

技術報告

# 吸光分析法によるリシロンブ抽出液中 マンニトールの新規定量法

田園大樹\*

Determination of mannitol in extracts from the kelp *Saccharina japonica* var. *ochotensis*  
by a newly developed spectrophotometric analytical method

Daiki TAZONO

A new spectrophotometric method to determine mannitol was developed by combining a conventional method based on generation of formaldehyde and its detection with 3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone (MBTH). Determination of mannitol in extracts from the kelp *Saccharina japonica* var. *ochotensis* was difficult with the conventional method because of non-specific colorations caused by contaminants. However, the newly developed MBTH method enabled determinations of mannitol with reasonable levels of accuracy after pretreatments to remove contaminants using chloroform and cationic deproteinization agents. Although the MBTH method showed relatively low precision for samples with low or high mannitol concentrations, it will be useful for analyses of natural samples such as seaweeds that usually include large amounts of contaminants.

キーワード：マンニトール, リシロンブ *Saccharina japonica* var. *ochotensis*  
2020年2月6日受付 2020年10月30日受理

マンニトールは、高親水性で炭素数6の鎖状多価アルコールであり、細菌類や真菌類、海藻、高等植物等においてエネルギー代謝や浸透圧調整、抗酸化作用等に関係している (Jennings *et al.* 1998, Shen *et al.* 1999)。海藻のうち褐藻類においては、炭酸同化の一次生成物がこのマンニトールであることが知られており、好気呼吸基質のほか貯蔵態同化産物としても機能することが知られている (Yamaguchi *et al.* 1966, Yamaguchi *et al.* 1969, 広瀬 1981)。褐藻類のツルアラメ *Ecklonia stolonifera* においては、藻体中のマンニトール含量に季節変動が生じることが知られている (小田桐・加藤 2014)。また、リシロンブ *Saccharina japonica* var. *ochotensis* についても、藻体中のマンニトール含量が時期によって大きく変動することが分かっており (Kodama and Kawai 2019)、藻体中

マンニトール含量は、藻体の季節的な生理状態、栄養状態を推察する上で重要な指標となる可能性がある。また、昆布だらしい呈味は、グルタミン酸ナトリウムとマンニトール、塩化カリウムによって発現するとされている (上田 1997)。このように藻体中のマンニトール含量は、昆布類の呈味性の指標としても重要であり、リシロンブをはじめとした海藻藻体中のマンニトールを一定の精度で定量する方法の重要性は高い。

マンニトールをはじめとした糖アルコールは、総糖質定量法であるフェノール-硫酸法には陰性である。また、還元性を示さないことから、還元糖の定量法である Somgy-Nelson 法も適用できない。このため液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーで定量されることが多いが、高額で大掛かりな設備が必要でこれらを活用

\* 北海道立総合研究機構栽培水産試験場  
〒051-0013 北海道室蘭市船見町1丁目156-3  
Mariculture Fisheries Reserach Institute, Hokkaido Research Organization, Funamicho1-156-3, Muroran, Hokkaido 051-0013, Japan  
tazono-daiki@hro.or.jp

できる状況は限られる。

Larsen (1978) は, Cameron *et al.* (1948) の方法に準じた方法として, マンニトールを含む粉末試料に硫酸酸性下でメタ過ヨウ素酸カリウム (以下,  $\text{KIO}_4$ ) を作用させ, ヨウ素滴定により定量する方法を見出している。本法は糖アルコールが, 他の糖類に比べ  $\text{KIO}_4$  により急速に酸化されることに基づいており, 適切な反応時間を取ることで, マンニトール以外の夾雑する糖類の影響を少なくしている。Larsen (1978) の方法は, 食品加工利用の分野を中心に利用されているが, 固形試料として 100mg 程度を必要とするため, 試料がさらに微量の場合には適用できない。また, 滴定操作は十分に習熟した者が行わないと誤差が大きくなることから, 簡便かつ汎用的に使える方法とは言い難い。

Greefe *et al.* (2003) は, 細菌の *Leuconostoc mesenteroides* 由来の mannitol 2-dehydrogenase (以下, MDH) を触媒とし, マンニトールがフルクトースに酸化される際に酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (以下,  $\text{NAD}^+$  と略) が還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (以下,  $\text{NADH}$  と略) に還元されることを利用した, 高感度なヒト血清中マンニトールの定量法を示している (以下, 本法を MDH 法とする)。MDH 法は, 容易な操作と分光光度計による吸光度の測定のみでマンニトールを定量できる方法である。現在市販されるマンニトール定量キットは, 本法にさらにプローブによる呈色を組み合わせたものがほとんどであり, 血清や尿, 細胞培地, 生体組織からの抽出液等さまざまな試料に応用可能とされる (Bio Vision 社 D-Mannitol Colorimetric Assay Kit, BioAssay Systems 社 EnzyChrome D-Mannitol Assay Kit 他)。しかし, MDH 法で用いる *L. mesenteroides* 由来の MDH は非常に高価であり, 多検体を分析するには費用が高額となる。このため, 市販のキットは, 小容量での反応, 検出が可能なマイクロプレートリーダーの使用が前提となっており, コストや設備の面から汎用的な分析方法とは言い難い。また, MDH はマンニトールだけでなく, フルクトースに対しても作用する基質選択性を有することから, 25mM のフルクトースの共存により 26% の誤差が生じると推定されている (Greefe *et al.* 2003)。加えて, MDH 法は  $\text{NAD}^+$  が  $\text{NADH}$  に還元されることを利用するが,  $\text{NAD}^+$  は補酵素として生体中に普遍的に存在する物質であることから, 各試料の  $\text{NAD}^+$  量のバックグラウンドを別途定量する必要があり, 分析コストや夾雑物, 操作性の面も含めると汎用的に使える方法とは言えない。

Tibbling (1968) は, ヒト血清中マンニトールの定量法として  $\text{KIO}_4$  による酸化とクロモトローブ酸による呈色を組み合わせた方法を示している (以下, 本法を Tibbling 法と示す)。糖アルコールに  $\text{KIO}_4$  が作用するとギ酸とホルムアルデヒドが生成するが, Tibbling 法は, マンニトールに  $\text{KIO}_4$  が作用することで 4 分子のギ酸と 2

分子のホルムアルデヒドが生じることを利用したものである。本法は, 2mg/mL, 4mg/mL のマンニトール水溶液を用いて酸化反応時間を検討し, マンニトールが十分に酸化される 10 分間のみ,  $\text{KIO}_4$  を作用させる。その後, メタ亜ヒ酸により酸化反応を停止し, 生じたホルムアルデヒドをクロモトローブ酸で呈色させ, 波長 570nm の吸光度を測定することでマンニトールを定量する。Tibbling 法では, 硫酸亜鉛と水酸化バリウムによる陽イオン系の除タンパク処理を, 発色の前処理として行うこととしている。また, Tibbling 法はヒト血清試料については高い添加回収率を示すが, クロモトローブ酸の呈色阻害物質である硝酸イオンや亜硝酸イオンが含まれる試料には適用できない。一方, リシリコンブに代表される褐藻類の抽出液等, 生体由来試料の多くには, これらの無機窒素イオンが含まれている。実際にリシリコンブ抽出液について Tibbling 法により分析すると, 抽出液の濃度に依存しない様な赤色を示し, 試料がさらに高濃度の場合には黄色を呈すことから (Data not shown), 本法をそのままリシリコンブ等の海藻試料の抽出液に適用することはできない。

Tibbling 法におけるクロモトローブ酸の役割は, 試液中のホルムアルデヒドを呈色させ定量することである。このことから Tibbling 法と呈色妨害物質の影響が少ないホルムアルデヒドの検出法を組み合わせれば, 海藻抽出液のような夾雑物が多い試料であっても, 分光光度計等の分析機器で簡易かつ汎用的にマンニトールの分析が可能と考えられる。ホルムアルデヒドの定量法は Tibbling 法で用いられるクロモトローブ酸のほか, アセチルアセトン法 (Nash 1953), パラロザニリン法 (Lyles *et al.* 1965) などの測定法が知られているが, 感度および操作の煩雑さの点で, 微量のホルムアルデヒドを簡単かつ迅速に分析できる方法とは言い難い (大富ら 1975)。これに関連して大富ら (1975) は, Sawicki *et al.* (1961) によって提案され, Hauser and Cummins (1964) によって操作の簡略化が行われた大気中のホルムアルデヒド定量法を応用し, 3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone (以下, MBTH) を用いた水中の微量ホルムアルデヒド定量法を考案している。

本報では, Tibbling 法と大富らの MBTH を用いたホル

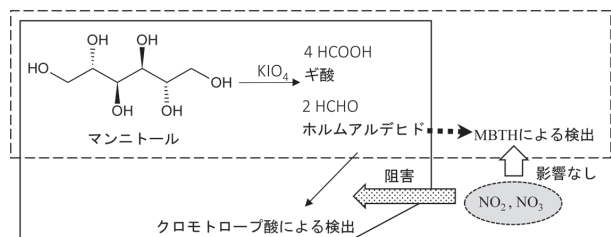


図1. Tibbling (1968) のマンニトール分析法 (Tibbling 法), 大富ら (1975) のホルムアルデヒド分析法, および MBTH 法の概念図  
実線枠は Tibbling 法を, 点線枠は大富らの方法を, 点線枠は本報での MBTH 法を示す

ムアルデヒド定量法を組み合わせ、水溶液中のマンニトールを一定以上の精度で定量する手法を開発した（以下、MBTH法とする）（図1）。また精度検証のため、MBTH法により分析したリシリコンブ抽出液のマンニトール添加回収率試験、および繰り返し試験の結果について示す。

## 材料と方法

### 試薬

1. **MBTH溶液** 3-Methyl-2-benzothiazolinonehydrazone hydrochloride（東京化成工業）0.1gを蒸留水（以下、DW）100mLに溶解し、0.1%（w/v）に調製した。

2. **酸化試薬** 無水塩化鉄（III）（関東化学）1.0gをDW100mLに溶解した後、アミド硫酸（富士フィルム和光純薬）1.6gをさらに添加して溶解した。

3. **硫酸亜鉛溶液** 硫酸亜鉛七水和物（純正化学）2.5gをDW100mLに溶解し、87mMに調製した。

4. **水酸化バリウム溶液** 水酸化バリウム八水和物（富士フィルム和光純薬）2.6gをDW100mLに溶解し、83mMに調製した。

5. **過ヨウ素酸溶液** 0.5MにDWで希釈した硫酸（富士フィルム和光純薬）100mLにメタ過ヨウ素酸カリウム（富士フィルム和光純薬）0.46gを溶解し、20mMに調製した。

6. **メタ亜ヒ酸溶液** メタ亜ヒ酸ナトリウム（Sigma Aldrich）2.6gをDW100mLに溶解し、200mMに調製した。

7. **マンニトール標準液** マンニトール（富士フィルム和光純薬）0.5gをDW100mLに溶解した標準原液を適宜DWで希釈して使用した。

8. **クロモトローブ酸試薬** クロモトローブ酸二ナトリウム二水和物（東京化成工業）1.1gをDW100mLに溶解し、10Mに希釈した硫酸450mLと混合した。調製直後は発色が鈍いことから使用する2日以上前に調製した。

その他、除タンパク処理に際し、非極性化合物を除去するために、クロロホルム（富士フィルム和光純薬）を用いた。メタ亜ヒ酸ナトリウムは純度90%以上、その他試薬は各社特級品を用いた。

**供試藻体** 北海道礼文町において生産されている養殖用リシリコンブ *S. japonica* var. *ochotensis* の1年目藻体を用いた。試料は2019年6月、8月、9月にそれぞれ採集した。

**リシリコンブ抽出液の調製** 採集した藻体の中央部から、φ20mmコルクボーラーにより円形の藻体片を切り出した。この藻体片を自然乾燥させた後、さらに乾燥機（EYLA WFO-501W）により80°Cで1晩乾燥させ、ミルサー（イワタニIMF-180）により粉碎した。実験に供した3ヶ月分、各月5本（合計15本）の粉碎藻体片の乾燥重量は25.9 ± 12.8mg（平均値 ± S.D.）、最小8.7～最大51.8mgであった。粉碎藻体片を15mLプラスチック

チューブに移し、DW10mLを分注して1晩水溶性成分を抽出した。翌日、抽出溶液の上清7mLをマクロピペットにより別の15mLプラスチックチューブに移し、藻体が入っているチューブに再度DW10mLを分注してさらに1晩抽出した。翌日、再び抽出液7mLを再度マクロピペットにより分取し、前日の抽出液と合わせて計14mLのリシリコンブ抽出液を得た（以下、抽出液と表記する場合は本抽出液のことを示す）。

**MBTH法の分析操作** 試料400μLを分注した1.5mLプラスチックチューブにクロロホルム1,000μLを分注し、ボルテックスミキサーで攪拌してクロロホルムに可溶の夾雑物を除去した。分離した水層から50μLを分取し、あらかじめ硫酸亜鉛溶液1,000μLを分注した別の2.0mLプラスチックチューブに加えた。さらに水酸化バリウム溶液1,000μLを加えた後、ボルテックスミキサーで攪拌し、遠心分離機（TOMY精工MRX-150）により11,800 × g、5分間、室温で遠心分離して除タンパク処理をした。

除タンパク処理後の上清300μL（分光光度計等で使用する総液量1,200μLの場合の液量。マイクロプレートリーダーを使用する総液量200μLの場合は50μLとする。以下、括弧内はマイクロプレートリーダー用分析操作の液量を示す）を1.5mLプラスチックチューブに分注した。続いて過ヨウ素酸溶液100μL（17μL）を加え、正確に10分間計測してマンニトールを酸化処理した。10分経過後、メタ亜ヒ酸溶液100μL（17μL）を直ちにに加え、酸化反応を完全に停止させるため20分程度静置した。

MBTH溶液500μL（83μL）を加え、さらに酸化試薬200μL（33μL）を加えボルテックスミキサーで攪拌し、そのまま45分静置して呈色させた。呈色後の試液の一部を分取し、分光光度計、あるいはマイクロプレートリーダーにより試液全量の波長628nmにおける吸光度を測定した。

**MBTH法によるマンニトール標準液の分析** MBTH法のマンニトール検出感度、検量線直線性を確認するため0.0mg/mL、0.1mg/mL、0.25mg/mL、0.5mg/mLの濃度にDWで調製したマンニトール標準液を、MBTH法により呈色させ、分光光度計（日立ハイテクノロジーズU-3300）により波長628nmにおける吸光度を測定した。

**Tibbling法によるマンニトール標準液の分析** MBTH法とTibbling法とを比較するため、0.0mg/mL、0.1mg/mL、0.4mg/mL、1.0mg/mLのマンニトール濃度に調製したマンニトール標準液をTibbling（1968）に従って測定した。すなわち、硫酸亜鉛溶液1,000μLを分注した2.0mLプラスチックチューブに標準液20μLを分注し、さらに水酸化バリウム溶液1,000μLを加えた後、ボルテックスミキサーで攪拌し、遠心分離機により11,800 × gで5分間、室温で遠心分離した。

遠心分離後の上清300μLを、15mL蓋付き試験管に分注した。続いて過ヨウ素酸溶液100μLを加え、正確に10

分間計測してマンニトールを酸化処理した。10分経過後、メタ亜ヒ酸溶液100 $\mu$ Lを直ちにに加え、酸化反応を完全に停止させるため20分程度静置した。

続いてクロモトロープ酸試薬3mLを加え、密栓した後、100 $^{\circ}$ Cに設定したウォーターバスで30分間加熱した。加熱終了後、蓋をゆるめ、室温まで冷却した後、試液の一部を分取して分光光度計（日立ハイテクノロジーU-3300）で波長570nmにおける吸光度を測定した。

**MBTH法における吸光度の経時変化** MBTH法における呈色時間、および呈色の経時的安定性を検討するため吸光度の経時変化を確認した。マンニトール標準液を0.1mg/mL、0.25mg/mL、0.5mg/mLの各濃度に調製し、MBTH法のメタ亜ヒ酸溶液を加えるまでの分析操作を行った。MBTH溶液、および酸化試薬を加えた後、直ちに試液の一部を分取して分光光度計（日立ハイテクノロジーU-3300）により波長628nmにおける吸光度を90分間記録した。

**リシリコンブ抽出液におけるマンニトールの添加回収率試験** 添加回収率試験は、夾雑物の存在下で試料に対する添加量が正確に分析されることで、その分析法の正確性を測る試験である。

各月に採集された藻体からの抽出液50 $\mu$ Lを、96穴マイクロプレートに分注し、DWおよび0.1mg/mLマンニトール標準液をそれぞれ加え、最終濃度がもとの抽出液の2倍希釈値（C0）、2倍希釈値+25 $\mu$ g/mL（C1）、2倍希釈値+50 $\mu$ g/mL（C2）となるよう調製した。マイクロプレートリーダー（コロナ電気SH1200）を用いたMBTH法で、各試料のC0、C1、C2および標準液希釈系列を分析し、標準液希釈系列の吸光度から作成した検量線によりC0、C1、C2のマンニトール濃度を定量した。

C1およびC2の値からC0の値を減じ、それぞれ25および50で除してマンニトールの回収率R1（C1 - C0）/25、R2（C2 - C0）/50を算出した。また、その変動係数（C.V）を算出した。

**リシリコンブ抽出液の繰り返し分析試験** 8月および、9月の試料2本分から得られた抽出液それぞれについて、マイクロプレートリーダーを用いたMBTH法により、同一試料を7回分析した。併せて標準液希釈系列を分析し、標準液希釈系列の吸光度から作成した検量線により試料のマンニトール濃度を定量した。各試料について平均値、標準偏差および変動係数を算出した。

## 結 果

**MBTH法とTibbling法によるマンニトール標準液の分析** MBTH法は、0.0mg/mLから0.5mg/mLのマンニトール濃度の間でBeerの法則に従って濃度依存的に吸光度が上昇し、直線性の高い検量線が得られた（図2）。決定係数の値はTibbling法、MBTH法とも0.9980、0.9985とほぼ同値となった（図2）。検出感度については、ク

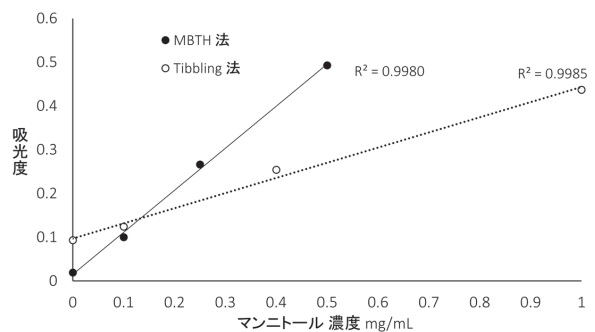


図2. MBTH法およびTibbling法により作成したマンニトール標準液の検量線

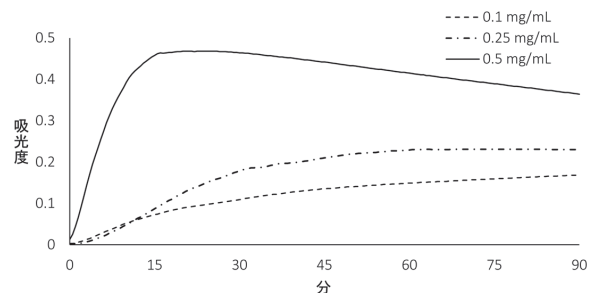


図3. MBTH法によるマンニトール標準液（0.5mg/mL、0.25mg/mL、0.1mg/mL）における吸光度の経時変化

ロホルム処理後の試料分取量がMBTH法の方が2.5倍多いが、Tibbling法よりも切片の値が低く、0.1mg/mL以上の濃度でMBTH法の方が高い吸光度を示しており、検出感度はTibbling法よりも優れる（図2）。

**MBTH法における吸光度の経時変化** マンニトール濃度0.5mg/mLでは、20分まで徐々に吸光度が上昇し、20分から26分の間に最も高い0.468に達した（図3）。以降は緩やかに吸光度が減少し、45分後には0.442、60分後には0.415となり、90分後には0.364まで減少した（図3）。

マンニトール濃度0.25mg/mLでは、30分後に吸光度は0.109、45分後に0.210、60分後に0.230に達し、以降はほぼ一定の吸光度を示した（図3）。

マンニトール濃度0.1mg/mLでは、30分後に吸光度は0.109、45分後に0.135、60分後に0.149に達した。以降も緩やかに吸光度は上昇し続け、90分後には0.169に達した（図3）。

**リシリコンブ抽出液におけるマンニトールの添加回収率試験** 6月の5試料の添加回収率はR1で84.9～125.7%、R2では84.9～107.0%であった（表1）。8月の5試料の添加回収率はR1で74.7～112.1%、R2で91.7～120.6%であった（表1）。9月の5試料の添加回収率はR1で95.1～159.6%、R2で113.8～124.0%であり、試料番号3のR1が全試料中最も誤差が大きくなった（表1）。また9月の試料のR2はすべて10%以上高い値となった（表1）。6月および8月の試料の変動係数はともにR1で約14%、R2で約10%であった（表1）。9月の試料の変動係数はR2で3.4%であったが、R1は22.0%と値が高く

表1. リシリコンブ抽出液における添加回収率試験の結果

試料番号	マンニトール濃度 (µg/mL)								
	6月			8月			9月		
	C0	C1	C2	C0	C1	C2	C0	C1	C2
1	1.3	32.7	46.3	80.2	98.9	128.6	222.8	247.5	284.0
2	22.5	52.2	76.0	92.1	117.6	137.9	170.2	194.0	227.1
3	14.0	35.2	60.7	56.4	82.8	107.4	206.7	246.6	268.7
4	13.1	43.7	55.6	89.6	117.6	143.0	148.1	177.0	209.3
5	13.1	41.2	66.6	50.5	76.0	110.8	90.4	119.3	149.8
試料番号	回収率								
	R1(C1-C0)/25		R2(C2-C0)/50		R1(C1-C0)/25		R2(C2-C0)/50		
1		125.7%	90.0%		74.7%	96.8%	98.5%	122.3%	
2		118.9%	107.0%		101.9%	91.7%	95.1%	113.8%	
3		84.9%	93.4%		105.3%	101.9%	159.6%	124.0%	
4		122.3%	84.9%		112.1%	107.0%	115.5%	122.3%	
5		112.1%	107.0%		101.9%	120.6%	115.5%	118.9%	
C.V		14.5%	10.4%		14.4%	10.7%	22.0%	3.4%	

表2. リシリコンブ抽出液における繰り返し試験の結果

繰り返し回数	マンニトール濃度 (µg/mL)								AVE	S.D	C.V
	1	2	3	4	5	6	7				
8月	1	43.2	43.2	41.4	47.5	44.0	43.2	45.8	44.0	2.0	4.5%
	2	83.8	75.2	82.1	70.8	82.1	76.9	78.6	78.5	4.6	5.8%
9月	1	198.9	198.0	191.9	200.6	198.9	193.7	190.2	196.0	4.0	2.0%
	2	141.8	141.8	139.2	141.8	144.4	141.8	141.8	141.8	1.5	1.1%

なった(表1)。

**リシリコンブ抽出液における繰り返し試験** 8月の試料番号1を用いた、7回の分析値は41.4~47.5µg/mLであり、平均では44.0±2.0µg/mL(平均値±S.D.以下同様)、変動係数は4.5%であった(表2)。また、試料番号2の分析値は70.8~83.8µg/mL、平均では78.5±4.6µg/mLとなり、変動係数は5.8%であった(表2)。

同様に、9月の試料番号1の分析値は190.2~200.6µg/mL、平均では196.0±4.0µg/mLとなり、変動係数は2.0%であった(表2)。9月の試料番号2の分析値は139.2~144.4µg/mL、平均では141.8±1.5µg/mLとなり、変動係数は1.1%であった(表2)。

## 考 察

マンニトール標準液を分析した結果、MBTH法を用いた場合においても高い検量線直線性が得られた(図2)。このことから、クロロホルムによる抽出処理、陽イオン系の除タンパク処理、およびマンニトールの酸化工程はMBTHの検量線直線性には大きく影響しないと考えられた。また検出感度については、除タンパク処理後の分取量が異なるため様に比較はできないが、Tibbling法と同等かそれ以上の感度を有しているとみられ、検量線直線性と感度の観点からすると、MBTH法はマンニトールの定量法として十分に機能すると考えられた。

MBTH法における吸光度は、マンニトール濃度0.5mg/mLでは20分まで徐々に吸光度が上昇し、以降は

緩やかに吸光度が減少した(図3)。また、同濃度0.1mg/mLでは42分で0.131に達し、以降も緩やかに吸光度は上昇し続けており(図3)、経時的な呈色安定性には問題がある。大富ら(1975)は水中の微量ホルムアルデヒドをMBTHにより呈色させた場合、波長628nmにおける吸光度は14分後に最大に達し、以降17時間まで一定であることを示している。このことからクロロホルム抽出、陽イオン系除タンパク、およびマンニトール酸化のいずれかの工程が影響し、MBTHの呈色安定性が損なわれたと考えられる。このため、MBTH法においては試料の反応時間に十分留意する必要があり、反応時間に差が生じる場合などは、併せて標準液を分析するなどの対応が必要である。反応時間については、本報では検量線直線性に問題が無かったため45分を採用したが、適切な反応時間については更なる検討が必要である。

添加回収率試験では、いずれの月の試料についても10%以内の誤差で分析できている試料がある一方で、20%以上の誤差が生じている試料もあった(表1)。特に9月の試料ではR1で5試料中3試料、R2では5試料すべてで誤差が10%以上となっている(表1)。9月の試料は6、8月の試料と比べるとマンニトール濃度が高くなっており、試料中のマンニトール濃度が分析精度に影響した可能性がある。マンニトール濃度が最も低い6月の試料についても、R1の誤差が5試料中5試料すべてで10%以上となったが、一方で6月の試料のR2、8月の試料のR2では5試料中4試料で誤差が10%以下であった(表1)。このことから、MBTH法により精度よく分析できるマン

ニトール濃度は6月の試料のC2から8月の試料のC2の濃度帯、すなわち50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 付近と考えられる。

繰り返し試験では、8月の試料の変動係数は4.5%、5.8%、9月の試料では2.0%、1.1%であった(表2)。9月の試料と8月の試料を比較すると、9月の試料はいずれもマンニトール濃度が100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上となっており、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度帯で繰り返し分析の精度が安定すると示唆される。

MBTH法は、MDH法と比較しても、非酵素的反応であることから基質選択性の影響を受けない点や、各試料のNAD<sup>+</sup>量のバックグラウンドを別途定量する必要がない、等の点で優れる。また、Tibbling法と比較しても、MBTH法の場合は加熱工程がなく、操作性の面で利点がある。一方、マンニトール以外の糖アルコールや、ジオール構造を有する夾雑物が存在する場合には、これらの物質からもホルムアルデヒドが発生する可能性があり、分析精度が低下する。

MBTH法では、Tibbling法同様、硫酸亜鉛水溶液、および水酸化バリウム水溶液による陽イオン系除タンパク処理を採用した。除タンパク処理としては他に、トリクロロ酢酸(TCA)でタンパク質を沈殿させた後にジエチルエーテルで残存するTCAを抽出して除去する方法(Huang *et al.* 2010, Greenland and Lewis 1984)、メタノールとクロロホルムで抽出する方法(Wessel and Flügge 1984)などが知られる。MBTH法の除タンパク処理においてTCA処理、もしくはメタノール-クロロホルム抽出を行うと、ブランクでもMBTHが強く呈色し、呈色安定性が大きく損なわれた(Data not shown)。この現象はTCA処理において、水層に残存したジエチルエーテルを遠心エバポレーター、もしくは湯浴により除去しても発生したことから、水層に不可逆的な反応が起こったことが推定される。このためMBTH法における除タンパク処理は、陽イオン系除タンパク法を用いる必要がある。また同様の理由で、除タンパク処理前に行うクロロホルム抽出についても、水層に一定の溶解性を示すジエチルエーテルなどを用いることはできず、クロロホルムのように疎水性が極めて高く、水層に影響しない溶媒が適する。

本報におけるMBTH法の分析操作では水酸化バリウム八水和物、硫酸亜鉛七水和物、クロロホルム(いずれも医薬用外劇物)、およびメタ亜ヒ酸ナトリウム(医薬用外毒物)という極めて有害性の高い物質を採用しており、実験者や環境に配慮した分析手法とは言えない。また、これらの廃液、沈殿物は専門業者に回収を依頼することになるため、廃液の処理コストという観点では問題点が残る。実験者に対する安全性や更なる低コスト化、自然環境へ配慮の観点からも、これらの物質の代替は今後の課題となる。クロロホルム抽出の代替試薬としては、ジクロロメタン、n-ヘキサンなどが候補として挙げられ

る。また、除タンパク処理については、スピнкаラムを用いた限外ろ過や、マンニトールは熱安定性が高いことからタンパク質の加熱変性による沈殿などを組み合わせることで、MBTH法がより有用な方法となる可能性がある。

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり、実験に用いる養殖用リシリコンブの試料採集に協力して下さった宗谷地区水産技術普及指導所礼文支所の本前伸一支所長、野間田元主査、生産途中の養殖用リシリコンブを提供して下さった漁業者の大倉氏に深謝する。

## 文 献

- Cameron M, Ross A, Percival E (1948) Method for the routine estimation of mannitol, alginic acid, and combined fucose in seaweeds. *J. Soc. Chem. Ind.*, **67**, 161 - 164.
- Greefe H, Gütschow B, Gehring H, Dibbelt L (2003) Sensitive and specific photometric determination of mannitol in human serum. *Clin. ChemLab Med.*, **41**, 1049 - 1055.
- Greenland AJ, Lewis DH (1984) Amines in barley leaves infected by brown rust and their possible relevance to formation of 'green islands'. *New Phytol.*, **96**, 283 - 291.
- Hauser TR, Cummins RL (1964) Increasing sensitivity of 3-methyl-2-benzothiazolone hydrozone test for analysis of aliphatic aldehydes in air. *Anal. Chem.*, **36**, 679 - 681.
- 広瀬弘幸 (1981) 藻類学総説. 内田老鶴圃, 東京, pp. 147 - 180.
- Huang G, Yang Q, Wang ZB (2010) Extraction and deproteinization of mannan oligosaccharides. *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.*, **65**, 387 - 390.
- Jennings DB, Ehrenshaft M, Pharr DM, Williamson JD (1998) Roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen-mediated plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 15129 - 15133.
- Kodama H, Kawai T (2019) Monthly change of mannitol content in the kelp *Saccharina japonica* var. *ochotensis* from Wakkanai and Rebun, Northern Hokkaido, Sea of Japan. *Algal Res.*, **12**, 73 - 75.
- Larsen B (1978) 17: Brown seaweeds: analysis of ash, fiber, iodine, and mannitol. In "Handbook of Phycological Methods" (ed. by Hellebust J, Cragie J) Cambridge Univ. Press, London, pp. 181 - 188.
- Lyles GR, Dowling FB, Blanchard VJ (1965) Quantitative determination of formaldehyde in the parts per hundred million concentration level. *J. Air. Poll. Count. Ass.*, **15**, 106 - 108.
- Nash T (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.*, **55**, 416 - 421.
- 小田桐慎一郎・加藤陽治 (2014) ツルアラメに含まれる糖質、アミノ酸およびポリフェノールの季節変化. *日本食品化学工学会誌*, **61**, 268 - 277.
- 大富美智子・大野智子・赤堀貞利 (1975) MBTH法による水中の微

- 量ホルムアルデヒドの定量法. 工業用水, **202**, 21-24.
- Sawicki E, Hauser TR, Stanley TW, Elbert W (1961) The 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone test. Sensitive new methods for the detection, rapid estimation, and determination of aliphatic aldehydes. *Anal. Chem.*, **33**, 93-96.
- Shen B, Hohmann S, Jensen RG, Bohnert AH (1999) Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant Physiol.*, **121**, 45-52.
- Tibbling G (1968) A routine method for micro determination of mannitol in serum. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **22**, 7-10.
- 上田要一 (1997) だし中の“コク”, “あつみ”成分の研究. 日本味と匂学会誌, **4**, 197-200.
- Wessel DM, Flügge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.*, **138**, 141-143.
- Yamaguchi T, Ikawa T, Nishizawa K (1966) Incorporation of radioactive carbon from  $H^{14}CO_3^-$  into sugar constituents by a brown alga, *Eisenia bicyclis*, during photosynthesis and its fate in the dark. *Plant Cell Physiol.*, **7**, 217-229.
- Yamaguchi T, Ikawa T, Nishizawa K (1969) Pathway of mannitol formation during photosynthesis in brown algae. *Plant Cell Physiol.*, **10**, 425-440.