

コリン定量法の一変法

高田 幸二・西元 諄一

On the Modified Methods of Choline Estimation.

Koji TAKADA, and Jun'ichi NISHIMOTO,

まえがき

水産動物の筋肉及び臓器成分の生化学的研究の一部として、新陳代謝とコリンの消長との関係を明らかにするために実験を行つた。コリンの定量法については今までに多数発表せられている。先ずその主なる方法を略記すれば、Roman (1930)¹⁾ のコリンとヨードとの化合物であるコリン・過ヨード塩をクロロホルムに溶解後チオ硫酸ソーダにて滴定しヨード量から求むる法、Shaw (1938)²⁾ のライネツケ塩と結合したコリン・ライネツケ塩を 60°C に温め、次にヨードを加え、コリン・過ヨード塩として比色する法、Jacobi (1941)³⁾ のコリン・ライネツケ塩のアセトン溶液を比色する法、更に Harold (1953)⁴⁾ のコリン・過ヨード塩をエチレン・ダイクロライドに溶解し比色する法等がある。

それで余等の実験には何れの方法が適しているかを検べるために、前記諸方法の比較実験を行つた。処が Shaw 法は色調が濃厚に過ぎるために稀釈して比色したが値が区々であり Jacobi 法は長時間の放置後の測定で、又コリン含有量の測定範囲が 0.5mg~9mg/cc. であり、Harold 法は操作は余り繁雑でなく且つ短時間内に定量が出来るが、コリン・過ヨード塩の生成が容易でなかつた。

以上の様な理由から前記の諸方法を参考にして別に一変法を案じ、これによつて実験を行つた、茲にその方法と結果の概略を発表する。

実験方法

A 試薬

三塩化酢酸水溶液 10% (W/V)

アンモニウム・ライネツケ塩水溶液 5% (W/V) ;

水によく溶解し濾過して用い、その都度調製する。

$n/10$ 苛性ソーダ水溶液

ヨード・ヨードカリ水溶液 ;

ヨード 8 g ヨードカリ 10 g を水に溶解し全量を 50 cc. とする。

アセトン 市販一級品

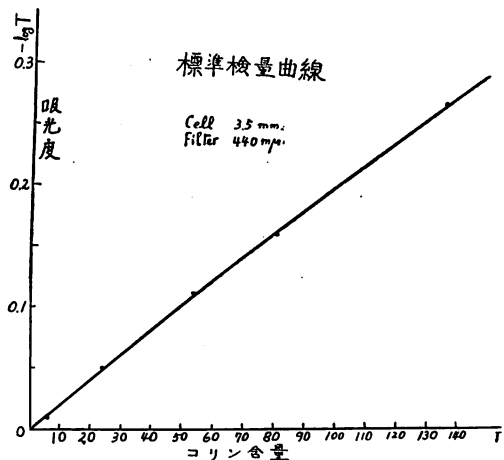
B 操作

細碎試料 2 g に三塩化酢酸液 2 cc. を加え、手動にて 5 分間振盪する、濾紙にて濾過、濾紙を水にてよく洗い、濾液の全量を 10 cc. とする、その 1 cc. を採り、ライネツケ塩液 0.5 cc. と苛性ソーダ液 0.1 cc. とを加え、生じたる沈殿を 2 分間遠心沈殿せしめる (3000r. p.m), 上澄液を除き、水 2 cc. を加えよく振盪して沈殿を充分に懸濁させる。60°C の温

湯中に2分間浸しコリン・ライネツケ塩を溶解, 更に2分間遠心分離を行う(3000r.p.m) 上澄を損失のない様に他の試験管に移し, I-KI 溶液 0.3 cc を加え水中に20分間放置後10分間遠心分離を行い(2000.r.p.m), 冷水(4~5°C)を以て沈殿を洗い流さぬ様に数回洗いヨードの色を全くなくする(洗滌は洗液一回毎に全部除かず少量残した方が沈澱の損失が少ないと考える)。沈澱をアセトンで溶解し全容を2cc.とし, その色調を測定する。(この実験では日立製光電比色計 EOP 型を使用, フィルター S-43, セル 3.5 mm)。

C 標準曲線

標準液。塩化コリン水溶液; 100mg/al
標準曲線。別図は標準液の一定濃度とその吸光度とを座標にとり図示したもので, その関係は 140 τ /cc 附近までは直線的である, それ以上はこの線上より若干低い値が得られたがこれはコリン・過ヨード塩が浮上する傾向があるので沈澱が多量になると, 洗滌の際に或る程度の損失を来すものと思われる。又 20 τ /cc 以下の微量の場合にも沈澱洗滌の際流失のなき様注意を要する。



1. 実験法の検討

a. 浸出時間

組織試料から浸出する際の用水量, pH, 時間等は当然問題となる, これについては天野⁵⁾の研究がある。当実験では除蛋白液でコリンの抽出を行うため特に時間の影響を調べた, その結果浸出振盪は手動5分間で大体充分であることを認め, 第一表は浸出と時間との関係を示したものである。

| 種類 | アンモニア mg% | 時間 分 | 種類 | | | |
|----|-----------|------|-------|-------|-------|-------|
| | | | 2.5 | 5.0 | 7.5 | 10.0 |
| ア | ジ | 16 | 0.01 | 0.01 | — | 0.01 |
| | " | 22 | 0.01 | 0.015 | 0.015 | 0.015 |
| | ジユモクザメ | 40 | 0.165 | 0.165 | 0.2 | 0.165 |

b. 呈色液の安定度

溶液の蒸発が色調に影響を与えると思われるので室温 28°C の夏季に於ての実験の結果を第二表に示した, この程度の気温であれば5分以内に比色を完了すればよい。然し 30°C 以上の場合は溶液の蒸発を考慮せねばならぬ故出来る限り迅速に行うことが肝要である。又蒸発を防止する意味から測定液を冷却することがよいと考えこれを行つて見たがセルが曇るので適当でなかつた。

| 時間 分 | コリン含量 2cc.中 τ | | | | |
|------|--------------------|------|-------|------|------|
| | 10 | 20 | 40 | 80 | 160 |
| 2 | 0.02 | 0.04 | 0.08 | 0.24 | 0.27 |
| 5 | 0.02 | 0.04 | 0.08 | 0.24 | 0.27 |
| 10 | 0.01 | 0.02 | 0.08 | 0.24 | 0.27 |
| 20 | 0.005 | 0.02 | 0.075 | 0.24 | — |

c. コリンの確認

ライネツケ塩は、アミノ酸、ビタミン B₁ 等と結合して沈殿することが知られているので、若し魚肉浸出液中に含まれている前記物質により、コリン測定に誤りを生じないか否かを知るために、濾紙クロマトグラフによりその関係を調べた、即ち展開剤は n-ブタノール(水飽和)濾紙は東洋濾紙 No 51 (28.5×6) で 30 °C に於て 5~6 時間展開し、発色剤には夫々ヨード及び 0.2% エンヒドリン溶液を使用した。この結果エンヒドリン反応は現われなかつたからアミノ酸の存在は考えられない。

尚ビタミン B₁ については魚肉中⁶⁾に含まれている量は魚の種類によつて大巾に異つてゐるが大體 20~150 γ /100g 程度の含量である、これについて検討した結果 V. B₁ のライネツケ塩⁷⁾は酸性液中で生じ、アルカリの添加によつて消失することが証明せられている、それで 10 γ , 250 γ /100cc 含有液につき試験したが 10 γ の場合ライネツケ塩は全く見られず 250 γ の場合は白濁を生じたがアルカリを加えることにより液は全く透明になつた、又定量方法と同様の処理をしたがヨードの色も見られず全く影響はなかつた。

d. 回収率

魚肉試料に一定の割合に既知量のコリン液を加え前述の定量法によりコリン含量を測定した、その結果は第三表の様で 91~95% の範囲内であつた。

第三表 回収率

| コリン添加量 | 0 | 10 | 30 | 50 | 80 | 150 |
|----------------|----|-----|----|-----|-----|-----|
| コリン総量 γ | 58 | 68 | 88 | 108 | 138 | 208 |
| コリン含量 γ | 58 | 68 | 80 | 102 | 132 | 192 |
| 回収率 % | — | 100 | 91 | 94 | 95 | 91 |

e. 浸出液の処理

Shaw 法の原法では組織試料の浸出液を除蛋白後、エーテル、軽油等で処理するのであるが、短時間の簡単な振盪操作では脂肪、磷脂質等が完全に除かれるものとは思われない。それで有機溶剤での処理の有無がどの程度定量値に影響を与えるかを確かめるために、処理、未処理の両浸出液について測定を行い、その比較値を第四表に示した。処理した場合には多少の影響がある様に見えるがその値は実験誤差と考えられる。これは恐らくコリンが溶剤に移した損失とも思われる、それで本実験では溶剤処理をしなかつた。

第四表 浸出液処理の影響

| 種類 | サバ | アジ | カツオ 肝臓 |
|-----|-------------------|---------------------|-----------------------|
| 未処理 | 5 (γ /cc) | 2.5 (γ /cc) | 131.5 (γ /cc) |
| 処理 | 5 | 2.5 | 122.5 |
| 差 | 0 | 0 | 9 |

実験結果

数種の魚についてその筋肉及び臓器のコリン含有量を余等の変法にて測定した結果を第

第五表 魚肉中のコリン含量

| 種類 | サバ | メバチ | アジ | マイワシ | イトヨリ | ミズイカ |
|-------------|-----|-----|------|------|------|------|
| アンモニア含量 mg% | 16 | 16 | 15 | 23 | 17 | 23 |
| コリン含量 mg% | 7.0 | 8.0 | 12.9 | 10.0 | 28.0 | 29 |

五表及第六表に示した、魚種によつて相違があり、最低はサバで最高はイトヨリであつた。又臓器中ではサバ、カツオ共に肝臓及び幽門垂は他の臓器より含有量の多いことが知られた。

第六表 臓器のコリン含量

| 臓器 \ 種類 | サバ mg% | カツオ mg% |
|---------|--------|---------|
| 胃 | 6.25 | 11.0 |
| 心臓 | 3.75 | — |
| 幽門垂 | 31.75 | 78.25 |
| 腎臓 | 5.0 | 68.5 |
| 肝臓 | 31.1 | 69.5 |
| 腸 | 17.25 | 56.0 |

附 記

コリン定量法は大体コリン・過ヨード法とコリン・ライネツケ塩法との二反応に分けられる。余等はこれら両者を探り入れた併用法と見るべき変法を案じ実験を試みたがコリンの回収率から見るときは未だ満足すべき方法と認めることが出来ない、この事が欠点であつて尚研究の余地があるが従来諸方法に比してたいして遜色の無いものと信ずる。又コリン・ライネツケ塩は水に浮上する傾向がある故にこの点にも注意すれば実験誤差を僅少に止めることが出来ると思われる。

次に魚種及び臓器によりコリン含有量の異なるのは当然のことと考えられるが尚この他に年令、漁場、漁獲後の経過時間、保蔵条件等により、又鮮度低下に伴う生体内酵素作用及び細菌の増殖に原因をなす魚肉の体内燐脂質の分解によつて生ずるコリンの問題がある。それで魚肉及び臓器中のコリン含有量とその生理的乃至魚種別等並びに魚肉の鮮度低下に伴うコリンの消長については引続き実験中である故次回に発表の予定である。

要 約

- 1) 従来コリン定量法を追試しそれを参考にして一変法を案じたがその方法はコリンの定量に適している。
- 2) 魚肉及び臓器中のコリン含有量を測定せしに魚種及び臓器によりその含有量を異にする。

Résumé

The author studied the methods for choline estimation, and a new modified method, for more fitting than any former ones, was devised.

The key-points from which the method was derived may be summarized as follows ;

The choline content values were ascertained to vary not only with the difference of the fresh fish meat of diverse species, but with that of the several sorts of internal organs.

文 献

- 1) W. ROMAN : *Biochem. Z.*, 219, 218 (1930)
- 2) F. H. SHAW : *Biochem. J.* 32, 1002 (1938)
- 3) H. P. JACOBI, C. A. BAUMAN, W. J. MEEK : *J. Biol. chem.*, 138, 571 (1941)
- 4) HAROLD O, APPLETON, BERTON, LADU, JR., B, B LEVY, J. M. STEELE B. B. ERODIE :
J. Biol. chem., 205, 803 (1953)
- 5) 天野慶之 : 東海区水研報告 1, 1. (1950)
- 6) 赤堀四郎 : アミノ酸及蛋白質 (著書)
- 7) 栗田悦郎, 佐藤和男, 相原 伝, : ビタミン 7, 738, (1954)
- 8) 矢野元昭, 山口 順, : ビタミン 20, 8, (1955)
- 9) Glick, D., : *Methods of Biochemical Analysis.* (著書) 265, vol. I (1954)