わい他

ワールブルグ検圧計によるグルタミン酸の 分析精度ならびに阻害物質に関する研究

瀬戸 寿太郎*

ワールブルグ検圧計を用いて微量のガスの発生または吸収の量を測定する際生ずる測定値の誤差について、その誤差因子と大きさを統計的に求め、測定誤差を重点的に小さくする有効な方法を示した。経験によれば容器1本の測定から得られる測定値の誤差は $\pm 2\%$ であるが、グルタミン酸のように高度の分析精度を要求する試料の場合、測定精度および測定値の偏りを $\pm 0.5\%$ 以下に下げなければならないことが多い。この場合、著者は単に測定本数を増して平均値をとって求める方法によらずに、測定平均値の精度を算出する実験式を誘導して、高精度の測定値を求められるようにし、さらに図表によって容易にこれを求められるようにした。なお、この図表から所要測定精度に対応する最小にしてかつ十分な所要測定セット数(測定回数)を決定できるようにした。また容器間の差を相殺するために新測定法を工夫し、これにより複雑な容器定数を定める操作を省略することができた。さらに分析精度に影響をおよぼす阻害物質についての検討もおこなった。

1 緒 言

ワールブルグ検圧計は手軽で比較的正確な測定値が得られるので、近来多方面に利用され、とくにアミノ酸混合物中のグルタミン酸の定量には有力な武器となっている。しかし、比較的正確な値が求められるとはいえ、一般に1本の測定から求められる測定値は経験によれば相対的に $\pm 2\%$ の測定誤差をとまう。また Schales¹⁾は高純度のL-グルタミン酸をL-グルタミン酸炭酸酵素を使用して測定した結果が理論値に対し $102.6 \pm 2.5\%$ であったと報告している。奥貫ら²⁾も同様な実験によってそれが99%および100%であったと報告している。

従来おこなわれているワールブルグ検圧法においては8本1組(1セット)とし、そのうち温圧計を1本、他の7本の容器には試料溶液を組み入れて測定している。この際生ずる誤差因子は容器定数を決めるときに入る誤差、測定中の気圧変化ならびに温度変化にもとづく間接的影響およびマノメーターの読み誤差などをあげることができる。また、容器定数誤差、同一容器の長期間使用による容器定数の経時変化にもとづく誤差、酵素の力価の変移および製造時を異にした酵素の使用などによるグルタミン酸の反応率の異同なども、すべて測定値に対する偏りの原因となる。しかし、グルタミン酸のように高度の分析精度を要求する試料の場合、これらの測定誤差および偏りは少なくとも $\pm 0.5\%$ 以下に下げなければなら

ぬことが多く、一般には同一試料について測定本数を増すことにより、その平均値を採ることがおこなわれている。著者はこの場合測定誤差については、その誤差因子とその大きさを求めることによって誤差を重点的に小さくする有効な測定法を考案した。さらに測定値の偏りについてはグルタミン酸標準溶液(1.5mg/0.5ml)を同一セット内に組み入れ、同時に測定することによって上記偏りを無くすようにした。まずこの測定法におけるセット内およびセット間の誤差因子の大きさを統計的に求め、これにより所要精度を満足する最小にして、かつ十分なセット内容の組み入れ方および所要セット数(所要測定回数またはくりかえし実験回数)を見出す実験式を誘導した。しかし、この式の計算はやや面倒なため、さらにこの式の値を簡便に求められる図表を作成した。

なお一般に、容器定数はFig. 1のようにマノメーターと容器を連結したときのマノメーターの一定目盛までの容積から求められ、水銀法³⁾が広く利用されているがこれらの操作はきわめて複雑なうえ、ブンゼン係数を用いて計算するために誤差(偏りの原因)が入る。このほかグルタミン酸標準溶液を使用し、多数(20~30回)の測定をおこない容器定数をマノメーターの読み(単位mm)で表示する方法もあるが、これもなかなか面倒である。加うるに、前記いずれの方法も容器ごとにあらかじめ全部の容器について複雑な容器定数を厳密に求めておかなければならないうえに、容器ならびに酵素の経時変化をチェックしなければならない欠点がある。著者はこれらの

* 味の素(株)川崎工場：川崎市鈴木町

Fig. 1 マノメーターおよび容器

容器間の差を相殺するために、一つのセット内に一定に配置した容器のなかにグルタミン酸標準溶液および試料溶液（被検溶液）を満たして測定をおこなったのち、容器を空にし、ついで、これらの容器にそれぞれ他の種類（たとえば試料溶液を入れた容器にはグルタミン酸標準溶液を、グルタミン酸標準溶液を入れた容器には試料溶液を入れる）の溶液を入れかえて同様の操作をおこない、これを所要精度に応じた所要測定回数くりかえすことによって、容器定数を決める面倒な操作を省略することができた。

2 実 験

2.1 操 作

ワールブルグ検圧計は1セット8本組を使用し、主室、副室、側室は Fig. 2 のような容器を用いた。

この容器の主室には酵素のリン酸緩衝液 (Na_2HPO_4 4.0 g, KH_2PO_4 12.1 g $\rightarrow$ 1 l) の懸濁液 2 ml, 副室に

Fig. 2 容 器

主室：酵素懸濁液 2ml 側室：2N 硫酸 0.2ml
副室：グルタミン酸標準溶液または試料溶液 0.5ml

は標準溶液の場合はグルタミン酸を、試料溶液の場合は試料をそれぞれ 0.5 ml, 側室には 2N 硫酸 0.2 ml を入れる。反応は恒温槽 (37°C) 中で酵素懸濁液とグルタミン酸標準溶液または試料溶液を混合し、反応終了後 2N 硫酸を添加して溶液中の残留炭酸ガスを追出す。

2.2 容器定数の決定

1セット内に温圧計1本およびグルタミン酸標準溶液 (1.5mg/0.5 ml) 7本を組みこみ 30 回測定して求めた (単位 mm)。

2.3 温圧計 (thermobarometer) の読み (mm) のバラツキ

セット内のバラツキをみるために1セット8本全部を温圧計としてそのバラツキを測定した。なおこの場合は酵素を用いずに主室にリン酸緩衝液 2 ml のみを入れ、測定精度の信頼性を高めるため実験を 10 回くりかえした。

2.4 測定法およびデータのとり方

上記の方法によってあらかじめ求めた容器定数既知の容器を使用して、1セット8本のうち1本を温圧計とし、3本をグルタミン酸標準溶液、他の4本を同一の試料溶液とした。温圧計1本は位置を固定し、他の7本の配置はランダムに選り測定した。同一試料について同様の測定を3~11セット(3~11回)くりかえした (Fig. 3 参照)。

Fig. 3 セット内容器の比較配置図

- 試料を入れた容器
- 酵素のリン酸緩衝液の懸濁液を入れた容器(温圧計)
- ◎ グルタミン酸標準溶液を入れた容器(ランダム配置)

ここで3本のグルタミン酸標準溶液を無視すれば常法の4本の測定値がえられ、試料のグルタミン酸純度は (1) 式であらわされる。

また3本のグルタミン酸標準溶液を入れて考えたときは (2) 式のようなになる。

(2) 式において $\sum K_j / \sum x_j$ は (1) 式の補正係数とみなせる。

Table II 新法と常法のセット内測定値の範囲比較表 ($n=4$, 単位%)

No.	新法Rx	常法Ry	No.	新法Rx	常法Ry	No.	新法Rx	常法Ry	No.	新法Rx	常法Ry	
1	1.54	1.54	52	0.60	0.61	103	1.83	1.86	154	1.68	1.68	
2	1.97	1.79	53	1.45	1.41	104	0.83	0.83	155	1.84	1.80	
3	1.24	1.22	54	2.57	2.53	105	1.21	1.21	156	2.21	2.21	
4	2.44	2.40	55	1.99	1.97	106	1.61	1.58	157	2.54	2.47	
5	2.05	2.03	56	1.49	1.49	107	0.91	0.90	158	1.41	1.36	
6	0.61	0.61	57	1.04	1.06	108	0.80	0.79	159	1.38	1.34	
7	1.71	1.71	58	1.88	1.84	109	1.37	1.37	160	1.50	1.49	
8	0.90	0.90	59	1.32	1.31	110	0.99	0.98	161	2.92	2.88	
9	2.88	2.88	60	1.18	1.17	111	0.90	0.90	162	1.30	1.29	
10	0.47	0.50	61	0.68	0.68	112	2.00	2.00	163	0.68	0.68	
11	0.69	0.69	62	1.37	1.35	113	2.33	2.33	164	0.61	0.60	
12	1.07	1.07	63	1.83	1.83	114	0.72	0.73	165	1.77	1.74	
13	0.60	0.58	64	1.47	1.45	115	0.76	0.76	166	1.66	1.62	
14	1.21	1.19	65	0.95	0.94	116	0.28	0.28	167	1.77	1.75	
15	2.40	2.35	66	2.04	2.02	117	1.85	1.85	168	2.50	2.46	
16	2.09	2.09	67	0.18	0.18	118	0.84	0.82	169	0.95	0.94	
17	1.67	1.62	68	0.19	0.19	119	1.46	1.45	170	0.84	0.82	
18	2.01	1.98	69	1.34	1.34	120	2.88	2.91	171	0.71	0.71	
19	0.87	0.86	70	1.80	1.78	121	2.49	2.47	172	0.71	0.70	
20	1.64	1.64	71	1.59	1.59	122	1.46	1.44	173	0.91	0.91	
21	0.54	0.52	72	0.51	0.51	123	1.09	0.96	174	2.04	2.04	
22	2.06	2.05	73	0.69	0.69	124	1.24	1.22	175	0.84	0.87	
23	0.65	0.67	74	1.19	1.18	125	1.87	1.83	176	1.63	1.68	
24	0.87	0.88	75	1.60	1.60	126	1.47	1.45	177	2.54	2.46	
25	1.58	1.59	76	1.00	0.99	127	0.95	0.95	178	2.08	2.05	
26	1.67	1.66	77	0.62	0.61	128	2.91	2.87	179	0.80	0.80	
27	1.56	1.54	78	1.88	1.86	129	1.13	1.11	180	1.48	1.44	
28	2.71	2.66	79	0.73	0.74	130	2.79	2.74	181	2.45	2.43	
29	1.12	1.11	80	1.55	1.54	131	1.74	1.71	182	1.38	1.34	
30	1.69	1.68	81	0.92	0.93	132	1.14	1.12	183	1.35	1.33	
31	1.51	1.51	82	2.03	2.00	133	0.90	0.89	184	0.66	0.64	
32	0.55	0.55	83	1.03	1.03	134	0.61	0.61	185	1.21	1.20	
33	1.68	1.67	84	1.19	1.18	135	1.86	1.86	186	2.18	2.18	
34	1.08	1.07	85	1.32	1.32	136	1.24	1.21	187	2.62	2.53	
35	1.22	1.20	86	0.63	0.62	137	1.81	1.81	188	0.42	0.41	
36	1.04	1.07	87	0.76	0.76	138	2.50	2.46	189	0.78	0.77	
37	2.73	2.67	88	1.16	1.15	139	2.83	2.80	190	1.11	1.11	
38	0.75	0.75	89	0.57	0.57	140	1.93	1.89	191	2.51	2.48	
39	1.81	1.81	90	1.56	1.55	141	0.72	0.71	192	2.61	2.59	
40	1.79	1.79	91	2.03	2.02	142	0.67	0.66	193	2.78	2.68	
41	1.09	1.08	92	2.05	2.03	143	1.02	1.01	194	0.41	0.40	
42	0.95	0.94	93	2.25	2.23	144	1.59	1.59	195	1.33	1.32	
43	1.04	1.03	94	1.16	1.14	145	1.05	1.06	196	1.78	1.71	
44	2.11	2.10	95	2.08	2.06	146	1.71	1.65	197	1.26	1.23	
45	1.89	1.87	96	1.63	1.61	147	2.08	2.08	198	1.22	1.21	
46	1.71	1.70	97	0.78	0.78	148	2.32	2.29	199	1.10	1.07	
47	1.69	1.67	98	1.01	1.02	149	0.42	0.43	200	1.45	1.46	
48	1.52	1.50	99	1.01	1.01	150	1.19	1.18	201	1.40	1.43	
49	0.71	0.71	100	1.73	1.70	151	0.37	0.37	202	0.93	0.93	
50	1.05	1.04	101	0.53	0.53	152	1.33	1.29	203	2.28	2.22	
51	2.51	2.51	102	1.58	1.59	153	1.19	1.17	204	2.08	2.05	
										平 均	1.433	1.419

一般に V_x および V_y は次のようにあらわされる。

$$V_x = V_{bx} + \frac{V_{ux}}{4} \quad \dots\dots\dots (11)$$

$$V_y = V_{by} + \frac{V_{uy}}{4} \quad \dots\dots\dots (12)$$

ここで V_{bx} および V_{by} は新法および常法のセット間バラツキである。

(11) 式および (12) 式の V_x , V_{ux} , V_y , V_{uy} に前述の不偏推定量 (9), (6), (10), (8) の値を代入すると次のようになる。

Table III セット内平均値のセット間の範囲の比較表 (単位 %)

No.	セ ツ ト 数 k	新法 $R\bar{x}$	常法 $R\bar{y}$	No.	セ ツ ト 数 k	新法 $R\bar{x}$	常法 $R\bar{y}$
1	9	1.115	2.400	17	4	0.325	1.515
2	7	1.365	2.030	18	5	0.770	0.405
3	7	1.020	2.120	19	5	1.625	1.990
4	9	2.910	2.140	20	5	1.890	2.270
5	8	1.300	2.965	21	6	2.085	4.065
6	7	1.395	1.445	22	5	1.055	1.685
7	7	0.980	2.720	23	6	1.020	2.560
8	11	1.355	2.170	24	4	0.690	1.070
9	7	1.205	1.020	25	7	1.565	2.500
10	7	1.680	3.930	26	3	1.440	0.840
11	10	1.650	2.365	27	9	1.135	3.640
12	7	1.485	1.515	28	5	1.185	2.500
13	7	1.665	2.265	29	5	1.220	2.000
14	7	1.315	1.705	30	5	1.320	2.400
15	7	2.225	2.715	31	6	1.835	3.025
16	7	0.995	3.275	平均	6.6	1.407	2.234

Table IV 温圧計, 新法および常法の測定値の精度比較表

	温圧計	新 法	常 法
セット内 $\left\{ \begin{array}{l} V_w \\ \sqrt{V_w} \end{array} \right.$	0.510 0.713	0.489 0.699	0.477 0.691
セット間 $\left\{ \begin{array}{l} V_b \\ \sqrt{V_b} \end{array} \right.$		0.160 0.400	0.592 0.769

$$V_{bx}=0.160 \quad \dots\dots\dots (13)$$

$$V_{by}=0.592 \quad \dots\dots\dots (14)$$

以上を表示すると Table IV のとおりである。

新法と常法の V_w の値はほとんど同一で有意差が認められないので $(V_{wx}+V_{wy})/2=0.482$ を V_w の値と見なしてよい。したがって $\sqrt{V_w}$ の値として 0.695 を使用しう。

また V_{bx} と V_{by} の有意差検定をおこなうにあたり, それぞれの自由度は Satterthwaite⁴⁾ の方法によって求めたところ,

$$\phi_{bx}=47, \quad \phi_{by}=105$$

$$F_0 = \frac{V_{by}}{V_{bx}} = \frac{0.592}{0.160} = 3.7$$

$$F(40, 60; 0.005) = 2.18$$

であるから $F_0=3.7$ は両側 1% 有意水準で有意である。すなわち新法は常法よりも明らかにセット間精度はよくなっている。

5 考 察

a) 新法と常法におけるセット内バラツキ (V_w) はデータのとり方から当然同一になるはずであり, また実際にも (6) 式および (8) 式からわかるようにほとんど同一

値である。したがってその値は平均して $V_w=0.482$ と見なしてよい。

b) (4) 式の温圧計の同一セット内バラツキ $V_{T.B.}=0.510$ と $V_w=0.482$ を比較すると

$$F_0 = \frac{V_{T.B.}}{V_w} = \frac{0.510}{0.482} = 1.06, \quad F(60, \infty; 0.025) = 1.39$$

となり有意な違いはなく, したがって同一のバラツキと見ることができる。よってセット内のバラツキはすべて温圧計の誤差原因と同様の因子であることがわかった。

c) 温圧計のバラツキの実験には酵素を使用しなかった。かつ V_w と $V_{T.B.}$ の間に有意な違いがないので酵素によるセット内のバラツキにあたえる影響は無視できる。

d) 常法および同一セット内にグルタミン酸標準溶液 3 本を組み入れた新法についてセット間バラツキ V_b を比較すると, Table IV に見るように新法は常法の 1/3.7 に減少している。この事実は次のように説明できる。

常法ではセット内に 1 本の温圧計を基準にして補正しているため, もし仮に第 1 セット目の測定で温圧計が高く偏っている場合, 他の試料溶液の測定値はすべて低く偏る。逆に第 2 セット目の測定を第 1 セット目と同様におこなったとき, 温圧計が低く偏っているとすると, 試料溶液はその全体が高く偏り, 温圧計がセット間の変動に大きく影響をおよぼしていることがわかる。すなわち同一セットに温圧計を 3 本使用してその平均値をとり, 他の試料溶液を補正すれば, 温圧計の変動は分散の値で 1/3 に減少するから, 試料溶液のセット間の変動も 1/3 になることは明らかである。

この場合温圧計の代りにグルタミン酸標準溶液を使用しても変りはない。またこの事実は, 使用酵素を異にしてグルタミン酸の反応率が異なっているときでもそのまま適用できる。したがって同一セット内にグルタミン酸標準溶液を 3 本組んだ場合は, セット間変動は 1/3 になるはずであって, これは Table IV の 1/3.7 に減少している事実とよく一致する。以上によりセット間のバラツキの主要原因は, 温圧計あるいはグルタミン酸標準溶液の変動によるものであることがわかった。

e) d) から容器定数の決定されていない容器を用いて測定することも可能となる。すなわち, セット内のいく本かをえらびグルタミン酸標準溶液用に, 残りの容器は試料溶液用に供して測定する。容器間の差を相殺するために試料溶液に用いた容器とグルタミン酸標準溶液に用いた容器とは交互に用いて測定をおこない, 次式によって試料中のグルタミン酸量を求めることができる。

著者はこの方法を採用して好成績をあげている。

$$\text{グルタミン酸}(\%) = \frac{\sum x_i}{\sum y_i} \times \frac{\text{標準溶液中のグルタミン酸 (mg/0.5 ml)}}{\text{試料 (mg/0.5 ml)}} \times 100 (\%) \quad \dots\dots\dots (15)$$

x_i, y_i : 試料溶液およびグルタミン酸標準溶液それぞれのマンメーターの読み (mm)

この方法は測定個数が大きくなるので、高精度を必要とするときには非常に有効である。ただし、ここで注意すべきことは温圧計を入れないので、反応中気圧および恒温槽の温度変化によるマンメーターの読みの変化を直接見るができない。しかし必要あれば前記測定法をおこなうとき温圧計1本を組み入れることによって解決できる。一般に常時使用している容器であれば、グルタミン酸標準溶液によるマンメーターの読みの異常は容易に発見できる。

f) Table IV の実験データを基礎として新法と常法の測定平均値の精度を標準偏差で比較すると次のようになる。

$$\text{新法の標準偏差 } \sigma_1 = \sqrt{\frac{\sigma_w^2}{k \cdot n} + \frac{\sigma_b^2}{k \cdot m}} \quad \dots\dots\dots (16)$$

$$\text{常法の標準偏差 } \sigma_2 = \sqrt{\frac{\sigma_w^2}{(A-1)k} + \frac{\sigma_b^2}{k}} \quad \dots\dots\dots (17)$$

m : セット内のグルタミン酸標準溶液本数

n : セット内の試料溶液本数

k : セット数

σ_w^2 : セット内のバラツキを示し、その値は実験によって得た不偏推定量 $V_w=0.482$ を用いることができる

σ_b^2 : セット間のバラツキを示し、その値は実験によって得た不偏推定量 $V_b=0.592$ を用いることができる

A : 1 セット内の容器の本数, $A=m+n=8$

ここで $\sigma_1=\sigma_2$ になる条件を求めると、 $n=A-1$ すなわち $m=1$ のときである。この場合常法の温圧計をグルタミン酸標準溶液に置き換えたのみで精度に変化はない。 $m>1$ では $\sigma_1<\sigma_2$ である。したがって新法の方がいかなる場合にも有利である。つぎに σ_1 が最小となるための n の条件式を (16) 式から求め、これに $A=8$, $\sigma_w=\sqrt{0.482}$, $\sigma_b=\sqrt{0.592}$ を代入し整理すると次のようになる。

$$n = \frac{A \cdot \sigma_w}{\sigma_w + \sigma_b} \approx 4$$

$$\text{すなわち } m = A - n = 4 \quad \dots\dots\dots (18)$$

したがって試料溶液とグルタミン酸標準溶液が同本数のとき精度がもっともよいことになる。

g) (16)式から精度を計算するのはかなり面倒であるので、これをグラフに表わした (Fig. 4~7)。

グラフの使用方法は、たとえば $m=2$ の方法で同一セット内で同一試料を 6 本に組み、これを 3 セット (3 回) くりかえす場合、Fig. 5 を用いて $n=6$ から原点までの線と、 $k=3$ の縦の線との交点から原点までの距離が σ になる。信頼区間は $\pm u\sigma$ で表わされ、信頼度 95% では $\pm 1.96\sigma$ となる。

Fig. 4 では、 $m=1$ すなわちグルタミン酸の標準溶液が 1 本のとき、または常法のときは $n=1\sim 7$ まで測定できる。

以下 $m=1\sim 4$ の測定法を比較すると Table V のとおりである。

Table V m, n による測定精度の比較

m	n	k	σ	$\pm 1.96\sigma(\%)$
1	7	10	0.25	± 0.5
2	6	10	0.20	± 0.4
3	5	10	0.175	± 0.35
4	4	10	0.16	± 0.32

すなわちセット内のグルタミン酸標準溶液の本数 m のとり方によって精度は変化している。

$\pm 0.5\%$ と $\pm 0.32\%$ を比較すると、その差はわずかに $[0.18\%]$ であるが、 $m=1$ の方法で $\pm 0.32\%$ まで精度を上昇せしめるための所要測定回数は $(0.5/0.32)^2 \approx 2.5$ 倍にもおよぶことになる。

Fig. 4 $\sigma = \sqrt{\sigma_w^2/k \cdot n + \sigma_b^2/k \cdot m}$ の式における $m=1, n=1\sim 7$ のグラフ

Fig. 5 $m=2$, $n=1\sim6$ のグラフ Fig. 6 $m=3$, $n=1\sim5$ のグラフ

h) なお、ワールブルグ検圧計によってアミノ酸混合物（とくにグルタミン酸発酵法による粗グルタミン酸）中の L-グルタミン酸を定量する場合、使用する L-グルタミン酸脱炭酸酵素が L-グルタミン酸以外の物質を脱炭酸して分析精度に障害をおよぼすことが考えられる。これらの不純物質にもとづく阻害作用および酵素の力価の高低が L-グルタミン酸の脱炭作用におよぼす影響を、主として上記粗グルタミン酸をクロマトグラフィーによって定量した諸物質ならびに存在可能な物質についても検討したが、本報においては紙数の都合で結果のみを述べて別報することにする。

南瓜酵素は塩析法⁵⁾によって千葉県、宮崎県、山梨県

Fig. 7 $m=4$, $n=1\sim4$ のグラフ

産の 3 種より調製、pH=5.8、反応温度は 37°C を、E. Coli はアセトンパウダー、pH=4.2、反応温度は 37°C を採用した。

(1) L 型アミノ酸 17 種⁶⁾をそれぞれ L-グルタミン酸と共存せしめて L-グルタミン酸の定量をおこなったところ、いずれの酵素を使用してもアミノ酸は L-グルタミン酸の定量にほとんど影響しなかった。

(2) α-ケトグルタル酸とアミノ酸を共存せしめて盲検したところ、E. Coli の場合は異常にガス発生が多く 120 分後 7% に達したが、南瓜酵素についてはトランスアミナーゼがほとんど起らず、トランスアミナーゼの含量はあるとしても微量であると推察された。

(3) ピロリドンカルボン酸およびグルコースを添加して L-グルタミン酸の回収率ならびにこれらを添加したときの酵素の力価* の変化をみたところ、いずれの酵素を使用してもほとんど問題がなかった。

(4) 有機酸（ギ酸、酢酸、マロン酸、コハク酸）を添加したところ、E. Coli は南瓜酵素よりも阻害を受けにくかった。とくに酢酸の阻害作用は大きかったが、被検試料が上記粗グルタミン酸における有機酸の濃度ならば、反応速度に若干の影響をおよぼすだけで検出率には阻害をみなかった。

* 酵素の力価の算出は次式による。

$$f = \frac{k}{m} = \frac{1}{m \cdot t} \times 2.303 \log \frac{a}{a-x}$$

m : 酵素使用量 k : 反応速度定数

a : 反応終了時のモノメーターの読み

t : 反応時間(分)

x : t (分) 後のモノメーターの読み

(5) グルタミンの影響についてはグルタミン酸を使用せず、グルタミンの盲検をおこなったところ、南瓜酵素においてはまったく影響がないが、E. Coli 使用の場合には不純物のグルタミナーゼの作用によりグルタミンをグルタミン酸に転化せしめるため、それより発生する炭酸ガスの影響がみられた。

6 総 括

1. セット内の測定値のバラツキ (V_w) は新法と常法においてほとんど差異がなく、その値は平均して 0.482 である。

2. 測定時のセット内測定値のバラツキは温圧計のバラツキと同様の因子である。

3. 容器内における酵素の存在の有無は、測定誤差の原因にならない。

4. 同一セット内にグルタミン酸標準溶液を m 本組むことによって、セット間バラツキを $1/m$ にすることができた。

5. 容器定数未知の容器を用いても、試料の測定が可能になった。この場合、新法ではあらかじめ一つのセット内に一定に配置した容器のなかにグルタミン酸標準溶液および試料溶液を満たし、ついで上記 2 種の溶液をそれぞれこれと異なる種類の溶液にセット内に入れかえて同一操作をおこなう。これを所要測定精度に応ずる所要回数 (所要セット数) くりかえす必要がある。

6. 新法と常法の測定平均値の精度を標準偏差で比較すると次のとおりである。

$$\begin{aligned} \text{新法} \quad \sigma_1 &= \sqrt{\frac{\sigma_w^2}{kn} + \frac{\sigma_b^2}{km}} \\ \text{常法} \quad \sigma_2 &= \sqrt{\frac{\sigma_w^2}{(A-1)k} + \frac{\sigma_b^2}{k}} \end{aligned}$$

が等しいのは、 $n = A - 1$ すなわち $m = 1$ のときである。 $\sigma_b = \sigma_w$ とみなすと $m = n$ のとき σ_1 は最小となる。

7. 測定精度は図表により容易に求められるようにした。またこれにより所要測定精度に対応する最小にしてかつ十分な測定セット数 (回数) が決定できる。

8. 本実験においては、試料のグルタミン酸純度は約 95% であったので、マンメーターの読みは 105 mm 付近であった。しかし試料純度およびマンメーターの読みがこれと異なっても、換算すれば本法を応用できる。

9. 本実験においてはグルタミン酸を試料としたが、特別な誤差因子がない限り他種試料についても本測定方法を準用できる。

10. L-グルタミン酸を定量する場合、使用する南瓜酵素または E. Coli によって L-グルタミン酸以外の化合

物で分析精度に影響をおよぼす阻害物質が脱炭酸されることが考えられるので、これについても若干ふれておいた。

終りに臨み、本研究をおこなうにあたり御指導をいただいた京都大学名誉教授石橋雅義博士、味の素(株)常務取締役川崎工場長稲川四郎氏に対し感謝の意を表します。また、本研究発表を許可された味の素(株)社長長道面豊信氏をはじめ、種々御便宜をいただいた会社幹部の方々に深謝申し上げます。

文 献

- 1) O. Schales, S. Schales: *Arch. Biochem.*, **11**, 445 (1946).
- 2) K. Okunuki, S. Sakurai, G. Matsuda: *Proc. Jap. Acad.*, **28**, 347 (1952).
- 3) 吉川春寿他編：化学の領域，増刊，**13** (ワールブルグ検圧計)，60 (1956)，(南江堂)。
- 4) F. E. Satterthwaite: *Biometrics Bulletin*, **2**, 110 (1946).
- 5) K. Okunuki, M. Inagaki: *Proc. Jap. Acad.*, **27**, 658 (1951).
- 6) 瀬戸寿太郎：本誌，**9**, 940 (1960).

☆

A study on precision of value of measurement and on the inhibitors in the determination of glutamic acid by Warburg's manometer. Jutaroh SETO (Kawasaki Factory, Ajinomoto Co., Inc.)

An effective method has been presented thereby to trace statistically the factors of errors and their ranges resulting from the measurement by Warburg's monometer and to minimize such errors on priority basis.

According to the author's experiments, errors of measurement to be produced from one vessel are usually $\pm 2\%$. However, in the case of such sample as glutamic acid which requires a high degree of analytical precision, it often happens that deviation and bias in the values must be below $\pm 0.5\%$. In that case, instead of seeking the mean value by merely increasing the number of vessels, the author introduced an empirical formula thereby to calculate the precision of the mean value of measurement to such an extent that highly precise values could be obtained, and a nomograph was introduced in order to simplify the determination.

The number of measurements to be taken to reach the required precision could be selected by using the nomograph, which also made it possible to determine the least yet sufficient number of sets (or measurements). Besides, in order to offset differences among the measuring vessels, a new method was devised to eliminate the complicate operation of determining vessel constant.

Moreover, some references have also been made to the inhibitors which are included in the sample of L-glutamic acid when the latter is decarboxylated by using decarboxylase (from pumpkins or E. coli).

(Received May 17, 1960)