プロタミンによるアスコルビン酸水溶液の安定化

山内修二,^{*,a} 二村典行,^b 木下俊夫^b

エスエス製薬 (株) 中央研究所,^a 北里大学薬学部^b

Stabilization of Ascorbic Acid Aqueous Solution by Protamine

Shuji YAMAUCHI,^{*,a} Noriyuki NIMURA,^b and Toshio KINOSHITA^b

Central Research Laboratory, SS Pharmaceutical Co. Ltd.,^a

1143 Nanpeidai, Narita-shi, Chiba 286, Japan and

School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato

University,^b 9-1 Shirokane-5, Minato-ku,

Tokyo 108, Japan

(Received December 21, 1992)

Protamine was found to stabilize ascorbic acid (AsA) in aqueous solution. The concentration of AsA (50 $\mu\text{mol/l}$) dissolved in 0.05 M phosphate buffer, pH 7, decreased by 57% after standing for 90 min at 30°C, whereas 91% of AsA remained under the same conditions in the presence of 60 $\mu\text{mol/l}$ protamine. When 0.5 $\mu\text{mol/l}$ of copper ion (II) was added to the above AsA solution (0.05 M phosphate buffer, pH 7) in the absence of protamine, AsA decreased by 5% after standing for 15 min at 30°C. On the other hand, 91% of AsA remained after 15 min and 52% of AsA remained after 90 min under the same conditions in the presence of 60 $\mu\text{mol/l}$ protamine. Furthermore, the effect of protamine on the stability of AsA in various pH solutions (pH 1–10) was examined after standing for 90 min at 30°C. Degradation of AsA was accelerated by increasing the pH from 1 to 10. On the other hand, the effect of protamine (60 $\mu\text{mol/l}$) on the stabilization of AsA was recognizable above pH 5 and degradation of AsA was controlled at higher pH. When 0.5 $\mu\text{mol/l}$ of copper ion (II) was added to the above solutions in the absence of protamine, degradation of AsA was greatly accelerated above pH 5. When 60 $\mu\text{mol/l}$ of protamine was added to the solutions, the effect of protamine on the stabilization of AsA was observed above pH 5 and degradation of AsA was controlled at higher pH.

Keywords—ascorbic acid; protamine; stabilization; copper; oxidation

アスコルビン酸 (AsA) は、植物を初め生物体内に広く存在し、様々な生理作用を有する物質で、生体を恒常的に維持するため必要不可欠であると考えられている。AsA は水溶液中では、そのエンジオール基が容易に酸化されデヒドロ AsA を生成する。AsA は酸性では比較的安定であるが、アルカリ性では酸化分解されやすく、この分解は微量の銅イオンにより更に促進される。また、デヒドロ AsA が加水分解されてラクトン環が開くと、ビタミン C としての効力を持たない 2,3-ジケト-L-グロン酸になり、さらに分解されて行く。そのため AsA の安定化剤として既に亜硫酸塩¹⁾などの抗酸化剤や、EDTA¹⁾などのキレート化剤が使用されている。しかし安定化剤自身が不安定 (亜硫酸塩)²⁾であったりヒトに投与するときの安全性が十分でない (亜硫酸塩, EDTA) 等、実用性に問題があった。著者はさきに、プロタミンのグアニジル基に基づく生体成分との相互作用につき詳細に検討し、³⁾ プロタミンはグルタチオンの安定化に有用であることを報告した。⁴⁾ プロタミンは

魚の白子として食品に使用され、また殺菌作用を有するため天然の保存剤として食品中に添加されており、毒性の低い安全性の高いタンパク質である。しかし、これまでプロタミンを AsA の安定化に利用した報告は知られていない。このような観点から本研究においてはプロタミンを AsA の安定化に応用した。

実験の部

試薬 プロタミンは Sigma Co. 製でサケ科魚類の精巢より抽出された試薬グレード IV (遊離塩基) の標品を使用した。このものは、分子量約 4300、白色の粉末で、1 g は水 10 ml に溶け、0.4% 水溶液の pH は 12、ミロン試薬に陰性である。AsA 及び硫酸銅は、和光純薬工業製の試薬特級を、デヒドロ AsA は Aldrich chemical company, Inc. から入手し、精製水は日局精製水を使用した。その他の試薬はすべて特級品を使用した。

装置 吸光度の測定は、島津製作所製紫外可視分光光度計 UV-160A、恒温槽はヤマト科学製ウォーターバスインキュベーター BF-45、pH メーターは東亜電波工業製 HM-50V を使用した。

緩衝液 pH 1 は 0.1 N HCl-KCl 緩衝液を用い、pH 2—4 は 0.05 M KH_2PO_4 -HCl 緩衝液を用い、pH 5—10 は 0.05 M KH_2PO_4 -NaOH 緩衝液を用いた。

定量法 AsA は紫外部に吸収極大をもつが、解離の状態によって吸収極大位置及び強度が異なることが知られており、⁵⁾ 本試験においても各 pH 緩衝液中での吸収極大を測定し、pH 1—3 は 244 nm で、pH 4 は 252 nm で、及び pH 5—10 は 265 nm の吸収極大を用い、それぞれの盲検体溶液を対照にそれらの吸光度を求めた。なお、AsA の分解物であるデヒドロ AsA は定量に影響を与えなかった。

安定化の方法 各 pH 緩衝液中で最終濃度として、AsA は 50 $\mu\text{mol/l}$ 、プロタミンは 0—240 $\mu\text{mol/l}$ 、及び銅イオンは 0—1.0 $\mu\text{mol/l}$ となるように調製し、20 ml 褐色フラスコに検液 20 ml を充填し、密栓し、所定の温度の水浴中に一定時間保存しサンプリングした。

結果と考察

Fig. 1 は一定量のプロタミンを添加した時の AsA の安定性に対する銅イオン添加量の影響を示す。50 $\mu\text{mol/l}$ の AsA 溶液 (0.05 M リン酸塩緩衝液溶液, pH 7) に 60 $\mu\text{mol/l}$ のプロタミンを添加し、銅イオン (II) を 0—1.0 $\mu\text{mol/l}$ 濃度になるように添加して 30°C、90 分間放置した。銅イオ

Fig. 1. Effect of Copper Ion Concentration on the Stability of AsA in the Presence of Protamine (60 $\mu\text{mol/l}$) in Phosphate Buffer Solution (0.05 M, pH 7) Standing 90 min at 30°C

Fig. 2. Effect of Protamine Concentration on the Stability of Ascorbic Acid (AsA) (50 $\mu\text{mol/l}$) in Phosphate Buffer Solution (0.05 M, pH 7) Standing 90 min at 30°C

ン (II) を添加しなかった場合の AsA の残存率は 91% であった。銅イオン (II) を添加した場合、AsA の残存率は銅イオン濃度の増加と共に直線的に減少し、 $0.5 \mu\text{mol/l}$ の銅イオン (II) を添加すると AsA の 90 分後の残存率は 52% となった。この時の AsA に対する銅イオン (II) のモル比は 0.01 である。一方、プロタミンを添加しない場合、銅イオン (II) $0.5 \mu\text{mol/l}$ を含む AsA 溶液中の AsA の残存率は 15 分後 5% と、ほとんど消失する傾向を示した (Fig. 3)。以後、銅イオン添加時の実験は $50 \mu\text{mol/l}$ の AsA 及び $0.5 \mu\text{mol/l}$ の銅イオン (II) 濃度下で行った。

Fig. 2 は中性溶液中での AsA の安定性に対するプロタミン添加量の影響を示す。 $50 \mu\text{mol/l}$ の AsA 溶液 (0.05 M リン酸塩緩衝液溶液, pH 7) を 30°C で 90 分間放置したときの AsA の残存率は 43% であった。この溶液にプロタミンを $12\text{--}240 \mu\text{mol/l}$ 濃度になるように添加した場合、AsA の残存率はプロタミン濃度の増加と共に増大し、 $60\text{--}240 \mu\text{mol/l}$ で一定の残存率 (約 90%) を示した。このときの AsA に対するプロタミンのモル比は 1.2 である。

Fig. 3 は銅イオン (II) 添加時の AsA の安定性と、添加したプロタミンの濃度との関係を示す。 $50 \mu\text{mol/l}$ の AsA 溶液 (0.05 M リン酸塩緩衝液溶液, pH 7) に銅イオン (II) $0.5 \mu\text{mol/l}$ を添加し 30°C で 15 分間放置すると AsA は急速に分解し、AsA 残存率は 5% であった。この溶液にプロタミンを $12\text{--}240 \mu\text{mol/l}$ 濃度になるように添加した場合、AsA の残存率はプロタミン濃度の増加と共に増大し $240 \mu\text{mol/l}$ で残存率は最大となり、15 分後の AsA の残存率は 96%, 90 分後 74% に達した。

Fig. 4 には pH 1—10 の緩衝液中での AsA の残存率の対数を時間に対してプロットした結果を示す。 $50 \mu\text{mol/l}$ の AsA 溶液を 30°C , 90 分間放置した時、pH 1—3 では AsA は安定であった。pH 4—10 では pH が高くなるに従って、AsA の対数 (残存率) は直線的に低下し、AsA の分解反応が一次反応であることが分かった。pH 10 では AsA 残存率は急激に低下した。

Fig. 5 は、上の溶液に $60 \mu\text{mol/l}$ の濃度になるようにプロタミンを添加した時の AsA の残存率の対数と時間との関係を示した。pH 1—4 ではプロタミン添加の影響は見られなかった。これはこの pH 範囲では AsA が十分安定であることによる。一方、pH 5—10 ではプロタミンの添加による AsA の安定化が顕著に認められた。

Table I に Fig. 4 及び 5 のデーターから計算によって求めた AsA の一次分解速度定数と pH

Fig. 3. Effect of Protamine Concentration on the Stability of AsA in the Presence of Copper Ion ($0.5 \mu\text{mol/l}$) in Phosphate Buffer Solution (0.05 M , pH 7) Standing 15 and 90 min at 30°C

○, 15 min; ●, 90 min.

Fig. 4. Degradation of AsA in Phosphate Buffer Solution (0.05 M) at Various pH

Fig. 5. Degradation of AsA in the Presence of Protamine (60 $\mu\text{mol/l}$) at Various pH in Phosphate Buffer Solution

との関係を示す。プロタミン無添加時には溶液の pH が 3 から 10 へ上昇して行くにつれて AsA の分解が促進されたが、プロタミン添加時には pH 5 からプロタミンによる AsA の安定化が認められ、pH が高くなるに従って AsA の分解は抑制された。

Table II は 0.5 $\mu\text{mol/l}$ の銅イオン (II) を含む AsA 溶液にプロタミンを添加しない場合及び添加した場合の AsA の一次分解速度定数と pH との関係を示した。プロタミンを添加しないと、pH 5 以上で銅イオン (II) による AsA の分解が急速に促進した。一方、上の溶液にプロタミンを添加すると pH 5 からプロタミンによる AsA の安定化が認められ、pH が高くなるに従って AsA の分解は抑制された。AsA は pH 1—2 では銅イオン (II) による酸化を受けにくく、pH が高くなるに従って AsA は銅イオンにより触媒的に酸化されデヒドロ AsA に分解されるものと考えられる。⁶⁾

AsA に対するプロタミンの安定化効果は pH 5—10 の広い範囲にわたり認められ、銅イオン (II) 共存下ではその効果が顕著に表れた。一般に AsA はアルカリ側ほど酸化を受けやすく、微量の銅イオンにより更に酸化が促進されやすい。このような場合においてもプロタミンを添加すれば AsA の酸化分解を抑制できる。

Table III には温度を変化させた場合の AsA の安定性に対するプロタミンの効果を示した。50 $\mu\text{mol/l}$ の AsA 溶液 (0.05 M リン酸塩緩衝液溶液, pH 7) を 30, 40, 50°C で 90 分間放置すると、温度が高くなるに従って AsA は不安定となり、90 分後の AsA の残存率は 30°C で 43%, 40°C で 3%, 50°C ではほとんど消失した。一方これらの溶液に 60 $\mu\text{mol/l}$ のプロタミンを添加すると、90 分後の AsA の残存率は 30°C で 91% となった。温度を高くすると安定化能は低下する

TABLE I. First Order Rate Constants of AsA in the Absence and Presence of Protamine (60 $\mu\text{mol/l}$) in the Buffer Solutions at 30°C

pH	log k	
	Absence of protamine	Presence of protamine
1	-4.72	-4.12
2	-4.04	-4.05
3	-3.86	-3.60
4	-2.62	-2.65
5	-2.42	-2.55
6	-2.23	-2.82
7	-2.04	-2.98
8	-1.86	-2.91
9	-1.70	-2.47
10	-1.05	-1.69

TABLE II. First Order Rate Constants of AsA in the Absence and Presence of Protamine (60 $\mu\text{mol/l}$) in the Co-existence of Copper Ion (0.5 $\mu\text{mol/l}$) in the Buffer Solutions at 30°C

pH	log k	
	Absence of protamine	Presence of protamine
1	-3.85	-3.91
2	-3.37	-3.73
3	-2.68	-2.75
4	-1.90	-1.84
5	-1.22	-1.46
6	-1.02	-1.74
7	-0.83	-2.15
8	-0.48	-2.30
9	-0.37	-2.20
10	-0.17	-1.69

TABLE III. Stability of AsA in Various Temperature in the Absence and Presence of Protamine (60 $\mu\text{mol/l}$) in the Buffer Solution (pH 7)

Time (min)	Residue of AsA (%)					
	Absence of protamine			Presence of protamine		
	30°C	40°C	50°C	30°C	40°C	50°C
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
15	88.7	73.0	54.5	99.0	96.5	91.5
30	79.1	46.5	20.5	97.4	92.0	81.8
45	71.0	26.5	5.5	96.0	88.0	73.0
60	60.6	12.0	2.5	94.0	83.2	65.0
90	43.2	3.0	0.0	91.2	75.8	50.8

TABLE IV. Stability of AsA in Various Temperature in the Absence and Presence of Protamine (60 $\mu\text{mol/l}$) Coexistence of Copper Ion (0.5 $\mu\text{mol/l}$) in the Buffer Solution (pH 7)

Time (min)	Residue of AsA (%)					
	Absence of protamine			Presence of protamine		
	30°C	40°C	50°C	30°C	40°C	50°C
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
15	5.1	1.0	0.0	91.1	80.0	59.5
30	1.2	0.0	0.0	83.4	61.0	31.5
45	0.0	0.0	0.0	74.8	46.0	16.0
60	0.0	0.0	0.0	67.2	34.0	7.2
90	0.0	0.0	0.0	52.4	18.0	2.0

が、50°C においても安定化効果が認められ、AsA の 90 分後の残存率は 51% であった。

Table IV には、上の溶液に 0.5 $\mu\text{mol/l}$ の銅イオン (II) を添加した場合の AsA の残存率と反応温度との関係を示した。30, 40, 50°C で 90 分間放置すると、30°C, 15 分後に AsA はほとんど消失した。これらの溶液に 60 $\mu\text{mol/l}$ のプロタミンを共存させると、90 分後の AsA の残存率は 30°C で 52% となる。温度が上昇すれば安定化能は低下するが、50°C においてもなお安定化効果が認められた。

Fig. 6 には、Table III 及び IV のプロタミンを添加した場合における AsA 残存率の対数と反応時間との関係を示した。0—45 分間の範囲で時間に対しほぼ直線的に変化し、このときの AsA の分解は一次反応と考えられる。

以上の結果は、プロタミンが AsA に対し安定化能を有することを示している。著者らは前報においてグルタチオンがプロタミンとの相互作用によって複合体を形成し安定化されている可能性を示唆した⁴⁾が、今回の AsA の場合についても、その安定化の要因を検討した。シリカゲルカラム

Fig. 6. Relationship between Time Course and Logarithm of the Residue of AsA in the Absence (●) and Presence (○) of Copper Ion (0.5 $\mu\text{mol/l}$) in the Co-existence of Protamine (60 $\mu\text{mol/l}$) in Phosphate Buffer Solution (0.05 M, pH 7)

(Nucleosil 100-5, 150×4.6 mm) に, AsA (20 µg/ml) の 20 µl を注入し, 5 mm リン酸塩緩衝液 (pH 7) を移動相として, 流速 1.0 ml/min で溶離すると, AsA は保持されず溶媒先端に溶出される. 一方, 我々が既に報告しているプロタミン吸着シリカゲルカラム⁷⁾に AsA 溶液を注入し, 同一条件下, 同じ移動相で溶離すると AsA は約 5 分に溶出される. この結果は AsA がプロタミンに吸着されることを示しており, したがって, プロタミンと複合体を形成する可能性をも示唆している. 一方, 銅イオン (II) も上と同じ条件 (ただし, 検出は電気伝導度) でプロタミンカラムに吸着され, 銅とプロタミンの相互作用が示唆された. さらに, AsA と銅イオン (II) のいずれが強くプロタミンに吸着されるかを調べるため, シリカゲル NH₂ 充填剤に *N,N*-disuccinimidylcarbonate (DSC) を縮合剤に用い, プロタミンを結合しプロタミン化学結合カラム⁸⁾を調製した. このカラムに 5 mm リン酸塩緩衝液溶液 (pH 7) を移動相として, AsA と銅イオンの保持時間を求めると AsA は約 5 分に溶出され, 銅イオンは溶離されなかった. これは銅イオンとプロタミンの相互作用がより強いことを示している. これらの結果は AsA, 銅イオン (II) 共にプロタミンに吸着され, 銅イオンの吸着がより強いことを示すが, 安定化への寄与の大きさを直接示すものではない. プロタミン分子が AsA を吸着すれば, この高分子による静電的反発あるいは立体障害のため酸素などの接近が阻害されて AsA の安定化が起こることも考えられる. 一方, 銅イオンがプロタミンとキレートして, AsA に接近できず AsA が安定化されることも考えられる.

天然のポリカチオンでもあるプロタミンは抗原性のないことが知られている安定なタンパク質であり, 食品である魚の白子に含まれており, また食品添加物として, さらにプロタミン-インシュリン注射液等の医薬品としても用いられている. このプロタミンに AsA を安定化する作用が認められたことから食品, 医薬品等への広い応用が期待される.

引用文献及び注

- 1) 江川昌平, 薬剤学, **21**, 177 (1961).
- 2) 寺尾求馬, 丸井悦子, 田中啓子, 中尾泰子, 薬誌, **100**, 81 (1980).
- 3) N. Nakamura, K. Murayama, T. Kinoshita, *Anal. Biochem.*, **152**, 386 (1986).
- 4) N. Nakamura, K. Murayama, F. Iinuma, T. Kinoshita, Y. Matsushita, I. Moriguchi, *Yakuzaigaku*, **48**, 54 (1988).
- 5) J. S. Lawendel, *Nature* (London), **180**, 434 (1957); S. Lewin, "Vitamin C: Its Molecular Biology and Medical Potential," "Structure and characteristic properties (chapter I)," Academic Press, London, 1976, p. 5; K. Heynes, H. Paulsen, *Ber.*, **86**, 836 (1953).
- 6) P. A. Seib, B. M. Tolbert (ed), "Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses," ACS, 1982, p. 163; 並木満夫, 中村 良, 川岸舜朗, 渡邊乾二, "現代の食品化学," 第2版, 三共出版, 1992, p. 153.
- 7) S. Yamauchi, N. Nimura, T. Kinoshita, *Analyst*, **118**, 161 (1993).
- 8) 未発表.