

アミノ酸の微量定量(第一報)

林 義 男

Microdetermination of Amino Acids

YOSHIO HAYASHI

A. 緒 言

微量アミノ酸の定量方法としては、近時微生物法¹⁾、又は澱粉(或はイオン交換樹脂)クロマトグラフ法²⁾などが推奨されているが、著者³⁾は簡易迅速に定量する方法を求めて既に POPE STEVENS 法⁴⁾について吟味報告した。

その要旨はアミノ酸液に磷酸銅の懸濁液を加えて可溶性のアミノ酸銅塩を生ぜしめ、その銅量を定量してアミノ酸量を算出するのである。爾後 WOIWOD⁵⁾ はアミノ酸銅塩の生成条件を改良するために懸濁磷酸銅液の調製法並に反応液の pH 値調節法などに修正を試みたが、著者はこれを追試した結果、POPE 法を準用するにあたり反応液の pH 値を磷酸緩衝液で調節すれば満足すべき定量値を求めうる事が明らかになったので以下報告する。

B. 実 験

I. 試 薬

POPE-STEVENSON⁴⁾ 並に WOIWOD⁵⁾ が採用した試薬と同様なものを下記の如くに調製した。その際に使用した水は硝子器再溜による metal- 及び CO₂-free のものである。

- | | |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| (1) 塩化銅液 | 27.3g. CuCl ₂ /L. |
| (2) 磷酸ソーダ液 | (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 64.5g. + NaOH 7.2g.)/L. |

- | | |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| (3) 磷酸緩衝液 | (硼砂 57.21g. + N-HCl 100ml.) /2L. |
| (4) 磷酸銅懸濁液 | 試薬(1), (2), (3)を 1 : 2 : 2(vol.) の割合に混合する。(使用前日調製) |
| (5) チモールフタレイン液 | 0.25g./50% 酒精 100ml. |
| (6) $\frac{N}{2}$ -NaOH | |
| (7) $\frac{N}{200}$ -チオ硫酸ソーダ | |
| (8) 澱粉溶液 | |
| (9) 第二磷酸ソーダ液 | 12.8g. Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O/500ml. |
| (10) 沃度加里液 | 10g. KI/20ml. |
| (11) 標準硫酸銅液 | 結晶硫酸銅を 2 回再結晶し、風乾した純品につき 100μg. Cu/ml. に調製する。 |
| (12) 醋酸 | 氷醋酸 5 : 水 1 (vol.) |

II. 操 作

POPE-STEVENSON⁴⁾ 並に WOIWOD⁵⁾ が行った操作を参考にして著者は次の如くにして各種のアミノ酸を定量する実験を行った。アミノ酸の各々について一定濃度のアミノ酸水溶液を調製し、その 5 ml. を直接 50 ml. メスフラスコ又は三角フラスコにとり、これに試薬(9)を 5 ml., 試薬 (4)を 1ml. 加えて混液の pH 値を約 8.3 に保ち、約 20~30 分間時々振盪して反応せしめる。然るのち水を加えて 50ml. に満たし、定量濾紙(東洋濾紙 No. 7)を用いて生成した可溶性のアミノ酸銅塩を濾過する。こ

の際、濾液は絶対透明であるべきで、然らざる場合は磷酸銅が漏出したためであるから特に注意すべきである。この濾液 (pH 8.3) 5 ml. をとり、試薬(9)を 0.5 ml. 加えて酸性とし、試薬(10)を 1 ml. 加えて遊離した沃度を試薬(7)にて滴定する。これと同様な操作を水について行って対照実験となした。

尚試薬(7)の力価決定には試薬(11)を用いて行った。又アミノ酸溶液が酸性を呈するときには試薬(5), (6)を用いて pH 値を約 8.3 に調節した後上述のように行った。

Ⅲ. 結果

1. 定量実験

グリシン、アスパラギン酸及びヒスチジン溶液の各々

第1表 グリシン (0.0536 g. グリシン/100 ml.) 液についての実験

No.	供試液中のグリシンの量 (mg)	滴定に要した $\frac{N}{200}-Na_2S_2O_3$ (ml)	同 左 補 正 値** (ml)	滴定に要した $\frac{N}{200}-Na_2S_2O_3$ に 相当する Cu の量* (mg)	補正した $\frac{N}{200}-Na_2S_2O_3$ 1 ml に 相当するグリシンの量 (mg)
1	2.680	4.00	3.92	1.25	6.8
2	2.412	3.59	3.51	1.12	6.9
3	2.144	3.23	3.16	1.01	6.8
4	1.876	2.80	2.74	0.88	6.8
5	1.608	2.47	2.42	0.77	6.6
6	1.340	1.92	1.88	0.60	7.1
7	1.072	1.53	1.50	0.43	7.1
8 φ	0.000	0.00			7.1
				平均	6.9

φ No. 8 は対照

* Cu 500 μg. を含む試薬(11)に対する試薬(7)の滴定値は 1.600 ml である。よって $\frac{N}{200}-Na_2S_2O_3$ 1 ml. \propto 312.5 μg Cu. に従って Cu 量を算出した。

** 更に $\frac{0.5 \text{ mg Cu}}{1.600 \times 0.3179} = 0.97897$ が試薬(7)の補正因子となることから滴定値に乗じて補正した。

以下同じ

第2表 アスパラギン酸 (0.0951 g. アスパラギン酸/100 ml) 液についての実験結果

No.	供試液中のグリシンの量 (mg)	滴定に要した $\frac{N}{200}-Na_2S_2O_3$ (ml)	同 左 補 正 値** (ml)	滴定に要した $\frac{N}{200}-Na_2S_2O_3$ に 相当する Cu の量* (mg)	補正した $\frac{N}{200}-Na_2S_2O_3$ 1 ml に 相当するグリシンの量 (mg)
1	4.755	4.01	3.93	1.25	1.21
2	4.280	3.50	3.43	1.09	1.24
3	3.804	2.97	2.91	0.93	1.30
4	3.329	2.48	2.43	0.78	1.36
5	2.853	2.05	1.99	0.64	1.38
6	2.378	1.72	1.68	0.54	1.41
7	1.902	1.29	1.26	0.40	1.51
8	0.000	0.00			1.51
				平均	1.34

第3表 アルギニン (0.1244gアルギニン*/100ml.) 液についての実験結果

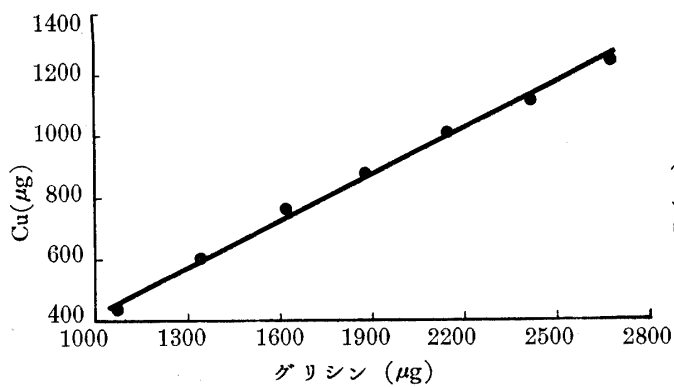
No.	供試液中のアルギニンの量 (mg)	滴定に要した $\frac{N}{200} - Na_2S_2O_3$ (ml)	同 左 補 正 値 (ml)	滴定に要した $\frac{N}{200} - Na_2S_2O_3$ に相当するCuの量* (mg)	補正した $\frac{N}{200} - Na_2S_2O_3$ 1 ml に相当するグリシンの量 (mg)
1	6.220	2.97	2.91	0.93	2.14
2	4.976	2.37	2.32	0.72	2.10
3	3.732	1.68	1.64	0.53	2.27
4	2.488	0.94	0.92	0.29	2.70
5	1.244	0.36	0.35	0.11	3.55

* アルギニン・1・塩酸 0.1504g を用い、遊離のアルギニンに換算した。

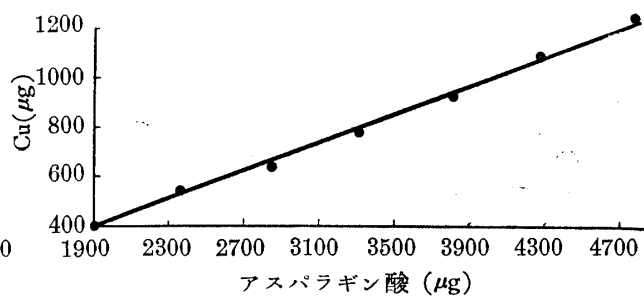
第4表 ヒスチジン (0.1237gヒスチジン*/100mg.) 液についての実験結果

No.	供試液中のヒスチジン量 (mg)	滴定に要した $\frac{N}{200} - Na_2S_2O_3$ (ml)	同 左 補 正 値 (ml)	滴定に要した $\frac{N}{200} - Na_2S_2O_3$ に相当するCuの量* (mg)	補正した $\frac{N}{200} - Na_2S_2O_3$ 1 ml に相当するグリシンの量 (mg)
1	6.185	5.20	5.09	1.63	1.215
2	4.948	4.25	4.16	1.33	1.187
3	3.711	3.31	3.24	1.03	1.142
4	2.474	2.11	2.07	0.66	1.195
5	1.237	1.08	1.06	0.34	1.167
平均					1.181

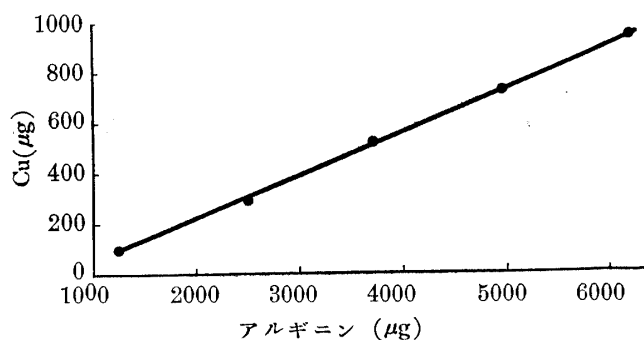
* ヒスチジン・1・塩酸・1水 0.1497g. を使用し、遊離のヒスチジンに換算した。



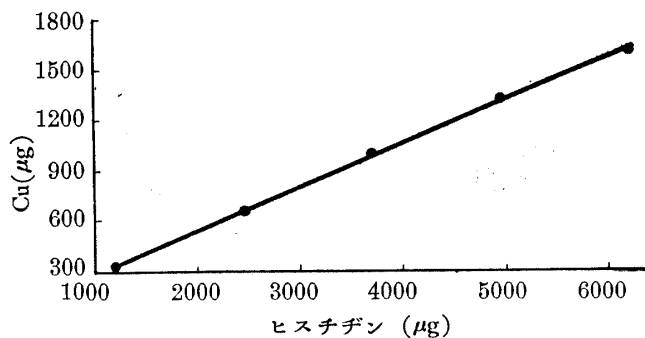
第1図 グリシン (0.0536g/100ml)



第2図 アスパラギン酸 (0.0951g/100ml)



第3図 アルギニン (0.1244g/100ml)



第4図 ヒスチジン (0.1237g/100ml)

IV. 実験操作に対する吟味

1. 磷酸銅懸濁液

Woiwod⁵⁾は磷酸銅の懸濁液を調製するに当り、試薬(1), (2), (9)を1:1:4 (vol.)の割合に混合し、逆流冷却器を附して1時間煮沸している。同氏は $\text{NH}_2\text{-N}$ 50 μg . 以下のアミノ酸を含む溶液に試薬(9)を 2.5 ml. 次に上記の磷酸銅液を 2.5 ml. 加えてアミノ酸銅塩の生成を完結せしめ、そのときの濾液につき Cu を比色定量している。同氏によれば磷酸銅液を上記のように調製すれば安定化して長期間の貯蔵にたえ、またアミノ酸との結合も一層正確になると述べている、

然しながら著者が実験反復した結果によれば Woiwod の磷酸銅液はアミノ酸との反応性が弱く、従ってこの銅液によってはアミノ酸の定量値は著しく減退する。しかして POPE-STEVENS の磷酸銅液はアミノ酸との反応性は鋭敏であるが、安定性が弱いから調製後 2~3 日の冷蔵にて更新しなければならない。

2. 反応時間

各種のアミノ酸液について前記の如く磷酸銅液を加えた後、5分、10分、20分、30分、40分、60分後にアミノ酸と結合した銅量を定量した結果は時間的には変化はなかった。よって著者は 20~30 分間室温にて反応せしめたのち次の濾過操作を行うことにした。

V. 夾雑物の影響

本法を実施する場合には、供試液中には酸類、糖類などが夾雑することが常である。かかる場合、夾雑物が磷酸銅に及ぼす影響を予め吟味すべきであるので、次の実験を行ってみた。

塩酸:

蛋白の塩酸加水分解の場合における残留 HCl の影響を吟味するためにグルタミン酸 5ml. に 2% HCl 2ml. を加え、前記のように pH 8 附近に中和し、以下常法の通り行い、その濾液につきグルタミン酸単独の場合と同じ正常な値を得た。よって HCl が共存してもこれを中和後経験すれば支障を来さないことを知った。

メタ磷酸:

植物又は動物の汁液から除蛋白するために用いるメタ磷酸が残留する場合は予想して実験を行ってみた。グルタミン酸溶液 5ml. に最終濃度 (50 ml. につき) が 2% となるように 10%メタ磷酸を 2ml. 加えたのち、中和し実験をすすめた結果、メタ磷酸の無添加の場合に比較して沃度澱粉反応の青色が幾度も再現して終点が一定せず、従って滴定値は遙かに大きく不定であった。よってメタ磷酸が共存する場合には定量が頗る困難なることを知った。

醋酸:

グルタミン酸及びグリシン溶液各々 5ml. に試薬(12)を 0.5 ml. 並に 0.1 ml. 加え、前記のように中和後同様に実験した処、塩酸の場合と同様に正常な結果を得た。従って醋酸が共存しても差支えないことを知った。

クエン酸:

クエン酸の 1% 溶液をグルタミン酸及びグリシン溶液 5ml. に 1ml. 添加し、前記のように実験した結果、試薬(7)の所要量は何れも 0.650 ml. 前後となり大に過ぎる。(但し濾後の pH 値は 8.3), 従ってクエン酸は本法の結果を誤らしめる。

リンゴ酸、蔞酸等も同様な影響を示すものと考えられる。

フェノール:

水にて 3:1 に稀釈したフェノールを 1 滴、或は 1ml. をグリシン液 5ml. に添加し、実験を行った処、暫時にして濾液は黒紫色に着色した。この色は醋酸 α 性にしても変化しないので滴定は全く不可能となった。

糖:

例えば 10% ぶどう糖溶液をグリシン液 5ml. に 5ml. 添加し実験を行った処、無添加の場合と全く正常な結果を与えた。よって糖の存在は本法の実施に支障を来さないことを知った。

VI. 要約

(1) POPE-STEVENS 並に Woiwod の方法を参照してグ

リシン, アスパラギン酸, アルギニン及びヒスチジンについて銅塩法によってこれらのアミノ酸の微量を定量しうることを知りえた。

(2) この場合, アミノ酸の銅塩は可溶性であることが必須条件である。従ってロイシン, シスチンの如きは難溶性の銅塩を形成するが故に, かかるアミノ酸の微量を本法によって定量する場合には別に工夫しなければならない。

(3) 本法を実施する場合には供試アミノ酸液中にメタ磷酸, 更に醋酸を除く有機酸類, フェノールなどが夾雑すれば定量が不可能になることを知りえた。

終りに臨み, 終始御懇篤なる御指導を頂いた恩師 京大名誉教授 農学博士 近藤金助先生に深甚の感謝の意を表す。

文 献

- (1) J. L. STOKES AND M. GUNNES: J. Biol. Chem., **157**, 651 (1945)
 ibid. **160**, 35 (1945)
- (2) W. H. STEIN AND S. MOORE: J. Biol. Chem., **176**, 337, 367 (1948)
 ibid. **178**, 53 (1949)
 ibid. **192**, 663 (1951)
- (3) 林 義 男: 西京大学学術報告 Vol. 2
 No 1 p. 63 (1954)
- (4) C. G. POPE AND M. F. STEVENS: Biochem. J., **33**, 1070 (1939)
- (5) A. J. WOIWOD: ibid. **42**, xxviii (1948)
 ibid. **45**, 412 (1949)
 Nature, LOND., **161**, 169 (1948)

以 上 (955年10月受理)