



Title	- アミノ酸定量法としてのNinhydrin法に於けるtoluene及びthymolに依る阻害について
Author(s)	長尾, 清
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 3(4): 265-268
Issue Date	1953-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/22766
Type	bulletin
File Information	3(4)_P265-268.pdf



[Instructions for use](#)

α-アミノ酸定量法としてのNinhydrin法に於ける toluene 及び thymol に依る阻害について

長 尾 清 (水産細菌学教室)

STUDIES ON THE INHIBITORY OF TOLUENE AND THYMOL UPON THE DETERMINATION OF α-AMINO ACIDS BY THE NINHYDRIN METHOD

Kiyoshi NAGAO

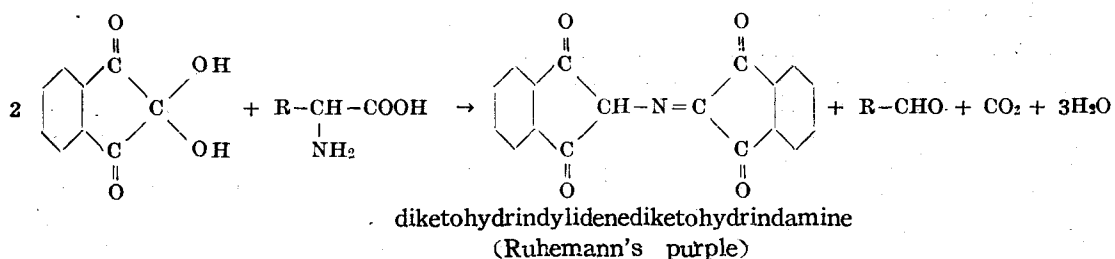
(Laboratory of Bacteriology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

The conditions for determining α-amino acids by the ninhydrin method were studied. The following condition gave satisfactory results. Twenty mg. ninhydrin was used for 1~4 mg. amino acids, for 10 min. at 110~115°C. When ninhydrin method was adopted for the determination of α-amino acids, toluene and thymol in sample were served to inhibit the evolution of CO₂.

総アミノ酸定量法としては、フォルモール滴定法、アセトン滴定法、氷醋酸法等の滴定法その他、Folinの比色法、亜硝酸ソーダによる Van Slyke 法及び ninhydrin 法等をあげる事が出来る。

フォルモール滴定法ではガラス電極を用いて電圧滴定⁽¹⁾すれば一番よく、0.1%位の誤差範囲で5~15rのアミノ酸量でも可能である。アセトン滴定法、氷醋酸法は0.1~0.2g程度のアミノ酸で行うのが普通である。Folinの比色法は鋭敏で迅速でよいが、アミノ酸以外の物質例えば芳香属の一级アミンはアミノ酸と同程度に呈色し、アンモニア、一・二級の脂肪属のアミン等に依り阻害される。Van-Slyke法も簡単であるが proline, oxyproline の全窒素は Van Slyke 法に依つては反応しない。Van Slyke 検圧法では一般に1~2%の誤差がある。

α-アミノ酸を ninhydrin の過剰と水溶液中で煮沸すると夫々のアミノ酸に対応するアルデヒドを生じこの際定量的に炭酸ガスを生ずる⁽²⁾。この際の反応式は Ruhemann⁽³⁾, Grassmann 及び Von Arnim⁽⁴⁾, Mac Fadyen⁽⁵⁾⁽⁶⁾に依り次の様に示されている。



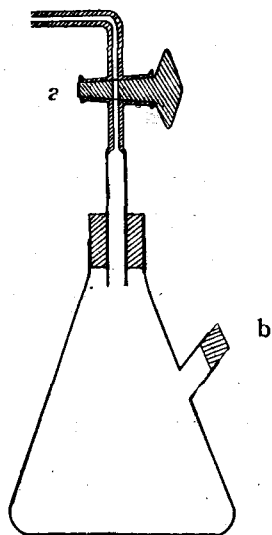
-COOH に対してα位の-NH₂及びNH(CH)-が反応する⁽⁶⁾ので、proline, oxyproline も定量的に反応する。β位の-NH₂は反応がおさえられるので glutamic acid からは1分子の炭酸ガスが出るのみで、cystine は -COOH に対して α位の-NH₂基を2個もつているので2分子の炭酸ガスを出す⁽⁶⁾。aspartic acid の場合は ninhydrin に依り酸化されて malonyl aldehyde を生じ、之が直ちに分解され脱炭酸されるので結局2分子の炭酸ガスを出す⁽⁶⁾。peptide は反応しない⁽⁶⁾から遊離のアミノ酸だけ区別出来る点で現在最も便利で鋭敏な方法である。最近 Moubasher 及び Sina⁽⁷⁾は ninhydrin

の代りに *Peri-Naphthindan 2,3,4 trione hydrate* を用い α -アミノ酸と反応して定量的に炭酸ガスを生成する事を報告している、この方法では $\pm 4\%$ 程度の誤差がある。

著者は細菌菌体より蛋白質分解酵素液を調製し、この酵素の活性を測定する為に(基質+緩衝液+酵素液+防腐剤)の混液を恒温に置き、 α -アミノ酸量の変化を ninhydrin 法に依り測定した。防腐剤として toluene 及び thymol を使用したが、試料中に toluene 及び thymol が入っていると炭酸ガスの発生を阻害する事を知つた。以下著者は Christensen, West 及び Dimick 氏の測定法²⁾ に基いて測定条件を検討しやゝ改良を加えた。又上述の如く ninhydrin 法に於ける toluene 及び thymol に依る阻害について実験結果を報告する。

I. ninhydrin 法の測定条件の検討

(1) 測定装置：Christensen 氏等の報告した装置^(2),10) に準じ之を若干改良した。吸収管は Fig.1



の如く改良した。即ち活栓 a 部を吸収管より取り外す事なく、b 部のゴム栓をはずし、こゝよりマイクロビュレットにて 0.03N. HCl により滴定し、大気中の炭酸ガスの吸収を出事だけ防止した。又 Christensen 氏等は吸収管に一定容の $Ba(OH)_2$ 溶液を CO_2 free の状態に入れる為に特別な装置を考案したが著者は自動マイクロビュレットを使用した。

(2) ninhydrin の使用量：Christensen 氏等はアミノ酸 1~4 mg に対して 1 cc 中に ninhydrin 30mg を含む溶液 1 cc 使用している。ninhydrin は割合に高価な薬品であるし、又 1 cc 中に ninhydrin 30mg を含む溶液は常温に於て過飽和の状態であるので、ninhydrin の使用量を出来るだけ節約しようとの意図のもとに ninhydrin の使用量を比較検討した。即ち上記の装置を使用し、Christensen 氏等の方法に依り測定した。1~4mg のアミノ酸(水 2 cc 中に溶解)に対し ninhydrin は 1 cc 中に 15mg, 20mg 及び 30mg を含む溶液夫々 1 cc 使用した。反応温度 $115^\circ C$, 反応時間 10 分、実験結果は Table 1 に示す通りである。

Fig. 1. Absorption flask.

Table 1. The effect of quantity of ninhydrin upon the determination of α -amino acids by the ninhydrin reaction

Amino acid	Quantity analysed mg.	Recovery calculated from CO_2 evolved%		
		15 mg. ninhydrin used	20 mg. ninhydrin used	30 mg. ninhydrin used
glycine	3.41	89.2	93.8	99.2
valine	1.35	83.5	99.7	99.7
cystine	2.73	83.4	100.9	100.5
methionine	2.25	49.2	102.7	102.7
tryptophane	3.25	60.6	99.2	99.2
arginine	2.85	87.1	99.8	99.8
histidine	4.15	92.3	100.0	100.0
proline	2.55	88.7	102.3	102.3

(3) 反応温度と反応時間：Christensen 氏等は 反応管に試料(2 cc 中に 1~4mg のアミノ酸を含む溶液)と ninhydrin 溶液 1 cc と飽和 KH_2PO_4 溶液 1 cc を加え磷酸浴上で $110\sim 115^\circ C$, 15 分間反応させている。この反応温度と反応時間を検討してみた。実験結果は Table 2 に示す通りである。但し ninhydrin は 1 cc 中に 20mg を含む溶液 1 cc を使用した。

Table 2. The effect of the reaction temperature and time upon the determination of α -amino acids by the ninhydrin reaction

Amino acid	Quantity analysed mg.	Recovery calculated from CO ₂ evolved%		
		70~85°C 10 min.	85~115°C 10 min.	110~115°C 10 min.
glycine	3.41	62.5	97.2	98.8
valine	1.35	88.3	89.5	99.7
cystine	2.73	70.8	79.8	100.9
methionine	2.25	85.8	94.4	102.7
tryptophane	3.25	92.6	92.6	99.2
arginine	2.85	68.5	78.5	99.8
histidine	4.15	90.7	92.9	100.0
proline	2.55	95.2	97.5	102.3

Table 3. The inhibitory action of toluene upon the determination of α -amino acids by the ninhydrin reaction

Amino acid	Quantity analysed mg.	Quantity of toluene cc	Recovery calculated from CO ₂ evolved
cysteine	1.92	0.05	59.4
methionine	2.25	0.1	55.2
tryptophane	3.25	0.1	76.8
cystine	2.73	0.1	94.6
arginine	2.85	0.1	102.4
lysine	3.15	0.1	30.5
glutamic acid	2.55	0.1	82.9
glycine	3.41	0.1	64.1
valine	1.35	0.1	87.7
histidine	4.15	0.1	76.8

Table 4. The inhibitory action of thymol upon the determination of α -amino acids by the ninhydrin reaction

Amino acid	Quantity analysed mg.	Quantity of thymol mg.	Recovery calculated from CO ₂ evolved
cysteine	1.92	0.1	47.7
methionine	2.25	1.0	55.2
tryptophane	3.25	1.0	29.4
cystine	2.73	1.0	85.8
arginine	2.85	1.0	53.5
lysine	3.15	1.0	48.8
glutamic acid	2.55	1.0	45.9
glycine	3.41	1.0	87.8
valine	1.35	1.0	83.0
histidine	4.15	1.0	80.4

2. α -アミノ酸を ninhydrin 法に依り測定する際、試料中に toluene 及び thymol が入っている

以上の実験結果より, ninhydrin の使用量は1~4mg のアミノ酸に対して1 cc中に ninhydrin 20mg を含む溶液1 ccにて足りる。勿論試料アミノ酸の含有量が多い時は反応を完全に行わせる為には ninhydrin 量も多くし, Ba(OH)₂ 溶液も多く必要であるが, 適宜試料を稀釈して用いればよい。反応温度110~115°C, 反応時間10分が適当である。

II. ninhydrin 法に於ける toluene 及び thymol に依る阻害について

α -アミノ酸を ninhydrin 法に依り測定する際に試料中に toluene 及び thymol が入っていると吸収管中のバリクに吸収される炭酸ガスの量は理論値よりも小なる値となる。即ちこの様な場合は定量的に炭酸ガスが生成されない。

ninhydrin 反応がいかなる理由により toluene 及び thymol にて阻害されるか不明であるが, 恐らく benzene 核についている -CH₃ 基の行動が主な原因になっているものと考察される。実験結果は Table 3 及び Table 4 に示す通りである。

要 約

1. ninhydrin 法に依る α -アミノ酸の測定条件を検討した結果 1~4mg のアミノ酸に対して ninhydrin 20mg を用い, 110~115°C, 10 分の反応が適当である。

と炭酸ガスの発生を阻害する。

文 献

- (1) M. S. Dunn and A. Loshakoff : J. Biol. Chem., 113, (1936), 359.
- (2) Christensen, West and Dimick : J. Biol. Chem., 137, (1941), 735.
- (3) S. Ruhemann : J. Chem. Soc. (Trans.), 99, (1911), 792, 1486.
- (4) Grassmann, W. and Von Arnim, K. : Ann. Chem., 509, (1934), 288.
- (5) D. A. Mac Fadyen : J. Biol. Chem., 141, (1941~1942), 671.
- (6) M. F. Mason : Biochem. J., 32, (1938), 719.
- (7) R. Moubasher and A. Sina : J. Biol. Chem., 180, (1949), 681.
- (8) D. A. Mac Fadyen : J. Biol. Chem., 186, (1950), 1.
- (9) D. A. Mac Fadyen : J. Biol. Chem., 186, (1950), 13.
- (10) Weat, Christensen and Rinehart : J. Biol. Chem., 132, (1940), 681.

(水産科学研究所業績 第138号)