

## ゼラチンの比色定量\*

越智通秋・大城善太郎

## Colorimetric Determination of Gelatine

Michitoshi OCHI and Zentaro OOSHIRO

## 結 言

魚皮の鞣剤に対する性質，煉製品の足と結締組織の関係，其の他の問題を究明する目的からゼラチンの定量を必要とすることが多い。

従来の定量法は主としてタンニン酸，ピクリン酸等による沈澱の窒素を測定する方法によつてゐるから，定量には相当時間と熟練を要する。のみならず分析対象となる試料中には多くの場合特に蛋白，ペプトン等の窒素化合物が共存しているので，之等の試料からゼラチンのみを分離定量することは甚だ困難である。筆者等はその分離定量を試みるため種々先覚<sup>1) 2) 3)</sup>の設定条件方法を検討し，坂口反応を適用して短時間に精度よく比色定量し得る方法を得たので，その概要を以下に報告する。

## I 試薬類及装置

ゼラチン標準液：医用ゼラチンを用いる。予め全窒素を測定してその濃度を決定せるゼラチン液を稀釈してその1cc.は500rのゼラチンに相当する如く調製した。(清水製葉滅菌ゼラチンを用いた)

苛性ソーダ溶液：5% (W/V)

$\alpha$ -ナフトール溶液：1% $\alpha$ -ナフトールアルコール溶液10ccを水で100ccとする。(0.1%)

次亜臭素酸ソーダ溶液：5%苛性ソーダ100ccを予め氷冷し，之に臭素0.64ccを加えて溶解する。(−4~0°Cに貯蔵すれば1ヶ月間充分使用し得る。)

尿素溶液：40% (W/V)

タングステン酸ソーダ溶液：10% (W/V)

硫酸：2N

磷酸ソーダ(二水素)溶液：10% (W/V)

除蛋白用混合液：20% (W/V) 三塩化酢酸1容：25% (W/V) 酢酸鉛1容)

硝酸カリ溶液：15% (W/V)

光電比色計：日立製 EPO-A 型

フィルターは BG (500 $\mu$ )，キューベットは 10mm のものを用いた。

## II 基礎実験

## 1. ゼラチンのアルギニン含量

本比色定量法はゼラチン分子中のグアニジン基に対する坂口反応を応用するものであるから，原料の異なるゼラチンでもそのアルギニン含量が一定でなければ定量値も亦精確に求め難い。サメ皮ゼラチン，牛皮ゼラチン，鯨皮ゼラチンを高橋<sup>4)</sup>の方法で調製し，之等を25%塩酸で20時間加水分解してアルギニンを比色定量した結果が第1表である。

\* 1954年10月3日 日本水産学会 水産食品分科会(清水)にて講演

Table 1. Arginine content of gelatine.  
(Estimated by colorimetric method)

Kinds of gelatine	Arginine content (%)
Cow hide-gelatine	8.50
Shark skin- //	8.40
Whale hide- //	8.52

表示のようにゼラチン中のアルギニン含量は  $8.48 \pm 0.04\%$  であり、原料別による含量差は先ずないものと思われる。

## 2. ゼラチン沈澱分離法の検討

### a. 試料の調製

動物組織等の熱水処理液ならばよいが、時には乾燥製品中ゼラチンの定量を必要とすることがある。斯様な試料からゼラチンを抽出するには結締組織中のコラーゲンのゼラチン化を防ぎつゝ之を溶出しなければならない。之等のことを検討した結果、乾燥粉末 1~2g に水 100 cc. を加えて 25°C の水浴中で処理すると約 2 時間でゼラチンは完全に抽出し得ることを認めた。

### b. Folin-Wu 試薬によるゼラチンの沈澱分離

Folin-Wu 試薬のゼラチン沈澱性については既に柏田・柿本<sup>1)</sup>等によつて提案されているが、筆者等は更に操作の簡易迅速化を企る目的から一段と詳細に検討した。

先ず種々濃度のゼラチン液 5 cc. に 10% タングステン酸ソーダ 1 cc. を加えて混和し更に 2N 硫酸 0.5~1.5 cc. を加えたが沈澱は容易に濾紙を通過し遠心分離も出来ない乳濁状液となることを知つた。(尤も長時間の後には沈澱分離が可能となつたが本定量法の目的には合致しない) この傾向はゼラチン濃度の低い程著しかつた。

そこで沈澱生成促進のため以後の操作を妨害しない性質の電解質添加により凝集沈澱せしめる方法について種々検討し、結局 Folin-Wu 試薬を加える前に 10% 第一磷酸ソーダ 1 cc. を加えると著しい効果を示すことが認められた。斯くすれば沈澱の生成は容易に且つ完全になされ、濾過及遠心分離可能となる。

### c. 共存蛋白等の除去

Folin-Wu 試薬はゼラチンのみに特異的な沈澱反応を示すものではないから、予めゼラチンを沈澱しない除蛋白剤で試料中の共存蛋白等を除去<sup>1)</sup>する必要がある。

数種の除蛋白剤のゼラチン沈澱能は第 2 表の如くであり、之から比色に影響しない前処理用の沈澱剤は三塩化酢酸及酢酸鉛が適当と思われた。そこで之等兩除蛋白剤による共存蛋白の除去について種々検討を加えたが、結局次の如く処理することが最も適當であることを知つた。即ち試料液 20 cc. に 20% 三塩化酢酸 1 容と 25% 酢酸鉛 1 容の混合液 5 cc を加え更に 15% 硝酸カリ 5 cc. を加えて濾過し、濾液 15 cc. に 2N 硫酸 5cc. を加えて鉛を沈澱させ再び濾過する(添加硫酸量は稍々過剰であるが Folin-Wu 試薬の一部としてそのまま利用するためである)。かくすればゼラチンを損失することなく共存蛋白を完全に除去し得るか若くはゼラチン以外の Folin-Wu 試薬沈澱態物質を完全に除去し得、且つその後に行う Folin-Wu 試薬によるゼラチン沈澱操作に全く影響を及ぼさないことを認めた。

Table 2. Precipitative activity of various protein precipitant for gelatine.

Protein precipitant	Reaction	Protein precipitant	Reaction
Picric acid	Positive	Meta phosphoric acid	Negative
Tannic acid	//	Hasic Pb-acetate	//
Phosphotungstic acid	//	Pb-acetate	//
Folin-Wu reagent	//	Trichloroacetic acid	//

3. 比色方法の検討

上記実験の如く操作して得たゼラチンの沈澱をアルカリに溶解し之に直接坂口反応を適用して比色定量するためその発色条件を検討した。

a. 比色操作

標準ゼラチン液 300  $\gamma$ /cc のものを調製する。その 5cc. を目盛付遠心沈澱管 (15cc. 容) に採り之に 10% 第一磷酸ソーダ 1 cc. を加えて混和更に 10% タングステン酸ソーダ 1cc. を加え再び混和し、2N 硫酸 1 cc. を加えて混和してゼラチンを沈澱させる。5分放置して遠心 (2分) して上澄液を吸引除去する。この沈澱に苛性ソーダ溶液を加えてよく之を溶解し 6 cc. とす。之を氷冷し、予め氷冷しある  $\alpha$ -ナフトール 1 cc. を加え次亜亜臭素酸ソーダ溶液 0.2 cc. を加えて発色せしむ。15~20 秒後尿素液 1cc. を加え 1 分後に比色する。

b. 発色時のアルカリ度の影響

種々のアルカリ度で発色させた結果を第 1 図で示した。図示のようにアルカリ度低き場合には勿論完全には発色しないが、夫が高くなると再び吸光値の減少が認められた。その最適濃度は 4~5% の範囲である。

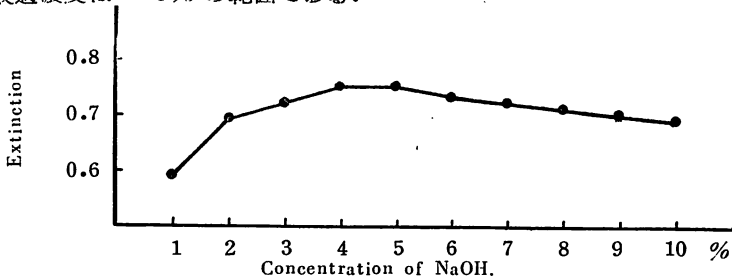


Fig. 1. Influence of alkalinity on color development.

c. 次亜臭素酸ソーダ溶液の所要量

次亜臭素酸ソーダの添加量によつても第 2 図の如く吸光値の変化が見られ、アルカリの場合と同様添加量の少ないときには勿論発色が弱く又過多の場合には再び発色度が減少する。その最適量は 0.2 cc. であつた。

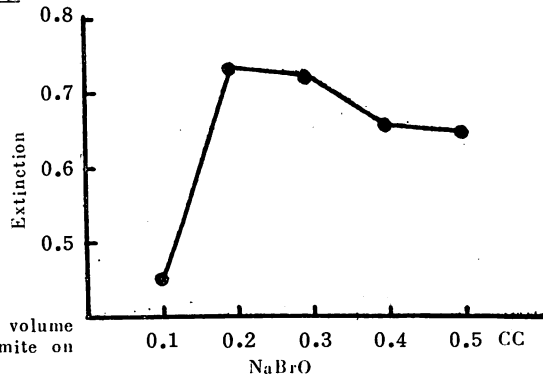


Fig. 2. Influence of adding volume of sodium hypobromite on color development

d.  $\alpha$ -ナフトール溶液の所要量

0.1% 溶液 1 cc. で充分であり、之による影響は上記のものに比して少なかつた。

## e. 呈色の安定度

之については種々報告<sup>5) 6) 7) 8)</sup>があるが、筆者等の結果では氷冷してあれば1~10分に亘るも充分安定であつた。

## f. 測定時におけるキューベットの曇り防止

比色時の試料は氷冷されているため、測定中(特に夏季において)キューベットの表面に発露して曇り吸光値に著しい誤差を与えることがある。之を防止するためキューベットの透光部兩外面に石鹼液を塗り乾燥し脱脂綿等で之を充分拭いきり、使用前にその面を蒸溜水で一様に湿らせた。

## g. 比色値に及ぼす沈澱剤の影響

比色値に影響する沈澱剤は Folin-Wu 試薬のみと考へてよいから之を確めるため次の如く比較した。即ち各種濃度のゼラチン液 5 cc. に上記の如く Folin-Wu 試薬を加えて之を沈澱せしめ、その沈澱に 5% 苛性ソーダを加へて 6 cc. としたものと、全上ゼラチン液 5 cc. に 30% 苛性ソーダ 1 cc. (結果として 5% 苛性ソーダに相当する)を加え、以後の操作は両者全く同様に行ひ比色した。その結果沈澱剤による影響は全く認められなかつた。(従つて後述の検量線の作製には、沈澱操作を省いてもよい。)

## h. 比色値に及ぼす沈澱洗滌剤の影響

沈澱洗滌剤<sup>1)</sup>を求めるため、水、硫酸、食塩加硫酸を用ひ各液 5 cc. 宛で洗滌を繰返し、それ等の効果を第3表に示した。

Table 3. Influence of washing solution on color value.

Washing sol.	Washing frequency				
	0	1	2	3	4
Water	1.00	0.880	0.835	0.610	0.550
N/10 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.920	0.885	0.880	0.870	0.860
N/10 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (containing 5% NaCl)	0.920	0.915	0.918	0.914	0.905
N/5 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.960	0.955	0.961	0.960	0.957
N/5 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (containing 5% NaCl)	0.960	0.961	0.959	0.961	0.960
N/2 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.960	0.958	0.959	0.960	0.959

これで明らかなように水は沈澱を溶解損失するが、硫酸は溶解を阻止する。筆者等は 5% 量の食塩を含む N/5 硫酸が最適と認たので、以下之を洗滌液とした。

## i. 共存物質の比色値に及ぼす影響並に洗滌効果

本法はゼラチンの沈澱を得て後比色定量するのであるから、溶液のまま呈色させる場合に比べ共存物質の影響は遙かに少ない。しかしゼラチン量(沈澱量)が多くなるとその影響も亦大きくなろう。試料ゼラチン液に予め呈色影響物質を含有させて操作した場合の之等共存物質の影響と洗滌効果は第4表の通りである。

Table 4. Removal of interfering substances on color value by washing

Substances added	Washing frequency			
	0	1	2	3
Control	1.03	1.03	1.03	—
NH <sub>4</sub> Cl 2.5mg	0.99	1.02	1.03	—
Histidine 0.5	0.98	1.03	1.02	—
Urea 1.0	1.01	1.03	1.03	—
Creatine 2.0	1.00	1.02	1.03	—
Tyrosine 2.0	1.01	1.02	1.02	—
Tryptophane 0.5	1.02	1.03	1.03	—
Arginine 1.0	1.70	1.25	1.05	1.03

これで明らかなように呈色影響物質は3回の洗滌で充分除去し得ることが判つた。

#### g. ゼラチン量と呈色との関係

種々濃度のゼラチン液 5cc. (100, 200, 300, 400, 500 r/cc) に前記 b の如く Folin-Wu 試薬を加えて沈澱させ、氷中水で操作して発色さす。その呈色度とゼラチン量との関係は第3図の如くゼラチン濃度が 500 r/cc までは Lambert-Beer の法則に従うものと考えられた。尙ゼラチンに直接呈色させて得られる定量値は、之を完全加水分解して得られるアルギニン絶対量の約 50% に相当する呈色値しか得られない。

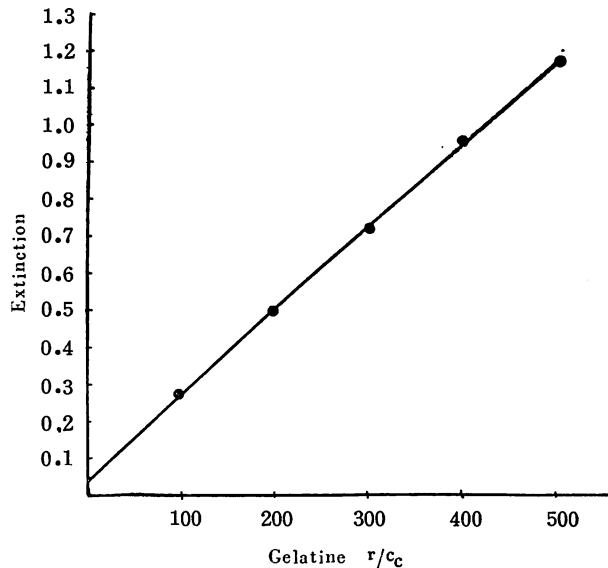


Fig. 3. Calibration curve of gelatine.

### III. 定量操作

以上の実験から定量法を次の如く設定した。

検液 20 cc. に除蛋白用混合液 (20% 三塩化酢酸 1 容 : 25% 酢酸鉛 1 容) 5cc. を加えてよく混和し更に 15% 硝酸カリ 5 cc. を加えて再び混和して共存蛋白等を沈澱させ、5 分放置後濾過する。濾液 15 cc. に 2N 硫酸 5 cc. を加えて鉛を沈澱させ 5 分後濾過する。この濾液は原検液の 2 倍稀釈となる。

濾液 5 cc. (ゼラチン含量の多いときには適宜稀釈したもの 5 cc. をとればよい。但し 2 倍以上稀釈したときは之に 2N 硫酸 1 cc. を加える。) を目盛付遠心沈澱管 (15cc. 容) にとり、10% 第一磷酸ソーダ 1 cc. を加えて混合し次に 10% タングステン酸ソーダ 1cc. を加えて混和するとゼラチンが沈澱する。5 分間放置後 2 分間遠心 (2000 R.P.M) して

上澄液を吸引除去し、 $N/5$  硫酸 (5% 量の食塩を含む) 約 5cc. を加え、ガラス棒で沈澱をよく攪拌して再び遠心し上澄液を除去する。この洗滌操作を後 2 回行う。沈澱に 5% 苛性ソーダを加えて溶解し 6 cc. とする。之に 0.1%  $\alpha$ -ナフトール溶液 1cc. を加え氷水中にて冷却する。5~10 分で  $1\sim 2^{\circ}C$  となるから、予め氷冷の次亜臭素酸ソーダ液 0.2 cc. を加え発色さす。15~20 秒後 40% 尿素溶液 1 cc. を加えてよく混和し氷水中に 1 分放置後 10 mm のキューベットに移し 500 m $\mu$  のフィルターを用いて吸光度を測定する。

#### IV. 実験結果

上記実験方法を検討するため卵アルブミン、市販ペプトン (ミクニ製)、サバ及カツオ熱水処理エキスに一定量のゼラチンを加えて上記の如く操作しゼラチンを定量した。その結果は第 5 表の如くであり、定量法として充分用い得られるものと考えられた。この場合の添加ゼラチンの回収率は 96~104% であつた。

Table 5. Recovery of gelatine added to various matter.

Matter	Gelatine added r/cc	Gelatine found r/cc	Gelatine recovered r/cc	Recovery %
Egg albumin	0	0		
	50	48	48	96.0
	200	193	193	96.5
Peptone (MIKUNI)	0	0		
	50	51	51	102.0
	200	203	203	101.5
Extract of mackerel meat	0	601		
	50	653	52	104.0
	200	807	206	103.0
Extract of skipjack meat	0	450		
	50	502	52	104.0
	200	645	195	97.5

### 総 括

ゼラチンの定量方法として坂口反応を適用する簡易迅速なる比色法を研究した。

1. ゼラチンのアルギニン含量は原料によらず略一定であることを認めた。
2. 乾燥試料中のゼラチンは  $25^{\circ}C$  の水で処理すれば約 2 時間で殆ど完全に抽出し得る。
3. Folin-Wu 試薬によるゼラチンの沈澱分離には相当時間を要するが、予め試料液に鱗酸ソーダ (第一) を添加すれば沈澱生成時間を短縮し得る。
4. 共存蛋白質等は除蛋白用混液 (三塩化酢酸-酢酸鉛) 及硝酸カリで完全に除去し得る。
5. 比色に適当な苛性ソーダの濃度は 4~5% である。
6. 比色時のキューベットの曇りは簡単な処理で防止し得る。
7. 呈色の極大吸収は 500 m $\mu$  附近にあり、ゼラチン濃度 500 r/cc までは Beer の法則に従う。
8. 本定量法は短時間に而も微量のゼラチンを定量し得る。回収率は 96~104% であり

充分利用し得るものと考えられる。

終りに臨み本実験の遂行に当り終始援助を得た当教室永吉秀夫氏に対し厚く感謝する。

### Résumé

Simplified method for colorimetric determination of gelatine in food and non-food through the well-known Sakaguchi's reaction was investigated.

The separation and determination of gelatine in the presence of large amount of other high molecular nitrogenous compound was achieved promptly by the following procedure :

To 20cc. of test solution was added 5 cc of precipitant mixture (20 % trichloroacetic acid 1 : 25% Pb-acetate 1), and 5 cc. of 15% potassium nitrate, and its solution was filtered after being allowed to stand for 5 minutes.

Then, 5 cc. of 2N sulfuric acid was added to 15 cc. of the filtrate to remove Pb<sup>++</sup>, and it was filtered after 5 minutes.

Five cc of the filtrate was transferred into 15 cc. centrifuge tube, and added 1 cc of 10 % sodium ortho phosphate di H (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O) and 1 cc of 10 % Na-tungstate to precipitate gelatine, the mixture was allowed to stand for 5 minutes, and then centrifuged for 5 minutes at 2000 R.P.M, and this supernatant liquid was siphoned off.

The precipitate was washed 3 times with 5 cc. of N/5 sulfuric acid containing 5 % sodium chloride. The precipitate was dissolved in 6 cc of 5% sodium hydroxide, and was cooled in a ice-bath for 15 minutes. Then, 1 cc of ice-cold  $\alpha$ -naphthol and 0.2 cc of ice-cold sodium hypobromite were added to the above solution. After 15 to 20 seconds, 1 cc of 40 % urea was added. The color developed almost immediately, but approximately 1 minute was required for maximum color development.

The optical density of the solution against water was read at 500 m $\mu$ .

The determination of gelatine in certain materials by this method was possible to be made in 40 to 60 minutes.

### 文 献

- 1) 柏田研一, 柿本大壱 : 日水誌 ; 18, 203~7 (1952)
- 2) 東大農化編 : 実験農芸化学 ; 641 (1952) 朝倉書店
- 3) 京大農化編 : 農芸化学実験書 ; 522 (1950) 産業図書K.K.
- 4) 高橋豊雄, 横山和吉 : 日水誌 ; 20, 4 11~20 (1954)
- 5) C.J. WEBER : J. Biol. Chem., 86, 2 17~22 (1930)
- 6) H.T. MACPHERSON : Biochem. J., 36, 59~63 (1942)
- 7) A.A. ALBANESE : J. Biol. Chem., 159, 185~94 (1945)
- 8) 岩村岳 : 農化誌 ; 24, 270~74 (1951)