
Index K-value with Tiazolyl Blue
Tetrazolium Bromide (MTT)

Sakae Negishi*1 and Etsuo Watanabe*2

魚肉中の ATP 関連化合物の変化量に基づいた鮮度指標 K¹⁾ 値が提案されて以来、イオン交換クロマトグラフィー法、酵素法、高速液体クロマトグラフィー法など多くの測定法が考案され広く応用されている。酵素を用いる測定には、酵素センサー法、²⁾ 酵素法、³⁾ 4-アミノアンチピリンを定量する比色法、⁴⁾ 酸素電極法、⁵⁾ テトラゾリウム塩を用いる試験紙法⁶⁾ などの種々の方法がある。テトラゾリウム塩は、xanthine oxidase (EC 1.2.3.2) によるヒポキサンチン (Hx) の酸化反応で環化され可視部に吸収をもつホルマリンゼン色素を生成し発色するが、これは 4-アミノアンチピリンの発色に比べてはるかに鋭敏である。そこで、この反応を用いた K 値の比色測定法を開発し、測定精度の検討を行った。

すなわち本法は、検液中の ATP, ADP, AMP, IMP を apyrase (EC 3.6.1.5), phosphatase alkaline (EC 3.1.3.1), adenosine deaminase (EC 3.5.4.4) を用いてイノシン (HxR) にまで分解し、ここで、生成した HxR および検液中に最初から存在する HxR を purine nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.1) によって Hx に加リン酸分解し、この Hx に MTT³⁾ の存在下で xanthine oxidase を作用させ、生成したホルマリン色素の発色の程度から K 値を測定するという原理によるものである。

測定は、溶液 1 (10 unit/ml phosphatase alkaline, 1 unit/ml adenosine deaminase, 1 unit/ml apyrase, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂ を含む pH 8.5 のトリス塩酸緩衝液) と溶液 2 (0.1 unit/ml purine nucleoside phosphorylase, 0.03 unit/ml xanthine oxidase, 1 mM MTT, 0.2% Tween 80, 2.5 mM EDTA を含む pH 8.0 の 0.2 M リン酸緩衝液) を調製し、魚筋肉の過塩素酸 (PCA) 抽出液を試料液 (0.1 g 筋肉/ml 相当) とし、Fig. 1 に示した操作により、Hx+HxR 区分の吸光度 (Abs.-A) および Hx+HxR+IMP+AMP+ADP+ATP 区分の吸光度 (Abs.-B) をそれぞれ 565 nm で測定した。K 値は (Abs.-A/Abs.-B) × 100 (%) の式で算出される。

測定精度の検討は、始めに、キハダと鶏肉 (胸部) 筋肉の PCA 抽出液を用い、HxR と Hx の合計濃度を測定し、10 回の繰り返し精度を求めた。なお、濃度の算出は検量線法による。結果は平均値と変動係数がそれぞれキハダでは $x=0.82 \mu\text{mol/g}$, $\text{CV}=1.5\%$ 、鶏肉では $x=2.74 \mu\text{mol/g}$, 2.8% であった。また、この時の検量線 (Hx) は 2~70 μM (Abs. 値: 0.05~1.69) の間で良い直線性を示し、その回帰式、母回帰係数の 95% の信頼区間および分散分析結果はそれぞれ $y=0.0244x+0.0194$, 0.0244 ± 0.0010 , $F_0=3327.1^{**}$ [$F(1, 6, 0.01)$] = 13.75 であった。

さらに、本法と高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の 2 法で各種魚分類の K 値を測定した。その結果を Table 1 に示した。回帰式 (x: HPLC; y: 比色法)、母回帰係数の 95% の信頼区間および相関係数を算出すると

*1 株式会社環境分析センター (EAC Corporation, Kamikawa 1120, Kodama, Saitama 367-02, Japan).

*2 東京水産大学食品工学科 (Department of Food Engineering and Technology, Tokyo University of Fisheries, Konan 4, Minato, Tokyo 108, Japan).

*3 3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazolyl) 2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide.

PCA extract of fish muscle, 0.1 ml

← H₂O 0.5 ml

← Soln. 2 1 ml

Incubate at 37°C for 20 min

Measure the absorbance at 565 nm

Abs. -A (Hx+HxR)

PCA extract of fish muscle, 0.1 ml

← Soln. 1 0.5 ml

Incubate at 37°C for 30 min

← Soln. 2 1 ml

Incubate at 37°C for 20 min

Measure the absorbance at 565 nm

Abs. -B (Hx+HxR+IMP+AMP+ADP+ATP)

Fig. 1. The scheme for colorimetric method.

Soln. 1: 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.5) containing phosphatase alkaline (10 unit/ml), adenosine deaminase (1 unit/ml), apyrase (1 unit/ml), MgCl₂ (1 mM) and ZnCl₂ (1 mM); Soln. 2: 0.2 M phosphate buffer (pH 8.0) containing purine nucleoside phosphorylase (0.1 unit/ml), xanthine oxidase (0.03 unit/ml), Tween 80 (0.2%), EDTA (2.5 mM) and MTT (1 mM).

Table 1. Comparison of the K-value determined by colorimetric method with that by HPLC

Name	K-value (%)	
	Calorimetric	HPLC
Sardine	26.6	26.7
Dog salmon	68.5	67.2
Saury	19.3	20.8
Yellowfin tuna	14.2	14.7
Marlin	20.9	22.3
Japanese horse mackerel	31.0	30.4
Japanese horse mackerel	28.4	28.1
Pacific cod	92.4	91.5
Pacific cod	91.2	88.8
Oriental shrimp	52.1	51.6
Oriental shrimp	74.0	75.3
Cuttlefish	60.0	60.1
Scallop (ligament)	2.6	5.5

それぞれ $y=1.026x-1.22$, 1.026 ± 0.030 , $r=0.999^{**}$ ($n=13$) となり極めて良い相関が認められた。

以上の結果から、本比色法は幅広い測定レンジを有し、可視部で精度良く K 値が測定できることが示された。

文 献

- 1) T. Saito, K. Arai, and M. Matsuyoshi: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **24**, 749-750 (1969).
- 2) I. Karube, H. Matsuoka, S. Suzuki, E. Watanabe, and K. Toyama: *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 314-319 (1984).
- 3) 江平重男, 内山 均: 日水誌, **35**, 1080-1085 (1969).
- 4) 宇田文昭, 林恵美子, 内山 均, 角田聖孝: 東海水研報, No. 111, 55-62 (1983).
- 5) 大橋 実, 宇津木義雄, 荒井 珪: 食品産業センター技研報, **8**, 75-91 (1985).
- 6) 根岸 栄, 嶋部征夫, 鈴木周一: 公開特許公報, 昭 60-49800 (昭 58, 8, 30).