



理科実習教育に適した遊離アミノ酸の定量分析法について

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-02-17 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 末継, 淳, 倉橋, 健介 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24729/00007530

理科実習教育に適した遊離アミノ酸の定量分析法について

末継 淳*, 倉橋健介**

A Simple Method of Free Amino Acids Quantification for Practical Training Courses

Atsushi SUETSUGU*, Kensuke KURAHASHI**

要旨

理科実習教育に適した遊離アミノ酸の定量分析法を確立するため、安全で安価な試薬類を用いて実験条件の最適化を試みた。その結果、ニンヒドリン法の溶媒を水のみとし、還元剤をフルクトースとした場合でも、反応液のニンヒドリン濃度を 1.5% (w/v) とし、フルクトースの最終濃度を 1.0% (w/v) まで高めることで、L-グルタミン酸ナトリウムの検量線が 18~89 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (3~15 mg L^{-1}) の範囲で作成できた。しかし、ヒドリンダンチンなどの不溶物が試料冷却後に徐々に析出するため、急冷せずに速やかに測定し、色素の妨害を受けにくい長波長 (800 nm など) の吸光度で濁度を確認する必要がある。なお、この析出物は、食塩水での塩析や卓上遠心機ではルーヘマン紫 (LV) の発色時間内に除去できず、過酸化水素水 (3%) では除去可能であったが LV の一部も失われた。また、検量線から逆算された LV の分子吸光係数は、加熱終了直後には文献値 (22000) (Friedman, 2004) と一致したが、吸光度の安定後には 15000~19000 (収率 68~86%) まで低下した。この収率は Pitts ら (2013) による実用上の基準を満たしていた。

キーワード: ニンヒドリン反応, 遊離アミノ酸, 吸光光度法, 理科実習教育

1. 序論

1-1. 本研究の背景

遊離アミノ酸の定量分析は、食品・医療や合成化学などにおいて重要な手法の一つである^[1]。遊離アミノ酸はタンパク質の加水分解物からも得られるため、遊離アミノ酸の定量分析法はタンパク質のアミノ酸組成分析においても重要な位置を占める^[1]。アミノ酸組成の自動分析計は Stein と Moore によって 1948 年に提案されている^[2]。彼らはこの自動分析計によって酵素 (リボヌクレアーゼ A) のアミノ酸配列と活性中心の触媒能との関係を明らかにして、1972 年にノーベル化学賞を受賞している^[3]。この自動分析計は、イオン交換樹脂カラムで分離された各種の遊離アミノ酸をニンヒドリン反応で検出するものであった^[2]。これと同様の手法は、現行のアミノ酸自動分析計にも採用されている^[1]。また、犯罪捜査などでは、指紋の検出にニンヒドリン反応が近年でも利用されている^[4]。

前述のような応用範囲の広さと重要性から、高等専門学校や高等学校などの理科教育においても、遊離アミノ酸の検出や定量を題材とした実習が行われている^[5]。

遊離アミノ酸のニンヒドリン反応による定量法は、発色反応による吸光度測定や検量線作成による定量分析を体験する実習材料にできる。しかし、ニンヒドリン反応の機構はやや複雑^[6]なため反応条件に注意を要する。また、実習にはできるだけ安全で安価な試薬と機材を用い、限られた実習時間内に確実な結果が得られることが望ましいが、ニンヒドリン法では、還元剤に毒性の高いシアン化カリウム^[7]や塩化スズ(II)^[2]などが用いられ、30分間もの長時間の加熱が反応に用いられ、^[8]など、必ずしも理科実習教育に適した手順が示されているわけではない。

現状では、ニンヒドリン反応による遊離アミノ酸定量には、メチルセロソルブ (エチレングリコールモノメチルエーテル) を溶媒とし、塩化スズ(II)を還元剤とする Spackman らの方法^[9]が普及している。一方で、水を溶媒とし、フルクトース (果糖) を還元剤とする安全な方法も古くから提案されている^[10-11]。これらのニンヒドリン反応系の最適化については、古くから様々な議論が行われており、pH・反応時間・溶媒組成・還元剤組成などを明確にした上で実習を行わ

2016年8月22日 受理

*技術教育支援室 (Support Center for Technical Education)

**環境物質化学コース (Environmental and Materials Chemistry Course)

ないと、混乱を生じる可能性が高い。そこで本研究では、ニンヒドリン反応を用いた遊離アミノ酸の定量に関する既往の研究を整理し、既往の理論との整合性や既知の問題点に配慮しながら、安全面やコスト面で優れた簡便な実験系を確立することを目的とした。

1-2. 文献調査による反応条件探索

ニンヒドリンと遊離アミノ酸の反応においては、第一級アミン($R-NH_2$, R は置換基)の α -アミノ酸(アミノ酸のカルボキシ基の隣(α 位, IUPACの命名法では2位)の炭素にアミノ基が結合したもの)の場合にはルーヘマン紫(Ruhemann's purple)と呼ばれる物質(図1)が生成し、第二級アミン($R-NH-R'$, R と R' はともに置換基)であるプロリンでは黄色の物質(図1, ニンヒドリンの2つの水酸基が1つのピロリニウムイオンに置換された物質)がまず生成するとされる^[6]。ニンヒドリンとアミノ酸の反応では、上記の色素の他にアミノ酸に由来する二酸化炭素やアルデヒドが生成するが、アミノ酸に由来するアンモニウムはpH2未満の強酸性でのみ定量的に回収される^[6]。強力な酸化剤であるニンヒドリンと生成したアルデヒドが結合すると、ルーヘマン紫の生成が阻害される可能性があるため、ニンヒドリン反応を促進するためには還元剤が必要であると考えられる。還元型ニンヒドリン(2-ヒドロキシインダン-1,3-ジオン)は元のニンヒドリン(2,2-ジヒドロキシインダン-1,3-ジオン)と反応すると、ヒドリンダンチン(図1)が生成すると考えられている^[6]。しかし、この反応機構については古くから議論があるため、時間分解分光などの近代的な手法による詳細な反応機構の検証を待たなければ断定し難い。例えば、

Kleinmanら(2003)はレーザーフラッシュフォトリシス(LFP)と電子スピン共鳴を使ってニンヒドリン反応に関わる物質の反応中間体を追跡し、ケチルラジカルの二量体化でヒドリンダンチンが生成するとしている^[12]。このように、従来からの説を覆す情報が近年の手法で得られる可能性があるため、反応中間体が実証されていない古典的な仮説は、実験条件の最適化のための指標とならない場合があることに注意が必要である。

ニンヒドリン反応を指紋の検出や薄層クロマトグラフィーなどでのアミノ酸の定性分析に用いる場合には、ルーヘマン紫の生成量を厳密に再現する必要がないため、pH緩衝液や還元剤などを用いない場合もある^[13]。そのため、理科教育の現場においては、定性分析に用いるニンヒドリン反応液や反応条件が定量分析に流用されることで、トラブルが生じることにも留意する必要がある。本研究では、ニンヒドリン反応を遊離アミノ酸の定量分析に用いることを想定しているため、反応機構のみではなく、分析値を変動させる恐れのある種々の要因について検討を行った。

アミノ酸とニンヒドリンの反応は幅広いpHで起こり得るが、その発色は微妙なpHの変化に大きく影響されることが知られている^[2, 14]。pH2.5未満では、ルーヘマン紫を対象とした比色ではなく、二酸化炭素の放出量を定量することでアミノ酸が定量される^[15]。この方法では吸光度法の実習はできない。pHが2.5以上の場合でも、ルーヘマン紫は酸性側で不安定でpH4未満では著しく分解することが知られている^[2]。しかし、ニンヒドリン反応ではニンヒドリンが溶解してできるケトンとアミノ基が結合する必要があるとされる^[6]ため、pHを下げて(H^+ 濃度を上げて)ニンヒドリン

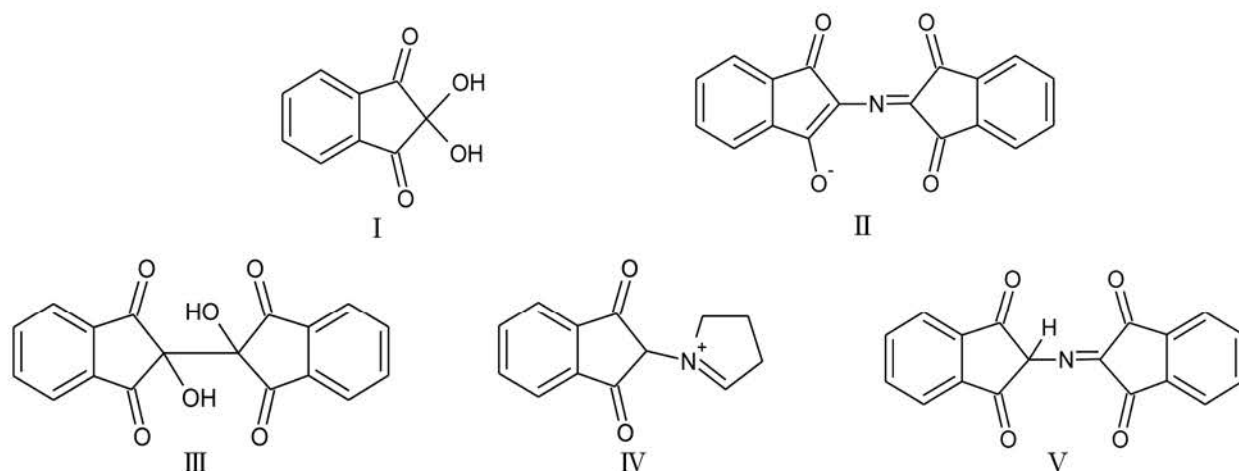


図1 ニンヒドリン反応に関わる物質

- I : ニンヒドリン
- II : ルーヘマン紫
- III : ヒドリンダンチン
- IV : ニンヒドリンとプロリンの反応物 (黄色)
- V : ルーヘマン紫の還元物 (オレンジ色)

(図1)構造中の2位の炭素(2つのヒドロキシ基と結合した炭素)の求電子付加反応を促進する方法が考えられる。実際に、ルーヘマン紫の収率が最大になるpHもpH5^[2], pH5.5^[9], pH6.2^[14]などと酸性側に集中している。したがって、ニンヒドリン法においては、反応を促進するための条件と生成物が安定に存在しうる条件が異なることに配慮して、pH緩衝液を選択する必要がある。そのため、生成物の安定性を重視する場合には塩基性側の条件を採用し、反応効率あるいは還元剤の安定性を重視する場合には酸性側の条件を採用することになる。さらに、コスト面での問題を考慮すると、pH4~6では酢酸ナトリウム緩衝液、pH6~8ではリン酸ナトリウム緩衝液が候補となるが、リンの排水基準^[16]や環境中での蓄積性を考えると酢酸ナトリウム緩衝液が望ましい。なお、クエン酸緩衝液は、緩衝液そのものに還元性があるため、ニンヒドリン反応液を長期間保存すると過剰なヒドリンダンチンを析出させる可能性が高い。

ニンヒドリン反応に用いられる還元剤の種類や量も研究者によって異なっている。最も一般的に使用されているものは塩化スズ(II)である^[2, 9]。しかし、塩化スズ(II)は劇物指定されている^[17]重金属化合物であり、常温でも還元能を示すためにニンヒドリンと混合した状態で長期間保存できない^[18]。また、塩化スズ(II)は塩基性条件では反応液中で沈殿する^[18]ため、キレート剤などを併用する必要がある。より安全で安価な還元剤を用いた研究では、アスコルビン酸^[7, 19]・フルクトース^[10-11]などが用いられている。アスコルビン酸も安全性の高い還元剤と考えられるが、溶液中で加熱時にルーヘマン紫と異なる着色物質を生成することが指摘されている^[20]。一方、フルクトースは保存性の高い還元剤として用いられてきた^[10-11, 18]。フルクトースは常温で酸性条件ではほとんど還元能力を示さず、加熱時に高い還元能を示すため、反応試薬を長期間常温で保存しても劣化しにくい還元剤とされている^[18]。しかし、フルクトースが過剰な還元能を示すと赤色のヒドリンダンチンが過剰に生成し、吸光度法による定量分析の妨げになる可能性がある。

ニンヒドリン反応液の溶媒に関しては、古くからの水のみを用いた方法^[ex. 21, 11]に対して、エタノール・フェノール・ピリジン・ジオキサン・グリセリン・メチルセロソルブ^[22, 2, 14]などの有機溶媒の添加による発色効率の向上や退色防止効果が報告されている。しかし、エタノールなどの揮発性の高い溶媒を用いると加熱反応中に反応液量が著しく減少し、メチルセロソルブのような溶媒を用いると有害な蒸気が放出されるためにドラフトチャンバーの使用が前提になるなどの制約を受ける。また、これらの有機溶媒の退色防止効果は、ルーヘマン紫に限らずヒドリンダンチンや他の反応生成物にも働きうるので、吸光度法のブランク値を増

大させる可能性がある^[14]。これらの問題を回避し、理科実習教育に適した安全で安価な方法を考える際には、水のみを溶媒とした反応系が望ましい。しかし、水のみを溶媒とした反応系は、ヒドリンダンチンが冷却後に析出するなどの問題で、アミノ酸の自動分析に関する初期の研究では断念されている^[2]ため、析出物の影響を回避するための簡易な手法を検討する必要がある。Wylie & Johnson (1962)^[11]は溶媒を水のみとしたが、還元剤のフルクトースの最終濃度を0.15% (w/v)と非常に低い値に抑え、加熱反応後に酸化剤(ヨウ素酸カリウム)溶液と混合することで、ヒドリンダンチンなどの不溶物を防ぐ方法を提案している。しかし、この方法で得られるルーヘマン紫の収率は半分程度にとどまる^[11]ため、より高い収率で安定した結果が得られる実用的な手法を検討する必要がある。

ニンヒドリン反応の加熱時間についても様々な方法が提案されている。現行のアミノ酸自動分析計では小型の反応槽と高温でも揮発しにくい溶媒(スルホラン^[23])などを用いて1分間未満の加熱で済むような工夫がされている^[24]一方で、手で30分間に及ぶ煮沸を要する方法^[8]も存在する。実験実習においては、高価なアミノ酸自動分析計が利用可能であるとは限らず、試薬の消費コストを抑えつつ視覚的に確認しやすいスケールで実験することが望ましい。

以上の文献調査から、理科実習教育における遊離アミノ酸の定量実験には、極端な時間短縮は目的から除外し、手動分析で多用される沸騰水中での加熱を既往の研究^[14, 24, 11]を参考にして13分間行うこととした。また、安全面・コスト・環境負荷を考慮すると、溶媒に水のみを用い、還元剤にフルクトース、pH緩衝液に酢酸ナトリウムを用いる手法が望ましいと考えられた。そのため、Wylie & Johnson(1962)^[11]によって指摘された、ルーヘマン紫の低収率とヒドリンダンチンの不溶化による影響を、できるだけ簡易に回避できる手法を検討した。

2. 試料及び方法

2-1. フルクトース濃度依存性の確認

ニンヒドリン反応における還元剤に、安全性が高く安価なフルクトースを用い、フルクトース濃度の変化(最終濃度0~5%, w/v)による吸光度への影響を調べた。反応液のニンヒドリン濃度は、水溶液として容易に調製できる上限付近の1.5% (w/v)とし、酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5, 濃度1 mol L⁻¹)に溶解させた。この反応液2.0 mLを試料溶液と混合し、純水(予備フィルタ付イオン交換水製造装置による水で代用)を加えて4.0 mLに定容した。4.0 mLの反応液があれば視覚的に色の変化を十分に確認でき、吸光度測定で多用される光路長1.0 cmの吸光度セル(キュ

ベット)で十分に測定が可能である。この場合のニンヒドリンの最終濃度は 0.75% であるため、定量するアミノ酸濃度の上限を 0.1 mmol L^{-1} としても、ニンヒドリンが完全にアミノ酸が反応する場合の約 210 倍のニンヒドリンが存在することとなる。遊離アミノ酸の標準試料には、実習での利用しやすさを考慮し、L-グルタミン酸ナトリウム水溶液を用いた。L-グルタミン酸ナトリウムは、業務用「味の素 S」などとして純度 99% のものが購入可能である^[25]。この L-グルタミン酸ナトリウム粉末を純水に溶解させた 50 mg L^{-1} 溶液を、内径 16 mm、長さ 180 mm のガラス製試験管に移し、ニンヒドリン反応液 2.0 mL と純水を加えて全液量を 4.0 mL とした。溶液の計量には理科実習教育での利用可能性を考慮してメスピペットを用いた。試料は沸騰水中で 13 分間加熱し、ニンヒドリン反応を促進させた。加熱後の試料は急冷せず、速やかに吸光度セルに移した。ただし、冷却後の析出物による濁度変化の測定を行う際には、加熱後の試験管を 3.0 分間常温の水に浸漬して急冷させた場合の吸光度(光学密度)測定も行った。また、急冷しなかった場合にも、試料の攪拌による濁度変化の測定を行った。この測定には、未反応のヒドリンダンチンによる析出物が最も多くなると考えられるブランク液(アミノ酸を含まない液)を用い、還元剤のフルクトース最終濃度は 2.5% (w/v) まで高めた。この吸光度の測定時には 1 分おきに吸光度セルにふたをして 10 回転倒攪拌を行い、波長 570 nm と 800 nm の吸光度と温度の測定を行った。吸光度測定には紫外・可視分光光度計(UV-1200, 島津製作所, 京都)を用いた。試料用セルには、実習での使用を前提としてポリスチレン製のマクロキュベット(光路長 10 mm, Kartell S.p.A.)を使用した。

2 - 2. ヒドリンダンチン除去法の検討

ニンヒドリン反応による遊離アミノ酸の定量では、過剰に生成したヒドリンダンチンが、常温の水に溶けないために沈殿して吸光度の誤差を生む可能性がある。この問題を回避するために、既往の研究ではヒドリンダンチンを常温で溶かすことができる溶媒を用いている^[9, 2, 9, 23]。しかし、ヒドリンダンチンの溶液は、酸性～弱塩基性では赤色となり、強塩基性では青色となるなど、試料の吸光度を著しく変化させる^[26]。また、理科実習教育では有機溶媒の排気施設が整備された実験室が確保できない可能性があるため、より簡易なヒドリンダンチン除去法として、以下の 4 種類の方法による効果を検証した。

- 1) 過酸化水素水添加(3%, w/w, 酸化による除去法)
- 2) 遠心分離(2000 ×g, 固液分離による除去法)
- 3) 食塩水添加(20%, w/w, 塩析による濁度低下法)
- 4) 純水添加(試料の希釈による濁度低下法)

加熱反応までの手順は 2.1 と同様とし、フルクトースの最終濃度は 1.0% (w/v) で固定した。上記の 1) の方法では入

手しやすい市販のオキシドール(健栄製薬株式会社, 大阪)を、加熱反応終了直後の試験管に 1 滴(約 0.05 mL)あるいは 2 滴(約 0.10 mL) 滴下し、よく振り混ぜた。滴下には 1 滴の重量が 0.01 g 未満の誤差で再現するメスピペットを用い、濃度計算時にオキシドール滴下による希釈効果を補正した。2) の遠心分離による沈殿除去法では、ヒドリンダンチンの析出を早めるために反応終了直後の試験管を常温(26°C)の水に 3.0 分間浸漬し、試料をマイクロチューブに移し、卓上の遠心分離器(回転くん Jr., フナコシ株式会社, 東京)で 1 回目に 2000 ×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を吸光度セル(キュベット)に移して波長 570 nm での吸光度を測定した。その後、遠心分離後の試料液を新しいマイクロチューブに移して 2 回目の遠心分離(2000 ×g, 10 分間)にかけ、上澄み液を吸光度分析に供した。3) と 4) の方法では、加熱反応終了直後の試験管に食塩水か純水のいずれかを 4.0 mL 添加し、試験管にふたをして十分に液体を混合した。この操作で試料液は 2 倍希釈されるため、検量線の作成時には最終濃度を半分として計算した。

3. 結果と考察

3 - 1. フルクトース濃度依存性の確認

ニンヒドリン法による L-グルタミン酸ナトリウムの定量実験において、還元剤にフルクトースを用いた場合、フルクトース濃度の違いによる吸光度への影響は非常に大きなものであった(図 2)。フルクトースを全く添加しない場合(0%) には、吸光度の変化がほとんど生じなかったため、ニンヒドリン反応が十分に進行しないことが確認された(図 2)。一方、フルクトースの最終濃度が 5.0% (w/v) の場合には、吸光度から算出されたルーヘマン紫の分子吸光係数が負の値となってしまう、定量計算が全くできないことがわかった(図 2)。この原因には、過剰の還元剤によってニンヒドリンの酸化力が打ち消され、アミノ酸との結合が阻害されたことが考えられた。また、フルクトース 5.0% (w/v) の場合の反応後の試料液はオレンジ色であったため、フルクトースの還元により生じる水素イオンが pH 緩衝液の能力を超えて放出され、ルーヘマン紫が還元された物質(図 1 の V, 最大吸収波長 485 nm^[27]) が生成した可能性が考えられた。フルクトースの最終濃度が 0.5 ~ 1.5% (w/v) の範囲では、分子吸光係数が約 16000 ~ 23000 の範囲に収まり、加熱反応終了後 20 分 ~ 90 分後までの範囲で安定した値を示した(図 2)。加熱反応終了後 20 分以降では、フルクトース最終濃度 1.0% (w/v) の試料が最も高い分子吸光係数を示した(図 2) ため、以降の実験ではフルクトース最終濃度を 1.0% (w/v) とすることとした。Wylie & Johnson (1962)^[11] はフルクトース最終濃度を 0.15% (w/v) と非常

に低い値に抑えているが、1)リン酸ナトリウム緩衝液を用いて中性に近い条件(pH6.7)で反応を行っていること、2)反応効率を低く抑えていること(およそ半分^[11]、分子吸光係数^[28]換算で11000)から、ブランク溶液の着色(ヒドリンダンチンの赤色)や不溶物の析出を完全に防ぐことを意図したものと考えられる。ルーヘマン紫の分子吸光係数として報告されている値は 22000 である^[28]ため、加熱終了後から吸光度値が安定するまでにルーヘマン紫の一部が失われた可能性が高い。この原因として考えられることは、1) pH 緩衝液が pH5.5 の酸性であるためルーヘマン紫が分解されやすい^[2]こと、2) 冷却によってフルクトースによる還元力が低下し、溶存するヒドリンダンチンの濃度が低下すること、3) 冷却によってヒドリンダンチンやルーヘマン紫が不溶化すること、4) ヒドリンダンチンによる吸光度の増加は、未反応のニンヒドリンが多い希薄試料で顕著になるために検量線の傾きが過小評価されること、であった。また、Ruhemann 自身が提案したニンヒドリン反応機構^[6]に基づくと、加熱反応中のアンモニア揮散なども問題になるはずである。しかし、フルクトース濃度が 1.0~1.5% (w/v) の条件では、加熱終了直後の分子吸光係数は 22000 に近い値となっており(図2)、pH は 5.5 と中性に近い条件であるため、加熱反応中のアンモニア揮散は吸光度低下の主因には含めなかった。以上の結果のように、ニンヒドリン法ではルーヘマン紫の収率 100%条件での定量分析は難しく、Pitts ら^[18]はニンヒドリン法における還元剤の選抜基準として、反応物の分子吸光係数が 15000 以上に相当する吸光度を与えるものが実用的であるとしている。このため、ニンヒドリン法では分子吸光係数の値からアミノ酸濃度を逆算するような手法は現実的ではなく、標準試料と測定試料を同時に測定することが望ましいことが確認された。

前述の結果を踏まえ、フルクトース最終濃度 1.0% (w/v) の条件で作成した検量線を図3に示した。図3は L-グルタミン酸ナトリウム濃度 0~89 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0~15 mg L^{-1}) の範囲で直線近似による検量線作成が可能であることを示している。しかし、決定係数は 0.9914 (10 分後)~0.9956 (60 分後)と、やや低い値にとどまった(図3)。これらの吸光度測定では水のみを溶媒としているため、過剰に生成したヒドリンダンチンなどが不溶化し、吸光度測定の誤差を生んだ可能性がある。この不溶物は常温の水・グリセリン・エタノールのいずれにも溶解しなかった。そのため、不溶化物による影響を避けるための手法を、次項の実験で検討した。その他の誤差要因としては、1 mL メスピペットによる計量誤差、加熱反応後の試験管の攪拌不足、吸光度セルのセル間補正の省略、などが考えられた。実習で可能であれば、1 mL 未満の液体の計量に適したメカニカルピペットを使用し、加熱反応後の試験管にシリコンゴム栓などでふたをして手袋を着用した手で十分に攪拌し、吸光度セルのセル間補正後にエタノールなどの速乾性の液体で吸光度セルを洗浄・乾燥して使用することなどで、検量線の精度は向上するものと考えられた。

3-2. ヒドリンダンチン除去法の検討

Spackman ら(1958)^[9]のアミノ酸自動分析に関する研究では、クロマトグラフィーで分離された各種のアミノ酸をフローセルで定量することが必要であったため、反応後に過剰に存在するヒドリンダンチンや副反応物を有機溶媒によって全て溶解させる必要があった。一方、理科実習教育においては、排気施設を必要とする溶媒の使用を避け、水のみを溶媒とする方法が望ましいため、Wylie & Johnson (1962)^[11]の方法を参考にして、不溶化物の妨害

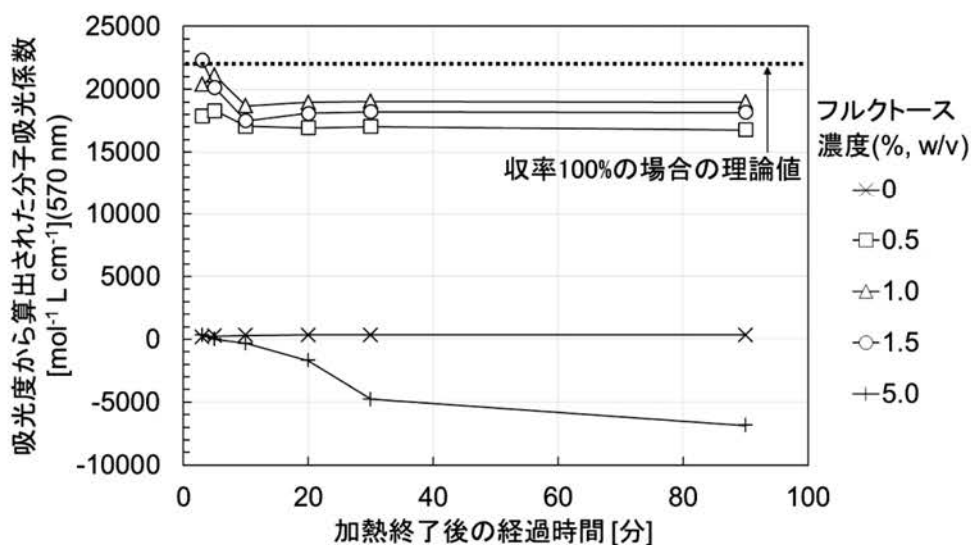


図2 フルクトースがニンヒドリン反応物の吸光係数へ及ぼす影響

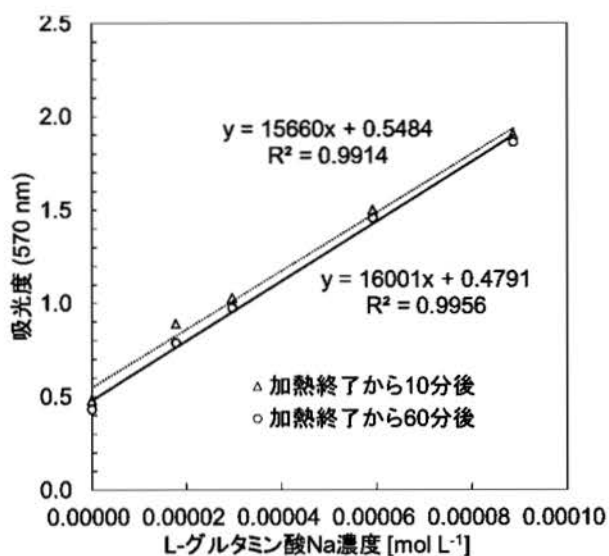


図3 フルクトース 1%のときのアミノ酸の検量線

を防ぐために以下の4種類の方法を検討した。

- 1) 過酸化水素水 (3%, w/w, オキシドール) による酸化
- 2) 卓上遠心分離機による固液分離
- 3) 食塩水 (20%, w/w) による塩析
- 4) 純水による濁度低減

その結果, 1) の過酸化水素水と4) の純水の添加による効果が認められたが, 2) の遠心分離法では遠心後にも不溶物の析出が徐々に進むため分離が困難であり, 3) の食塩水による塩析効果は認められなかった (図4~6)。また, 食塩水を添加した場合には, 高濃度 (最終濃度 7.5 mg L^{-1}) の L-グルタミン酸ナトリウムの反応液が紫色からオレンジ色に変色する現象が認められた。この現象は, 既往の研究^[29]で観測された塩濃度の増加にともなうニンヒドリン反

応速度の低下とも矛盾しない。また, pH 緩衝液の濃度を超える電解質が加えられて pH が酸性化しやすくなったことも原因として考えられる。1) の過酸化水素水を添加した場合には沈殿除去効果が観察されたが, ルーヘマン紫による波長 570 nm の吸光度も過酸化水素水の滴下によって低下した (図4)。この結果は, 既往の研究において過酸化水素水をニンヒドリンの分解・除去に用いている^[30]ことや, ヨウ素酸カリウムを酸化剤とした Wylie & Johnson の方法^[11]でも十分な収率が得られないことと矛盾しないものと考えられた。2) の遠心分離による不溶物除去法では, 冷却後に十分な時間 (1時間以上) をおいて不溶物が析出し終わってから固液分離を行う必要があり, 不溶物が析出し終わる前にルーヘマン紫の分解が進んでしまうことがわかった (図5, 90 分後の試料)。4) の純水希釈による濁度低減法では, 検量線の直線性は良好であったが (図6右) が, 検量線の傾きから求められたルーヘマン紫の分子吸光係数は Pitts ら (2013)^[18]が実用性の基準とした 15000 を下回った (図6右)。以上のように, ニンヒドリン反応液の溶媒を水とした場合の不溶物の除去は非常に困難であったが, 不溶物の析出による濁度の増加は冷却終了直後に起こる現象ではない (図7, 1 分ごとに攪拌した試料) ため, 極めて微細な粒子として析出し始める可能性が考えられた。この性質を利用すると, 加熱反応後の冷却操作は行わず, 吸光度の安定後に速やかに測定を行う方法が考えられた。この場合でも, 色素に妨害されにくい長波長 (800 nm など) の吸光度を測定することで, 濁度の増加が起きていないか確認する必要があるものと考えられる。なお, 図7において試料を攪拌しなかった場合の 800 nm 吸光度 (光学密度) に変化があまりなかったのは, 不溶物が吸光度セル壁面で凝集あるいは底部に沈殿し, 光路を妨害しなかった

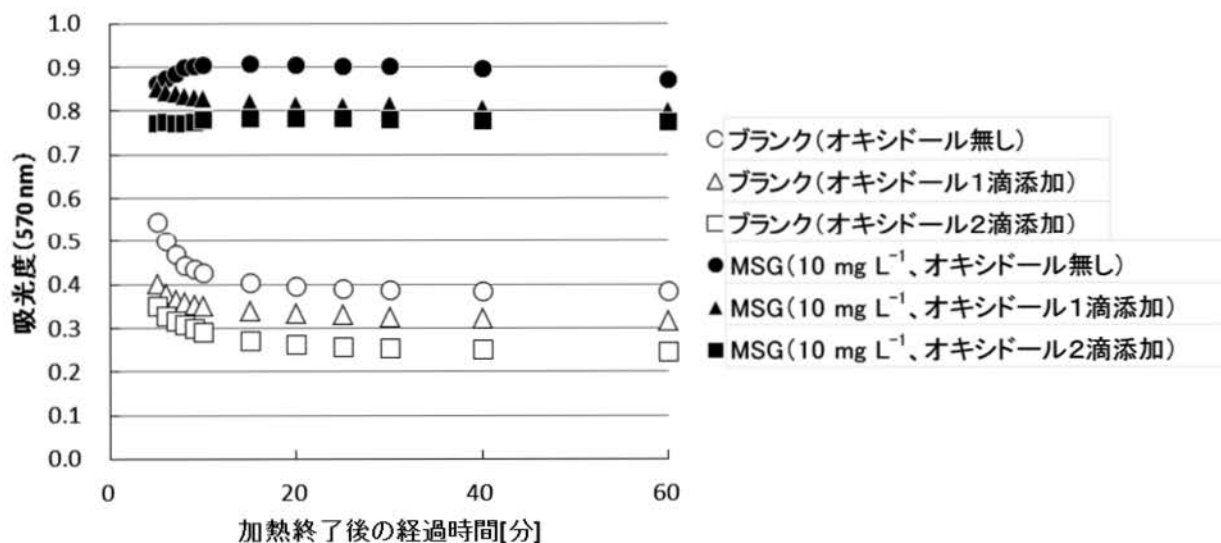


図4 オキシドール (酸化剤) 添加後の吸光度の推移
(MSG: MonoSodiumGlutamate, L-グルタミン酸ナトリウム)

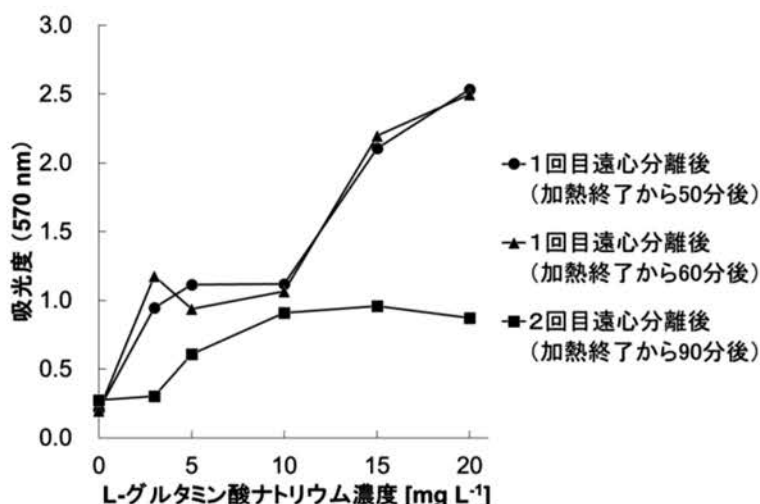


図5 遠心分離後のアミノ酸の検量線

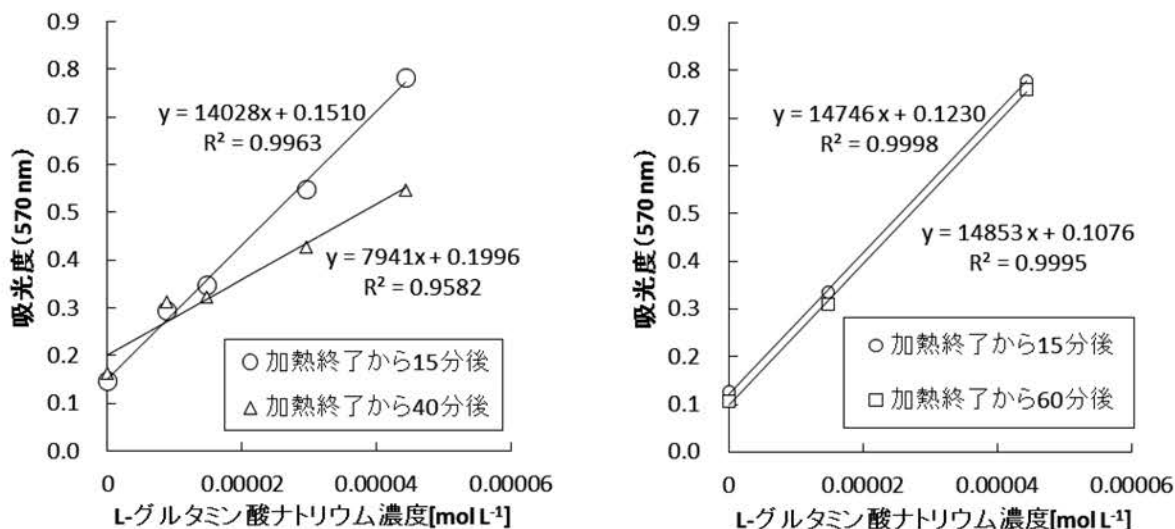


図6 塩析および希釈後のアミノ酸の検量線
(左：食塩水による塩析後、右：純水による希釈後)

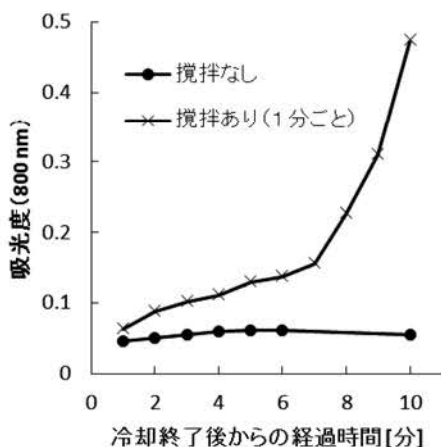


図7 ニンヒドリン反応のブランク液の吸光度の推移

ためと考えられる。このため、放冷が進んだ(60℃以下、図8右) 試料はできるだけ攪拌せず、速やかに測定することが望ましいことがわかった。特に、還元剤のフルクトース最終濃度を2.5% (w/v)まで上げた場合には、ヒドリンダンチンによる波長 570 nm の吸光度への影響が一定となるまでに20分間以上かかるようになってしまう(図8左)ため、試料の冷却・攪拌による濁度増加(図8右)に注意が必要となる。吸光度セルの攪拌を行わなかった試料では、析出物は粗大な粒子となる(図9左)ために濁度の増加にほとんど寄与しなかったものと考えられた。また、現行のアミノ酸自動分析計でも、波長 690 nm での吸光度測定を行い、波長 570 nm での吸光度から差し引く手法がとられている^[31]ため、溶媒が水のみではない場合にも濁度の検出は重要と考えられる。

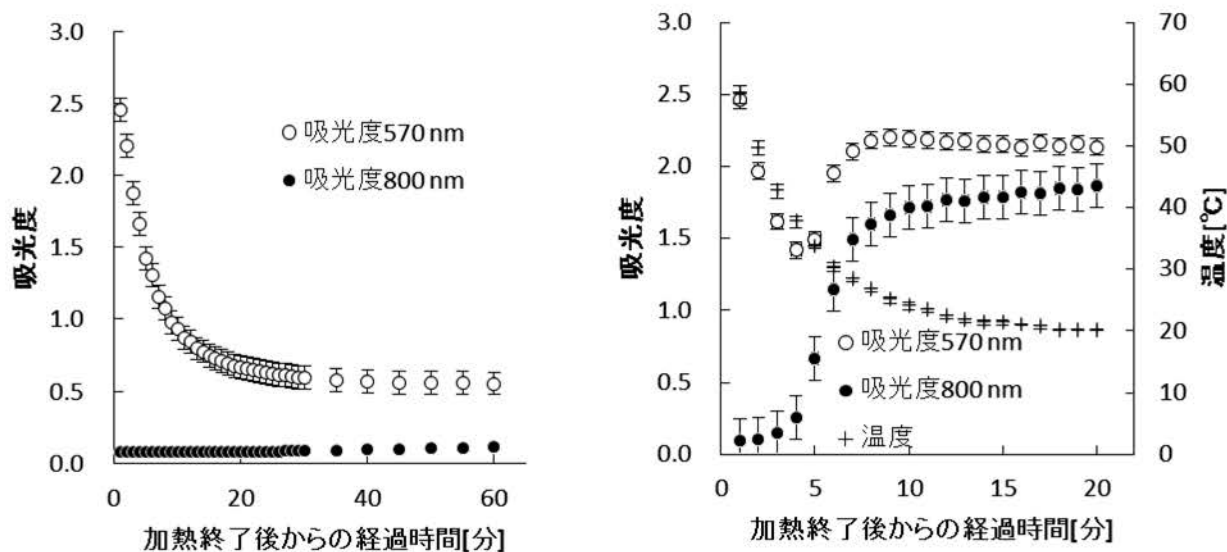


図8 ニンヒドリン反応のブランク液の吸光度の推移
(急冷なし, 左: 攪拌なし, 右: 1分おきにセルを攪拌)



図9 ニンヒドリン法測定後の試料
(左: 攪拌なし, 右: 1分おきにセルを攪拌)

4. 結論

理科実習教育に適した安全で低コストの遊離アミノ酸の定量分析法として, 次のような実験手順が有効であることがわかった。

- (1) 1 mol L⁻¹ 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) にニンヒドリンとフルクトースを溶解させ, ニンヒドリン濃度 1.5% (w/v), フルクトース濃度 2.0% (w/v) の反応液とする。
- (2) L-グルタミン酸ナトリウム 1.0 g を純水に溶解させて 250 mL の溶液とし, この溶液 1.0 mL

を純水で 100 mL まで希釈して, 40 mg L⁻¹ 標準液を作成する。

- (3) 実習用の未知試料として, L-グルタミン酸ナトリウム水溶液を当日もしくは前日に調製しておく。前日に調製する場合は冷蔵庫に保存する。濃度は 6.0~30 mg L⁻¹ の範囲で決定する (反応時の最終濃度で 3.0~15 mg L⁻¹)。
- (4) 作成した標準液を, 5 本のガラス製試験管 (内径 16 mm, 長さ 180 mm) にそれぞれ 0 mL (ブランク), 0.30 mL, 0.50 mL, 1.0 mL, 1.5 mL 入れ, 純水を追加して液量を全て 2.0 mL にする。
- (5) 未知試料 2.0 mL を 1 本のガラス製試験管 (内径 16 mm, 長さ 180 mm) に入れる。
- (6) 上記の試験管 6 本にそれぞれ 2.0 mL の反応液を加え, ふたをして十分に攪拌する。未知試料以外の試験管内の L-グルタミン酸ナトリウム濃度は 0, 3.0, 5.0, 10, 15 mg L⁻¹ となる。
- (7) 上記の試験管 6 本を沸騰水中で 13 分間加熱し, 耐熱性の手袋 (清浄な軍手など) を着用して十分に攪拌後, 速やかに溶液を吸光度セルに移す。

表 1 各種のニンヒドリン法の長所・短所の比較

改良ニンヒドリン法の提案者と特徴	長所	短所
Suetsugu & Kurahashi (2016) (本研究の手法) (高濃度フルクトース還元、急冷なし)	コスト、安全性	再現性
Wylie & Johnson (1962) (低濃度フルクトース還元、KIO ₃ 酸化)	安全性	分析時間、収率
Spackmann, Stein & Moore (1958) (塩化スズ還元、メチルセロソルブ溶解)	収率、再現性	コスト、安全性

(8) 加熱終了後 10~20 分後に波長 570 nm の吸光度を測定する。3.0 mg L⁻¹ の標準液については、波長 570 nm と 800 nm での吸光度を測定し、800 nm の吸光度が 570 nm の吸光度の 3%未満 (メスピペット・加熱時間・試薬純度等の誤差に由来するばらつきの総和が約 3%のため) に収まることを確認する。

(9) 上記の 0~15 m L⁻¹ 標準液の濃度と波長 570 nm の吸光度の関係を 2 次元グラフ (散布図) にプロットし、検量線を作成する。Microsoft Excel 等の表計算ソフトが利用できない場合は、方眼紙にプロットし、関数電卓等を用いて検量線を作成する。

(10) 上記の検量線から未知試料の濃度を求める。元の未知試料は 2 倍希釈されているため、検量線から求められた濃度を 2 倍する。

なお、上記の手順で標準試料 5 点、未知試料 1 点の分析を行った場合の消耗品費と光熱費の合計は 70 円程度となる。この実験でのコストを決める要因は試薬類よりも純水のグレードであるため、実習教育ではフィルタ付イオン交換水製造器等による水で検量線が作成可能であることを確認できれば、大幅なコスト削減が可能である。実習時間は上記の (4) ~ (8) を行う場合、およそ 1 時間である。

本研究の手法を既存のニンヒドリン法と比較して長所と短所を 5 項目の評価基準 (コスト、安全性、再現性、収率、分析時間) でまとめると、表 1 のようになるものと考えられる。本研究の手法の短所である不溶性粒子による吸光度の低下は、多量の不溶性粒子が光路部分に付着した場合に確率的に生じると考えられる (ただし、冷却後の攪拌を行わない場合には、著者らはこの問題を 1 度も経験していない)。そのため、多数の実習者が確実に結果を出すことが

目標の場合には、収率の低下があっても、反応後の純水希釈を行うか、反応液の比率を抑える方が望ましいものと考えられる。

参考文献

- [1] 小澤真一, 宮野博, 伊藤正人, 2015, S.I. News, 58 巻, 4968-4977 頁.
- [2] Stanford Moore, and William H. Stein, 1948, J. Biol. Chem., vol.176, pp.367-388.
- [3] Nobelprize.org, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1972/ (2015/10/9 閲覧).
- [4] 藤井 宏治, 阿部 高行, 日比野 和人, 伊藤 元貞, 井口 奨太, 北山 哲史, 中原 弘明, 水野 なつ子, 関口 和正, 2013, 日本法科学技術学会誌, 18 巻, 125-134 頁.
- [5] 田中芳和, 2008, 化学と教育, 56 巻, 168-169 頁.
- [6] Carey B. Bottom, Samir S. Hanna, and Donald J. Siehr, 1978, Biochem. Education, vol.6, pp.4-5.
- [7] E.W. Yemm, E.C. Cocking, R.E. Ricketts, 1955, Analyst, vol.80, pp.209-214.
- [8] Kevin, N. Pearce, D. Allas Karahalios, and M. Friedman, 1988, J. Food Sci., vol.5, pp.432-435.
- [9] Darrel H. Spackman, William H. Stein, and Stanford Moore, 1958, Anal. Chem., vol.30, pp.1190-1206.
- [10] S. Lie, 1973, J. Inst. Brew., vol.79, pp.37-41.
- [11] Edward B. Wylie, and Marvin J. Johnson, 1962, Biochim. Biophys. Acta, vol.59, pp.450-457.
- [12] Mark H. Kleinman, João P. Telo, Abel J.S.C. Vieira, Cornelia Bohne, and José C. Netto-Ferreira, 2003, Photochem. Photobiol., vol.77, pp.10-17.
- [13] 和光純薬工業株式会社, 製品詳細情報 (ニンヒドリンスプレー), <http://www.siyaku.com/uhShs.do?now=1444370974226> (2015/10/9 閲覧).
- [14] Ya Pin Lee, and Tsunekazu Takahashi, 1966, Anal. Biochem., vol.14, pp.71-77.

- [15] Donald D. Van Slyke, Robert T. Dillon, Douglas A. MacFadyen, and Paul Hamilton, 1941, *J. Biol. Chem.*, vol.141, pp.627-669.
- [16] 環境省, 一律排水基準, <http://www.env.go.jp/water/impure/haisui.html> (2015/10/9 閲覧)
- [17] 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部, 毒物及び劇物取締法, 別表第二94号, <http://www.nihs.go.jp/law/dokugeki/dai2-geki.pdf> (2015/10/16 閲覧).
- [18] Leslie John Pitts, Michael Gerard Pallot, and Philip Jones, November 2013, U.S. patent 14/086,236.
- [19] Sadaji Yokoyama, and Jun-ichi Hiramatsu, 2003, *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 95, pp.204-205.
- [20] Theodore Koppanyi, A. Earl Vivino, and Fletcher P. Veitch Jr., 1945, *Science*, vol.101, pp.541-542.
- [21] Alexander Benjamin, Greta Landwehr, and Arnold M. Seligman, 1945, *J. Biol. Chem.*, vol.160, pp. 51-59.
- [22] Walter Troll, and R. Keith Cannan, 1953, *J. Biol. Chem.*, vol.200, pp.803-811.
- [23] Michael V. Pickering, October 1979, U.S. patent 06/086,234.
- [24] N.G. Anderson, R.H. Stevens, and J.W. Holleman, 1968, *Anal. Biochem.*, vol.26, pp.104-117.
- [25] 味の素株式会社, <http://www.ajinomoto.co.jp/foodservice/products/catalogue/detail.aspx?ProductCode=A110906103#seg04> (2015/10/30 閲覧).
- [26] Douglas A. MacFadyen, 1950, *J. Biol. Chem.*, vol.186, pp.1-12.
- [27] Donald C. Wigfield, Gerald W. Buchanan, and Stephen M. Croteau, 1980, *Can. J. Chem.*, vol.58, pp.201-205.
- [28] Mendel Friedman, 2004, *J. Agric. Food Chem.*, vol.52, pp.385-406.
- [29] Zaheer Khan, 2000, *Indian J. Chem.*, vol.39, pp.1019-1023.
- [30] Albert E. Sobel, Albert Hirschman, and Lottie Besman, 1945, *J. Biol. Chem.*, vol.161, pp.99-103.
- [31] Pickering Laboratories, Inc., <http://pickeringlabs.cn/support/rbs/rb12.asp> (2015/10/30 閲覧).