

ビュレット試薬による魚肉蛋白質の迅速定量-I

呈色反応の促進と発色液の濁りの除去*

大 城 善 太 郎

Rapid Determination of Proteins in Fish Muscle through Biuret Reagent- I.

Acceleration of Color Reaction and Removal of Turbid Substances yielded in the Color Solution

Zentaro OOSHIRO

A rapid method of the colorimetric estimation of the modicum of protein in fish muscle under the use of biuret reagent (modified Sol's reagent) was put under examination, with the following procedure ascertained.

After taking 5ml. of sample into a colorimeter tube in which 0.5 to 4.5mg. protein-nitrogen was contained, 5ml. of biuret reagent was added. Then, after a well mixing, it was heated for 1 minute at 100°C on a water bath, to accelerate the color development. Although, the maximum color development required 1 minute, the development itself occurred almost immediately. Then, the colorimeter tube was cooled in a running water for about 1 minute.

And with the purpose of removing the turbid substances yielded, 1 ml of reagent mixture (20% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —35% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) was added to the above mentioned colored solution.

Then, those substances were adsorbed by the colloidal magnesium hydroxide prepared with magnesium sulfate and sodium hydroxide in biuret colored solution, in this case the former was added after being well mixed by the vigorous shaking for a spell of several seconds. The mixed solution was filtered after 2 minutes standing.

The optical density of the filtrate was read at the wave length of 530 m μ .

By the proposed method, the determination of protein was to be done with comparatively correct accuracy, the error, compared with that of Kjeldahl value, being to be kept within the range of $\pm 2\%$.

I 緒 言

ビュレット反応を利用して蛋白質を定量する試みは甚だ多い。その根拠はこの呈色反応が他の数多くの呈色反応のように蛋白質中の特殊なアミノ酸に対する反応であることとは本質的に異なり、蛋白質中のペプチド結合に由来するために蛋白質の種類による発色率も略一定していると云う大きな特色があるからである。魚肉蛋白質の定量にこの反応を適用した代表的研究は SNOW,¹⁾ 松本等²⁾ であろう。殊に松本等は魚肉抽出液に多く見られる発色液の濁りを除去することについて研究している。

筆者は呈色反応の加熱促進と濁り成分の吸着除去法について検討し、迅速定量法を確立し得たので、茲にその概要を報告する。

実 験 並 び に 考 察

I 試 薬 及 装 置

1. ビュレット試薬

10% NaOH, 0.4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.2% グリセリン

調製法; 予め20% NaOH, 0.8% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を調製しておく。20% NaOH 50ml にグ

※ 日本水産学会秋期大会 (長崎, 1955) にて発表

リセリン 0.2ml を攪拌し乍ら徐々に滴加する。次に 0.8% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 50ml を攪拌しつつ加える。この試薬は室温に放置しても、かなり長期間安定である。

2. 硫酸マグネシウム—硫酸亜鉛混合溶液

20gr. の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ と 35gr. の $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を蒸留水で溶解し 100ml とする。

3. 光電比色計

島津製 AKA 型, フィルター 530m μ , キューベット 10mm

II 定 量 操 作

検液 5ml を試験管にとりビューレット試薬 5ml を加えてよく混和し、沸騰水浴中に 1 分保ち、後水道水で冷却する。之に硫酸マグネシウム—硫酸亜鉛混合液 1ml を加えて数秒間はげしく振盪混和してから 2 分放置する。No.2 (9cm) 濾紙で濾過して清澄透明な呈色液を得る。之を 10mm のキューベットに移し 530m μ で比色する。

III 定 量 法 の 吟 味

1. ビューレット試薬の安定度

呈色反応を加熱促進するには試薬がその処理温度で安定であることが先決である。松本²⁾ は発色液を沸騰水浴中で加熱し得ることを述べ、太田³⁾ もその可能なことを実験している。周知のように多くのビューレット試薬は加熱操作に対して比較的不安定であり、場合によっては簡単に水酸化第二銅の沈澱を生ずるものである。既知のビューレット試薬中で後述の濁り除去操作を妨げず、而も加熱に対して安定なものは SOLS⁴⁾ の試薬であろう。そこでこの SOLS の試薬について安定度を吟味してみた。一般に試薬中の NaOH の濃度が高くなる程安定化することを認めたので、NaOH の濃度を 8% (原法の濃度), 10%, 15% となるようにビューレット試薬を調製し、之に同容の蒸留水を加えてよく混和し (定量時の Blank test に相当する), 沸騰水浴中に保ち、水酸化第二銅の沈澱し始める迄の時間によって安定度を比較した。結果は第 1 表の通りで原法の 8% NaOH- 試薬では 30 秒位で既に沈澱し始め定量には使用出来ないものと思われた。10% NaOH- 試薬は少なくとも 3 分間は安定であり、後述の発色の完結が 1 分でなされることからこの程度の濃度で充分と考えた。

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

加 熱 時 間 (分) 試薬の NaOH 濃度 (%)	0.5	1	2	3	4	5	10
8	±	+	+	+	+	+	+
10	—	—	—	—	±	+	+
15	—	—	—	—	—	—	±

○安定度は水酸化第二銅の沈澱生成の有無で表示す。(—, ±, +)

—: 水酸化第二銅の沈澱全くなし。試薬安定

±: " 沈澱生成す? 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、ビューレット試薬 (NaOH 8, 10, 15%) に同容の蒸留水を加えて行なったものである。

2. 発色に及ぼす煮沸時間の影響

蛋白質溶液に等容の10% NaOH-SOLS のビューレット試薬(以下単にビューレット試薬と記す)を加えて沸騰水浴中で発色させると、第2表のように1分で完結し、それ以上5分の加熱でも呈色値には変動がなく呈色物も全く安定である。

第2表 発色に及ぼす加熱時間の影響

加熱時間 (分)		0.5	1	1.5	2	5
吸光値	試料 1	.570	.620	.620	.620	.621
	" 2	.300	.317	.316	.316	.317

3. 発色液の濁りの除去

a. $Mg(OH)_2$ - 膠状沈澱の吸着能を活用して濁り成分を吸着除去する

魚肉抽出液殊に NaCl 若くは KCl 抽出液は多くの場合濁って居り、之にビューレット試薬を加えて反応させると一層濁るようになる。濁った発色液の呈色値を比色計で測定して、定量することは精度の上から殆んど不可能に近いことである。濁り成分については松本の研究があり、少なくともN化合物ではなく、Phosphatide であろうと考えられている。濁りの程度は同一魚肉の抽出液でも呈色温度及び時間によっても異なって来るから、その除去はこの定量方法を確立する上からも極めて重要なことである。松本²⁾は呈色液を一夜放置後遠心して除去するとか、呈色して3時間後に No. 3 ガラスフィルターで濾過して濁りを除去することに成功したと報告している。この方法は極めて簡単であるが、濁りを完全に除去し得ない例も出て居り、定量の迅速性と云う面から見れば尚満足すべき方法とは云い難い。

筆者は濁り成分を吸着によって即座に且つ完全に吸着除去する方法について検討し、呈色液(5% NaOH 相当溶液)に $MgSO_4$ 溶液を加えて $Mg(OH)_2$ の膠状沈澱を生成させ、その有する吸着能を活用して濁り成分を吸着させ之を濾過することによって全く清澄透明な呈色液を得ることが出来た。

この方法は甚だ興味あるもので、他にも応用し得るものと信じている。尚 $MgSO_4$ の外に之と類似した膠状の水酸化物を与える Zn, Mn, Al 等の塩類についても実験したが、何れも効果はなかった。

b. $MgSO_4$ の添加量

サバ肉の 1M-KCl 抽出液 5ml に Biuret 試薬 5ml を加えて沸騰水浴中で1分反応後冷却し、20% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ を種々量加えて振盪混和して濾過し、濾液の透濁を検した。第3表はその結果で反応液 10ml に 20% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1ml 加えれば濁りは完全に吸着除去し得ることがわかった。

第3表 発色液の濁りの除去と $MgSO_4$ の添加量

20% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 添加量 ml.	$MgSO_4$ 添加処理 ($Mg(OH)_2$ による吸着) した濾液の状態
0.25	混濁, 比色不可能
0.5	微かに混濁, " "
1.0	清澄透明, 比色可能
1.5	" " "
2.0	" " "

C. 吸光値に及ぼす MgSO_4 添加量の影響

$\text{Mg}(\text{OH})_2$ の膠状沈澱は濁りを吸着除去するから、ビュールット呈色物を吸着することとも考えられる。卵アルブミン溶液（発色液は濁らないから結果の解析が容易である）について前述の如く呈色させ、各濃度の MgSO_4 溶液を 1ml 宛加えて振盪混和し、2 分後濾過して濾液の吸光度を測定した。その結果は第 4 表に示す如く、 MgSO_4 の濃度（添加量）が増大するに従い吸光値は急減し、明らかにビュールット呈色物が吸着されたことを示している。このことはビュールット反応の缺点とも目すべき低感度を一層助長することになり、仮令濁りは完全に除去し得ても定量方法としては満足すべきものとはならない。

第 4 表 吸光値に及ぼす MgSO_4 添加量 ($\text{Mg}(\text{OH})_2$ による吸着) の影響

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の濃度 (%)	0	5	10	15	20	25	30	40
(Control)								
吸 光 値	0.412	0.405	0.355	0.302	0.260	0.245	0.232	0.200

備考: MgSO_4 の添加量はビュールット呈色液 10ml に各濃度の MgSO_4 1ml 加える方法で比較してある。

d. MgSO_4 - ZnSO_4 混合液を用いると吸光値の低下なしに濁りのみを除く事が出来る

$\text{Mg}(\text{OH})_2$ の濁り成分吸着能を阻害せず、ビュールット呈色物の吸着作用のみを選択的に遮蔽（マスキング）する方法について種々検討した結果、 MgSO_4 - ZnSO_4 の混合液で除濁操作することによって上記の目的が完全に達成し得られることを見出した。（この興味ある事実の解明も必要であるが、ここでは之れ以上立入らないことにする。）

即ち 20% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ に種々濃度になる様に $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を加えた混合液をサバの 1M-KCl 抽出液のビュールット呈色液に加えて除濁操作を行い、 ZnSO_4 の濃度の増加に伴う吸光値の変化を求めて見た。之等の結果は第 5 表の通りである。

第 5 表 膠状 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ によるビュールット呈色物の吸着に対する Zn^{++} の阻止効果

20% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ に含まれる $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の濃度 (%)	0	10	20	25	30	35	40
吸 光 値	0.310	0.415	0.531	0.555	0.583	0.615	0.615

これで明かなように ZnSO_4 の添加によって吸光値の低下が抑制され、35%以上の時には完全に阻止される。得られる呈色濾液も全く透明であることから Zn^{++} は $\text{Mg}(\text{OH})_2$ の濁り吸着作用を全く妨害しないことも理解される。

以上のことから呈色液 10ml に 20% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -35% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 混合液 1ml を加えて除濁操作することが最適と思われた。

e. 呈色反応後の過剰の Cu は $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 処理と濾過時に完全に吸着除去される

ビュールット反応後、未反応（過剰）の Cu（正確には錯イオン）は $\text{Mg}(\text{OH})_2$ で除濁する際に吸着されて殆んど除かれる。而して僅かに残った Cu は後に行う濾過の際に濾紙に吸着されてしまう。従って本法によると蛋白質の種類によって異るといわれる呈色調も判別出来る利点がある。

4. 共存物質の影響

ビュールレット反応は純蛋白のみでなく Peptide も之に参加することは既に明らかな事実である。又 SNOW¹⁾ は呈色に影響する低分子のものとして, NH_4 , Urea, Histidine, Serine, Threonine 等を挙げているが, 之等のものが実際に定量値にどの程度影響するかを確かめて見た。即ちサバの 1M-KCl 抽出液 (1.74mg-protein/ml) 5ml に表示の如き量を添加して蛋白質を定量しそれ等による定量値の誤差を求めた。

第6表から明らかなように, 従来よく云われている呈色影響物質はそれ程大きな影響を示さず, 実験誤差の中に含まれてしまう程度であることが明らかとなった。而し特にビュールレット反応陽性物質を多く含むような試料はトリクロール酢酸等で一度蛋白質のみを沈澱してから呈色させればよい。

第6表 共存物質の呈色値に及ぼす影響

添 加 物 (mg.)	吸 光 値	蛋白質定量値 (mg.)	誤 差 (%)
対 照 —	.263	8.7	
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5	.262	8.65	-0.7
2.5	.263	8.7	0
5.0	.264	8.75	+1.0
Urea 1	.263	8.7	0
5	.264	8.75	+0.5
25	.264	8.75	+0.5
Histidine 0.5	.265	8.89	+2.0
Serine 0.5	.267	8.90	+2.0

5. 各種魚肉蛋白質並卵アルブミンの吸光係数について

ビュールレット反応が魚種或は蛋白質の種類によらず一定の吸光係数を与えるならば, 操作の簡易迅速性と相俟って甚だ優れた定量方法となり得る。

タイ, アジ, サバ, イワシ, サメ肉の 5% NaCl (0.02M NaHCO_3) 抽出液, 並に卵白アルブミン等をトリクロール酢酸で純蛋白のみを沈澱させて精製した後キールダール法で窒素を求め, 之に 6.25 を乗ずる慣例に従い蛋白質を定量し, それぞれの試料蛋白溶液を稀釈して 5ml 中に 10mg の蛋白質を含有するようにして呈色反応を行い吸光係数を求めた。

第7表から単位蛋白量当りの吸光係数は魚種に関係なく略一定である。又卵白アルブミンも魚肉の抽出液の場合と殆んど一致した値を示した。

第7表 各種魚肉蛋白質のビュールレット試薬による発色の吸光係数

魚 種	吸 光 値
タ	.300
ア	.302
ヨ シ キ リ ザ	.303
マ イ ワ	.302
サ	.297
卵 白 ア ル ブ ミ ン	.303

6. 蛋白量と呈色度との関係

予めキールダール法で蛋白濃度を決定した新鮮なサバ肉の 5% NaCl 抽出液について前述の如く操作して呈色せしめ、 $530\text{m}\mu$ で比色し、呈色度と蛋白質の濃度の関係を求めた。

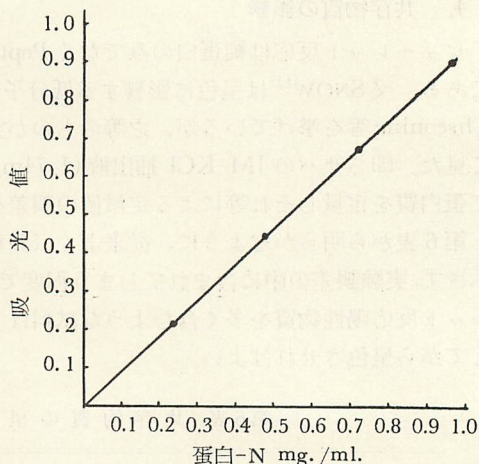
第1図の如く蛋白濃度が 0.9mg-N/ml までは Lambert-Beer の法則に従う。

総 括

魚肉蛋白質をビューレット試薬によって迅速に比色定量するための条件を検討し次の事を明らかにした。

1. 呈色反応を加温促進するための、加熱に対し安定なビューレット試薬を調製した。
2. 沸騰水浴中で発色させると反応は 1 分で完結する。
3. 魚肉抽出液にビューレット反応を行うと例外なく濁り、比色定量が不可能に近くなる。
4. 発色液に MgSO_4 溶液を加えて生ずる $\text{Mg}(\text{OH})_2$ の有する吸着能を活用して完全に濁り成分を吸着除去することが出来る。
5. $\text{Mg}(\text{OH})_2$ の膠状沈澱は濁り成分を吸着すると共にビューレット呈色物をも吸着するが、反応液に Zn^{++} を共存せしめることによって後者の吸着が完全に抑止される。
6. 呈色の極大吸収は $530\text{m}\mu$ 附近にあり、蛋白濃度 0.9mg-N/ml までは Lambert-Beer の法則に従う。
7. ビューレット試薬による発色率は魚種に関係なく略一定である。

終りに臨み御指導を賜った本学高田教授並びに越智教授に謹んで感謝の意を表する。なお本実験の遂行上有益な御助言を戴いた太田助教授にも深謝する。



第一図 魚肉蛋白質の検量曲線

文 献

- 1) J. M. SNOW: J. Fish. Res. Bd. Can., 7, 594~598 (1950)
- 2) 松本重一郎, 金光庸俊: 日水誌; 21, 284~288 (1955)
- 3) 太田冬雄: 未発表
- 4) A. SOLS: Nature; 160, 89 (1947)