TNBS 法による公衆浴場水中のアンモニアおよびアルブミノイド窒素の分別定量

林 秀 美 (昭和薬科大学*)

Spectrophotometric Determination of Ammonia and Albuminoid Nitrogen in public Bath Water by use of Trinitrobenzene Sulfonic acid.

Hidemi Hayashi

(Showa Pharmaceutical College*)

Ammonia and albuminoid-N as contaminants of public bath water, could be separately estimated by the following simple procedures. Sample to be analyzed was diluted with equal volume of distilled water. Two ml of the diluted sample solution was added with 0.1 N Na_2HPO_4 to make the solution slightly alkaline (pH 8.5) and mixed with 1 ml of 0.1 per cent solution of trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). The mixture was kept in a dark place at 40° for 2 hours, and the resulting orange-colored solution was extracted with ethyl acetate three times. The volume of combined ethyl acetate-extractes was adjusted to 5 ml and the optical density at 320 $\text{m}\mu$ was measured against ethyl acetate-extract of the blank solution obtained by treating 20 ml of distilled water in the same procedure. Ammonia-N could be estimated from the reading and standard curve shown in Fig. 3. The remaining aqueous solution was acidified by adding 1.0 ml of *N*-HCl and the volume was adjusted to be 5.0 ml (or more if necessary). From the optical density against blank solution, albuminoid-N could be estimated with the use of a standard curve obtained on glycine (Fig. 2). The contamination of public bath water proceeded as shown in Fig. 6 and the amounts of albuminoid-N were always about twice as much as ammonia-N.

(Received October 22, 1963)

アンモニアおよびアルブミノイド窒素の含有量は公共浴用水の適否や公共浴場水の汚染を判定するうえにもっとも適した基準の1つと思われる。このうちアンモニアの定量法に関しては、衛生試験法の飲料水試験の項にネスラー試液による方法があり、また一般試験法の項に記載されているケルダール法の後半を用いても可能である。他方アルブミノイド窒素の定量には飲料水試験のアルカリ性過マンガン酸カリウムによる蒸留法、一般試験の項に記載されているホルモル法、またはニンヒドリン法によるアミノ酸定量法が使用可能と思われる。それにもかかわらず公衆浴場水試験については、わずかに関連項目としてアルカル性過マンガン酸カリウムによる蒸留法があげられているのにすぎないのは、上記諸方法を公衆浴場水の分析に実際応用した場合、正確、迅速あるいは

は簡易といういづれかに不満が多いためであろう。

最近タンパク質の化学の分野で使用されている試薬のなかには、アンモニアやアルブミノイドの微量簡易定量に応用できる可能性のあるものが少なくない。とくに Sanger¹⁾ の DNP 法を改良した佐竹の TNBS^{2), 3), 4), 5)} による TNP (トリニトロフェノール) 化法においては、試薬の特異性が極めて高く、好ましくない副反応を伴なうことが少ないのでアンモニア、アミン、アミノ酸およびペプチドの微量比色分析への利用性が高いと思われる。この分析条件については佐竹らが検討し、試薬も内外で市販されているが、実施例はほとんどが純学術的なものだけであって、衛生化学的な立場からみて重要と思われる試料に応用した例はほとんどみられない。

著者は、衛生化学方面の拡大応用を考え、まず公衆浴場水中のアンモニアとアルブミノイドをとりあげ、これらを定量するために TNBS 法に若干の検討を加えた。

* 東京都世田谷区弦巻町 3-577 ; Tsurumaki-cho, Setagaya-ku, Tokyo.

その結果、必要試料は数 ml 以下という少量で十分であり、操作も従来の方法に比較して極めて簡単で、しかも薬剤混入の浴水の場合でも誤差が少ないことを知り、実用性のある分析法となりうることを知った。

実験方法

(1) 試料 東京都内世田谷区より男女湯別に所定時刻約 50 ml を三角フラスコに密栓して運び、なるべく速かに分析に供した。(薬剤混入の試料 Fig. 4. C, E, F 参照)。

(2) 試薬 (a) 0.1% 2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム (TNBS): 都立大学生物化学教室より恵与された標準品を水に溶かして 0.1% にする。遮光びんに貯え冷暗所に保存すれば数日間は使用可能である。なお市販品のなかには着色度が大きくブランク値の相当に高いものがあるが、以下のような方法をとれば佐竹の原報の場合とは異なり使用可能と思う。

(b) リン酸緩衝液: 0.1 N-Na₂HPO₄ Na₂HPO₄ 38 g を水にとかして 1 L にする (pH 8.5)。

(c) アルブミノイド窒素標準液: グリシン (味の素株式会社製) 53.62 mg を水にとかして 1 L にする。本液 1 ml 中にアミノ酸性窒素 0.01 mg (10ppm) を含む。

(d) アンモニア性窒素標準液: 塩化アンモニウム 381.9 mg を水にとかして 1 L とする。本液 1 ml はアンモニア性窒素 0.01 mg (10 ppm) を含む。

(3) 装置: 島津光電分光光度計 QR-50 型 石英製セル、光路長 10.0 mm のもの。

(4) 検量線の作成 (a) アルブミノイド窒素: 標準液 0.1, 0.2, 0.3……1.0 ml を遮光した試験管 (1.5 × 10.0 cm) にとり、水を加えて 2.0 ml にする。つぎに緩衝液 1.0 ml, さらに 0.1% TNBS 試液 1.0 ml を加えてよく混和したのち 40° の恒温水槽に 2 時間放置したのち、N-HCl 1.0 ml を加えて反応を停止する。蒸留水 2.0 ml について同様に操作したものを対照にして、これに対する吸光度を分光光度計で測定する (測定波長 340 mμ)。

(b) アンモニア性窒素, (a) と全く同様に標準液を段階的に希釈した溶液 2.0 ml に緩衝液, TNBS 試液 1 ml

ずつを加え、40° の恒温水槽で 2 時間反応させる。つぎに反応液を酸性にすることなく、そのまま数 ml の酢酸エチルで 3 回抽出し、抽出液の全量を 5.0 ml として分光光度を測定する (測定波長 320 mμ)。この場合にも蒸留水 2.0 ml について同様に操作した対照液に対する吸光度を求めた。

(5) 定量操作

検液 1.0 ml を試験管にとり、蒸留水を加えて 2.0 ml とする。つぎに緩衝液 1.0 ml を加え pH をほぼ 8.5 に調製し、0.1% TNBS 試液 1.0 ml を加えて 40° の恒温水槽で 2 時間反応させたのち、少量の酢酸エチルで 3 回抽出し、各抽出液を合せてその全量を正確に 5.0 ml にする。同時に蒸留水 2.0 ml について同様に操作し、この酢酸エチル抽出液を対照として吸光度を測定し、検量線によってアンモニア性窒素の ppm を求める。

一方酢酸エチル抽出後の水層には N-HCl 1.0 ml を加えて酸性として、必要があれば水を加えて正確に 5 ml として同様に対照液に対する吸光度を測定し、検量線によってアルブミノイド窒素の ppm を求める。

実験結果

(1) 比色法についての基礎検討

塩化アンモニウムおよびアルブミノイドとして用いたグリシンの水溶液をリン酸水素二ナトリウム液で pH 8.5 とし、TNBS 試液を加えると次第に黄褐色を呈するが、前者のもののみが酢酸エチルで抽出され、後者のものはこの条件下 (pH 8.5) では水層にのこる。酢酸エチルで抽出されたアンモニアの呈色と水層に残ったグリシンの呈色液を塩酸酸性としたものとは Fig. 1 のような吸収スペクトルを示し、それぞれピクラミドとトリニトロフェニルグリシンについて報告されている吸収スペクトルとよく一致している。そこでアンモニアは 320 mμ でピクラミドとして、またアルブミノイドは 340 mμ でトリニトロフェニル誘導体として分別比色したことになる。すでに佐竹は多くの第一級アミン、アミノ酸、およびペプチドのトリニトロフェニル誘導体はいずれも類似した吸収スペクトルをもち、吸収極大は酸性水溶液では 340 mμ 付近にあり、その TNP 基 1 個あたり分子吸光

Fig. 1 Absorption Spectra of the Color produced by Ammonia and Albuminoid with TNBS.

Sample solution was treated with TNBS at pH 8.5 and the optical densities were measured against a blank solution obtained by treating distilled water in the same way.

Fig. 2 Standard Curve of Albuminoid.

Two ml of Albuminoid (Glycine) solution was mixed with 1 ml of 0.1 N Na_2HPO_4 and 1 ml of 0.1 per cent TNBS. After standing at 40° for 2 hours, the mixture was acidified with 1 ml of N -HCl, and the optical density was measured at 340 $m\mu$ against the blank solution.

係数が互いに類似していることを確かめているので、最も入手の容易なグリシンをアルブミノイド窒素の検量曲線

Fig. 3 Standard Curve of Ammonia.

Two ml of Ammonia solution was mixed with 1 ml of 0.1 N Na_2HPO_4 and 1 ml of 0.1 per cent TNBS. After standing at 40° for 2 hours, the mixture was extracted with ethyl acetate, and the optical density of the combined extracts (5 ml) was measured at 320 $m\mu$ against the ethyl acetate extract of the blank solution.

作成の標準試料とした。その結果を Fig. 2 に示す。一般にトリニトロフェニル化合物溶液は吸光度が 0.8 以上になるとベールの法則にしたがわなくなり始めるので、高濃度の試料の場合は適当に希釈して吸光度を求めた。図の縦軸にはこのようにして求めた吸光度に希釈率を乗じ、全量 5.0 ml に換算した値を目盛っている。またグリシン窒素 7 ppm の試料液 1 ml (0.5 μ mole) が全量 5.0 ml で示す吸光度 1.42 という値が純 TNP-グリシンの $\epsilon \times 10^{-4}$ の文献値 (1.25) にきわめて近いことから、TNBS による TNP 化がこの条件下ではほぼ定量的に進行していることがわかる。

これに反してアンモニアの TNP 化はこの条件下では定量的に進行せず Fig. 3 の検量曲線にみられるように、グリシンの場合に比べて吸光度は約 $1/4$ の値しか示さなかった。しかし塩化アンモニウム標準液を所定の条件下 (40°, pH 8.5, TNBS の反応系内の初濃度 0.025 %) いろいろの時間処理したものの吸光度は Fig. 4 に示すようになり、2 時間前後ではほぼ一定値に達している。そこで TNP 化反応時間は 2 時間で十分であるとした。また酢酸エチルによる抽出操作は回収率よく行なわれた。その一例が Table I に示してある。この実験で

Fig. 4 Relation between the coloration of Ammonia and the reaction period.

Table I Recovery during the Ethyl acetate extraction.

Five ml of sample treated with 5.0 ml of 0.1 N Na_2HPO_4 and 5 ml of 0.1 per cent TNBS at 40° for 2 hours, and the color produced was extracted with 50 ml portions of ethyl acetate repeatedly. With the optical density of the extract at 320 $m\mu$, the recovery was calculated from the standard curve shown in Fig. 3.

Ammonia-N added in Sample	Ammonia-N recovered, (ppm). Number of Extractions.		
	1	2	3
1 ppm	0.98	0.98	1.00
5 ppm	4.98	4.99	5.00
10 ppm	9.98	9.99	10.00

は操作の都合上スケールを5倍にして行なったが(試料などすべて5.0 ml, 毎回5.0 mlの酢酸エチル抽出し, 全量25.0 mlとして比色する), この場合1回の抽出でほとんど抽出が完了していることから, 所定の $\frac{1}{5}$ スケールで行なっても3回の抽出で十分であろうと判定した。アルブミノイド窒素において酢酸エチル抽出操作を同様検討し, pH 8.5で抽出する限りは損失量2%を越えないことを確めた。

(2) 公衆浴場水分析への応用

東京都内の公衆浴場10箇所(女湯)から午後6時に採取した試料について本法でアンモニア性窒素とアルブミノイド窒素を分別定量した結果をFig. 5に示す。いずれの場合にもアルブミノイド窒素の方がアンモニア性窒素量の倍近く高い値を示し, 両者の和は10 ppm付近の

Fig. 5 Ammonia and Albuminoid Contents in Public bath water.

Ten different samples (A.....J) corresponding to 6.00 in Fig. 6, were analyzed according to the methods described in Fig. 2 and 3.

||||| Albuminoid □ Ammonia

ものが多かった。つぎに同一浴場についても男湯, 女湯別に汚染の進行程度を開業時刻から採取し分析した結果がFig. 6であって, 相対的に考えると女湯は6時まで汚染が進行するのに反し, 男湯は6時以後に爆発的によごれていく経過が明瞭に捕えられている。また最終的には男湯の方が汚染していくのは試料採取の季節(夏期), 場所(東京都内)から考えても当然のことと思われる。この場合にあっても常にアルブミノイド窒素量がアンモニア性窒素量の約倍量で平行的に増加していることが強調される。

またこの試料について別に比較のため衛生試験法, 飲料水試験法の項に記載された方法により, ネスラー試液による定量をもあわせて行なった。この値もFig. 6にあげてあるが, 一般にネスラー法の方が高い値を示し, 特にアンモニア含有の低い試料のときその差がはなはばしいようであった。

考察および総括

TNBS法によるアミノ酸, ペプチドの比色定量についてはこの試薬の創始者である佐竹およびその共同研究者^{2), 3), 4), 5)}によっていろいろ検討されてきている。しかしその条件についての検討は純学術的な試料についてのみされていたきらいがないでもない。著者はこの理論的にすぐれている方法を衛生化学的な立場から問題になる公衆浴場水中のアンモニアやアルブミノイド窒素の定量に応用する条件をいろいろ検討した結果, 実験の部に記載したような操作法をとれば, 試薬液の調製, 純度など今までTNBS法について問題にされてきた点を解決できることがわかった。

アンモニアとアルブミノイドの分別は簡単な酢酸エチル抽出方法で解決できる。TNPアミノ酸も酸性下では

Fig. 6 Progress of contamination of public bath water shown by the increment of Ammonia and Albuminoid-N.

大半酢酸エチルで抽出でき、さらに炭酸水素ナトリウム液に転溶できるが、TNP ペプチドでは酢酸エチルで抽出不能のことが多い。したがってアルカリ性下でアンモニアに由来したピクラミドを抽出する本法がアミノ酸、ペプチドおよびタンパク質を含めたアルブミノイドとの分別には適していた。

アンモニアの定量値がネスラー法より若干低くなる原因は不明で、将来の比較検討にまたねばならないが、本法による方が測定値のばらつきが少なく、結果が再現的であった。アンモニアがアルブミノイドに比べて、この条件下では TNBS で TNP 化されにくい原因については佐竹らがすでに説明している。この比色法において、特に注意しなくてはならないことは、TNP 化のときの温度と pH である。佐竹によれば pH が 1 低くなると反応速度が $1/10$ にも低下し、温度が 10° 低くても $1/2 \sim 1/3$ 低下するといわれている。この変動は定量結果に大きな影響を与えることが考えられる。

TNBS 法によって公衆浴場水中にはアンモニア性窒素量のほぼ倍量のアルブミノイド窒素が含まれることがわかった。しかし TNBS 法で測定できる窒素は全窒素量ではなくて TNP 化されるアミノ酸性窒素量であるか

ら、アルブミノイド全窒素量は理論的にはこれより多く、実測値にファクターを乗じないとアルブミノイド全窒素量とはならない。しかし公衆浴場水におけるアルブミノイドの大半は汗に起因し、この窒素の大半はアミノ酸によるとされているから、このファクターも決して大きなものでなく、各個のケースで大きく変動するものではないと思われる。

終りに御指導をいただいた都立大学佐竹一夫教授、昭和薬科大学草味正夫教授、福田助教授に深甚の謝意を表する。

文 献

- 1) F. Sanger : Biochem. J., **39**, 507 (1945).
- 2) T. Okuyama, K. Satake : J. Biochem., **47**, 454 (1960).
- 3) K. Satake, T. Ohashi, T. Shinoda : J. Biochem., **47**, 654 (1960).
- 4) T. Shinoda, K. Satake : J. Biochem., **50**, 293 (1961).
- 5) 佐竹一夫, 奥山典生 : 化学の領域(増刊), **34**, 63 (1957).