

水産食品のイノシン酸とその関連物質に関する研究 — I.

定 量 法 の 検 討

竹 田 正 彦 ・ 示 野 貞 夫

(農学部水産製造学研究室)

Studies on Inosinic Acid and the Related Compounds in Sea Food — I.

Analytical Method

By

Masahiko TAKEDA and Sadao SHIMENO

(Laboratory of Fish Technology, Faculty of Agriculture)

Summary

A procedure is described for the quantitative separation of nucleotides, inosine and hypoxanthine present in extracts of marine products. After the removal of nucleotides by ion-exchange on Dowex 1 (formate) at pH 6.0, inosine and hypoxanthine are exchanged on Dowex 1 (chloride) at pH 11 to 12. The nucleotides exchanged on former resin are then eluted by a succession of increasing formic acid and formate concentrations, and increasing pH (Fig. 2-a). The inosine and hypoxanthine exchanged on latter resin are eluted by a succession of increasing chloride and tetraborate concentrations, and diminishing pH, for evaluation by ultra-violet spectrophotometry (Fig. 2-b).

結 言

5'-イノシン酸 (IMP) は食品のうま味の一成分として古くから知られてきたが、近年ペーパークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどによるヌクレオチドの定量法が確立されるにいたって、各種食品のIMPとその関連物質の含有量が測定され、あらためてうま味との関係が注目されるようになった。一方IMPの工業的生産が可能になり、調味料ないし食品添加物として、そのすぐれた呈味性が積極的に利用されるようになった。

近年多数の研究者により報告された、水産食品のIMPとその関連物質 (アデノシン-3-リン酸 ATP・アデノシン-2-リン酸 ADP・5'-アデニル酸 AMP・ジフォスフォピリジンヌクレオチド DPN・イノシン・ヒポキサンチン) に関する諸研究成果を、食品化学的観点から総括すると、つぎの2方向に大別することができる。その1つは、うま味成分としてのIMPの役割を明らかにしたもので、中島¹⁾、藤田²⁾³⁾⁴⁾、斎藤⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾、小俣¹³⁾、大石¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾、JONES¹⁷⁾¹⁸⁾ らにより、新鮮あるいは凍結魚肉のIMP含有量はおよそ200~300 mg %で、獣肉のそれより多いこと、疲労魚と静止魚とでは死直後の筋肉内ヌクレオチドパターンが異なること、軟体動物の筋肉には死後IMPが蓄積されず、AMPが蓄積されること、あるいはカツオ節のIMP含有量は280~915 mg % (乾物として)であり、その品等はIMP量と関連しないことなどの諸点が明らかにされている。他方は、魚貝肉の死後硬直ないし自己消化過程におけるIMPとその関連物質の変化を追跡したもので、斎藤⁶⁾⁸⁾¹¹⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾、JONES¹⁸⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾、MURRAY²⁵⁾、KASSEMSARN²⁶⁾、CREELMAN²⁷⁾、

TOMLINSON²⁸⁾ らにより、ヌクレオチドの分解経路が魚類と軟体動物とはかなり異なること、貯蔵温度によりIMPの分解速度が著しく相違し、氷蔵魚では10~20日間で分解消失するのに対し、凍結魚では数カ月以上にわたって高濃度を維持すること、また同一温度に貯蔵しても、魚種によりIMP→イノシン→ヒポキサンチンの各分解速度が多少異なることなどの諸点が明らかにされている。

以上のように、水産食品のIMPとその関連物質の含有量、ならびに貯蔵中の変化に関してはある程度の知見が得られ、比較生化学および加工利用の面からみて、多くの興味ある事実が判明している。しかしこれら成分の分解または蓄積に關与する筋肉内の諸酵素の性質については、まだあまり研究されていない。したがって、回遊性魚類と底生性魚類におけるIMP分解過程の比較、あるいはIMP分解過程に及ぼす種々の筋肉成分の影響など、生化学的また食品化学的に重要な問題がまだ数多く残されている。著者らはこれらの問題を解明するために本研究に着手した。

本報はまず水産食品中のIMPとその関連物質の正確な含有量を知るために、イオン交換クロマトグラフィーによる定量法を検討したものである。ヌクレオチドのイオン交換クロマト法には、従来報告された諸方法のうち最も適当と考えられるBERGKVISTら²⁹⁾の方法を、多少簡易化して用いた。またイノシンおよびヒポキサンチンのそれには、近年JONES³⁰⁾が報告した、プリン塩基およびヌクレオチドのイオン交換クロマト法を、新井ら³¹⁾の方法と同様に、stepwise-elution systemに改めて適用した。その結果、試料中の各種ヌクレオチド、イノシンおよびヒポキサンチンを、連続的に能率よく分離し定量する方法を設定することができたので報告する。

実 験 の 部

試薬：従来の研究¹⁾⁴⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁷⁾により、水産動物筋肉に含まれている主なヌクレオチドとその分解物は、ATP、ADP、AMP、DPN、IMP、イノシンおよびヒポキサンチンであることが知られているので、本実験では次の試薬を標品として用いた。

ヒポキサンチン	Zellstoffabrik Waldhof Co. Ltd.
イノシン	東京化成株式会社
5'-IMP	和光純薬工業株式会社
DPN	Sigma Chemical Co. Ltd.
5'-ATP	Sigma Chemical Co. Ltd.
(少量の5'-AMPおよび5'-ADPを含む)	

これらの試薬はすべて0.03~0.63 mg/ml. の濃度に水に溶解して使用した。また正確な濃度はこの溶液の吸光度から算出した。

実験 1. ヒポキサンチンおよびイノシンの相互分離

JONES³⁰⁾ の報じたイオン交換樹脂Dowex 1-X8 (200-400メッシュ)、塩酸型、1×4.5cmのカラムを使用し、新井ら³¹⁾ の報じたstepwise-elution systemを採用してイオン交換クロマトグラフィーを行なった。すなわちヒポキサンチン0.301mgとイノシン0.500mgを含む水溶液20 ml. を、2 Nアンモニア水でpH 11~12に調整してから上記のカラムに通し、50 ml. あたり2滴の2 Nアンモニア水を加えた水で洗浄したのち、Fig. 1に示した脱着液AおよびBを順次500 ml. ずつ、毎分1 ml. の速度で流過させ、溶出液をフラクションコレクターを用いて10 ml. ずつ分取した。そしてその260 m μ (ヒポキサンチン) または250 m μ (イノシン) における紫外部吸光度を、それぞれの脱着液を対照として、ベックマン型分光光度計QR-50型を用いて測定し、分子吸光係数にヒポキサンチン10400、イノシン12000を適用して定量した。

以上の実験の結果, Fig. 1 に示すような溶離図が得られた。ヒポキサンチンとイノシンの分離は完全であって, 回収率もそれぞれ 98.4%, 99.3% と良好であった。したがって, 本方法は JONES らの原法および新井らの改良法と同様に, ヒポキサンチンとイノシンの相互分離にきわめて好適であることが確認された。

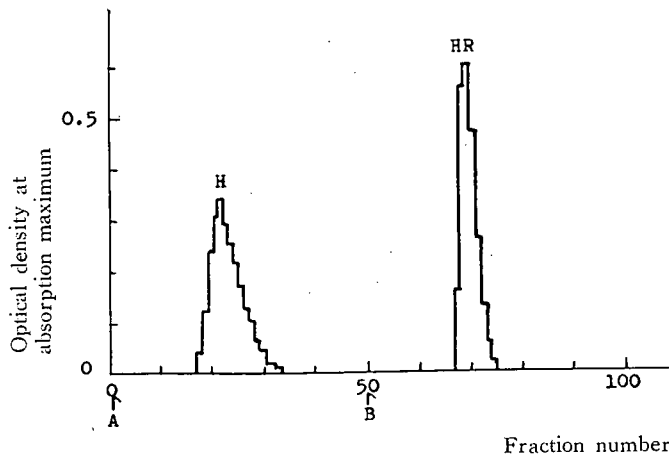


Fig. 1. Separation of hypoxanthine (H) and inosine (HR) from a synthetic mixture by ion-exchange chromatography. Column: Dowex 1-X8 (chloride). Eluting agents: 0.1 N NH_4OH +0.035 N HCl +0.005 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (A); 0.001 N HCl +0.0002 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (B). Fractions of 10 ml. collected.

実験 2. ヒポキサンチン, イノシン, IMP, DPN, AMP, ADP および ATP の相互分離

試料を Dowex 1-X4 (200~400メッシュ), ギ酸型, $1 \times 6 \text{ cm}$ のカラムに通し, 非吸着のイノシンとヒポキサンチンを十分に洗い出したのち, ヌクレオチドを BERGKVIST²⁹⁾ の方法に準じて分離し, 上記流出液中のイノシンとヒポキサンチンを実験 1 の方法に従って相互に分離した。すなわちヒポキサンチン 0.301 mg, イノシン 0.500 mg, IMP 2.17 mg, DPN 0.369 mg および ATP (少量の AMP と ADP を含む) 5.13 mg を含む水溶液 40 ml. を, 0.3 N アンモニア水で pH 6.0 に調整したのち, まず上記のカラムに通してヌクレオチドを吸着させる。ただちに水で流出液の $260 \text{ m}\mu$ における吸光度が 0.01 以下になるまで洗浄して, ヒポキサンチンとイノシンを完全に流出させ, 初めの流出液と合わせて, 0°C . または -20°C . で貯蔵し後刻 (日) の分析に供す。そしてカラムに Fig. 2 (a) に示した脱着液 I・II・III・IV を, 順次 200・350・400・500 ml. ずつ, 毎分 0.5 ml. の速度で流すと, DPN, AMP, IMP, ADP および ATP が順次溶出分離するので, これをフラクションコレクターで 10 ml. ずつ分取し, $250 \text{ m}\mu$ (IMP) および $260 \text{ m}\mu$ (AMP・ADP・ATP・DPN) における紫外部吸光度から各化合物を定量した。なお IMP, AMP, ADP, ATP および DPN の分子吸光係数には, それぞれ 12800, 14200, 14500, 14700, 18700 を適用した。つぎに先にカラムから流出したイノシン・ヒポキサンチン混合区分を, pH 11~12 に調整したのち, 実験 1 の方法に従って相互に分離定量した。

以上の実験の結果, Fig. 2 に示すような溶離図が得られた。各種ヌクレオチド, イノシンおよびヒポキサンチンの相互分離は完全であり, 回収率 (%) もまたヒポキサンチン 94.7, イノシン 102.2, IMP 93.1, ATP 93.8, DPN 94.6 といずれも良好であった。なお溶離図における各ピークの同定は, カラムからの溶出位置ならびに $260 (250) \text{ m}\mu$ の吸収と $250 (240) \text{ m}\mu$ および $270 (260) \text{ m}\mu$ の吸収との比によった。ただし DPN はその CN-付加物の吸収曲線によって同定

した。したがって、本方法によれば、2種類のクロマトカラムを要するが、試料中に含まれる各種ヌクレオチド、イノシンおよびヒポキサンチンを高精度で連続的に分離定量することができる。つまり本方法は試料中のヌクレオチドパターンを調べる場合にきわめて好適である。またわずか4種類の脱着液で、主要ヌクレオチドが完全に溶離するので、BERGKVISTらの原法（7種類の脱着液を使用）よりもきわめて簡易な方法である。したがって、2台のフラクションコレクターを用いてヌクレオチド区分とイノシン・ヒポキサンチン区分とを平行して同時に溶出分離すると、3日間で1試料を分析することができる。なお多数の試料を分析する場合には、イノシン・ヒポキサンチン区分を -20°C で凍結貯蔵しておき、適当な時期に分析することができる。

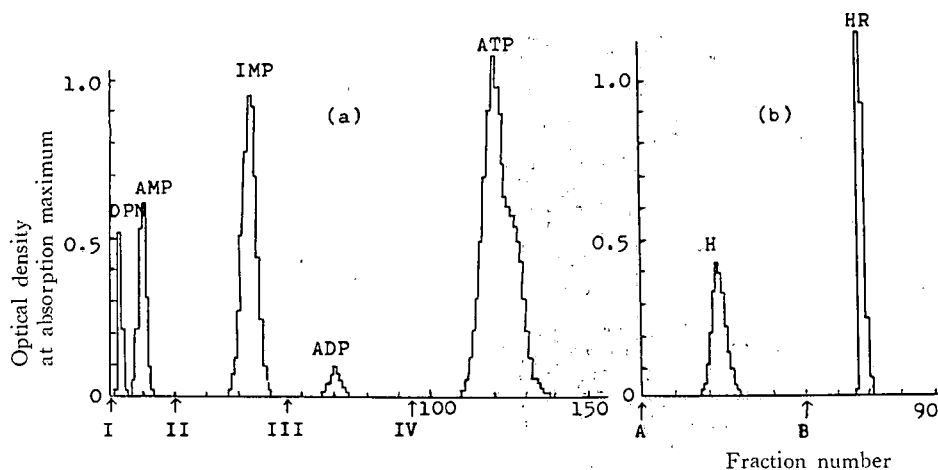


Fig. 2. Separation of nucleotides, inosine (HR) and hypoxanthine (H) from a synthetic mixture by ion-exchange chromatography.

(a)

Column: Dowex 1-X4 (formate),
200-400 mesh, 1×6 cm;

Eluting agents:

I, 0.1 N HCOOH;

II, 0.1 N HCOOH+0.05 N
HCOONa;

III, 0.1 N HCOOH+0.3 N
HCOONa;

IV, 0.1 N HCOOH+0.5 N
HCOONa;

Flow rate: 0.5 ml./min.;

Fractions of 10 ml. collected;

(b)

Dowex 1-X8 (chloride),
200-400 mesh, 1×4.5 cm.

A, 0.1 N NH_4OH +0.035 N HCl
+0.005 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$;

B, 0.001 N HCl+0.0002 M
 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$.

1.0 ml./min.

10 ml.

要 約

水産食品中のイノシン酸とその関連物質の定量法を設定するために、IMPほか数種のヌクレオチド、イノシンおよびヒポキサンチンを含む標品試料について、BERGKVISTらの報じたギ酸型 Dowex 1 および JONES の報じた塩酸型 Dowex 1 を用いたイオン交換クロマト法により、それぞれヌクレオチドおよびイノシン・ヒポキサンチンと分離定量したが、ほぼ満足すべき結果を得た。ただし本実験においては、いずれも stepwise-elution system を採用し、BERGKVIST らの用いた 7 種類の脱着液を 4 種類に簡易化してヌクレオチドを溶離し、新井らが用いた 2 種類の脱着液を用いてイノシン・ヒポキサンチンを溶離した。

文 献

- 1) 中島宣郎・市川恒平・鎌田政喜・藤田栄一郎：農化，35，803 (1961).
- 2) 藤田孝夫・橋本芳郎：日水誌，25，147 (1959).
- 3) ————：日水誌，25，312 (1959).
- 4) ————：日水誌，26，907 (1960).
- 5) SAITO, T., and K. ARAI : Arch. Biochem. Biophys., 73, 315 (1958).
- 6) ———— and T. TANAKA : Nature, 181, 1127 (1958).
- 7) ———— : Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 23, 579 (1958).
- 8) 斎藤恒行・新井健一・田中ツネ：北大水産彙報，9，121 (1958).
- 9) ————：矢島敏克：日水誌，25，573 (1959).
- 10) ————：化学，15，101 (1960).
- 11) ————：日水誌，27，461 (1961).
- 12) ARAI, K., and T. SAITO : Nature, 192, 451 (1961).
- 13) 小俣 靖・江口 祝：日水誌，28，630 (1962).
- 14) 大石圭一・田村祐子・村田喜一：日水誌，25，644 (1959).
- 15) ————：日水誌，25，646 (1959).
- 16) ————：日水誌，25，649 (1959).
- 17) JONES, N. R., and J. MURRAY : Biochem. J., 77, 567 (1960).
- 18) ————：Biochem. J., 80, 26 P (1961).
- 19) 斎藤恒行・新井健一：日水誌，22，569 (1957).
- 20) ————：日水誌，23，265 (1957).
- 21) SAITO, T., K. ARAI and T. YAJIMA : Nature, 184, 1415 (1959).
- 22) JONES, N. R., and J. MURRAY : Biochem. J., 66, 5 P (1957).
- 23) ————：Z. vergl. Physiol., 44, 174 (1961).
- 24) ————：J. Sci. Food Agric., 13, 475 (1962).
- 25) MURRAY, J., and N. R. JONES : Biochem. J., 68, 9 P (1958).
- 26) KASSEMSARN, B., B. S. PEREZ, J. MURRAY and N. R. JONES : J. Food Sci., 28, 28 (1963).
- 27) CREELMAN, V. M., and N. TOMLINSON : J. Fish. Res. Bd. Canada, 17, 449 (1960).
- 28) TOMLINSON, N., and V. M. CREELMAN : J. Fish. Res. Bd. Canada, 17, 603 (1960).
- 29) BERGKVIST, R., and A. DEUTSCH : Acta Chem. Scand., 8, 1877 (1954).
- 30) JONES, N. R. : Analyst, 85, 111 (1960).
- 31) 新井健一・斎藤恒行：日水誌，29，168 (1963).
- 32) 東大農化教室：実験農芸化学，下巻，491，朝倉書店，東京 (1960).

(昭和39年9月30日受理)

