

食品中のビタミンUおよび酸加水分解による変化

大槻 耕三*・河端 信*・田口 邦子**

Analyses of Vitamin U in Some Foods and Methionine Derivatives after Hydrochloric Acid Hydrolyses

KOZO OHTSUKI*, MAKOTO KAWABATA*, KUNIKO TAGUCHI**

Analyses of vitamin U and methionine in water-extracts and HCl-hydrolysates of vegetables were carried out by cation-exchange high performance liquid chromatography. The water-extracts of the brassica vegetables contained much vitamin U than methionine, though the same vegetable samples hydrolyzed with HCl contained much more methionine than vitamin U.

To elucidate the decomposition of vitamin U during the HCl-hydrolyses, standard vitamin U were treated in some HCl-hydrolysis conditions as a model experiment. About 40% of vitamin U were remained and several methionine derivatives were obtained after the HCl-hydrolysis.

(Received 15 August, 1989)

I. 諸 言

ビタミンUは別名S-メチルメチオニンスルフォニウム (MMS) といい、アミノ酸誘導体であって抗消化器カイヨウ因子であり、食物では主に野菜中に遊離状態で含まれている⁽¹⁻¹⁰⁾⁽¹⁵⁾。従来ビタミンUはTLC法⁽¹¹⁾や間接的ガスクロマトグラフィー法⁽¹²⁾によって分析されてきたが、我々は数年前から高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC) による直接分析法を開発改良して、分析をより確実に、またより高感度にしてきた^(9,10)。

アミノ酸分析機によるビタミンUの分析法についてはSkodakら⁽⁵⁾やKovatcheva⁽⁶⁾の報告があるが前者は1分析あたり9時間、後者は105分間も要したが、我々の方法ではHPLCにより50分間まで短縮することができた⁽¹⁰⁾。この方法ではNa系のバッファーを用いるが、より高分離や多成分の分離分析にはやはり

Li系のバッファーを必要とし、分析時間は約175分間必要となるが、溶出位置による物質の同定確認の点からは、後者の方がより精度が高い。これら両者とも検出法としてはニンヒドリンによるポストカラム法であるが、ビタミンUのように比較的不安定な物質には、プレカラムラベル法は副数の副産物を与えることがよく起こるため、ポストカラム法がより適当であろう。

ビタミンUは普通遊離状態で存在するため、食品試料から水抽出やアルコール抽出して、その一部を分析することになるが、食品の総アミノ酸分析の場合、試料を先ず6N HCl、110℃、24時間の加水分解を行う。この時ビタミンUは一部壊されたり、変化することが予想されるが、これらの変化を上記 HPLCアミノ酸分析機を使用して検討した。野菜類なかでも特にアブラナ科野菜にはビタミンUが多く含まれるが、これら

* 京都府立大学生活科学部食物学科食品学講座

Department of Food Science and Nutrition, Kyoto Prefectural University

** 光華女子短期大学家政科

Kouka Women's Junior College

を塩酸加水分解した場合、副産物が他のアミノ酸の溶出位置と重なり、定量値に悪い影響があることも考えられる。これら副産物のアミノ酸分析機チャート上での溶出位置や、副産物の生成量などについてモデル実験を行ない、各種分析法でのこれらの溶出位置などを本報告で検討した。昭和61年9月に発表された「改訂 日本食品アミノ酸組成表」⁽¹³⁾には、ビタミンUの分析定量が行なわれていないが、HPLCアミノ酸分析機で分析されているため、ビタミンUの副産物が色々な他のアミノ酸のピークに重なっているものと思われ、特にアブラナ科の野菜の分析値はそれらの影響を受けているものと考えられる。これらの副産物の主なものはホモセリンとホモセリンラクトンおよびメチオニンであるが、メチオニンは必須アミノ酸の1つであるので、この分析定量という観点からも、上記加水分解法のビタミンUへの影響というのは重要な問題である。

II. 実験材料および方法

(1) 実験材料

市販の菜の花、ブロッコリー、カリフラワー、キャベツ、白菜、ターサイ、小松菜、クレソン、ラディッシュ、大根、カブ、その他の野菜を購入して材料とした。

(2) 実験方法

(i) ビタミンUおよび遊離アミノ酸分析用試料については、野菜1.00gにつき蒸留水4.00mlを加え試験管中でBM-1シャフト付Biomixer（日本精機製作所）により粉碎する。続いてブレードシャフトに付着している試料を蒸留水5ml入りの試験管で洗浄し、両液を合わせる。このジュースを80℃30分間加熱するが、この間2分間ずつ3回超音波にあてる。その後このジュースを2分し一方はビタミンUと遊離アミノ酸分析用とするため、3000rpm、10分間の遠心分離にかけ、上清をステンレス金網（400メッシュ）およびメンブランフィルター（0.45 μ m、東洋濾紙社製）で濾過する。濾液の一部をLi系バッファー⁽¹⁰⁾のHPLCアミノ酸分析機に直接インジェクトして分析する。

(ii) 野菜の総アミノ酸含量の分析のために、上記(a)のもう一方のジュースをよく懸濁して、その0.50mlを加水分解試験管（12 ϕ ×90mm）にとり、蒸留水を0.25mlと12N HCl（アミノ酸分析用、ナカライテスト社製）0.75mlおよび0.1Mフェノール0.15ml（または最終0.04%になるよう β -メルカプトエタノール）を加え減圧封管し、110℃で24時間加水分解する。分解液を100mlナスフラスコへ移し50℃以下でロータリーエバポレーターにより乾固し、もう一度蒸留水を加え乾固する。これを一定量のクエン酸バッファー（0.2N Na⁺, pH3.10）に溶解し、総アミノ酸分析試

料とする。

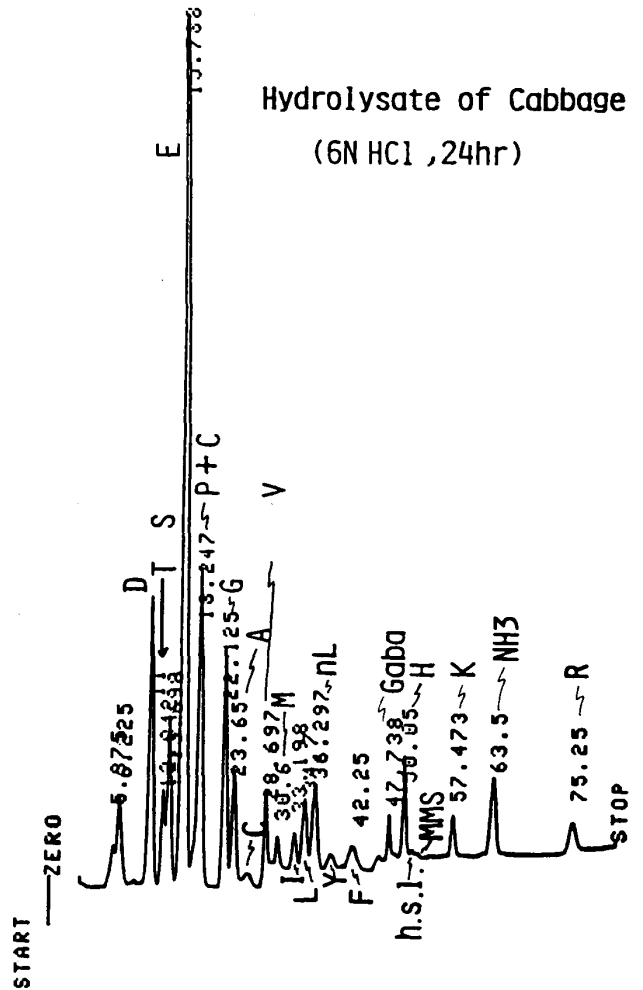


Fig. 1 Amino acid analysis of cabbage hydrolysate; in 6 N HCl at 110℃ for 24 hr; nL, nor-Leu; Gaba, γ -aminobutyric acid; h.s.l., homo Ser lactone; MMS, vitamin U.

(3) アミノ酸分析機および試薬

上述の遊離アミノ酸およびビタミンUを分析するには、Li系バッファーを用いるHPLCアミノ酸分析法⁽¹⁰⁾を用いた。ビタミンUのみを分析する時には0.35 N Na⁺クエン酸バッファー、pH6.5、を用いる迅速法⁽¹⁰⁾によった。

総アミノ酸含量定量（すなわち試料をHCl加水分解したものを分析する時）のためには、Na系バッファー（第1バッファーは0.2N Na⁺クエン酸、pH3.25、第2バッファーは0.2N Na⁺クエン酸、pH4.25、第3バッファーは0.45N Na⁺クエン酸ホウ酸pH9.61）を使用した。検出法はニンヒドリン発色法によった⁽¹⁴⁾。

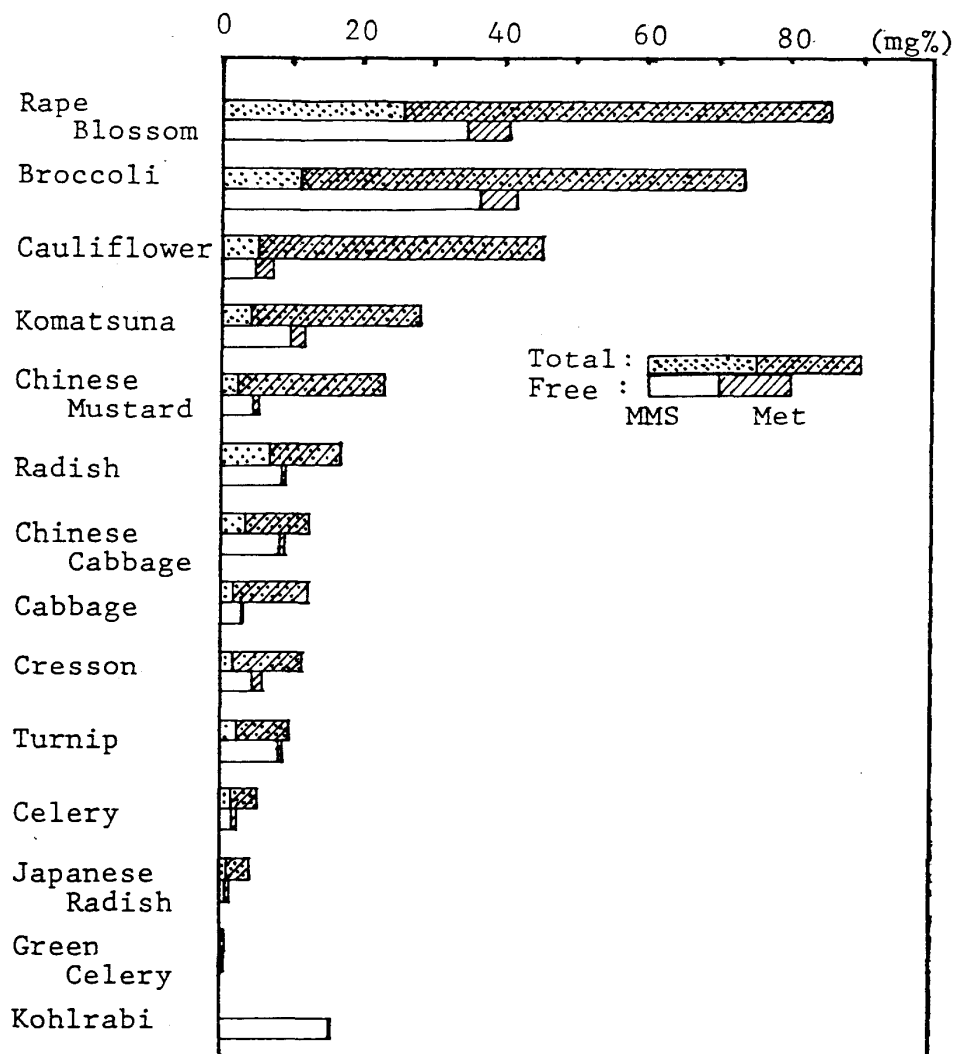


Fig. 2 Contents of methionine derivatives in vegetables. MMS, vitamin U ; Total, amino acid contents of the hydrolysates ; Free, amino acid contents of the water extracts; total values of MMS and Met in Kohlrabi was not analyzed.

いずれも島津製作所社製のLC-6 A HPLC装置を使用し、(サンプラー; SIL-6 A、コントローラー; SC L-6 A、インテグレーションレコーダー; CR-6 A)、ニンヒドリンポンプとして協和精密社製のKHDを用いた。分離カラムとして協和精密社製K-62210 FL 4.6φ×150mmをLi系バッファー用として、ケムコ社製MCI CK-10U 4.6φ×150mmをNa系バッファーに使用した。

アミノ酸の標準溶液は宝興産社製で、ビタミンUはナカライテスク社製(京都)から入手した。バッファー用の各試薬はアミノ酸分析用級または特級のものを使用した。フェノール、β-メルカプトエタノール、蟻酸、過酸化水素、ニンヒドリンはナカライテスク社から購入した。

Ⅲ. 結果および考察

野菜試料を6 N HCl、110°C、加水分解すると、通常のアミノ酸以外にも多くの未知ピークが出現する。キャベツの例をFig. 1に示すが、このチャートの、5.8分、6.2分などがそれらのものである。この分析例では試料量を少なくインジェクトしているためホモセリンラクトンやビタミンUは小さなピークで現われている。この例のようにNa系バッファーで分析したものと、同じもとの試料の遊離アミノ酸について分析したものについてまとめたのがFig. 2である。この図中の試料の水分含量は、菜の花 89.8%、ブロッコリー 87.6%、カリフラワー 90.3%、小松菜 92.4%、たい菜 94.1%、ラディッシュ 95.7%、白菜 96.8% : キャベツ 93.7%、クレソン 93.8%、かぶ 93.3%、セロリ 93.9%、大根 95.8%、グリーンセロリ 92.9%、コールラビ 93.2%であった。水分含有量の多いもの

は勿論見かけ上、アミノ酸含量に低い値がでるので、上記試料を全部、水分含量で90%に計算しなおせば比較しやすい。水分含量は野菜試料については、その保存状態でかなり変動するものと思われる。

それぞれの試料の上段と下段の棒グラフを見ればメチオニン誘導体の総アミノ酸量と遊離アミノ酸量とが比較できる。いずれの試料においても総アミノ酸中のメチオニン量が最も多く含まれ、次に遊離アミノ酸中のビタミンUの量が多いことが理解される。すなわち、野菜中のメチオニン関連物質中では、ビタミンUは量的にも重要であることがわかる。加水分解後（すなわち総アミノ酸量中の）ビタミンUは、この分解処理により少し破壊され、減少しているように思えるが、後に述べるように、ビタミンUはモデル実験では、もっと多くの量が壊されているようである。ブロッコリーと小松菜、白菜、カブにおいてはビタミンUの破壊が50%以上であるが、他の試料についてそうでないのは、メチオニンとペクチンが6N HCl 110℃の条件下ではビタミンUを生成している可能性も考えられる⁽⁷⁾。

ここで、Fig. 3にメチオニン誘導体の変化をまとめてみる。下段のメチオニンは、酸化をうけ、メチオニンスルホキサイドになるが、さらに酸化をうけるとメチオニンスルホンとなる。メチオニンはメチル化されるとビタミンUとなり、このものは中性～アルカリ

性で分解し青のり臭のあるジメチルサルファイドとホモセリンラクトンとなり加水分解をうけホモセリンになる。

ビタミンUはこのように比較的分解されやすいのでこれがアミノ酸分析チャート上にどのようにでるかを見たのがFig. 4である。これはNa系バッファの分析チャートであるが、(a)の通常のアミノ酸パターンと(b)のビタミンUのHCl加水分解処理後のパターンとを比較すると、ホモセリン以外は、分離可能であることがわかる。ホモセリンはグルタミン酸の溶出位置と接近しているため、前述のFig. 1、Fig. 2などのアミノ酸分析チャートでも見かけられなかった。チャート(b)から27.5分の未知ピーク以外は、ビタミンUのHCl加水分解処理による影響を定量的に解析できる。総アミノ酸定量のための加水分解処理にはいろいろな方法が行なわれているが、ここでは4種の操作⁽¹³⁾について、その際ビタミンUがどのように変化するかを分析し、その結果をまとめたのが、Fig. 5である。(a)操作においてはよく行なわれる6NHClのみによる加水分解で、この時ビタミンUが変化するものとその生成割合を示した。(b)では還元剤のβ-メルカプトエタノールを少し加えてある場合の結果である。この時のみFig. 4(b)に示した未知ピークが2%生成する。(c)ではメチオニンやシスチンの定量のため前処理⁽¹³⁾として過熾酸

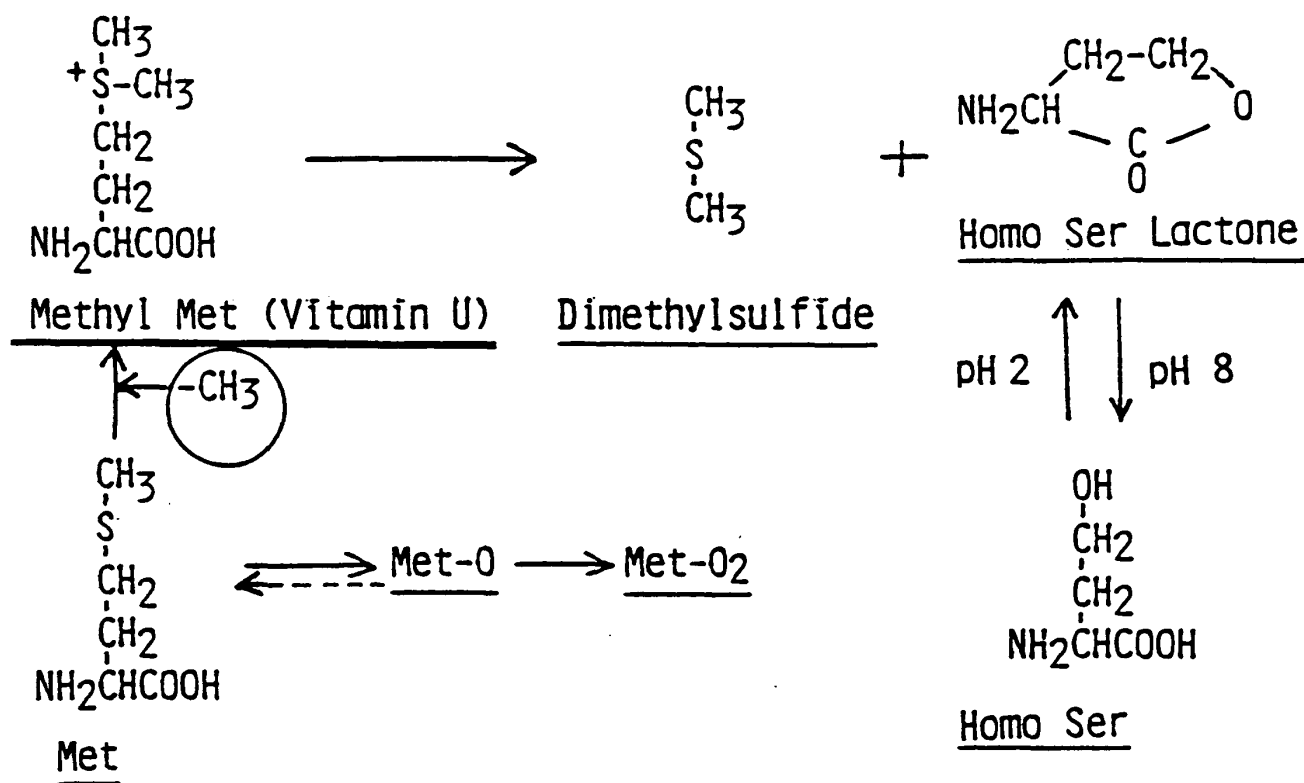


Fig. 3 Relations among methionine derivatives. Met-O, methionine sulfoxide; Met-O₂, methionine sulfone.

酸化が行なわれるが、この時の結果である。ビタミンUは殆んど酸化を受けないことがわかった。(d)では(c)の後操作として(b)の加水分解処理をするが、その結果を示す。以上の結果から、(a)、(b)より通常のHCl加水

分解処理によりビタミンUは約40%が破壊されずに残ることがわかった。また約40%がメチオニンを生成することも明らかとなり、ビタミンUを多量に含む試料において、アミノ酸分析を行う場合は、この点を考慮

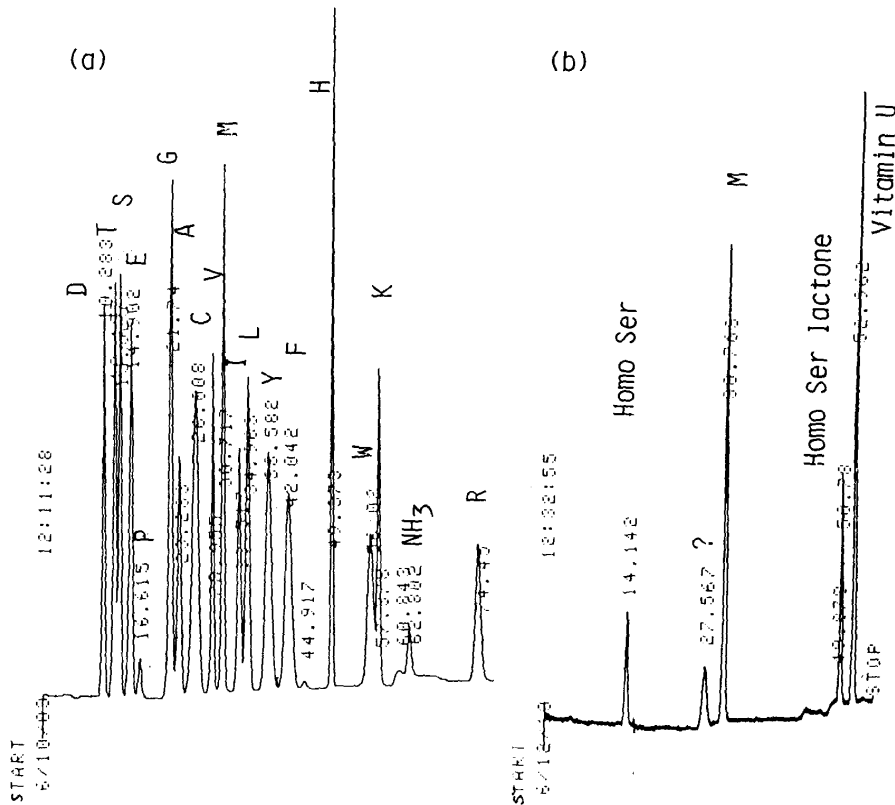


Fig. 4 Chromatograms of (a) standard amino acids (b) a standard vitamin U sample hydrolysed in 6 N HCl and 0.04% β -mercaptoethanol at 110°C for 24 hr.

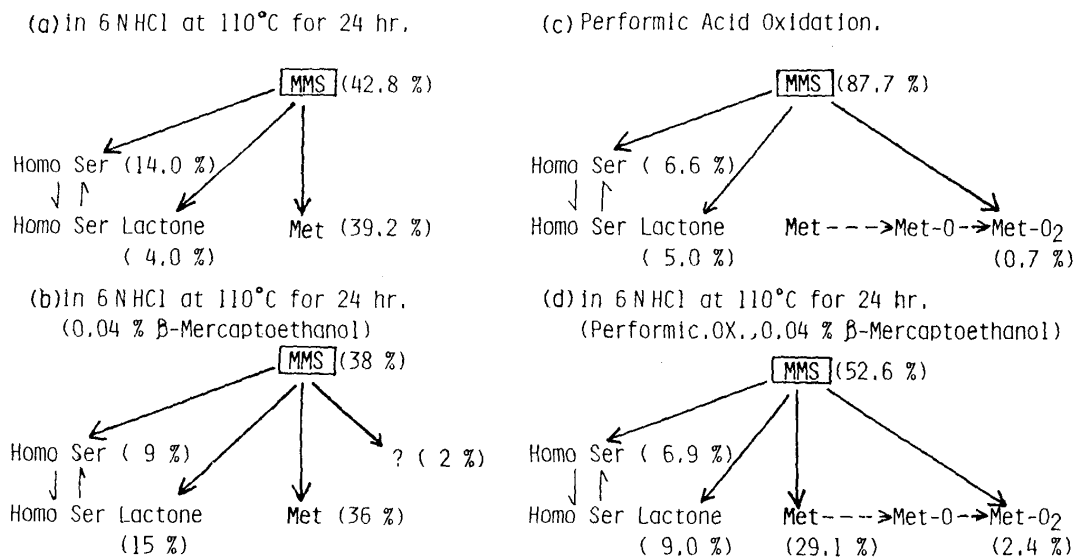


Fig. 5 Changes of vitamin U after various treatments. MMS, vitamin U.

に入れる必要がある。またホモセリンの生成が、グルタミン酸の定量値にも影響する。

IV. 要 約

食品中、特に野菜中に含まれるビタミンUおよびメチオニンの定量分析を水抽出物および塩酸加水分解した試料について行った。分析した試料中では、塩酸加水分解試料中に含まれるメチオニンの量が他のメチオニン誘導体より多く、次いで水抽出物中のビタミンUであった。このビタミンUの分解産物はアミノ酸分析チャート上で他のアミノ酸ピークと合わさり、定量を妨害することがわかった。そこで標準のビタミンUを用いて、数種の塩酸加水分解処理操作を行い、モデル実験を行った。その結果通常の塩酸加水分解処理により、ビタミンUは約40%が壊されずに残り、約40%はメチオニンを生成することが明らかとなった。

この他にホモセリンラクトン、ホモセリン等が生成することも明らかとなった。

(1989年8月15日受理)

本研究の一部は昭和63年度文部省科学研究費 一般研究(c)によった。本研究に多大の御協力をいただきました中島悦子、宮田賀代子、立花久財子氏に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) F. Challenger and B. Hayward, Chem, Ind, (London) ,25, 729 (1954)
- 2) R. Mc Rorie, C. L. Sutherland, M. S. Lewis, A. D. Barton, M. R. Glazener and W. Shive, J. Am, Chem, Soc. , 76, 115 (1954)
- 3) 平岡栄一、紀氏健雄、ビタミン、28, 387 (1963)
- 4) T. Kiribuchi and T. Yamanishi, Agric, Biol, Chem. , 27, 56 (1963)
- 5) F. I. Skodak, F. F. Wong and L. M. White, Anal, Biochem, 13, 568 (1965)
- 6) E. G. Kovatcheva, Analyst, 104, 79(1979)
- 7) Y. Obata and Junya Mizutani, Agric. Biol, Chem. , 25, 36 (1961)
- 8) 日野哲雄、君塚明光、伊東克己、小笠原武、農化誌、36巻、5号、413 (1962)
- 9) K. Ohtsuki, M. Kawabata, K. Taguchi, H. Kokura and S. Kawamura, Agric, Biol, Chem, 48, 2471, (1984)
- 10) K. Ohtsuki, M. Kawabata, H. Kokura and K. Taguchi, Agric, Biol, Chem. , 51, 2479 (1987)

- 11) T. W. Keenan and R. C. Lindsay, J. Chromatogr, 30, 251 (1967)
- 12) A. A. Bezzubov and N. N. Gessler, J. Chromatogr, 273, 192 (1983)
- 13) 科学技術庁資源調査会編「改訂、日本食品アミノ酸組成表」(1986)
- 14) S. Moore, D. H. Spackman and W. H. Stein, Anal, Chem. , 30, 1185 (1958)
- 15) 日本ビタミン学会「新ビタミン学」 p457 昭和44年9月