〔農化 第 37 巻, 第 4 号, p.196~200, 1963〕

食品アミノ酸のペーパークロマトグラフィーによる 定量法の改良に関する研究 (第 1 報)*

展 開 法 の 検 討

久 米 譲 (小手川醤油株式会社)

昭和 37 年 8 月 23 日 受 理

緒 言

近年になって微生物定量法, イオン交換樹脂クロマトグラフ法, ろ紙電気泳動法, 同位元素希釈法, ペーパークロマトグラフ法, その他諸種の原理に基づくアミノ酸の新定量法のめざましい進歩と応用によって, おもな食品中のアミノ酸の含有量がしだいに明らかとなり, まだ完全とはいえないが, だんだん信頼のできる分析値が得られるようになった^(1~6, 10, 11).

しかしながら, 未定量の食品も非常に多く, すでに報告されている食品でも分析値に疑問のあるものもある. またアミノ酸の定量法についても, あるものは器具装置, 試薬など比較的高額の経費を要し, あるいは相当に大規模な施設を要する. そして実験も相当に煩雑で, 熟練とかなりの長時間を必要とする.

これらに反して, ペーパークロマトグラフィーによる定量は, 周知のごとく, 微量の試料で迅速かつ経済的に, 一括して各アミノ酸を分離し, 定量できる著しい特徴をもっている. ただ, 難点は分析精度がやや低いことである.

そこで著者は, この分析精度に分析化学上はもちろん, 数理統計学的解析^(7~9), さらに分析作業の標準化という立場からも徹底的に検討し, 改良を加えて微量の試料を正確, 鋭敏かつ迅速に分離定量する方式を考案確立した. すなわち, 著者の提案する方式は impregnate technique による 6 種の展開溶剤を使用する一次元下降法で, 分離した各アミノ酸の定量はスポットを切りとり, 試験管にとってニンヒドリン溶液中で発色させて比色する方法である. 各アミノ酸の分析精度は 0.20~6.00 γ N の定量範囲において, $\pm 2\sim 3\%$ (2σ 限界として) 以下であった. 試料は蛋白質, 食品などの酸加水分解したアミノ酸の混合物で, 19 種のアミノ酸を, 他のアミノ酸は全部まったく異なった R_F のところにくるように, おのおの完全に分離し定量した. ただし, トリプトファンは, 直接化学的定量法⁽¹²⁾および紫外線吸収スペクトルのアルカリ溶液における変化からチロシンとともに求めた⁽¹³⁾.

本報では, 次報で述べる展開溶剤の選択を除いた展開条件について検討した結果を述べる.

結 果 お よ び 考 察

1. 試料 (標準) の調製および保存 窒素として 100 mg の純アミノ酸を採って, 30 ml の沸騰水を加えてよく攪拌し溶解するように注意しながら, 過剰をさけて 6 N の HCl を滴下した. 冷却後 5 ml のイソプロピルアルコールを加え, 50 ml の容量フラスコに満たして標準アミノ酸原液とした. 原液の希釈は 10% イソプロピルアルコール (pH 6.5) で行なった. ただし, シスチンは pH 1.0, チロシンは pH 2.0 とした.

各純アミノ酸は市販の特級品で, 純度に疑問のあるものは主として Greenstein & Winitz⁽⁴⁾ の記載する The National Research Council の提案する基準にしたがって検定したが, Block & Bolling⁽³⁾, Crumpler & Dent⁽¹⁴⁾ の報告も参照した. 不純物の除去は, Dunn & Rockland⁽¹⁵⁾, Hughes & Young⁽¹⁶⁾, Block & Weiss⁽²⁾ らの方法にしたがった. 最後に標準試料原液の濃度は, 全窒素を Semimicro-Kjeldahl法⁽¹⁷⁾ で定量して決定した.

このようにして調製した 10% イソプロピルアルコールを添加した標準液を 20° 以下の冷暗室に半年以上貯蔵しても異常を認めなかった.

2. 試料の塗布 試料の採量に使用したマイクロピペットは, 1~5 λ 区分の市販品および種々の孔径の水銀温度計より自製したもので, 試料の性質, とくに粘性によって適宜使いわけた. 5 λ (標線と先端間約 100 mm)

* Studies on Improvements in Quantitative Paper Chromatography of Amino Acids in Foods.
Part I. Research on Procedure of Development.
By Yuzuru KUME (Fundokin Shoyu Co., Ltd.)

を40~55秒ぐらいで流出するものが適当で、採量誤差も少なかった。

洗浄は、まず重クロム酸塩硫酸混合液中に浸漬し、ついで水洗、純アルコールおよびエーテルと順次に処理した後、空気気流中で乾燥した。

そして常法どおりマイクロピペットで自動的に吸い上げて採量した試料を、原線に自然流出して3~5λ スポッティングした。スポットの大きさは、直径または幅を5mm以下にできるだけ小さくした。ろ紙上の試料の乾燥は、暗室に1~3時間放置して、室温(15~26°)で行なった。

マイクロピペットの容量検定および採量誤差の検討は、直接秤量法⁽¹⁸⁾および滴定法⁽¹⁸⁾によった。結果は1~5λ水準において、標準偏差 $\sigma = 0.0087 \sim 0.0150 \lambda$, 変動係数 $c = 0.57 \sim 0.27\% \sigma$ で、25, 5, 3 ml の標準ピペットの変動係数が、それぞれ 0.025, 0.052, 0.090% σ には、はるかに劣った。しかし、著者の計画した本定量法の全分析精度から考えると、ほぼ無視できた。

なお、著者の試験で採量の精度に影響する大きな事項として、つぎのようなことが認められ、時には著者の設定する定量法の全分析精度に意外に大きな影響を及ぼすことがあった。

(1) 流出先端付近における小滴の付着程度。これは比較的大きな誤差を招来した。

(2) マイクロピペットの先端部の形状は、ただちに自然流出速度に影響し、時には液柱に気泡または切れ目を生ずる原因となった。Conway⁽¹⁸⁾は、採量の標準偏差は流出時間の平方根に逆比例すると報告している。したがって、マイクロピペットの先端部の仕上げは、とくに綿密に眼鏡研磨機などで磨きあげる。

(3) また、マイクロピペットの管孔壁の残液量は、採量誤差を左右する決定的因子であった。この残液量は内部表面の洗浄、管孔の大きさおよび試料の粘性などによって支配された。

3. ろ紙の選択 ろ紙中にニンヒドリン呈色性の不純物が含まれ、アミノ酸の比色定量の精度にいろいろと影響する^(5, 19~25)。そこで著者が、われわれの日常使いなれた東洋濾紙株式会社製のペーパークロマトグラフ用のろ紙について、試験した結果が第1表である(第1表参照)。

第1表 ろ紙の差異

種 類	測 定 値		摘 要
	$\bar{x}_{(E_0)}$	$\hat{\sigma}_{(E_0)}$	
東洋濾紙 No. 50	.2331	.1070	ペーパークロマトグラフ用として標準品
" No. 51	.1452	.0542	薄手、ワットマン No. 1 に相当
" No. 51A	.1171	.0513	生物化学精密分析用
" No. 52	.2301	.1940	東洋濾紙 No. 2 に適応するクロマト用
" No. 53	.2834	.1402	微量の鉄分を嫌うクロマト用
" No. 54	.1042	.0417	{耐酸, 耐アルカリ, 湿潤強度大 ワットマン No. 54 に類似}

$\bar{x} = \Sigma \bar{x}/k$, $\bar{x} = \Sigma x/n$, n (sample size)=2, k (number of samples)=10

x : 個々の測定, $\hat{\sigma}$: 母標準偏差の不偏推定値, $\hat{\sigma} = \bar{R}/d_2$

各種類のろ紙 10 枚を乱数表によって選び出し、1枚のろ紙から 20×20 mm の紙片を2枚ずつ切りとり、ランダム化して後述する著者のニンヒドリン比色法で定量した。その結果からろ紙中の不純物による呈色性を平均値 $\bar{x}$ で、バラツキを標準偏差 $\hat{\sigma}$ で求めた。呈色性の不純物のもっとも少ないろ紙は No. 54

であった。ついで No. 51A, No. 51 の順で、No. 50, No. 52, No. 53 は相当に劣った。しかし、No. 54 できても $\bar{x}_{(E_0)} = 0.1042$, $\hat{\sigma}_{(E_0)} = 0.0417$ で、そのままでは定量用ろ紙として使用できないことがわかった。

また、各アミノ酸の分離状態や分離できる試料の量には、ろ紙の種類によって大きな差異がなく、乱れないコンパクトネスによくまとまったスポットを与えた。しかし、No. 51, No. 51A にはときどき不良のものがみられ、分離できる試料の量もやや少なく、湿潤時に破れやすかった。

4. ろ紙の洗浄および緩衝液の impregnation このように、東洋濾紙株式会社製のろ紙が、各種類ともそのままでは定量用として使用できないことを知ったので、第2表に示すような洗浄を試みた(第2表参照)。

供試ろ紙は東洋濾紙 No. 53, 20×40 mm である。第2表中、最初に記載した5洗浄法は、記載者の示す処理法にしたがった。これ以下の著者の行なった洗浄は、次項で述べる下降式の展開そうと同様な洗浄そうを使用した。展開溶剤用のガラスといに洗浄用の溶剤を入れ、恒温暗室(22±1°)で、24~62時間掛け流した。所定の時間洗浄した後とり出して、暗室でじゅうぶん自然乾燥して、さらにもう一度蒸留水で48時間、溶剤洗浄の場合と同様に掛け流しを行なった。以下の各実験においても同様であるが、本研究に使用した蒸留水、酸、アルカリ、塩類などは、いずれも電気伝導度や dithizone 試験⁽²⁶⁾による不純物を含まないもの、また有機溶剤類も、必ず再留を行なって、沸点区分の正しい重金属類などの不純物の不含を確認の上^(27, 28)使用することが、つぎのニンヒ

第 2 表 ろ 紙 の 洗 浄

洗 浄 法	測 定 値		摘 要
	$\bar{x}_{(E_0)}$	$\hat{\sigma}_{(E_0)}$	
Kay, Harris & Entenman 法 ⁽²¹⁾	.268	.039	{ 1:1 の 95% エタノールと 1.2 N 酢酸との混合液による洗浄
Connel, Dixon & Hanes 法 ⁽²³⁾	.223	.029	{ 2 N AcOH $\rightarrow$ H ₂ O $\rightarrow$ 0.5 N LiOH $\rightarrow$ H ₂ O $\rightarrow$ 0.1% Ca-acetate $\rightarrow$ H ₂ O $\rightarrow$ 95% エタノール
Wynn 法 ⁽¹⁹⁾	.056	.021	蒸 留 水
Kemble & MacPherson 法 ⁽²⁴⁾	.144	.041	中性溶剤+オキシソ
Thompson & Steward 法 ⁽²⁵⁾	.303	.032	0.3 N HCl $\rightarrow$ 0.5 N NaOH で中和 $\rightarrow$ H ₂ O
Novellie 法 ⁽²²⁾	.094	.026	1% NaOH $\rightarrow$ H ₂ O
フェノール:緩衝液 (pH 12.0~8.4) (フェノール区分)	.033	.004	McFarren ⁽²⁹⁾ の展開溶剤および緩衝液 測定値は緩衝液の pH 12.0, 10.0, 9.0, 8.4 を使用 した 4 つの場合の平均値
フェノール:緩衝液 (pH 6.2~1.0) (フェノール区分)	.382	.078	{ 緩衝液 pH 6.2, 4.2, 1.0 を使用した 3 つの場合の平均値
フェノール:緩衝液 (pH 12.0) (緩衝液区分)	.093	.036	
フェノール:緩衝液 (pH 1.0) (緩衝液区分)	.236	.038	
緩 衝 液 (pH 12.0)	.082	.035	
フェノール (水飽和) 24 時間	.173	.036	
62 "	.055	.074	

無処理東洋濾紙 No. 53 .272 .153 対照, 各場合の平均値

欄内の時間は, 洗浄時間を示す. とくに記載のないものは, 48 時間の洗浄である.

$$\bar{x} = \sum x/n, \quad x = 12 \sim 15, \quad x: \text{個々の測定値}, \quad \hat{\sigma} = \sqrt{n \sum x^2 - (\sum x)^2 / n(n-1)}$$

ドリンによる比色定量に絶対に必要な条件であった.

このように洗浄した 1 枚のろ紙については, 原点, 中間, 先端の 3 か所の付近から 20×20 mm の切片をとった. そして一連の同時実験には, 無処理ろ紙 No. 53 を組み入れ, 前項の選択試験の場合と同様に比色定量を行った結果から平均値と標準偏差を求めて, 洗浄効果の如何をみた.

従来の洗浄方法では, その効果が期待できなかった. 簡易にしてもっとも効果のあったのは, 著者の見出したアルカリ性緩衝液を飽和したフェノールによる洗浄であった. さらに著者は, メタノール, エタノール, プロピルアルコール類, ブタノール類, アミルアルコール類, ベンジルアルコール, ベンゼン, クレゾール類, 2,4-ルチジン, ピリジン, 2,4,6-コリジンなどの単体または混合溶剤, 蒸留水, 希酸, 希アルカリ類, McFarren⁽²⁹⁾ の報告する各種展開溶剤など 74 種の溶剤で, 洗浄そうを使用し, 48~62 時間, 同様に著者の掛け流し方式で洗浄試験を行なった. 結果はいずれもアルカリ性緩衝液の飽和フェノールの場合より相当に劣った.

このフェノール洗浄によれば, 呈色性 $\bar{x}_{(E_0)} = 0.033$, パラツキ $\hat{\sigma}_{(E_0)} = 0.004$ ($n=12$). ところがフェノール単独アルカリ性緩衝液飽和フェノールの緩衝液区分, またはアルカリ性緩衝液単独では, あまり洗浄効果がなかった.

東洋濾紙株式会社の各ろ紙をアルカリ性緩衝液を飽和したフェノールで洗浄した結果は, 平均値の有意差検定などを行なうまでもなく, ろ紙の各種類間に差異がなかった. 呈色性 $\bar{x}_{(E_0)} = 0.028 \sim 0.035$, パラツキ $\hat{\sigma}_{(E_0)} = 0.003 \sim 0.005$ で, ほとんど一定であったから, じゅうぶんに洗浄の目的を達している.

したがって, 著者は展開用ろ紙の impregnation を, これまでの試験結果からつぎのように規定した. 東洋濾紙 No. 53 を用い, 大きさは 20×400 mm と 130×600 mm との 2 種を規格した. これらのろ紙を洗浄そうを用いて, アルカリ性緩衝液の飽和フェノール, たとえば次報で述べるフェノールに pH 9.00, 0.067 M の緩衝液を飽和した展開溶剤 A で 48 時間以上掛け流し, じゅうぶんに自然乾燥した後, さらにもう一度蒸留水で 48 時間, 同じように掛け流して乾燥した.

つぎに, 洗浄ろ紙をそれぞれ規定した緩衝液に浸漬し, 一端を懸吊して室温で自然乾燥した. ろ紙のアルカリ性緩衝液の飽和フェノールによる洗浄は恒温暗室 (22±1°) で, その他の蒸留水洗浄, 自然乾燥は天井にシロコ型^コの吸引装置を付けた暗室で行なった.

各緩衝液の調製は第 3 表に示すとおり, McFarren⁽²⁹⁾ の記載にしたがったが, 0.067 M の pH 3.35 および pH 5.50 の緩衝液は著者が新たに組み入れたものである. 最後に必要なものは, 各緩衝液の pH をそれぞれの配

第3表 緩 衝 液

pH	塩類のモル濃度と配合割合
1.00	50.0 ml の 0.200 M の KCl + 97.0 ml の 0.200 M の HCl
3.35	1.0 ml の 0.067 M の CH_3COONa + 30 ml の 0.067 M の CH_3COOH
5.50	50.0 ml の 0.067 M の クエン酸 + 110.0 ml の 0.067 M の NaOH
9.00	50.0 ml の 0.067 M の ホウ酸, KCl + 21.3 ml の 0.067 M の NaOH
12.00	50.0 ml の 0.067 M の ホウ酸, KCl + 53.5 ml の 0.067 M の NaOH

合塩類で、厳密に ± 0.01 pH に調製した。

5. 展開そう, 展開室および

展開操作 展開そうは 250×350×650 mm の角形のガラス
そうで、その底にろ紙を敷き、

展開溶剤の調製の際に分取した緩衝液区分を入れた。そして底から 600 mm のところにステンレスの架台をとりつけ、これに 30×30×340 mm の展開溶剤を入れるガラスとい 2 個を置く。このといの両側近くとりつけた 4 本のガラス棒に試料をスポッティングした緩衝化ろ紙を掛け、その一端をといに入れた。ふたは電気絶縁ビニルテープで完全に密封した。それから、この展開そうを恒温暗室に置き、展開せずにそのまま 12~48 時間以上放置して、ろ紙をじゅうぶんに展開溶剤蒸気で飽和させてから、ふたにとりつけた注入管の活栓を開いて展開溶剤を注入した。

展開室は厳密に $22 \pm 1^\circ$ に保たれた恒温暗室で、展開溶剤の調製や保存、ろ紙のアルカリ性緩衝液飽和フェノール洗浄などもすべてこの恒温暗室を使用した。

このように展開温度、展開溶剤の調製や保存などを厳密に $22 \pm 1^\circ$ に保ち、密封された展開そうで展開溶剤蒸気をじゅうぶんに平衡化してから展開をはじめ、途中で展開溶剤などに変化を起こさせることがなく、終始一貫して操作することが、もはや常識となった当然のことではあるが、はっきりとした完全な分離、コンパクトネスにまとまったスポット、再現性のある R_F を得る必須の要件であった。

要 約

もともとアミノ酸のペーパークロマトグラフィーによる比色定量法の難点とされていた分析精度に、詳細なる組織的検討を加えて、食品中のトリプトファンを除く 18 種のアミノ酸を、6 種類の展開溶剤を用いて一次元下降法によって正確、迅速に分離定量ができるように改良した。各アミノ酸の定量範囲は窒素として 0.20~6.00 μ g で、分析誤差は $\pm 2 \sim 3\%$ であった。

本報では、おもに試料(標準)の調製および保存、試料の塗布、ろ紙の選択、ろ紙の洗浄および緩衝液の impregnation、展開そう、展開室、展開温度、展開前の溶媒蒸気との飽和など、展開溶剤の選択を除いた展開の諸条件について検討を加え、これらを規制した。

本報告の概要は、昭和 35 年 9 月、長崎大学における日本栄養食糧学会九州支部大会で講演発表した。

- (1) 赤堀四郎, 水島三一郎編: 蛋白質化学, 第 1 巻, 共立出版 (1954); 第 2 巻 (1954); 第 3 巻 (1955); 第 4 巻 (1956); 第 5 巻 (1957).
- (2) R. J. Block, K. W. Weiss: "Amino Acid Handbook", Thomas, Springfield, Illinois (1956).
- (3) R. J. Block, D. Bolling: "The Amino Acid Composition of Proteins and Foods", 2nd Ed. Thomas, Springfield, Illinois (1951).
- (4) J. Greenstein, M. Winitz: "Chemistry of the Amino Acids", vol. 1~3, J. Wiley, Inc., New York (1961).
- (5) R. J. Block, E. L. Durrum, G. Zweig: "A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis", 2nd Ed., Academic Press Inc., New York (1958).
- (6) M. L. Orr, B. K. Watt: "Amino Acid Content of Foods" (1957); 大磯敏夫: 食品のアミノ酸含有表, 第一出版 (1960).
- (7) C. A. Bennett, N. L. Franklin: "Statistical Analysis in Chemistry and the Chemical Industry", J. Wiley, Inc., New York (1954).
- (8) 田口玄一: 実験計画法, 上巻, 丸善 (1962).
- (9) 石川 馨: 分析誤差 (分析化学講座, 7-A), 共立出版 (1957).
- (10) S. Moore, W. H. Stein: *J. Biol. Chem.*, **221**, 893 (1954); S. Moore, D. Spackman, W. H. Stein: *Anal. Chem.*, **30**, 1185, 1190 (1958).
- (11) H. H. Strain: *Anal. Chem.*, **32**, 3 R (1960); R. Kunin: *ibid.*, **32**, 67 R (1960).
- (12) J. R. Spies: *ibid.*, **22**, 1447 (1950).
- (13) T. W. Goodwin, R. A. Morton: *Biochem. J.*, **40**, 628 (1946).
- (14) H. R. Crumpler, C. E. Dent: *Nature*, **164**, 441 (1949).
- (15) M. S. Dunn, L. B. Rockland: "Advances in Protein Chemistry", 3, Academic Press, Inc., New York, 1947, p. 53.
- (16) I. W. Hughes, G. T. Young: *Nature*, **164**, 503 (1949).
- (17) 久米 譲, 井村洋一, 山下貞利, 島津利武: 本誌, **33**, 862 (1959).

- (18) E. J. Conway : "Microdiffusion Analysis and Volumetric Error", 4th Ed., Grosby Lockwood, London, 1957, p.358.
- (19) V. Wynn : *Nature*, **164**, 445 (1949).
- (20) A. J. Woiwod : *ibid.*, **166**, 272 (1950).
- (21) R. E. Kay, D. C. Harris, C. Entenman : *Arch. Biochem. Biophys.*, **63**, 14 (1956).
- (22) L. Novellie : *Nature*, **166**, 1000 (1950).
- (23) G. E. Connel, G. H. Dixon, C. S. Hanes : *J. Biochem. Physiol.*, **33**, 416 (1955).
- (24) A. R. Kemble, H. T. McPherson : *Biochem. J.*, **56**, 548 (1954).
- (25) J. F. Thompson, F. C. Steward : *Plant Physiol.*, **26**, 375, 421 (1951).
- (26) J. F. Thompson, C. J. Morris : *Anal. Chem.*, **31**, 1031 (1959).
- (27) 桑田 勉 : 溶剤, 丸善, p.221 (1957).
- (28) A. Weissberger, E. S. Proskauer : "Organic Solvents, Physical Properties and Methods of Purification", Interscience Publishers, Inc., 1955, p.297.
- (29) E. F. McFarren : *Anal. Chem.*, **23**, 168 (1951).
-