ペーパークロマトグラフ法による大根葉の 遊離アミノ酸に関する研究

Studies of the free amino acids of Radish leaf
by paper chromatography

(昭和27年10月28日受理)

齋 藤 恒 行 渡 部 俊 夫
(Tsuneyuki Saito) (Toshio Watanabe)

緒 言

大根葉部の栄養価については既に多くの報告がある。即ち成田氏によればその蛋白はリジンの含量が多く優秀であり、鈴木氏によれば無機分が多く大根とは分布が異なっており、藤田氏によればビタミン含量多く、岩田氏はビタミンC含量、無機成分含量その他から総合的に検討し大いに利用すべきものと賞している。

更に著者等の一人齋藤は白鼠による栄養試験を行いその優秀性を確かめ、特にこれはその蛋白質の性質にある事を認めた⁽¹⁾。

一方大根及びその皮の遊離アミノ酸分布については、武藤氏がペーパークロマトグラフ法により多くの根菜類を調べた報告中に記されている⁽²⁾。

著者等は大根葉部の遊離アミノ酸をペーパークロマトグラフ法により調べ、之を大根及び皮の部分の遊離アミノ酸と比べてみた。

実験方法

(1) 供試材料 秋大根(宮重大根)についてその葉を一度水洗し生のもの乾燥したものを用い、大根は一度水洗し身及び皮に分けて用いた。

i. 葉の生のものはそのまま壓出した汁液にアルコールを加え蛋白を除き、シラップ状に濃縮し試料とした。

ii. 乾燥した葉は少量の水と共に擦りつぶし濾過した液に更にアルコールを加えて蛋白を除き、シラップ状まで濃縮し試料とした。

iii. 生葉の汁液よりのぞいた水溶性蛋白は、20倍量の8N鹽酸と20倍量の10%バリタ水により夫々加水分解し、中和、濃縮して試料とした。

iv. 身、皮は夫々乳鉢中で磨細し壓出した液にアルコールを加えて蛋白を除き濃縮して夫々試料とした。

(2) 一次元ペーパークロマトグラフ法 フェノール(20%含水)、ピリジン(10%アニリン含有)、ブタノール・酢酸・水(4:1:1)を溶媒として用いた。

濾紙は東洋濾紙 No.2 を 2 cm×45 cm に切り用いた。

(3) 二次元ペーパークロマトグラフ法 ブタノール・

酢酸・水(4:1:1)とフェノール(20%含水)によつた。

之に使用した濾紙(東洋濾紙 No.2)の寸法は常法通り 30cm²のもの他に、15cm²の大きさのもの⁽³⁾を用いた。

濾紙の乾燥はニンヒドリンによる発色に大きな影響を持つてくるので毎回 85~95°C で 20 分乾燥した。

(4) 確認 上記試料をペーパークロマトグラフ法により一次元、二次元に展開させ、ニンヒドリンにより発色させ、その位置と色調により確認した。尙確認に當つて Rf 値は文献値⁽⁴⁾を参照し、更にアルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、グルタミン酸、メチオニン、ヒスチジン、ロイシン、チロジン、トリプトファン、バリンを夫々単独に、又混合し、更に試料に混じて判定に資した。

アミノ酸の Rf 値は温度の變化により必ずしも一定しない。著者等は上記の濾紙、溶媒を用い 15~20° でアミノ酸の Rf 値を求めて表 I の様な値を得た。此の條件では参照した文献値と大きな差異のない事、この温度の範囲ではその差により餘り變化のない事、しかもその Rf 値のずれは測定したすべてのアミノ酸について相対的に大となり小となるものである事を確認に先だち知つた。

又ブタノール・酢酸・水を溶媒として用いた場合、此等を混合して長く置くとエステル化し Rf 値が違つてくるので、混合後7日目迄のものを使用した。

尙ピリジンを溶媒とした場合は発色が餘り明瞭でなく色調の違いがよく見分けられなかつたので、以下の實驗に於いても餘り使用しなかつた。

表 I アミノ酸の Rf 値の測定

アミノ酸	溶媒		ピリジン
	フェノール	ブタノール・酢酸	
グ リ シ ン	0.38~0.40 (0.40)	0.28~0.31 (0.32)	
バ リ ン	0.74~0.77 (0.74)	0.53~0.56 (0.53)	
ロ イ シ ン	0.79~0.84 (0.86)	0.68~0.71 (0.69)	0.66~0.71 (0.65)
チ ロ ジ ン	0.64~0.67 (0.66)	0.52~0.56 (0.59)	0.72~0.77 (0.74)
アスパラギン酸	0.12~0.14 (0.12)	0.20~0.24 (0.26)	0.15~0.17 (0.16)

グルタミン酸	0.18~0.21 (0.20)	0.27~0.31 (0.32)	
メチオニン	0.78~0.81 (0.83)	0.51~0.54 (0.56)	
リジン	0.40~0.42 (0.43)	0.11~0.12 (0.12)	0.14~0.18 (0.14)
ヒスチジン	0.66~0.69 (0.70)	0.18~0.22 (0.25)	0.33~0.35 (0.34)
アルギニン	0.48~0.51 (0.48)	0.11~0.14 (0.13)	0.17~0.20 (0.14)
トリプトファン	0.77~0.81 (0.80)	—	0.68~0.70 (0.66)
アスパラギン	0.41~0.45 (0.42)	0.36~0.40 (0.36)	

註. () 内は参照した文献値。 —

実験結果及び考察

(1) 一次元ペーパークロマトグラフ法 前記の要領で一次元ペーパークロマトグラフ法を行つた。各溶媒を用いて測定した Rf 値は次の通りである。

尙十は発色, 十+は発色大, 十+十+は発色甚大である事を表し, 又 P は紫色, R.P は赤紫, B.P は青紫, G は灰色, Y は黄色, O は橙色の色調を表わす。

i. フェノールを使用した場合

生葉: 0.09, 0.14, 0.21, 0.34, 0.39, 0.43, 0.49, 0.52, 0.58,

G.P P P P P G P P P

+ 十+ 十+ + 十+ 十+ + +

0.64, 0.69, 0.74, 0.78, 0.83, 0.89, 0.92

G P P P P Y P

十+ + + + + 十+ +

乾燥葉: 0.04, 0.09, 0.13, 0.15, 0.22, 0.30, 0.35, 0.41,

G.P P B G P G P R.P

+ + 十+ 十+ 十+ + + +

0.43, 0.47, 0.54, 0.64, 0.68, 0.71, 0.78, 0.80,

G P R.P O P P P P

+ + + 十+ + + + +

0.86, 0.91

Y P

十+ +

葉水溶性蛋白質酸分解物:

0.05, 0.09, 0.12, 0.16, 0.22, 0.28, 0.33, 0.39, 0.44, 0.47,

G.P G.P P G P G P R.P G P

+ + 十+ 十+ 十+ + 十+ 十+ +

0.62, 0.67, 0.75, 0.86, 0.91

P G P Y P

+ + + 十+ +

身: 0.05, 0.10, 0.13, 0.16, 0.22, 0.27, 0.35, 0.39, 0.43,

R.P R.P P R.P P P P R.P P

+ + + + + + + 十+ 十+

0.49, 0.54, 0.58, 0.66, 0.69, 0.77, 0.81, 0.86, 0.90

P P P G P P P Y P

+ + + + + + + +

皮: 0.09, 0.13, 0.16, 0.21, 0.27, 0.36, 0.40, 0.43, 0.50,

G P R.P P P P P G P

+ 十+ + + + 十+ + 十+

0.53, 0.58, 0.65, 0.68, 0.75, 0.81, 0.86

P P G P P P Y

+ + + 十+ + + 十+

ii. ブタノール・醋酸を使用した場合

生葉: 0.11, 0.13, 0.20, 0.23, 0.27, 0.31, 0.34, 0.38, 0.42,

R.P P R.P P P P P Y.G Y

十+ 十+ 十+ + 十+ 十+ 十+

0.52, 0.56, 0.70, 0.73

P G P P

+ + + +

乾燥葉: 0.04, 0.10, 0.12, 0.19, 0.21, 0.26, 0.29, 0.34,

G.P G.P P P P P P B.P

+ 十+ 十+ 十+ 十+ + + +

0.39, 0.41, 0.51, 0.56, 0.68, 0.72

O Y P G.P P P

十+ 十+ + 十+ + +

葉蛋白質酸分解物: 0.04, 0.09, 0.12, 0.19, 0.22, 0.27, 0.35,

R.P P P G.P P P P

+ 十+ 十+ + + + 十+

0.39, 0.41, 0.52, 0.58, 0.68, 0.72

G Y P G P P

十+ 十+ 十+ + + +

身: 0.04, 0.09, 0.11, 0.19, 0.22, 0.27, 0.30, 0.36, 0.42,

G.P R.P P R.P P P G.P P Y

+ + + + + + 十+ 十+

0.53, 0.58, 0.70, 0.75

P G.P P P

+ + + +

皮: 0.04, 0.09, 0.12, 0.19, 0.22, 0.27, 0.34, 0.38, 0.42,

R.P P P R.P P P P O Y

+ + 十+ 十+ + 十+ + 十+

0.56

G.P

+ +

iii. ビリジンを使用した場合 (色調不明瞭)

生葉: 0.12 0.16 0.18 0.24 0.31 0.34 0.44 0.51 0.62

+ 十+ 十+ + + 十+ 十+ +

0.70 0.74 0.82

十+ +

(2) 二次元ペーパークロマトグラフ法 各試料につ

いて前記の要領で二次元ペーパークロマトグラフ法を行

い, 夫々次図の如きクロマトグラムを得た。

1 図 生葉

2 図 乾燥葉

3 図 水溶性蛋白質分解物

4 図 水溶性蛋白質分解物

5 図 大根身

6 図 大根皮

但し×印は最初試料をつけた点。又各斑點に附した番號は夫々次のアミノ酸に相當する事を示す。

1. グリシン 9. シスチン 17. アルギニン
2. アラニン 10. メチオニン 18. リジン
3. セリン 11. トリプトファン 19. アスパラギン
4. スレオニン 12. プロリン 20. グルタミン
5. バリン 13. オキシプロリン 21. グルタチオン
6. ロイシン 14. アスパラギン酸 22. グルコサミン
7. チロジン 15. グルタミン酸
8. フェニルアラニン 16. ヒスチジン

(3) アダムキューウィツ氏反應 プタノール・酢酸では検出不能であるトリプトファンの存在をより明確に知る爲に、アダムキューウィツ氏反應を用いた。

葉の水溶性蛋白質酸分解物以外は全部反應を認めた。

(4) アミノ酸の確認 一次元法により大體のアミノ酸分布を知った。然し二次元法によつてより正確にアミノ酸を分離確認することができた。

以上の測定から確認したアミノ酸の種類と大體の量の關係は、夫々の試料について表Ⅱの通りである。

表Ⅱ アミノ酸の分布

アミノ酸	試料	生葉	乾燥葉	水溶性蛋白質	大根身	大根皮
グリシン	+	+	+	+	+	+
アラニン	+	+	+	+	+	+
セリン	+	+	+	+	+	+
スレオニン	+	+	+	+	+	+
バリン	+	+	+	+	+	+
ロイシン	+	+	+	+	+	+
チロジン	+	+	+	+	+	+
フェニルアラニン	+	+	+	+	+	+
シスチン	+	+	+	+	+	+
メチオニン	+	+	+	+	+	+
トリプトファン	+	+	+	+	+	+
プロリン	+	+	+	+	+	+
オキシプロリン	+	+	+	+	+	+
アスパラギン酸	+	+	+	+	+	+
グルタミン酸	+	+	+	+	+	+
ヒスチジン	+	+	+	+	+	+

アルギニン	++	++	++	+	++
リジン	++	++	++	++	++
アスパラギン	++	++	++	++	++
グルタミン	+	+	+	+	+
グルタチオン	+	+	+	+	+
グルコサミン	+	+	+	+	+

註. +は存在. ++は多量存在. +++は甚だ多量存在。

(5) 考察

i. 葉の中に遊離の形で存在するアミノ酸は種類が多く、特にプロリン、アスパラギンの量が多く、グリシン、スレオニン、シスチン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、アルギニン、リジンが之に次ぐ。

ii. 葉の水溶性蛋白はグルタミン酸、アスパラギンに富む。葉の遊離アミノ酸に比べてその分布に大きな變りはない。

iii. 大根身の部分に存在する遊離アミノ酸はグリシン、リジン、アスパラギンが多い。先に武藤氏の得ている結果を見るとプロリン、オキシプロリンの存在を認めず、アスパラギンの存在は疑わしいとしているが、此の3者はいずれもニンヒドリンとの色調に特色があり著者等は明かにその存在を認め得た。

iv. 大根皮の部分に確認された遊離アミノ酸は葉や身の部分に比べてその種類が少い。セリン、スレオニン、シスチン、プロリン、アスパラギン酸、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギンが多い。やはりプロリンの存在を認めた点しかかなりの量である点で武藤氏の報告と異なる。

要 約

大根葉、大根身及び大根皮の遊離アミノ酸と大根葉中の水溶性蛋白質のアミノ酸分布を、ペーパークロマトグラフ法により調べた。

葉の遊離アミノ酸は種類が多く、アスパラギン、プロリンの存在量特に多く、鹽基性アミノ酸、酸性アミノ酸の量も多い。

葉の水溶性蛋白中にはアスパラギン、グルタミン酸が多く、大體の分布は遊離アミノ酸に似ている。

身の遊離アミノ酸にはグリシン、リジン、アスパラギンが多く、プロリン、オキシプロリンも存在を認めた。

皮の遊離アミノ酸は割合に種類が少いが、プロリンは存在しその量も比較的多い。

参考文献

- (1) 齊藤恒行：學藝, 2, 182 (1950).
- (2) 武藤聰雄：日農化, 24, 325 (1951).
- (3) 武藤聰雄：日農化, 24, 321 (1951).
- (4) Consden, Gordin, Martin: Biochem. J. 38, 224 (1944); Dent: Biochem. J. 41, 240 (1947); Nature, 160, 80 (1947); Williams, Kirby: Science, 107, 481 (1948); Pratt, Jacques, Auclair: Science, 108, 213 (1948); Rockland, Dunn: Science, 109, 539 (1949).

(北海道學藝大學札幌分校)