

## 沱紙上のアミノ酸のニンヒドリン反応に関する研究 (IV)

アミノ酸のペーパークロマトグラフィーにおいて展開溶媒が異なると、ニンヒドリン呈色物の色調も異なってくる原因について

金田 信・富永直友

Effects of developing solvents for paper chromatography on the color shades of reaction products of amino acids with ninhydrin on paper

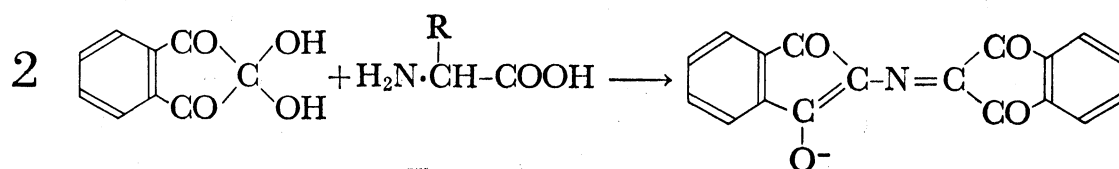
By

Makoto KANEDA and Naotomo TOMINAGA

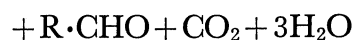
(Faculty of Science, Kagoshima University, Kamoike-cho, Kagoshima)

沱紙上のアミノ酸にニンヒドリン溶液を噴霧加温すると紫色の色素を生じるが、この呈色反応によって沱紙上のアミノ酸を検出する方法は一般に広く用いられている。

アミノ酸のニンヒドリン反応については、すでに広範な研究がなされており、この反応によって生じる紫色の色素 (Ruhemann's Purple, 以下 R. P. と記す) は (I) のような構造の色素であり、その反応式からもわかるように水溶液中での反応ではアミノ酸の種類が異なっても生成する色素は同一の R. P. であると考えられる。

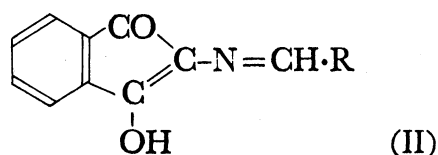


(I)



しかし沱紙上のアミノ酸のニンヒドリン反応は水溶液中の反応とは異なり、その呈色物の色調は必ずしも同一の紫色ではなくアミノ酸の種類が異なったり、また、アミノ酸のペーパークロマトグラフィーに用いた溶媒の種類が異なると、呈色物の色調が多様に異なってくることはすでに多数の研究者によって報告されている<sup>1)~6)</sup>。しかし従来の報告はいずれもその現象の報告のみにとどまり、その原因については推測の域を脱せず十分なとくのか説明はいまだなされていない。

たとえば Moubascher, Ibrahim らは沱紙上の呈色物が色調の異なったニンヒドリン反応の中間体と R. P. の混合物であると考え、その色調の多様性はこれらの色素の種類および生成量の変化によって生じるものであると説明している。



また McCaldin はニンヒドリン反応の中間体として (II) のようなシッフ塩基が生じる可能性があるが、これらのシッフ塩基はアミノ酸の側鎖 R 基を含むためアミノ酸の種類が異なると生じるシッフ塩基も異なってくるから、ニンヒドリン呈色物の色調の多様性は、呈色物が上記各種シッフ塩基と R. P. の混合物であると考えられることによって説明できるのではないかと報告している。

上記の各種シッフ塩基については Ruhemann, 山岸, 高木らの報告があるが、グリシン, アラニン, グルタミン酸などきわめて一般的なアミノ酸から生じるであろうと考えられるシッフ塩基はいまだ単離されていない。

このように沱紙上のアミノ酸のニンヒドリン呈色物は、R. P. および R. P. 以外の色素の混合物であるのではないかと従来から推測されてきたが、上記の呈色物を分離し、混合物であることを明らかにした報告は従来なされていなかった。

しかるに著者は既に報告したように<sup>8)</sup>, 沱紙上のアミノ酸とニンヒドリンの反応呈色物をペーパークロマトグラフィーによって分離し、これらの呈色物が R. P. および R. P. 以外の副生色素の混合物であり、しかもこれらの副生色素の色調, 生成量は、各アミノ酸により異なることを明らかにした。

これらの結果から、沱紙上のアミノ酸のニンヒドリン呈色物の色調が、アミノ酸の種類によって異なってくるのは、上記の副生色素がアミノ酸の種類によって色調, 生成量を異にすることに起因するのではないかと推測できる。

しかし上記の結果のみではアミノ酸のペーパークロマトグラフィーに用いた溶媒の種類が異なると、同一種類のアミノ酸のニンヒドリン呈色物でもその色調を異にする現象の原因を説明することは出来ない。

このように色調が異なる理由として Atkinson<sup>7)</sup> は沱紙上のニンヒドリン反応によって生じた hydrindantine が、沱紙に残っている展開溶媒の液性によって酸性では赤色に、塩基性では青色に変色することをあげている。

一方著者は沱紙上のアミノ酸とニンヒドリンとを反応させる際に、ニンヒドリン溶液として pH 5.5 の酢酸緩衝液を加えたものを用いると、グリシン, アラニン, アスパラギン酸, グルタミン酸, リジン, ヒスチジン, アルギニンなどでは R<sub>f</sub> あるいは色調が上記の副生色素とは異なるさらに別種の副生色素が分離されることを見だし、沱紙上のニンヒドリン反応によって生じる色素の種類は呈色時の共存物によっても異なるのではないかと推測した。さらに副生色素の一種であるフェニルアラニンとニンヒドリンによって生じる青色副生色素は、そのメタノール溶液に希塩酸, 酢酸などを添加すると紫色になるが、さらに希アンモニア水, ペリジンなどを添加するとともに青色にもどることも明らかにした<sup>9)</sup>。

このような結果から同じアミノ酸であってもペーパークロマトグラフィーに用いた展開溶媒が異なると、そのニンヒドリン呈色物の色調が異なる現象には上記の副生色素が密接な関係を有しているのではないかと考え、副生色素の生成および色調に沱紙に残っている溶媒がどのような影響をおよぼしているかということをも明らかにするためにこの研究を行なった。

実験結果

滷紙上でニンヒドリンとアミノ酸が反応する際、共存する溶媒の種類が異なると、生成する副生色素の種類も異なってくるのではないかと考え次の実験を行なった。

1) 各種のペーパークロマトグラフィー展開溶媒の共存下に呈色させたニンヒドリン呈色物の分離

0.02~0.1Mのアミノ酸水溶液、第1表に示した各種の展開溶媒<sup>10)</sup>および2%ニンヒドリンメチルセロソルブ溶液を順次滷紙に重ねてつけ、空気乾燥器中100~105°Cに10分間加熱した。呈色物の分離は既報<sup>8)</sup>と同じようにメタノール:水(1:1, 容量比)を展開溶媒に用いたペーパークロマトグラフィーによって行なった。

その結果アラニン、セリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、ヒスチジン、アルギニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンなどの場合は、呈色時に共存する溶媒の種類が異なっても副生色素の種類にはほとんど変化は認められなかった\*。

しかしグリシンの場合は第1図に示すように、緩衝液を含む溶媒の共存下に加熱呈色を行なうと、赤色副生色素が生成する。故にこの色素の生成条件をさらに明らかにするために次の実験を行なった。

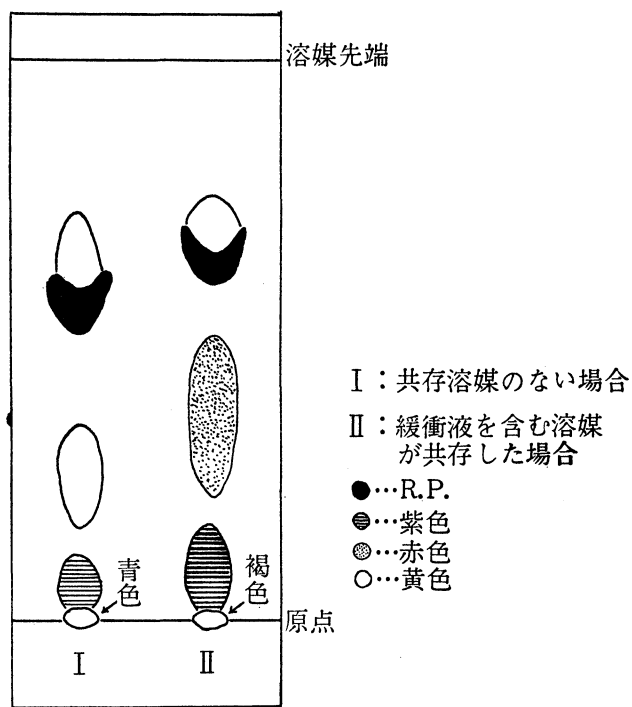
2) グリシンを溶かす緩衝液の種類およびpHが異なった場合の呈色物

第2表に示す各種の緩衝液に0.1Mになるようにグリシンを溶かし、この溶液を滷紙につけ、次に2%ニンヒドリンメチルセロソルブ溶液を重ねてつけ既報<sup>8)</sup>と同じ方法で呈色および呈色物の分離を行なった。滷紙につけたグリシンおよびニンヒドリンの量ならびにその割合は既

第1表 呈色時に共存させた各種溶媒の組成

1)	ブタノール, 酢酸, 水 (4:1:1)*
2)	2 Nのアンモニア水を飽和したブタノール
3)	ブタノール, ピリジン, 水 (1:1:1)
4)	コリジン, 水 (3:1)
5)	水を飽和したメタクレゾール
6)	ルチジン, コリジン, 水 (1:1:2)
7)	メタノール, ピリジン, 水 (20:1:5)
8)	フェノール, 水 (5:1)
9)	ピリジン, 酢酸, 水 (10:7:3)
10)	リン酸緩衝液 (pH. 6.2) を飽和したルチジン
11)	ホウ酸緩衝液 (pH. 8.0) を飽和したコリジン
12)	リン酸緩衝液 (pH. 12.0) を飽和したフェノール

\* カッコ内は容量比を表わす。



第1図 グリシンの呈色物のペーパークロマトグラム

\* 副生色素の量は共存物の種類によって多少の変化が認められたが、この実験では色素生成量の検討は行なわなかった。

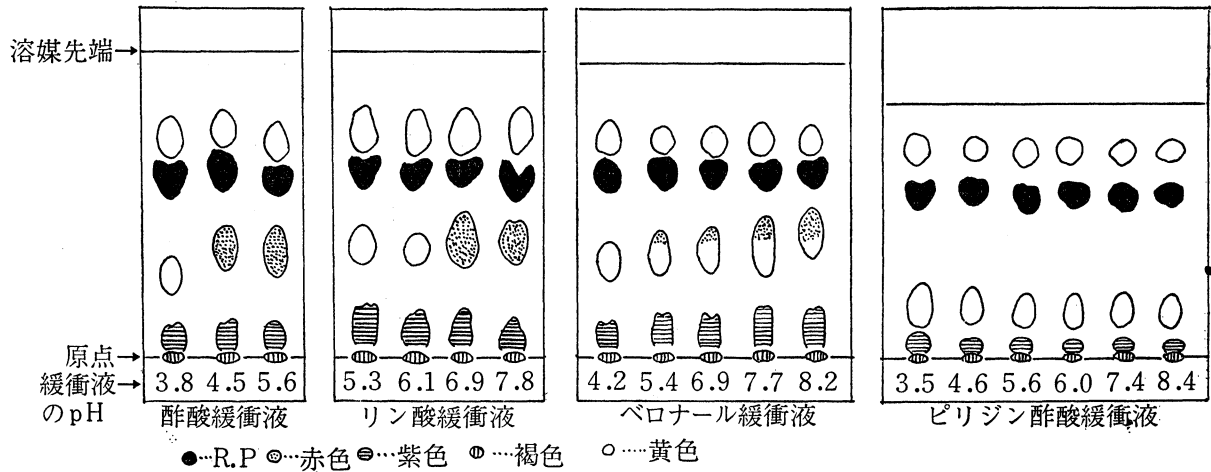
報とほぼ同じにした。

その結果第2図に示すように緩衝液として酢酸緩衝液，リン酸緩衝液，ペロナル緩衝液を用

いた場合を比較するとグリシンを溶かした緩衝液の pH が小であると黄色色素，大であると赤色色素が生成する。しかし前記3種の緩衝液を用いた場合には赤色色素が生成した pH と同一 pH のピリジン：酢酸緩衝液を用いると赤色色素は生成しない。また前記3種の緩衝液はいづれも弱酸のナトリウム塩を含んでおり，

第2表 アミノ酸を溶解した緩衝液の成分

1)	M/5 酢酸，M/5 酢酸ナトリウム溶液
2)	M/10 塩酸，M/7 ペロナルナトリウム溶液 M/7 酢酸ナトリウム溶液
3)	M/30 第1リン酸カリウム溶液 M/30 第2リン酸ナトリウム溶液
4)	M/10 酢酸，ピリジン



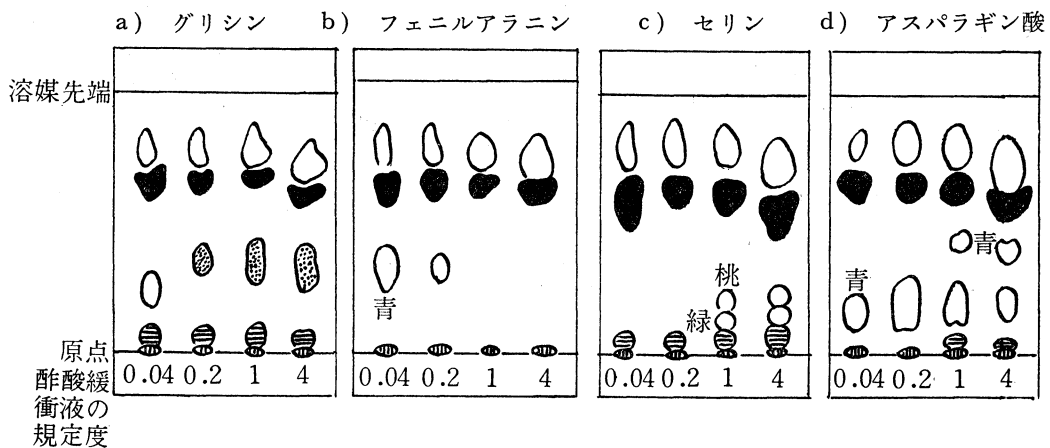
第2図 グリシンの呈色物のペーパークロマトグラム

また pH が大になる程ナトリウム塩の濃度は大になっている。

故に赤色色素の成因は呈色時に共存する弱酸のナトリウム塩の濃度に関するのではないかと考えて次の実験を行なった。

3) グリシンを溶かす緩衝液の濃度が異なった場合の呈色物

0.04N, 0.2N, 1N, 4N, など濃度の異なる酢酸緩衝液 (pH 5.5) に 0.1M になるようにグリシン



第3図 数種のアミノ酸の呈色物のペーパークロマトグラム

を溶かし、このグリシン溶液を用いて呈色を行ないその呈色物を分離し第3図 a) のようなペーパークロマトグラムを得た。この結果によって赤色副生色素の生成に影響を与えているのは緩衝液の pH ではなくてその緩衝液の弱酸のナトリウム塩の濃度であることが確認される。\*

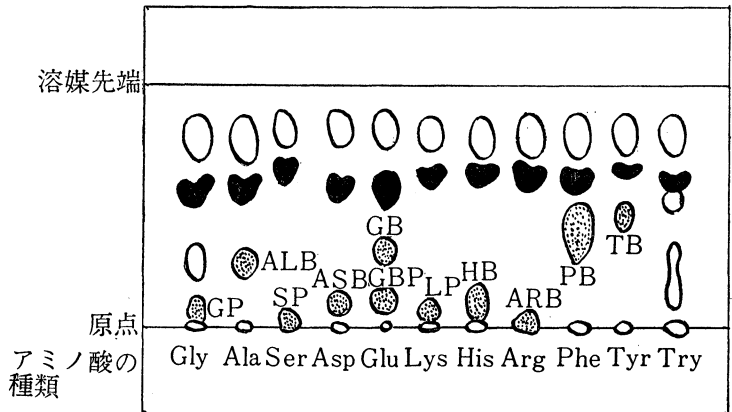
既に 1) に記したようにグリシン以外のアミノ酸の場合は呈色時に共存する溶媒の種類が異なっても副生色素の種類にはほとんど変化が認められなかった。しかし 3) に記したようにグリシンの場合の赤色副生色素の生成は呈色時に共存する弱酸のナトリウム塩の濃度によって左右されることから考えると、グリシン以外のアミノ酸の場合も共存する塩類の濃度が相当高くなると副生色素の種類は異なってくるのではないかと考え次の実験を行なった。

4) 濃度の異なる緩衝液に各種のアミノ酸を溶かした溶液を用いて得られる呈色物。

3) に記した濃度の異なる緩衝液にフェニルアラニン、セリン、アスパラギン酸などのアミノ酸を溶かし、このアミノ酸溶液を用いて得られる呈色物の分離を行ない第3図 b) c) d) に示すようなペーパークロマトグラムを得た。この結果によってわかるようにフェニルアラニンの場合は、共存塩類の濃度が高くなると青色副生色素が減少、消失してしまい、またセリン、アスパラギン酸などの場合は副生色素の種類が異なってきた。このような現象はその他のアミノ酸についてもほぼ同じように認められた。しかしグリシンの場合は呈色時に共存する塩類の濃度が比較的低い場合にも種類の異なった副生色素を生じるが、その他のアミノ酸の場合は共存塩類の濃度がかなり高くないと副生色素の種類や量に変化を生じないという点はいちじるしく異なっている。

上記のような結果からアミノ酸のペーパークロマトグラフィーにおいて一般に用いられている展開溶媒の大半は、その量がきわめて大量でない限り沱紙に残留してニンヒドリン呈色の場合にアミノ酸と共存しても、呈色物中の副生色素の種類あるいは量にはほとんど影響を与えないことがわかる。しかしグリシンはニンヒドリン呈色時に沱紙に残留している溶媒が弱酸のナトリウム塩を含んでいる場合にかぎって、その量が比較的少量であっても赤色副生色素を生じる点で他のアミノ酸といちじるしく異なっていることがわかる。

次に沱紙上のニンヒドリン反応によって生成した R. P. および副生色素が沱紙に残留している各種の溶媒によって変色する



●...R.P. ⊙...変色する副生色素(符号は第4表の符号に対応する) その他の色素については第一報において説明した。

第4図 沱紙上のアミノ酸のニンヒドリン呈色物のペーパークロマトグラム

\* 赤色色素は呈色時にナトリウムイオンの共存のみによっても生じるのではないかと考え、食塩水あるいは食塩水を添加したピリジン酢酸緩衝液などにグリシンを溶かして呈色を行なったが赤色色素は生成しなかった。また黄色、赤色の両副生色素は Rf が多少異なっており、また沱紙上で黄色色素に酢酸緩衝液を噴霧しても赤色には変わらないことから考えると、両者は構造の全く異なった色素ではないかとも考えられるが、これらの色素の構造については未だ検討を行っていない。

のではないかと考え次の実験を行なった。

### 5) 各種の溶媒を噴霧した場合の滷紙上の R. P. および副生色素の変色

第4図に示すように滷紙上のニンヒドリン反応によって得られた呈色物をペーパークロマトグラフィによって分離し、R. P. および副生色素が存在する部分の滷紙を切取って水、希塩酸、希アンモニア水などを噴霧し湿った状態のまま吸収測定用セルの内壁に密着し可視部吸収スペクトルを測定した。\* 測定には日立分光光度計 EPO-2A 型を用いた。

第3表 滷紙上の R. P. に各種の溶媒を噴霧した時の色調

溶 媒	$\lambda_{MAX}$ (m $\mu$ )
水	407, 575
ピリジン	410, 579
水を飽和したフェノール	408, 576

その結果第3表および第4表に示すように R. P. はどの溶媒を噴霧してもいちじるしい変色は示さなかったが、副生色素の大半は希塩酸、酢酸、フェノールなどの酸性溶媒を噴霧すると紫色を呈し、一方

第4表 滷紙上の副生色素に酸性溶媒、塩基性溶媒を噴霧した時の色調

副生色素の種類	色 調 ( $\lambda_{MAX}$ , m $\mu$ )		
	展 開 直 後	酸性溶媒を噴霧した時	塩基性溶媒を噴霧した時
G P	紫 (577)	青 (620)	灰 紫
A L B	青 (598)	紫 (558)	青 (602)
S P	紫	紫	青
A S B	青 (600)	紫 (552)	青 (600)
G B P	青 紫	紫	青
G B	青	紫	青
L P	紫 (572)	紫 (572)	褪 色
H B	青 (620)	褪 色	青 (620)
A R B	青 (601)	褪 色	青 (610)
P B	青 (610)	紫 (550)	青 (610)
T B	青 (610)	紫 (550)	青 (610)

ピリジン、コリジン、希アンモニア水などの塩基性溶媒を噴霧すると青色を呈することがわかった。

## 結 論

アミノ酸をペーパークロマトグラフィによって分離し滷紙上のアミノ酸をニンヒドリン反応によって検出する場合、アミノ酸の展開に用いた溶媒が異なるとたとえ同じアミノ酸であってもそのニンヒドリン呈色物の色調が多少異なってくるのは、ニンヒドリン呈色物に含まれる副生色素が滷紙に残留している溶媒によって変色することが主な原因である。しかしグリシンの場合は上記の原因以外に滷紙に残留している溶媒に弱酸のナトリウム塩が含まれており、この塩がニン

\* 滷紙上の色素の吸収スペクトルを測定する場合、色素を滷紙から抽出した溶液を用いて測定した方が正確な測定値が得られるので、各色素の滷紙からの抽出を試みた。しかし副生色素の中には、抽出しにくい色素、あるいは抽出過程で分解退色するものがあるので、この実験に於ては滷紙に付着した状態で吸収スペクトルを測定した。

ヒドリン呈色時にグリシンおよびニンヒドリンと共存したために、異なる色調の副生色素を新に生成したことが原因の一部になる場合もある。

本研究に貴重な御示唆、御指導を賜った恩師赤堀四郎先生および大阪大学教授成田耕造先生に深謝の意を表します。

本研究の一部は大阪大学蛋白質研究所において行なったことを記し謝意を表します。

### 文 献

- 1) Consden, R., Gordon, A. H., Martin, A. J. P.: *Biochem. J.* **38**, 224 (1944)
- 2) Rockland, L.B., Underwood, J. C.: *Anal. Chem.* **26**, 1557 (1954)
- 3) Hardy, T. L., Holland, D. O., Naylor, J. H. C.: *ibid.* **27**, 971 (1955)
- 4) Pratt, J. J., Auclair, J. L.: *Science* **108**, 213 (1948)
- 5) Levy, A. L., Chung, D.: *Anal. Chem.* **25**, 396 (1953)
- 6) Dent, C. E.: *Biochem. J.* **43**, 169 (1948)
- 7) Atkinson, R. O., Stuart, R. G., Stuckey, A. E.: *Analyst* **75**, 447 (1950)
- 8) 生化学 : **33**, 829 (1961)
- 9) 生化学 : **34**, 258 (1962)
- 10) R. J. Block, E. L. Durrum and G. Zweig: A manual of paper chromatography and paper electrophoresis. (Academic Press, 1955) p. 111