数種酸性染料の牛乳蛋白質の定量に対する適用性の比較

慶 田 雅 洋*・津 郷 友 吉**・川 口 豊**

蛋白質は一般に等電点の酸性側で酸性染料のスルホン基と反応して不溶性の沈澱を生ずる。この反応はクエン酸ナトリウム・塩酸緩衝液においては

$$P \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_3^+ \text{Cl}^- \end{matrix} + D \text{--SO}_3\text{Na} \rightarrow P \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_3^+ \text{O}_3\text{S} \end{matrix} D + \text{NaCl}$$
で示される(ただし P: 蛋白質, D: 染料)。この原理に基づいた蛋白質の定量法は色素法 (dye-binding method) と呼ばれ、牛乳および穀類などの蛋白質含量の測定に応用されている。牛乳に色素法を最初に応用したのは Udy¹⁾ および SCHÖBER & HRTZEL²⁾ であって前者はオレンジ G を後者はアミドブラック 10 B を使用して牛乳の蛋白質含量を測定した。本邦でも 浜田ら³⁾ がアミドブラック 10 B の応用について基礎的な研究を行なっている。両染料とも酸性アゾ染料に属する。DOLBY⁴⁾ は両染料の測定精度について比較した結果、比色値の読みのバラツキは両染料ともほとんど同じであるが、アミドブラック 10 B のほうが pH 2 付近では牛乳蛋白質に対する吸着性が 3 倍も高いために測定誤差は 1/3 であると報告している。アミドブラック 10 B を使用して多数の試料について応用する装置はオランダで実用化されており、このほかにもデンマークの A/S N. Foss Electric よりも “Pro-Milk” の名称で市販されている。前者は Merck 社のアミドブラック 10 B (Amidoschwarz 10 B) を使用しており、後者は自社で調製した粉末を使用するように定められている。

アミドブラック 10 B は Color Index No. 20470 (Acid Black 1) の酸性染料であり、紙電泳動における蛋白質の染色検出剤としても使用されている。国際的には Merck 社の製品が広く普及しているが国内でも 2, 3 種類市販されている。アミドブラック 10 B による牛乳蛋白質の定量法の実用化に関しては、わが国では畜産物価格審議会(農林省の諮問機関)の諮問によって設けられた生乳成分調査会においても色々と検討された。その際に使用する染料の条件としては測定精度の高いもののほうがすぐれており、測定精度が同程度ならば牛乳 1 検体

あたりの使用量の単価の安いほうがより有利であるといえる。著者らはわが国において入手しうる輸入アミドブラック 10 B 染料 1 種類および国産品 2 種類を選び、牛乳および合乳に対する反応性を調べ、著者らがこの目的に開発した 2 染料 Diacid Light Green GS⁵⁾ および Acid Light Scarlet GL⁶⁾ を用いる方法と比較、検討した結果について報告する。

1. 市販アミドブラック 10 B 染料の基礎的性質

実験には輸入品 (Merck), 国産品 A (第一化学 Amidoschwarz 10 B) および国産品 B (東京化成 Amino Black 10 B) の 3 種類のアミドブラック 10 B 染料を使用した。それらの染料の基礎的な性質は第 1 表に示すとおりである。染料はすべて pH 1.9 のクエン酸緩衝液 (0.1 M) に Merck は 0.03%, 国産品 A は 0.05%, 同 B は 0.053% の濃度に溶解して調製*した。アミドブラック 10 B は pH が低いほど牛乳蛋白質に対する吸着性の強いことが確かめられているので、色素液の pH としては牛乳との混合反応の際に加水分解を起こさない範囲でできるだけ低い pH として 1.9 を選んだ。市販 3 染料ともこの条件の緩衝液に対する溶解性は良好であって、常温で攪拌するだけで均一な溶液を得ることができる。

Absorbancy Index (K)⁷⁾ は染料の純度を知る指標として米国においてしばしば使用されている数値であって、その求め方は $K=A/C$ の計算式による [ただし A: 1 cm セルによる吸光度, C: 染料濃度 (g/ml), カールフィッシャー法により水分を測定して濃度の補正を行なった。] 吸収極大 (590 mμ) における Absorbancy Index の測定値は第 1 表に示したとおりである。本表よ

注: * 各染料とも溶解にあたってはカールフィッシャー法により水分を測定し、水分を除いた値で濃度を定めた。アミドブラック 10 B は吸湿性が高いので色素液の調製には必ず水分を補正することが必要である。

* 東京大学農学部 (東京都文京区弥生 1 丁目)

** 山梨県立農林高校 (山梨県中巨摩郡竜王町)

Comparison of the Applicability of Several Acid Dyes for the Determination of Protein in milk.

By MASAHITO IWAIDA, TOMOKICHI TSUGO and YUTAKA KAWAGUCHI.

第1表 市販アミドブラック染料の基礎的性質

市 販 品 の 種 類	染 料 の 形 態	pH 1.9 クエン酸 緩衝液への溶解性	Absorbancy Index*	備 考
Amidoschwarz 10 B (Merck)	粉 末	良 好	91.0	純度 80% 以上
Amidoschwarz 10 B (国産品 A)	"	"	83.6	
Amino Black 10 B (国産品 B)	"	"	49.6	

注: * Absorbancy Index = $\frac{590 \text{ m}\mu \text{ における 吸光度}}{\text{染料濃度 (g/ml)}}$

第1図 市販アミドブラック 10 B 染料の吸収スペクトル

り Merck の製品は純度がもっとも高く、国産品 A はやや低く、国産品 B は Merck の半分以下の純度であることが知られる。Merck 製品にはラベルに純度 80% 以上と表示しており、実際には 80~86% であるといわれているが、国産品にはこのような表示はない。

アミドブラック 10 B のなかには色調の異なる染料が混在していることがある。これはアミドブラック 10 B の光分解物であるといわれ、HERRINGTON⁸⁾ はこれにアミドピンク (Amido Pink) という名称を与えている。この物質は 520 mμ 付近に吸収極大を有する。このような不純物としてのアミドピンクが多量に混在する場合には、反応の結果にも影響することになる。したがってこれら 3 染料の吸収スペクトルを比較した。その結果は第 1 図に示すとおりである。3 染料とも 590 mμ における吸収以外には 320 mμ 付近にやや大きい吸収、400~500 mμ の間にごく小さい吸収が見出されるのみであって、アミドピンクの存在による影響はほとんど認め

られない。したがって各染料とも光分解の影響はない純品として使用することができる。

2. 実験方法

アミドブラック 10 B 以外の染料については、Diacid Light Green GS および Acid Light Scarlet GL の 2 染料 (いずれも三菱化成) およびオレンジ G (JIS 規格 K 8220) を使用した。ホルスタイン乳は山梨県中巨摩郡竜王町の牧場より、ジャージー乳は同県北巨摩郡小淵沢町の農家よりそれぞれ採取した。いっぽう混合乳は三協乳業甲府工場 (約 20% ジャージー乳, 80% がホルスタイン乳), 八ヶ岳酪農協同組合 (ジャージー乳, ホルスタイン乳各 50%) および明治乳業戸田橋工場 (関東一円のホルスタイン乳) より採取した。なお、個乳, 混合乳とも 100 ml に対して昇汞粉末 (脂肪検定用試料の保存のために通常用いられるフクシン, 食塩入り昇汞錠剤を摩砕したもの) を 60 mg の割合で防腐剤として添加した。色素反応の実施に当っては牛乳 (100 ml のポリエチレン製びんに保存したもの) を 40℃ まで加温し、十分に混和したのちに 20℃ まで冷却したものを 0.5 ml のメスピペットを使用して 30 ml 容の共栓試験管に注入したのちに、染料液 (いずれも 0.1 M クエン酸緩衝液, pH 1.9 に溶解したもの) を 10 ml 特殊自動ビュレット⁹⁾ より注入する。つぎに試験管を密栓し、4~5 回回転して色素反応を完結させる。この際に絶対に振とうしてはならない。内容物が泡立って反応が完全に行なわれない危険があるからである。牛乳の採取量および染料液の濃度は第 2 表に示すとおりである。反応混合物は小型遠沈管に移し、3,000 rpm で 5 分間遠心分離したのちに上澄液を希釈せずに島津・ボシュロムの SP-20 型光電比色計に特殊フローセルを取付けて吸収極大で吸光度を測定した。ただしオレンジ G の場合だけは遠心分離によって反応生成物を完全に沈降させることができないので、東洋汙紙 No.2 9 cm の定性汙紙により汙過した汙液についても行なった。比色計に特殊フローセルを備え付けた場合の外観は第 2 図に示すとおりである。特殊フローセルの拡大図は第 3 図に示すとおりである。セルの厚さは

第2表 牛乳・染料反応一覧表

市 販 品 の 種 類	牛 乳 (m ℓ)	染料濃度 (%)	染料液 (m ℓ)	測定波長 (m μ)
Amidoschwarz 10 B (Merck)	0.2	0.03	10	590
Amidoschwarz 10 B (国産品 A)	0.2	0.05	10	590
Amino Black 10 B (国産品 B)	0.2	0.053	10	590
Diacid Light Green GS	0.5	0.1	10	645
Acid Light Scarlet GL	0.2	0.08	10	502
Orange G (JIS K 8220)	0.2 (ホルスタイン) 0.1 (および混合乳)	0.03	10	475
"	0.1 (ジャージー)	0.03	10	475

第2図 島津・ボッシュロム SP-20 型光電比色計と特殊フローセル

約 0.45 mm であって色素液は下から入って上へ抜けるようになっている。

3. 実験結果

(1) 個 乳

ジャージーおよびホルスタイン乳についての結果は第3表のとおりである。アミドブラック 10 B は3種類ともジャージーおよびホルスタイン乳において標準ケルダール法との相関係数は 0.9900 以上、回帰からの標準

第3図 特殊フローセルの断面図

第3表 個乳の染料別、牛乳別反応一覧表

市 販 品 の 種 類	ジャージー乳			ホルスタイン乳		
	例 数	標準ケルダール法との相関係数	回帰からの標準偏差	例 数	標準ケルダール法との相関係数	回帰からの標準偏差
Amidoschwarz 10 B (Merck)	30	0.9957	0.014%	30	0.9977	0.017%
Amidoschwarz 10 B (国産品 A)	30	0.9978	0.031	30	0.9964	0.022
Amino Black 10 B (国産品 B)	30	0.9972	0.036	30	0.9970	0.020
Diacid Light Green GS	26	0.9990	0.016	36	0.9978	0.036
Acid Light Scarlet GL	42	0.9953	0.061	40	0.9922	0.029
Orange G (JIS K 8220)	30	0.9670	0.121	30	0.9813	0.049
" (遠心分離法)	30	0.9950	0.047	30	0.9983	0.027
" (逕過法)						

第4表 混合乳の染料別、工場別反応一覧表

例数：各工場 12，合計 36

市 販 品 の 種 類	三 協 (甲 府)	八 畠	明 治 (戸 田 橋)	合 計
Amidoschwarz 10 B (Merck)	r : 0.9976 s : 0.004	r : 0.9983 s : 0.003	r : 0.9974 s : 0.007	r : 0.9977 s : 0.015
Amidoschwarz 10 B (国産品 A)	r : 0.9949 s : 0.007	r : 0.9884 s : 0.008	r : 0.9935 s : 0.034	r : 0.9919 s : 0.029
Amino Black 10 B (国産品 B)	r : 0.9980 s : 0.004	r : 0.9980 s : 0.003	r : 0.9970 s : 0.002	r : 0.9975 s : 0.005
Diacid Light Green GS	r : 0.9980 s : 0.009	r : 0.9953 s : 0.011	r : 0.9984 s : 0.012	r : 0.9972 s : 0.013
Acid Light Scarlet GL	r : 0.9971 s : 0.005	r : 0.9978 s : 0.004	r : 0.9985 s : 0.017	r : 0.9974 s : 0.016

注：r…標準ケルダール法との相関係数 s…回帰からの標準偏差 (%)

偏差は 0.04% 以下であって、相関においては Diacid Light Green GS よりやや劣るが、Acid Light Scarlet GL よりはややすぐれた成績を示しており、標準偏差においてはアミドブラック 10 B (Merck) がもっともすぐれており、以下 Diacid Light Green GS および国産品アミドブラック 10 B 2 染料が並び、Acid Light Scarlet GL はやや劣る。オレンジ G は遠心分離法では前記 5 染料よりもはるかに劣り、濾過法によらねば正確な値を得ることができない。なお国産品 A の Amidoschwarz 10 B は特殊自動ビュレットによる連続採取の際に染料液が泡立ち、メニスカスが読取りにくくなるのが欠点である。

(2) 混 合 乳

混合乳の測定成績は第 4 表のとおりである。ただしオレンジ G は対象から除外した。本表よりアミドブラック 10 B の 3 染料のなかでは、各工場とも国産品 A が他の 2 つに比較して相関係数、回帰からの標準偏差においてやや劣ることが認められる。Merck、国産品 B、Diacid Light Green GS および Acid Light Scarlet GL の間には実質的な差は認められず、また牛乳を工場別に比較してもその間に特徴ある傾向は見いだされない。

4. 考察ならびに結論

アミドブラック 10 B を使用した牛乳蛋白質の迅速定量法については 10 年前から研究されており、オランダでは実用化されている。わが国では従来から脂肪含量によって原乳の買付けを行なっており、蛋白質を乳価の算定に取入れることは現在までのところ行なわれていない。しかしながらわが国の牛乳の蛋白質含量が欧米の酪農先進国のそれに比較して低い水準にあることから見て、乳価の算定および乳牛の検定にその蛋白質含量を考慮することが必要であると考えられる。酸性染料の牛乳

蛋白質への吸着性を利用した色素法は簡便であり、しかも島津・ボシュロムの SP-20 型光電比色計を一部改造して使用すればきわめて高い精度で多数の検体を迅速に処理することができる。本文において使用した酸性染料の牛乳蛋白質に対する吸着性を比較すると Diacid Light Green GS がもっとも高く、混合乳で測定した場合に蛋白質 1 g 当たり染料 472.9 mg、つぎが Acid Light Scarlet GL であって同じく 1 g 当たり 430.9 mg、アミドブラック 10 B は 217.5 mg、オレンジ G では 120.5 mg という数値が得られている⁶⁾。吸着性の高い染料ほど吸光値の差が大きくなるので測定しやすいという点では便利である。実際に個乳および混合乳に応用した結果では、Diacid Light Green GS、Merck および国産品 B のアミドブラック 10 B 製品の 3 者がもっとも精度が高く、Acid Light Scarlet GL および国産品 A のアミドブラック 10 B はやや劣る。オレンジ G は濾過法によらねばよい結果を得ることができず、濾過の操作は繁雑であり、濾紙のコストが加わるので経費の負担も増すため不適格であるとする、供試 6 染料のうち Diacid Light Green GS および Merck と国産品 B のアミドブラック 10 B 染料が精度の上では適格であるといえる。オランダでは Merck の Amidoschwarz 10 B を使用して独特の装置により牛乳の蛋白質分析を行なっているが、その場合の標準ケルダール法との差の標準偏差は個乳で 0.045%、混合乳では 0.035%、であるといわれ、前述の国産品 4 染料はこれに比べてむしろすぐれており、いさきかも見劣りするものではない。

色素法においては精度のほかに経費も重要な要因である。精度が同程度ならば安い染料を使うほうが有利である。ただし染料の価格は g 当たりの値段で比較することができない。高価な染料でも牛乳蛋白質に対する吸着量

第5表 染料の総合判定表

市販品の種類	価 格 (円/g)	牛乳1検体への 使用量 (mg)	1 検体当たり の単価 (銭)	測定精度	判 定	備 考
Amidoschwarz 10 B (Merck)	62.0	3.0	18.6	A	不適	
Amidoschwarz 10 B (国産品 A)	52.0	5.0	26.0	B	不適	染料液の 泡立性
Amino Black 10 B (国産品 B)	10.4	5.3	5.5	A	適	
Diacid Light Green GS	3.0	10.0	3.0	A	適	
Acid Light Scarlet GL	4.3	8.0	3.4	B	不適	
Orange G (JIS K 8220)	17.2	3.0	5.2	B	不適	汙過法による ほうがよい

が高ければ使用量は少なく済み、1 検体あたりの単価は割安になるからである。この点について比較し、総合的に判定した結果は第5表に示すとおりである。本表より Diacid Light Green GS は、1 検体当たりの単価も安くまた精度も高いすぐれた染料であることが知られる。アミドブラック 10 B 染料は精度の点では Merck がすぐれた染料であることはいうまでもないが、国産品 B と比較して価格が 3 倍にもつくので、国産品 B も精度において甲乙をつけがたいことを考えあわせると、国産品 B のほうが有利であると結論される。Acid Light Scarlet GL は以上の3種に精度の点でやや落ちるが、価格の安いのが特徴である。

5. 要 約

市販アミドブラック 10 B 3 染料 (Merck および国産品 2 種) について牛乳の蛋白質含量の測定に対する適用性を調べ、Diacid Light Green GS, Acid Light Scarlet GL, およびオレンジ G の 3 染料と比較検討した。その結果 Diacid Light Green GS, Merck および国産品 A のアミドブラック 10 B 染料が精度の点ではもっともすぐれていることを認めた。ただしこの 3 種のうち、Merck のアミドブラック 10 B は牛乳 1 検体当たりの染料の単価が他の 2 染料の 3 倍以上になるので費用の点で

難点がある。したがって Diacid Light Green GS および国産の Amino Black 10 B がすぐれた染料として推奨される。オレンジ G は汙過法によればよい結果を得ることができるが、汙過法は実用としては不向きである。

終りに臨み、本実験の遂行に終始協力いただいた東京大学農学部部長尾昭雄氏に感謝する。

文 献

- 1) UDY, D.C.: *Nature*, **178**, 314 (1956).
- 2) SCHÖBER, R., HETZEL, H.F.: *Milchwissenschaft*, **11**, 123 (1956).
- 3) 浜田 寛・小石川常吉・志賀勝治・石川竜太: 農産技研誌, **7**, 289 (1960).
- 4) DOLBY, R.M.: *J. Dairy Res.*, **28**, 43 (1961).
- 5) TSUGO, T., IWAIDA, M. and KAWAGUCHI, Y.: *J. Dairy Sci.*, **49**, 455 (1966).
- 6) 津郷友吉・慶田雅洋・川口 豊: 未発表
- 7) ASHWORTH, U.S., CHAUDRY, M.A.: *J. Dairy Sci.*, **45**, 952 (1962).
- 8) HERRINGTON, B.L.: *The Dye-Binders*, November (1962).

(1966 年 5 月 14 日受理)