100 チオ硫酸ソーダ溶液にて滴定し盲検との差を求めれば, N/100 チオ硫酸ソーダの 1 ml は 0.840 mg の葡萄糖に相当する. 此の方法を用いると多量の果糖或いは蔗糖の共存する試料でもその葡萄糖糖を比較的小さい誤差で定量出来る. しかし果実中の糖以外の諸成分の影響はかなり大きく桃, 洋梨, リンゴ等の果汁をイオン交換樹脂処理して定量すると無処理の場合の夫々 74, 87, 88% の結果が得られ, 糖以外の妨害物質除去の必要を認めた.

蔗糖の純結晶を頂いた日本精糖工業会安藤孝久氏に感謝の意を表します. 本報の要旨は昭和 33 年 5 月農化大会で報告した.

(1) 松尾義之: 醸酵工学, 35, 447 (1957).	(1953).
(2) 古田守夫, 水口克江, 大和田静子: 農産技研誌, 1, 9 (1953).	(6) 松尾義之, 南波 章: 大阪醸造学会第 9 回講演会発表要旨 (1957).
(3) R. Willstätter, G. Schudel: <i>Ber.</i> , 51, 780 (1918); 東京大学農芸化学教室編: 実験農芸化学(下巻), 394(1952); 二国二郎: 澱粉化学, 422 (1955).	(7) P. A. Shaffer, M. Somogyi: <i>J. Biol. Chem.</i> , 100, 695 (1933); 江上不二夫他編: 標準生化学実験, 17 (1953); 奥田 東編: 植物栄養生理実験書, 132 (1953).
(4) 斎藤昭三, 倉沢文夫: 新潟大農, 3, 29(1952).	(8) M. Somogyi: <i>J. Biol. Chem.</i> , 195, 19 (1952); 二国二郎: 澱粉化学, 686(1955).
(5) 林 義男: 西京大(理学, 家政学), I, 84	

シリカゲル分配クロマトグラフィーによる 中性アミノ酸の定量について*

神 立 誠, 内 藤 博 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭 和 33 年 6 月 21 日 受 理

緒 言

中性アミノ酸は栄養上必須のものが多いけれども, 現在迄一部の中性アミノ酸特にバリン, ロイシン及びイソロイシン等に関しては比較的容易な定量法が見当らない. 一方これらのアミノ酸は組織蛋白質の構成成分として量的にも多く, 種々の栄養条件下に於ける定量値が二, 三報告されているが必ずしも明確でないので, その定量法を検討した. Martin, Synge⁽¹⁾ 及び Tristram⁽²⁾ 等はシリカゲルによる N-アセチルアミノ酸の分配クロマトグラフ法を考案したが, シリカゲルの品質によって再現性が一定でないことが最大の欠点とされている. 然し一方カラムが比較的容易に作製出来ること, アミノ酸のバンドをカラムに吸着された指示薬によって観察しながら行う事及び溶出バンドは中和滴定により容易に定量出来る点等の長所があるので, 主として市販クロマトグラフィー用シリカゲル製品を用いこの方法を検討した. 又同時に Tristram⁽²⁾ はメチオニン含量の高いカゼイン及び β -ラクトグロブリンでメチオニンの値が一定でないと述べているので, この点と共にメチオニン, バリンの分離によって両者の定量値を確実にしようとする目的で performic acid 酸化を試みた. その結果を次に報告する.

実 験 の 部

シリカゲル 次の様な市販クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて実験を行った. シリカゲル (Merck, 和光純薬), lot 1, lot 2 及び lot 3. Silicic acid (Mallincrodt) lot 1 及び lot 2. シリカゲル (Mallincrodt, 和光純薬).

以上のゲルを蒸留水に懸濁し, 上澄を傾斜し去り, 上澄が透明になる迄この操作をくり返し 105~130°, 約 8 時間乾燥し恒量に達したものを用いた. Merck 製品は 80 メッシュの篩を通して用いた. 又水ガラス (Merck) Tristram⁽²⁾ の方法に従って 10 N HCl 処理によってシリカゲルを調製した (ゲル A とする).

2. 指示薬 Alphamine-G-acid(6,8-disulfo- β -naphthaleine-azo-N-phenyl- α -naphthylamine) を ami-G-acid 及び phenyl- α -naphthylamine よりジアゾ化によって調製し⁽³⁾, そのアンモニウム塩を 0.02% 水

On the Determination of Neutral Amino Acids by Partition Chromatography on Silica Gel.
By Makoto KANDASTU and Hiroshi NAITO (Department of Agricultural Chemistry, Faculty
of Agriculture, University of Tokyo)

第 1 図 蛋白質水解物のクロマトグラフィー前処理

びフミン物質を除去し、モノアミノ酸区はエーテル、イソamilアルコール (1:1) で燐タングステン酸を除去し減圧濃縮により HCl を溜去し、供試液とした (第 1 図)。

6. クロマトグラフィー 主として Tristram⁽²⁾ の方法に従った。即ち乾燥シリカゲルと指示薬水溶液を乳鉢で充分に混和し、溶媒に懸濁し攪拌しながら 1×30 cm クロマトグラフ管につめ、0.05~0.1 ml/分 の割合で展開した。シリカゲルに対する添加水溶液の最適量は第 1 表に示す様にゲルの性質によって異なる。溶出したバンドは N/100 Ba(OH)₂ でブロムチモールブルー指示薬で滴定してアセチルアミノ酸量を算出した。

第 1 表 各種シリカゲルによるアセチルアミノ酸回収値

シリカゲル	水分含量(%)		実験 番号	添加 水分 %	溶 媒	アセチルアミノ酸*		移動率†† R
	free water	Structural water				平均回収率(%)		
Silicic acid (Mallincrodt) lot 1	6.8	4.8	1	56	CB ₃	{ Leu 88	0.3	0.2~0.3
			2	58	"	{ Val+Met 78	0.3	
			3	60	"	{ Leu 82.5	0.3	
			4	68	"	{ Val+Met 97.3	0.3	
同 上 lot 2	10.5	4.6	5	70	"	{ Leu 82.1	0.3	0.5~0.6
			6	53	"	{ Val+Met 92.9	0.3	
			7	70	"	{ Leu 90.2	0.3	
			8	70	"	{ Val+Met 98.8	0.3	
Silica gel (Mallincrodt) ゲル A	6.2	4.8	9	60	"	{ Leu 87.3	0.3	0.3
			10	60	CB ₃ →E ⁺	{ Val+Met 91.3	0.3	
			11	60	CB ₃	{ Leu 82.9	0.3	
			12	30	"	{ Val+Met 76.5	0.3	
Silica gel (Merck) lot 1	4.2	3.2	13	26.7	"	{ Leu 80.7	0.3	0.3~0.4
			14	26.7	"	{ Val+Met 70.5	0.3	
			15	26.7	E**	{ Leu 88.6	0.3	
			16	26.7	E**	{ Val+Met 78.9	0.3	
同 上 lot 2	6.5	2.0	17	60	CB ₃	{ Leu 105.0	0.3	0.15
			18	60	CB ₃	{ Val+Met 105.0	0.3	
			19	60	CB ₃	{ Leu 98.0	0.3	
			20	60	CB ₃	{ Val+Met 94.5	0.3	
同 上 lot 3	2.7	3.1	21	30	"	{ Leu 78.2	0.3	0.15
			22	30	"	{ Val+Met 94.9	0.3	
			23	30	"	{ Leu 99.2	0.3	
			24	30	"	{ Val+Met 96.6	0.3	
同 上 lot 3	2.7	3.1	25	26.7	"	{ Leu 99.1	0.3	0.2
			26	26.7	"	{ Val+Met+Pro 98.6	0.3	
			27	26.7	E**	{ Leu+Val 100.8	0.3	
			28	26.7	E**	{ Leu+Val 100.8	0.3	

* アセチルアミノ酸は夫々アミノ酸をアセチル化した標本を用い 0.5~3.0 mm の濃度で用いた。

** 14 及び 15 はアミノ酸を常法通りアセチル化して行った。従って回収率は最初のアミノ酸に対する値を示す。

+ CB₃→E は最初 CB₃ のカラム動通し次に再び E のカラムで展開したことを意味する。

†† R=(バンドの移動距離/溶媒の移動距離)

溶液としてカラム固定相に吸着させた。これによって赤色乃至は赤紫色カラムにアセチルアミノ酸の青いバンドが展開され、分離の状態が極めて明瞭に認められ、高濃度の *n*-ブタノール含有クロロホルム又は酢酸エチル等によっても脱色され難い。

3. 溶媒 *n*-ブタノール 3~17% 含有クロロホルム (以下 CB₃, CB₁₇ と略記) 又は酢酸エチル (以下 E と略記) を用いた。いずれも使用前 Tristram⁽²⁾ の記載に従って精製し、水で飽和して用いた。

4. Performic acid 酸化 Toennies, Homiller⁽⁴⁾ の方法により 88% 硝酸溶液 30% 過酸化水素 (9:1) で室温 80 分反応させた (第 1 図)。

5. クロマトグラフィー前処理 主として Tristram⁽²⁾ の方法に従った。蛋白質の 6N・HCl 水溶液は予め常法に従って燐タングステン酸でジアミノ酸及

実験結果及び考察

A シリカゲルの検討 第1表に示す様にアセチルアミノ酸の回収値はシリカゲルの製品又は製法により異なる。Mallincrodt 製のものは展開バンド相互の分離は著しく良好であるが、バンド前端が濃く明かに吸着性を示している。Ramsey-Patterson⁽⁵⁾ 法によって調製されたこの製品は吸着性が可成り強いとの報告があるが⁽⁶⁾, 10 N HCl による熟成によっても必しも回収率は改善されない。実験に供した範囲では Merck 製クロマトグラフ用シリカゲルが一定の良好な回収値を得た。但し製品により可成り性質が異なり, lot 2 はアルカリ性を示し, 明かに熟成が不十分であり 0.2 N HCl 中和によって良好な結果を得た。以上の様に最適添加水分量, 水分含量

第2表 Performic acid 酸化によるアミノ酸回収値*

アミノ酸 mgN	酸化	溶 媒**	吸 着 帯	回 収 値		%
				測定値 mgN	計算値 mgN	
Met 0.234	—	E	1. 速 (Leu, Val, Met) ⁺	0.667	0.663	100
Val 0.300	—	E	2. 遅 (Pro)	—	—	—
Leu 0.129	+	E	1. 速 (Leu, Val)	0.420	0.429	98
Pro 0.214	+	E→CB ₃	2. 遅 (Pro, MSO ₂)	—	—	—
Phe 0.085	—	E _(a)	1. 速 (Phe, Leu, Val)	0.120	0.129	93
Leu 0.387	—	E _(a)	2. 速 (Phe, Leu, Val)	0.315	0.300	105
Val 0.150	+	E _(b)	1. 速 (Phe, Leu, Val)	0.730	0.768	95
Met 0.078	—	E _(b)	2. 速 (Phe, Leu, Val)	0.621	0.690	90
Tyr 0.070	—	E	3. 遅 (Ala, Pro)	—	—	—
Pro 0.107	—	CB	4. 遅 (MSO ₂)	0.075	0.083	91
Gly 0.100	—	E	5. 不動 Gly	0.376	0.387	97
Ala 0.153	+	CB	1. Phe	0.228	0.228	100
			2. Leu	0.068	0.070	98
			3. (Val, Met)	0.095	0.083	114
			4. Tyr	0.363	0.387	94
			1. Phe	0.149	0.150	100
			2. Leu	0.098	0.070	140
			3. Val			
			4. Tyr			

* アミノ酸は何れも供試混合液を作った後常法によりアセチル化しクロマトグラフィーを行った。

** E: 酢酸エチル CB₃: CHCl₃-3% n-ブタノール

E→CB: E で溶出したバンドを再び CB₃ のカラムで展開し, バリンのバンドからは n-ブタノール含量を増加して (CB₁₀) 最後に CB₁₇ で溶出する段階的溶出を行った。

† 括弧内は相互に分離出来ない単一のバンドを意味する。

第2図 アミノ酸混合物のクロマトグラフィーによる分別

等が製品によって著しく異なり, 単に含有不純物(例えば Fe⁺⁺⁺, Al⁺⁺⁺), ゲルの熟成の度合等のみが回収率に影響する因子とは思われない。Trueblood^(7,8) 等はシリカゲルを 120~200° に加熱又はエーテル, アセトン等予め洗滌することによって除去した水分を free water とし, 更に高熱によりゲルの構造が破壊される迄の減量を fixed water 又は structural water と仮定し, 吸着クロマトグラフィーに於ける両者の比率と吸着性を論じているが, 本実験に於ても前に述べた様に 105~130° で恒量になる迄のシリカゲルの減量を free water 量とし, 更に電気マッフル中 600° 一夜加熱

した減量を structural water 量として求めた。その結果は第1表に示す様に一般に structural water 量が多いシリカゲルでは良好な結果が得られなかった。この点 Trueblood^(7,8) 等の吸着クロマトグラフィー担体としてのシリカゲルに対する結論と一致している。この点はシリカゲルの調製法と関連してなお検討を要するものと思われる。以上の検討により以後の実験には Merck 製シリカゲルを用いた。

B Performic acid によるメチオニンの酸化 メチオニンは前記ギ酸, 過酸化水素混合物による室温 80 分の酸化により完全にメチオニンスルホン (MSO₂ と略記) に変化することを Albanese⁽⁹⁾ のヨード滴定法により確認した。反応後の performic acid の除去は完全に行われなければその後のクロマトグラフィーに著しい影響を与えるので, 35° 以下減圧濃縮をくり返

第 3 図 クロマトグラフィー系統図

第 3 表 カゼイン及び筋肉蛋白質の分析値 (全 N 中アミノ酸 N%)

アミノ酸	カゼイン*				筋肉蛋白質		
	測定値	A	B	C	測定値	A	文献値 ⁽¹¹⁾
全 N	14.8				16.8		
Ala	3.5±0.6**		3.5	3.6 MB	—		6~9
Val	4.4±0.2		4.5	5.0 MB	3.6±0.2**		3.1~4.7 : 5.0
Leu(S)	12.0±0.3		10.8	9.9 MB	9.5±0.4		9.8 : 13.2 : 10.7
Pro	—		7.7	8.0 MB	6.3±1.0		5
Phe	2.9±0.3	2.6	3.62	2.6 MB	2.0±0.3	2.2	2.2 : 2.18
Tyr	2.7±0.6	3.0	2.7~3.0	2.7 Photo	2.0±0.2	1.8	1.9 : 1.8
Met	2.0±0.5	2.1	—	1.7 MB	1.8±0.4	2.0	1.4 : 1.48

* A : 夫々 Phe : Kapeller-Adler 法⁽¹¹⁾, Tyr : Millon 法⁽¹¹⁾, Met : Albanese 法⁽⁹⁾によって定量した値。

B : Tristram⁽²⁾ による分配クロマトグラフィーの値。

C : Dunn⁽¹²⁾ MB : バイオアッセイ法, Photo : 比色法による値

**標準誤差

以上の結果より第 3 図に示す方式に従ってクロマトグラフィーを行った。即ち酢酸エチルカラムによってプロリンを除去したフラクションを更にクロロホルム-*n*-ブタノールのカラムを展開し、フェニルアラニン、ロイシン及びイソロイシン、バリン及びチロシンを定量した。メチオニンスルフォンのバンドは吸着大で、本実験に用いた溶媒によっては 20~40% の回収率に止った。従って無処理区と酸化区の値からバリンの値を差引いてメチオニンの値を算出することを試みたが、実際の蛋白質水解物の場合には著しい誤差を生じた。アラニン及びプロリンは CB₁₇ によっても溶出が遅く従って誤差が大きい。

C 蛋白質の分析 蛋白質としてメチオニン含量の比較的多いカゼイン及び筋肉蛋白質を選び前述の方法に従って分析を行った結果を第 3 表に示す。カゼインは市販脱脂乳より精製した。又筋肉蛋白質は生後 110~120 日、体重 200~280 g の Whister 種白鼠雄の主として背部筋肉より調製した。ネズミは次に示す標準飼料によって 25 日間飼育したものである。即ち小麦澱粉 65%、カゼイン 20%、バター脂 10%、マッカラム塩 No. 135 5% の合成飼料で飼育屠殺後 Janney の方法⁽¹⁰⁾に従い筋肉蛋白質を調製した。

分析の結果は略々文献値に近い値を示している。バリン及びロイシン、イソロイシン含量は比較的正確に定量され、添加回収試験の結果 93.8~98.0% の回収率を得た。アラニン、プロリン及びメチオニンは本実験に供した溶媒系では必しも十分な結果が得られなかったため、他の溶媒を考えた上で検討すべきものと思われる。

総 括

シリカゲルによる中性アミノ酸の分配クロマトグラフィーを検討した結果以下のことを明かにした。

(1) クロマトグラフィーに用い得るシリカゲル製品は不純物の含有、粒子の大きさ等の他にゲルの水分含量特に structural water 含量がアミノ酸回収率に大きな影響を与えるように思われる。

(2) Performic acid 酸化によりメチオニンとバリンを分離した結果、バリンの定量値は良好であった。

(3) カゼイン及び白ネズミの筋肉蛋白質について分析した結果を述べた。

(本報文の大意は昭和 32 年 4 月、日本農芸化学学会大会に於て報告した。)

(1) A. H. Gordon, A. T. P. Martin, R. L. M. Syngé : *Biochem. J.*, 37, 79 (1943).

(2) G. R. Tristram : *Biochem. J.*, 40, 72 (1947).

し大部分の溶媒を除去した後 2N NaOH で pH 9~10 に調整してアセチル化を行った。第 2 表に示す様にメチオニン、バリンは完全に分離され、他のアミノ酸回収値に影響は見られない。然しチロシンは酸化したものである異常な値を与えるのは部分的に酸化を受けた結果と思われる。performic acid 酸化によってバリンが唯一のバンドを示すことはカラム溶出液 0.3~0.5 ml 分割のクロマトグラムによって明かに示されている (第 2 図)。

- (3) H. F. Liddle, H. N. Rydon : *ibid.*, 38, 68 (1944).
 (4) G. Toennies, R. P. Homiller : *J. Am. Chem. Soc.*, 64, 3054 (1942).
 (5) L. L. Ramsey, W. F. Patterson : *J. A. O. A. C.*, 31, 139 (1948).
 (6) G. B. Corcoran : *Anal. Chem.*, 28, 168 (1956).
 (7) K. N. Trueblood, E. W. Malmberg : *ibid.*, 21, 1055 (1949).
 (8) K. N. Trueblood, E. W. Malmberg : *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 4112 (1950).
 (9) A. A. Albanese, J. B. Frankston, V. Irby : *J. Biol. Chem.*, 156, 293 (1944).
 (10) N. W. Janney : *J. Biol. Chem.*, 25, 177 (1916).
 (11) R. J. Block, D. Bolling : *The Amino Acid Composition of Proteins and Foods* (1951).
 (12) M. S. Dunn : *Advances in Chemistry Series.*, 3, 22 (1950).

フラボノイドに関する研究 (第1報)*

フラボノールのアルミニウム塩について

林 屋 慶 三 (京都工芸繊維大学繊維学部)

昭和 33 年 6 月 23 日 受 理

緒 言

フラボノール類が種々の金属と塩を形成することは、古くより観察されてきた事実である。アルミニウムとの塩に関しても、すでに多くの研究が報告されている。即ちフラボノール類と塩化アルミニウムと反応して、鮮明な黄色の化合物となり、これらの多くのものは緑色を帯びた螢光を発する。従ってフラボノール類の定性に、この呈色反応が使用されて居り⁽¹⁾、又定量にも⁽²⁾利用された。特に morin はアルミニウムと安定な塩を作り、この塩が極めて特徴ある螢光を発するので、morin の定性ばかりでなくアルミニウムの定性⁽³⁻⁵⁾に、又定量にも⁽⁶⁾使用された。又一方フラボノール類がアルミニウムと如何なる構造の塩を形成するかに関しても、ポーラログラフを用いた研究⁽⁷⁾や、その他の報告⁽⁸⁾が見られる。以上の様に多くの研究があるにも拘わらず、アルミニウム塩の性質には尚不明の点が多い。即ちフラボノールとアルミニウムが、如何なる比で結合しているか、フラボノールの如何なる位置で塩形成をしているか、等の重要な問題が残されている。著者は主として morin のアルミニウム塩について、アルミニウムの結合比、結合位置、塩の安定性、等について検討を加えた。その結果、従来認められて来た事実、更に 2, 3 の新しい知見を加えることが出来たので報告する。

実 験 の 部

1. Morin のアルミニウム塩の調製 Morin 0.8 g をピリジン 15 cc に溶かし、この溶液に 0.65 g の $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ を加え、約 2 時間逆流冷却器を附して煮沸する。反応混合液を濾過し、濾液を約 200 cc の水中に投入する。生じた沈澱を濾過水洗し乾燥する。このようにして得た粉末を 80% アルコール及びメタノールから 2 回再結を繰返し、無定形の粉末を得た。収量は 0.8 g で、ハロゲン、窒素原子を含まない。アルミニウムによる比色定量の結果は第 1 表のようで、 $Al=2.72\%$ であった。下記 II の型の塩と考えた場合の計算値は、 $Al=2.91\%$ である。従って著者の得た塩は $Al: morin$ が 1:3 の比の塩であると推定する。

第 1 表 モリン-アルミニウム塩のアルミニウム分析

試料 mg	Al_2O_3 mg	Al mg	Al% %	$Al(morin-2H)_3$ としての計算値
15	0.77	0.407	2.72	2.91%

2. アルミニウム塩の性質 上記のアルミニウム塩 (分子量 927) 9mg をエタノール 100cc に溶解し、吸収スペクトルをとり第 1 図を得た。

Morin の 268 $m\mu$, 368 $m\mu$ の吸収位置は僅かに長波間へ移動して、新たに 270 $m\mu$, 420 $m\mu$ に極大吸収が見られる。この溶液は紫外線下で弱い螢光を発するが、塩生成の反応時に観察した強い螢光は見られなかった。即

* Studies on Flavonoid. Part I. On the Aluminium Salts of Flavonols.

By Keizo HAYASHIYA (School of Textile Fibers, Kyoto Technical University)