

# ビューレット試薬による魚肉蛋白質の迅速定量—II

固形試料の直接定量について\*

大 城 善 太 郎

## Rapid Determination of Proteins in Fish Muscle through Biuret Reagent—II.

### An Application for Direct Determination of Protein in Solid Sample

Zentaro OOSHIRO

With all the detailed reports on the colorimetric determination of proteins in fish muscle with the use of Biuret reagent, very few attempts were made for the estimation of proteins in a solid state.

So, some studies were made on this problem, and the wished for result was got by the "Direct Protein Reaction" method, with the aid of the procedure of dissolving it by NaOH in Biuret reagent with no destruction of the peptide bond in protein.

Far less amount of sample than that of Kjeldahl method was needed in the new method, and it was done within only the lapse of time from 15 to 20 minutes.

#### 緒 言

先に筆者<sup>1)</sup>は、魚肉抽出液中の蛋白質を迅速に定量する目的から、ビューレット反応を適用して、呈色の促進と濁り成分の除去方法について検討し、略満足すべき条件を見出し、その大要を報告した。

ビューレット反応を用いて定量する試料は蛋白質溶液である。而し乍ら蛋白質工業の分野とか或は栄養学的な研究では、定量対象となるものが必ずしも蛋白質溶液のみでなく、固形の蛋白試料を直接定量する場合が可成り多い。

筆者はこのような固形試料中の蛋白質の定量にビューレット反応を適応させることにつき種々吟味し、略満足すべき定量方法を確立することが出来た。本文ではその大要を報告する。

#### 実 験 方 法

##### I. 試薬及び装置 (前報<sup>1)</sup>と全く同じものである。)

ビューレット試薬 (10% NaOH, 0.4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.2%グリセリン)

硫酸マグネシウム-硫酸亜鉛混合溶液 (20%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -35%  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (w/v))

光電比色計 (島津製 AKA型)

##### II. 定 量 原 理

前報<sup>1)</sup>で実証したように沸騰水浴中でビューレット反応を行わしめ得るから、固形の蛋白質試料をビューレット試薬中で注意深く加熱すると、呈色反応と蛋白質の溶解(10% NaOHによる)とは全く同時に起ることから、固形試料を精度よく直接比色定量すること

※ 日本水産学会秋期大会(長崎, 1955.)にて発表



が出来る。

### III. 定量操作

約 140mg (生鮮肉なら 700mg) 以下の蛋白試料を 50~100ml のマイヤーに秤取し、之にビュレット試薬 25ml を加え、沸騰水浴中で絶えずゆるやかに攪拌し乍ら 5分加熱して溶解呈色せしめる。流水で冷却し 50ml のメスコルベンに移し蒸留水を加えて定容とする。その 10ml に 20%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -35%  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  混合溶液 1ml を加えてよく振盪混和し、2分放置後 No. 2 濾紙 (9cm) で濾過し、濾液の吸光値を測定し蛋白量を求める。

### IV. 定量法の吟味

#### 1. ビュレット試薬の安定度

既に前報でも指摘したように SOLS の試薬を沸騰水浴中で加熱する場合、試薬の NaOH 濃度が高い程安定化されることを認めた。

固形試料の定量の場合には、直接原液を加えて操作出来るから NaOH の濃度も2倍になり、一層安定化されるものと考えられた。SOLS の原法によるビュレット試薬 (8% NaOH) と、筆者が改変した試薬 (10% NaOH) の沸騰水浴中での安定度は第 1 表に示す通りである。これで明らかな様に原法の試薬に比し、10% NaOH にした試薬は著しく安定性があり、定量目的に適するものと思われた。

第 1 表 沸騰水浴中での加熱処理に対するビュレット試薬の安定度  
に及ぼす NaOH 濃度の影響

加熱時間 (分)	1	5	10	15	20
試薬の NaOH 濃度 (%)					
8	-	±	+	+	+
10	-	-	-	±	+

- : 水酸化第二銅の沈澱全く生成せず、試薬安定

± : " 沈澱生成し始む? 定量的使用の限界

+ : " 沈澱生成す 試薬は定量目的には使用出来ない

操作はビュレット試薬をそのまま沸騰水浴中で加熱した。

#### 2. 発色に対する煮沸時間の影響

市販粉末ゼラチン 100mg, キハダマグロ乾燥肉 200mg, キハダ鮮肉 500mg 及び 1000mg をそれぞれ 100ml のマイヤーに採り、之にビュレット試薬を 25ml 加えて沸騰水浴中で一定時間加熱呈色せしめ、後は前記の定量操作に従い処理して加熱時間と呈色との関係を求め第 2 表の如き結果を得た。

試料 1, 2, 3, は処理時間と共に呈色値が増大し、5分で最高値を示し、それ以後は15分の加熱でも吸光値には変化が見られない。之は呈色反応が5分で完結し、而も生成したビュレット呈色物が強アルカリ性 (10% NaOH 相当) でも全く安定なことを示すものである。

試料 4 は蛋白質量に比し、ビュレット試薬の絶対量が不足した場合の一例を示したものである。表示の如く吸光値は反応処理時間と共に一旦は増大するが、やがて減少し、呈色物の色調も亦赤褐色化する。

以上 1, 2, 3 及び 4 の呈色値の変化から次の事が明かとなった。即ちビュレット呈色物は過剰の試薬 (ここでは Cu が主体となる) の存在で保護され安定である。而し蛋白量が多



過ぎるとCuが全くビューレット呈色反応のために消費されるため、一旦生成されたビューレット呈色物はアルカリによる分解を受けて褪色して行く。

第2表 発色に及ぼす加熱時間の影響

加熱時間 (分)		1	2	3	4	5	10	15
吸光値	1 市販粉末ゼラチン 100mg	.302	.325	.345	.345	.344	.345	.345
	2 乾燥キハダマグロ肉 200mg	.200	.292	.562	.585	.595	.594	.595
	3 生鮮キハダマグロ肉 500mg	.350	.400	.450	.465	.470	.471	.470
	4 生鮮キハダマグロ肉 1000mg	.470	.560	.930	.990	1.00	.960	.785

### 実験結果

マグロ乾肉、マグロ生鮮肉、サバ鮮肉及び卵白アルブミンについてビューレット呈色法により蛋白質を定量すると共に、之等の試料を除蛋白剤で沈澱して精製後マイクロキールダール法で定量を行い、両者を比較した。第3表から明らかなようにビューレット定量法は従来のマイクロキールダール法に対し、±2% 以内の誤差で可成り正確に、而も極めて迅速(20分以内)に定量することが出来る。

第3表 本法の精度(キールダール法との比較)

	蛋白質 mg (N×6.25)		誤差 (B/M×10 <sup>2</sup> ) (%)
	マイクロキールダール法 (M)	ビューレット比色法 (B)	
キハダマグロ鮮肉	141.0	142.2	+0.8
	35.5	35.0	-1.5
キハダマグロ乾肉	103.1	103.5	+0.3
	56.2	56.8	+1.0
サバ鮮肉	85.2	84.8	-0.5
	10.2	10.0	-1.8
卵白アルブミン	138.3	138.1	-0.2
	23.1	22.8	-1.3

### 要約

固形蛋白試料に直接ビューレット反応を適用して蛋白質を定量する方法について吟味し、精度よく極めて迅速に行える定量法を確立した。

### 文献

- 1)大城善太郎：本誌；6, 119~124 (1958)