

ニンヒドリン酸化法によるアミノ態窒素の定量⁽¹⁾⁽²⁾

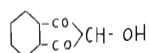
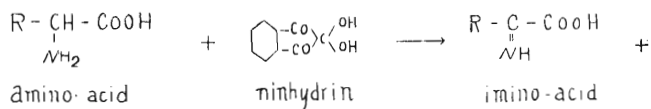
柿本大壱, 山崎利盛

Study on the Determination of Amino Acids
by the Ninhydrin Reaction

Daichi KAKIMOTO, Toshimori YAMASAKI

蛋白質の加水分解によつて生ずるアミノ酸の総量を知るには Sørensen のフオルモール滴定法, Willstätter-Waldschmidt-Leitz のアルカリによる滴定法, Linderstrom-Lang の酸による滴定法等滴定による定量法と van Slyke の瓦斯分析等があり一般に後者が広く用いられて居る, 又最近 Abelin 氏等は Pope-Stevens の加銅法を利用した沃素法⁽³⁾によるアミノ態窒素の定量法を報告している. 著者等の研究室に於て先にカツオの生化学的研究の一部としてカツオ幽門垂の中に含まれる諸成分を追及し, 特に窒素化合物として多量のアミノ酸が存在して居る事を知つたが⁽⁴⁾此の種の臓器は多量に酵素を含み内容物が実験に供せられる以前に分解作用を受けるので他の組織に於ける如く蛋白質のみを分離してから加水分解せしめてアミノ酸を定量する事が困難であり, 斯様な条件下でアミノ酸の総量を比較的正確に定量する為には前記の数多くの方法では何れも満足な結果を期し難いと思われる. van Slyke 法ではプロリン, オキシプロリンは全く定量されないが Mc Fadyen, Christensen 氏等⁽⁵⁾によつて報告されたニンヒドリン酸化法によるとこれらのアミノ酸も定量せられ, 特にポリペプチドはニンヒドリン酸化に関与せず遊離の α -アミノ酸のみを定量し得る利点があるので著者等は此等の方法に従い装置の一部を変更し, 特に普通実験室で用いられているガラス資材を利用して装置を組立て個々のアミノ酸に就いて定量すると共に蛋白質の加水分解物のアミノ酸総量を定量してみた. 以下本法の原理と実験装置及び操作の概略を説明する.

原理: ニンヒドリンはアミノ酸に対し次の反応式に示す如く酸化的に作用してアミノ酸より炭酸ガスを発生せしめる⁽⁶⁾.



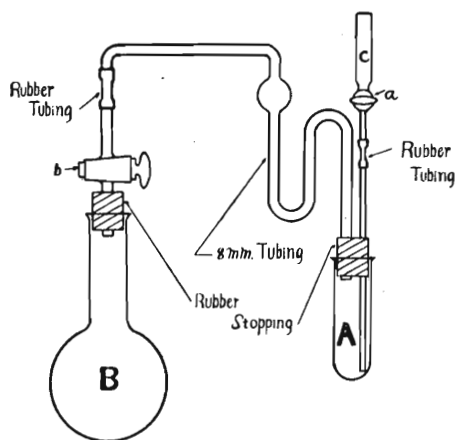
此の炭酸ガス水を水酸化バリウムの規定液に吸収せしめて滴定定量し, その値からアミノ酸量を計算によつて求めるのである。

試薬:

- 1) Ba(OH)₂: 0.05N の水酸化バリウムを調製, (飽和バリタ溶液 1 容 + 水 9 容)
- 2) HCl: 0.03N の塩酸, あらかじめ NaOH にて規定度を定める。
- 3) 指示薬: T. B. (チモール, ブリュウ)
C. R. (クレゾール, レッド)
クラーク及びラプスの指示薬を用う。
- 4) ワセリン
- 5) ニンヒドリン溶液: 1 cc. の蒸留水にニンヒドリン 4 mg を含むもの。
- 6) KH₂PO₄ 飽和溶液。

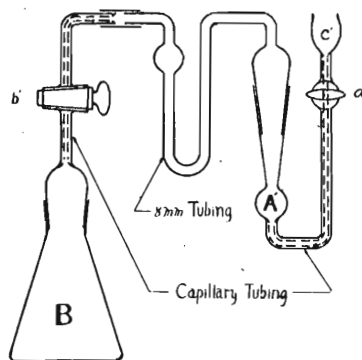
装置及び操作: Christensen 氏等の報告した装置に準じ若干変更して行つた。Fig 1 及び 3 は著者等の組立てた装置で, 比較のため Christensen 氏等のものを Fig 2 に示した。

Fig 1. Apparatus used by authors.



A: reaction vessel
B: absorption flask
a & b: 2 way stop-cocks

Fig 2. Christensen's apparatus.



A: reaction vessel
B: absorption flask
a & b: 2 way stop-cocks

装置操作共に Christensen 氏等のものと殆んど相違しないので著者等の用いた装置及び操作を説明し若干変更した箇所には説明の折に氏等のものを付け加える事にする。予め 1 cc の蒸留水を U 字管に入れる。チモールブルー (T. B.) 1 滴, クレゾールレッド (C. R.) 2 滴を炭酸ガス吸収管 B フラスコにとり減圧にするため三方活栓を Fig 3 に示した如く取付け水流ポンプに連結し 30mm の減圧にする, B フラスコ内にある空気が吸引排除されたら三方活栓を廻してソーダ石灰塔に通ずるようすれば炭酸ガスを含みぬ空気が B フラスコに充満される。此の操作が終つた後直ちに B フラスコを装置から外し迅速に Fig 4 に示すマイクロビューレットのゴム栓にはめ込む, 此の場合外部からの炭酸ガスの侵入を防ぐため速やかに操作する事が必要である, 次に三方活栓を水流ポンプに通ず

Fig 3. Complete view of apparatus

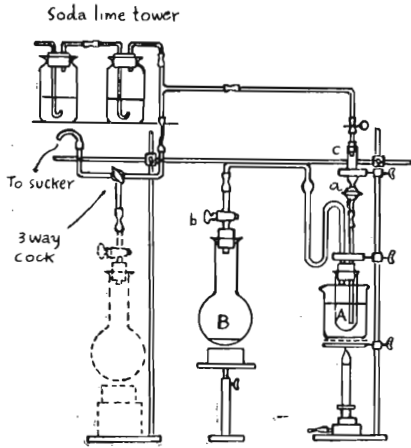
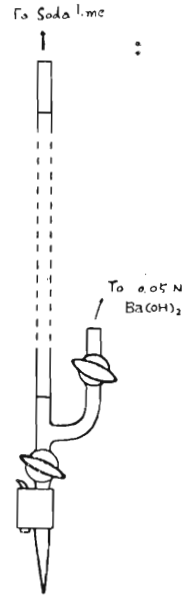


Fig 4. Micro Burette.



る。Christensen 氏等は B' フラスコに一定容のバリタを炭酸ガス不含の状態に入れる為の特別の装置を考案⁽²⁾したが著者等は Fig 4 に示した如くマイクロビュレットに若干の装置をほどこして満足な結果を得た。此のビュレットから 0.05 N-Ba(OH)₂ を 2.5cc 正確にとつた B フラスコは水流ポンプで引きながら再び前の装置にもどしゴム栓部にはワセリンを塗布して完全に空気の侵入を防ぎ B フラスコを 30mm の減圧にする、マンメーターが 30mm を示したならば活栓 b を閉じ B フラスコを外気と遮断すると共に三方活栓をソーダ石灰塔に通じ B フラスコを取外して U 字管部とゴム管によつて連結し三方活栓は水流ポンプに通じゴム栓部はワセリンにて外気の侵入を防ぐ。以上の操作が終つてから反応管 A に 0.5~2mg/cc のアミノ酸溶液 2cc をとり a の活栓を閉じて後 A 管をゴム栓部に装置しワセリンを用いて前述の如く外気を防ぐ。ニンヒドリン溶液 2cc と KH₂PO₄ 1cc を c に採り此の部分とソーダ石灰塔を連結する (Fig 3), 反応管 A は Christensen の装置では Fig 2 に示す如く反応試薬が毛細管を通り A 管の底部に入り込むが著者等のものは細管が A 管の底部にまで達しその先端より試薬が注入する様にした。A 管は塩化カルシウム半飽和溶液の湯煎に浸し 110~115°C に於て 15 分間加熱する、但し此の場合湯煎の温度が約 90°C に達した時にコック b を少しく開き反応管 A と B フラスコを連結すると気圧の差により気流が A から B の方向に流れ 110°C に達する頃 a の活栓を少しく開けば c の中の反応試薬は A 内の減圧の為に容易に注入出来る。注入された試薬は A 内に於てアミノ酸と作用し炭酸ガスを発生するが此の炭酸ガスは A と B の圧力差により U 字管を通り B フラスコ内に流れる。此の時ガスの流れは U 字管内の気泡の動きによつて観察する事が出来る、斯くして 15 分間加熱を続ける。加熱し終つても B フラスコは常圧には達しないので b コックを閉ぢ a コックを全開し反応管 A から湯煎を外し反応管 A に起る気泡を緩和せしめる。此の操作に約 5 分を要し気泡の動きが弱まつてから b コックを調節して B フラス

コ内を常圧にすると尚残留すると思われるガスは全て吸収管Bフラスコに送り込まれる。U字管の気泡が動かなくなつたら炭酸ガスが全てBフラスコに送り込まれたものとし此の装置よりBフラスコを外すが、此の間に更に 10 分間を要し、反応試薬がA管内に注入されてBフラスコを外すに到るまで約 30 分を費す事になる。次にBフラスコを外し速やかにゴム栓を施し時々ゆり動かし乍ら 15 分間放置する。此の間に第2回目の実験が始められる様にcをソーダ石灰塔の連結から外し、反応管Aをゴム栓から取り去り三方活栓とU字管とを継ぎ大気中の炭酸ガスをU字管に送る。此の場合U字管の水は取り代える必要なく、爾今そのまま使用に供する事が出来る。斯様に第2回目の準備が完了したならば先に密栓を施したBフラスコにアセトン 3cc を加え塩酸の入つて居るマイクロビューレットに連結し規定塩酸により滴定する。斯くしてバリタに吸収された炭酸ガスの量を求め、その量より盲試験値を減じ直ちにアミノ態窒素量を知る事が出来る。

実験結果：著者等の組立てた装置の性能を確める為に炭酸カルシウムを用いて炭酸ガスを生ぜしめ上記の装置により CO₂ 量を測定した結果純炭酸カルシウム 4mg に N/10HCl 2 cc を作用せしめて得られた炭酸ガス量から盲試験による値を減じた結果 1.7588mg で之を炭酸カルシウムに換算すると、4.0001 mg となりその回収率 100.0% になる事を知つた。上記の結果から装置の完全なる事を確め得たので次に個々のアミノ酸に就いてアミノ態窒素の回収率を検べた結果は第1表の通りであり、これを Christensen 氏等の行つた結果と比較したところ第2表の如き結果を得た。

個々のアミノ酸に就いては上表の結果に示された如く良好なる測定値を得たので、次に常法に従い 25 % HCl で 24時間加熱したアルブミンの加水分解液を van Slyke の窒素区分法により分割しモノアミノ区のアミノ態窒素を各々ニンヒドリン法と van Slyke 法により定量し、ジアミノ区は(隣タングステン酸沈澱部) シスチンをデニス法により定量し、ヒスチジンは PH7.3 に於て銀塩として分離した後銀塩を硫化水素で分解して後ニンヒドリン法に

Table 1. Comparison of Results by Ninhydrin and Kjeldahl Method.

Amino acid	weight of sample (mg)	per cent recovery	
		ninhydrin	Kjeldahl
glycine	1.429	97.9	100
cysteine	2.345	100.4	"
leucine	2.246	100.3	"
phenyl alanine	2.362	100.2	"
glutamic acid	2.957	99.8	"
valine	2.340	100.5	"
serine	1.717	100.4	"
alanine	1.641	100.1	"
tyrosine	4.417	99.6	"
histidine	3.101	100.7	"
proline	2.538	100.0	"
lysine	3.064	100.2	"
arginine	3.377	100.7	"

Table 2. Comparison of Results by Christensens' and authors' experiment.

Amino acid	percent recovery	
	Christensens	Authors
glycine	94.4	97.9
aspartic acid	100.3	100.0
cysteine	99.6	100.0
leucine	100.6	100.3
phenyl alanine	99.9	100.2
glutamic acid	100.8	99.8
valine	101.1	100.5
serine	100.2	100.4
alanine	99.5	100.1
tyrosine	100.3	99.6
histidine	—	100.7
proline	—	100.0
lysine	96.4	100.2
arginine	—	100.7

より定量し、リヂン、アルギニンは上記ヒスチヂンを除去した濾液の全窒素並びにニンヒドリン法によるアミノ態窒素量から次に示す方程式を用いて算出した。即ち燐タングステン酸沈澱部のシスチンの量を c 、リヂンを x 、アルギニンを y とし、リヂン、アルギニン区の全窒素、並にニンヒドリン酸化による窒素を夫々 T 、 n とすれば

$$\begin{cases} 1/4 y + 1/2 x + c = n \\ x + y + c = T \end{cases}$$

となり、アルギニン、リヂンを求める事が出来る。本法によつて求めた結果は第3表の如くである。

然し乍ら上述のジアミノ酸の定量法は純粋な蛋白質の加水分解液に就て得られた定量値で、序文にも記した如くアミノ酸以外の窒素化合物を含有する天然物に就てアミノ酸のみを定量するには別にジアミノ区の個々のアミノ酸を分離して定量しなければならない。著者等は本研究に於てモノアミノ酸は van Slyke 法より高い値を示し、全窒素に対し近似値を得た。ジアミノ区に於ては van Slyke 法と同一の結果を得た。然し乍らフェニールアラニン等も燐タングステン酸により若干沈澱される事も知られて居るので本法によつても尙ジアミノ区は正確に定量する事は出来ない。

要 約

十数種のアミノ酸及び蛋白質の加水分解物につきニンヒドリン酸化法によるアミノ酸の定量方法を実験した。ニンヒドリン酸化法を用うれば普通の化学実験室で自ら容易に組立て得る簡単な装置により、個々のアミノ酸では殆んど 100% に近い回収率を以て定量せられ、蛋白質の加水分解物に於て van Slyke の瓦斯法に比べ理論値に近いと思われる値が得られた。

終りに臨み終始御懇篤なる御教示と本報告の御校閲を賜わつた本学柏田教授に深甚なる謝意を表す。

R é s u m é

For the quantitative determination of amino acids, the ninhydrin method gave better result than van-Slyke.

To do this experiment authors set up a simple and cheap apparatus which was commonly obtained in the usual laboratory.

文 献

- 1) B. E. Christensen, E. S. West & K. P. Dimick: J. Bio. Chem., 137, 738 (1941).
- 2) E. S. West, B. E. Christensen & R. E. Rinehart, J. Bio. Chem., 132, 681 (1940).
- 3) I. Abelin: C. A., 44 7368c (1950).
- 4) 柏田、柿本、山崎: 日水誌 (印刷中).
- 5) Mc Fadyen: J. Bio. Chem., 141, 671 (1941—42)
- 6) Christensen, West: J. Bio. Chem., 137, 735 (1941)
- 7) 赤堀: アミノ酸及蛋白質 (著書) 67 頁.

Table 3. Analytical Results of Albumin Hydrolysate

Fraction of amino acid	van Slyke method	Ninhydrin method	total N
mono amino	431.45	465.22	473.00
diamino			136.16
histidine	20.04	18.89	—
arginine	57.33	60.18	—
lysine	48.40	46.71	—
cystine (Denis')	10.40	10.40	—
Sum	136.17	136.18	—