ニンヒドリン比色法による血漿遊離アミノ態窒素の定量

萩 森 一 郎・神 立 誠

麻布大学, 相模原市 229

(1980. 4. 2 受付)

血漿中の遊離アミノ態窒素の定量法として滴定法, ガス分析法, 比色法, 加銅法などの方法がある¹⁾, これらの方法は, 操作が複雑な特別の装置を必要とするか, あるいは定量精度が低い等の問題がある²⁾. このため, 比較的操作简单で特別の装置を必要としないニンヒドリン比色法³⁾を血漿遊離アミノ態窒素の定量に応用することを試みた.

血漿中には, アミノ酸以外にも幾つかのニンヒドリン発色物質が存在するので, これらの影響を除去する方法について検討し, 良好な結果を得たので報告する.

材料および方法

1) 検量線の作成. MOORE and STEIN^{4,5)}により提案され, ROSEN⁶⁾によって改良されたニンヒドリン比色法に準じて, 0.14, 0.18, 0.42, 0.56, 0.63, 0.73, 0.84 mg N/100 ml に調製した L-Leu 溶液の検量線を作成したのちに, ヒトの血漿中濃度⁷⁾を参考にして, アミノ酸以外の発色物質として尿素溶液, クレアチン, クレアチニン, 尿酸の混合液 (Mix・A) ならびに L-Leu 溶液に図 I の L-Leu 濃度に対応している尿素と Mix・A を加えた混合液 (Mix・B) の検量線を作成した.

なお, アンモニアとペプチッドは血漿中濃度が極めて小さいため, 考慮の対象から除外し, Mix・B 以外の各成分の調製濃度は, 推定血漿中濃度の最低値の $\frac{1}{2}$, 最低値, 平均値, 最高値, 最高値の 2 倍 (尿素は最高値の 1.25, 1.5 倍) とした.

2) 検量線の検討. 実際にニンヒドリン比色法を用いて血漿遊離アミノ態窒素を定量する場合に適当な希釈倍数は 10 倍であったから, Mix・A は推定最高値濃度の $\frac{2}{10}$ とし, 尿素を推定最低値濃度⁷⁾の $\frac{1}{10}, \frac{2}{10}, \frac{3}{10}, \frac{4}{10}$ に変

えたときの吸光度が, 種々の L-Leu 濃度に対しどのような影響を与えるかを検討した. すなわち, それぞれ 4 個の 100 ml メスフラスコ 4 組を準備し, すべてに Mix・A 溶液 (6.06 mg N/100 ml) を 10 ml とり, さらに各組にはそれぞれ L-Leu 溶液 (14.01 mg N/100 ml) を 0, 2, 4, 6 ml ずつ入れ, ついで各組ごとに 0.93, 1.87, 2.80, 3.73 mg N の尿素を加え, すべてのフラスコを蒸留水で定容とした. したがってそれぞれの組は, L-Leu 濃度が 0, 0.28, 0.56, 0.84 mg N/100 ml となり, 各組内の尿素濃度は 0.93, 1.87, 2.80, 3.73 mg N/100 ml となる. これらについてそれぞれの吸光度を測定し, L-Leu 濃度ごとの検量線を作成した.

3) 定量精度の検討. ニンヒドリン比色法による血漿遊離アミノ態窒素の定量精度を検討するために, ヤギの血漿 2 ml に対して, L-Leu の 2.30 または 3.70 mg N/100 ml 相当量, 尿素の 13.06 または 22.39 mg N/100 ml 相当量, L-Leu 2.30+尿素 13.06 mg N/100 ml 相当量および L-Leu 3.70+尿素 22.39 mg N/100 ml 相当量の溶液それぞれ 0.5 ml を添加し, 無添加血漿の 1.25 倍希釈を対照として, L-Leu-N の添加回収率および尿素を添加したときのアミノ態窒素の測定値に与える影響について検討した.

つぎにヤギの血漿 4 ml に対して, 2.60 および 4.10 mg N/100 ml に相当する Gly 溶液 1 ml を添加し, 無添加血漿の 1.25 倍希釈を対照として, 血漿遊離アミノ態窒素を本法と銅錯塩ヨウ素比色法⁹⁾で測定して Gly の添加回収率を求め, 両法の比較検討を行なった.

さらに, 8 検体のヒツジおよびヤギの血漿を用いて, 本法による測定値と日立アミノ酸自動分析計 (KLA-3 B 型) による測定値を比較した.

4) 血漿の調製法および処理法. ニンヒドリン比色法

Determination of Free Amino Acid Nitrogen in the Blood Plasma by Colorimetric Method with Ninhydrin: Ichiro HAGIMORI and Makoto KANDATSU (Azabu University, Sagami-hara-shi 229)

に供試する血漿は、つぎのように処理することにより満足すべき結果がえられた。すなわち頸静脈より採取したヘパリン加血液を 2,500 rpm で 15 分間遠心分離し、得られた血漿 1 ml を 10% TCA 4 ml とともに遠沈管に入れて攪拌し、15 分間静置したのち 2,500 rpm で 15 分間遠心分離して除蛋白血漿 (5 倍希釈) をうる。この 3 ml を試験管に採取し、等量のエチルエーテルを加えて正確に 30 回激しく振盪したのち、静置して上清のエチルエーテルを注意深く除去する。この操作を 3 回繰り返す。残存する少量のエチルエーテルを自然蒸発させるために 1 時間静置したのち、0.02 N NaOH 1 ml を加えて pH を 4.5~5.0 に修正する。pH 修正後の血漿は、ヒトの血漿遊離アミノ態窒素²⁾と L-Leu の検量線の窒素量を考慮して、最終希釈倍数が 10 倍になるように 2 ml の蒸留水を加える。

結果および考察

1) 図 1 に示したように、Mix・B の吸光度から尿素の吸光度を差し引いた値は L-Leu の検量線と一致した。したがって Mix・B の吸光度におよぼす Mix・A の影響は、本実験の目的であるアミノ態窒素の定量よりみれば無視し得る程度であった。この結果より、ニンヒドリン比色法を用いての血漿中の遊離アミノ態窒素の測定は、血漿中の尿素含量を測定することによってほぼ可能であるとの見通しを得た。なお、L-Leu、尿素、Mix・A

溶液の窒素に対する吸光係数 (mg/100 ml) はそれぞれ 15.9, 0.230, 0.088 であった。このことは、ニンヒドリン比色法を応用して血漿遊離アミノ態窒素を定量する場合に、アミノ酸以外の物質の吸光度におよぼす影響は極めて小さいことを意味している。

2) 0, 0.28, 0.56, 0.84 mg N/100 ml の L-Leu 溶液に、血漿中の推定最低値濃度の $\frac{1}{10}$, $\frac{2}{10}$, $\frac{3}{10}$, $\frac{4}{10}$ に相当する尿素をそれぞれ加えると、いずれの L-Leu 濃度においても、吸光度は尿素含量に比例した直線となり、しかもその回帰係数には L-Leu 濃度による有意差はみられなかった。そこで 4 組の測定値をプールした回帰係数を求めると 0.0087 (相関係数 $r=0.92$) となり、尿素濃度 1 mg N/100 ml 当たり吸光度を 0.0087 差し引けば L-Leu のみの吸光度がえられる。したがって Conway の微量拡散法³⁾によって血漿中尿素含量を定量し、血漿の吸光度から尿素濃度 1 mg N/100 ml 当たり 0.0087 を差し引いて得た数値を L-Leu の検量線に当て嵌めることにより、血漿中の遊離アミノ態窒素を求めることができる。

3) ヤギの血漿にそれぞれ 2 レベルの L-Leu または L-Leu+尿素を添加したときの L-Leu-N の添加回収率の平均値は、それぞれ $100.2 \pm 4.0\%$ と $107.8 \pm 8.1\%$ であった。血漿に 2 レベルの尿素を添加したときの血漿遊離アミノ態窒素の平均値は、尿素を添加しないときの値に比べて $99.8 \pm 0.3\%$ となりほとんど同じ値を示した。

Fig. 1. Calibration curves of L-Leu, Urea, Mix. A, Mix. B and calculated values of L-Leu. ○—○: L-Leu solution. □—□: Urea solution. ●—●: Mix. A solution. (Creatine, Creatinine and Uric acid). ×—×: Mix. B solution. (L-Leu, Urea and Mix. A). △—△: The values were obtained by subtracting the absorbance of Urea from that of Mix. B.

本法と銅錯塩ヨウ素比色法の測定値を比較した結果、銅錯塩ヨウ素比色法は本法の $95.8 \pm 5.4\%$ となり、本法よりやや低い値を示した。また2レベルで添加した Gly-N の添加回収率は、本法が $99.0 \pm 2.9\%$ 、銅錯塩ヨウ素比色法が $87.8 \pm 9.3\%$ であり、本法は銅錯塩ヨウ素比色法に比べて Gly-N の添加回収率が高く、同時に安定した測定値を示した。

ヒツジおよびヤギの血漿8検体について、本法とアミノ酸自動分析法を比較した結果、本法では 5.58 ± 0.92 mg N/100 ml、アミノ酸自動分析法では 5.23 ± 0.66 mg N/100 ml となり、本法の方が自動分析法より $6.3 \pm 7.7\%$ 高い値を示した。

以上の実験より血漿遊離アミノ態窒素を定量するためにニンヒドリン比色法を応用した本法は、比較的定量精度の高い簡便法として十分に利用できることが明らかとなった。

謝 辞

本実験にあたり、アミノ酸自動分析を行なっていたいたヤクルト本社研究所岩淵明氏に深謝する。

文 献

- 1) 森本 宏編, 動物栄養試験法, 324-328, 養賢堂, 東京, 1971.
- 2) 馬場 茂明・奥田 清編, 臨床化学Ⅱ, 医化学実験法講座 3 B, 84-85, 中山書店, 東京, 1973.
- 3) 有機微量分析研究懇談会編, 有機微量定量分析, 488-491, 南江堂, 東京, 1972.
- 4) MOORE, S. and W. H. STEIN, J. Biol. Chem., **176**: 367-388, 1948.
- 5) MOORE, S. and W. H. STEIN, J. Biol. Chem., **211**: 907-913, 1954.
- 6) ROSEN, H., Arch. Biochem. Biophys., **67**: 10-15, 1957.
- 7) WHITE, H., P. HANDLER and E. L. SMITH, "Principles of Biochemistry", 5th ed. 801-802, McGraw-Hill・Kōgakusha, Tokyo, 1973.
- 8) 柴田 進・北村元仕, 臨床化学定量法, 44-47, 中山書店, 東京, 1963.
- 9) 石坂音治, 微量拡散分析試験法, 31-33, 南江堂, 東京, 1969.