カツオ幽門垂の利用に関する研究—Ⅱ*

幽門垂エキスよりアルギニンの分離

柿 本 大 壺・吉 峰 哲 郎

(鹿児島大学水産学部)

Studies on the Utilization of Pyloric Coeca of Skipjack—Ⅱ.

Preparation of Arginine from Pyloric Coeca Extract

Daiichi KAKIMOTO and Tetsuro YOSHIMINE

In the isolation of arginine from extractive matter of pyloric coeca, it is necessary to find means for elimination of agmatine. Basic nitrogen compounds containing arginine and agmatine were separated from other matters by the treatment with activated charcoal at pH 8.0 followed by the elution with HCl-acetone. After removed of acetone the residue was treated with picric acid, almost all the agmatine being precipitated. After filtering off the agmatine picrate, arginine was precipitated as its flavianate, and finally purified as the hydrochloride. The yield of arginine thus obtained corresponded to 76 % by the bioassay value.

著者等は前報¹⁾に於て幽門垂エキスよりヒスチジンの分離に関する研究を報告したが、引き続きアルギニンの分離を試みた。アルギニンの分離に就いては種々の方法が考えられるが、第1報で報告したように試料が蛋白質の加水分解物ではないため、夾雑するアミノ酸以外の物質の影響を考慮しなければならない。特に幽門垂エキス中にはアグマチン、アルカインその他アルギニン類似の有機塩基が数多く含まれていることは著者の一人が既に報告²⁾した処である。これ等の化合物は当然アルギニンの分離に影響を与えることが考えられるので古くから行われているゼラチン酸水解物よりの分離法³⁾そのままを適用することはできない。著者等はアルギニン及びその類似化合物を特定の pH 条件下で活性炭吸着を行うことにより比較的容易に他のアミノ酸類から分別し、更に共存するアグマチンは大部分をピクレートとして除去し得ることを知ったのでこのことを応用してアルギニンを分離することができた。以下その方法並にこれにともなう共存物質の影響について報告する。

実 験 の 部

1. 試料： 試料は第1報¹⁾と同様 64 % 含水の幽門垂エキスを用いた。
2. 試薬の調製： アルギニン分離のための沈澱試薬として中性酢酸鉛、ピクリン酸、フラビアン酸の三者、吸着用に活性炭、脱着用に酸性アセトン溶液等を使用した⁴⁾が、活性炭及び酸性アセトン溶液は次の如く調製した。
 - a. 石津製活性炭 50 g に N-HCl 500cc を加え、湯煮上で攪拌しつつ約 5 時間加温後、熱時上澄を傾瀉し、次いで熱蒸溜水で Cl⁻ イオンの消失するまで洗滌を繰返し、乾燥後、更に 120°C に 4 時間加熱したものを使用した。
 - b. 塩酸タ性アセトン溶液は 80 % アセトン液に 10 % の塩酸を加えて pH を 2.0 としたもので、活性炭に吸着せしめたアルギニンの脱着に使用した。
3. 幽門垂エキスよりアルギニン分離方法： 前記のカツオ幽門垂エキス 200g に蒸溜水を加えて全体を約 1 l に稀釈し、不溶物を濾別する。この溶液に 25 % 中性酢酸鉛溶液を加えて沈澱を完成せしめ一夜放置後沈澱を濾別し、濾液部に硫化水素を通じて鉛を除去した後減圧濃縮して硫化水素を溜去する。該溶液の pH は

1956 年 3 月 20 日受理

* 1956 年 4 月 日本水産学会にて講演

5.6を示したので稀塩酸により pH 5.0 とした後活性炭を加えて脱色し、次に10%のカセイソーダを加えて pH を 8.0 とする。アルギニンその他の塩基性窒素化合物はこの pH 条件で良く活性炭に吸着されるので溶液が坂口反応を呈しなくなる迄活性炭を取り替えて吸着を繰返す。吸着を終えた活性炭を合し冷水で2~3回洗滌した後真空乾燥し微粉末状とする。次にその 1g に対し前記の酸性アセトン溶液 25cc を加えて 30 分間振盪する溶出操作をくり返す。茲に得た抽出液を合し、減圧濃縮しアセトンを除去する。該溶液中にはアルギニンの他アグマチン等のグアニジン体、リチン等数種のアミノ酸類が含まれている (Table 1 参照)。この溶液に直ちにフラビアン酸を加えて煮沸放冷するとアルギニンとアグマチンの混合フラビアナートを

Table 1. Amino acids found in the process of arginine separation

Amino acids or bases	Process				
	1	2	3	4	5
Arginine	+	+	+	+	+
Aspartic acid	+	±	—	—	—
Glutamic acid	+	+	—	—	—
Cystine	+	+	+	—	—
Serine	+	+	—	—	—
Glycine	+	+	—	—	—
Threonine	+	+	—	—	—
Alanine	+	+	+	+	—
Tyrosine	+	±	—	—	—
Valine	+	+	+	+	—
Leucine	+	+	+	+	—
Phenyl alanine	+	+	+	+	—
Lysine	+	+	+	—	—
Histidine	+	+	+	+	—
Proline	+	+	—	—	—
Ornithine	+	+	—	—	—
Agmatine	+	+	+	—	—
Arcaïne	+	+	+	—	—
Methyl guanidine	+	+	+	—	—
Octopine	—	—	—	—	—
Unknown	+	+	—	—	—

Process 1, 2, 3, 4 and 5 are same as those diagram 1.

析出しアグマチンの離脱ができないが、あらかじめピクリン酸飽和水溶液を加えて煮沸放冷すると、大部分のアグマチンをピクレートとして除去することができる。このようにしてアグマチンをピクレートとして濾別した後フラビアン酸を加え、湯煎上で加温して十分にフラビアン酸を溶解し室温に放置すると無定形のアルギニンフラビアナートを得る。これを濾別し、冷水で十分に洗滌した後熱水に溶解し放冷してアルギニンフラビアナートを再結晶せしめる。斯くしてアルギニンフラビアナート 2.5 g を得た。このものは融点 253°C で黒変、270°C で分解しアルギニンモノフラビアナートと一致したが、更に茲に得たフラビアナートを常法により分解し塩酸塩として結晶せしめた。その収量 0.82 g 融点 217°C、分解点 235.4°C、全窒素 21.2 % で武田製アルギニン塩酸塩と一致した。Fig. 1 は著者の分離せるアルギニンである。更に又ブタノール、酢酸、水 (4:1:1) を展開剤とする濾紙クロマト法により同定の結果 Rf 値 0.18 を示し、フェノール、水 (25%含水) による Rf 値 0.61 でニンヒドリン、坂口両反応を与え、これによつても全くアルギニンと一致することが確認せられた。

4. 幽門垂エキスのアルギニン含有量：前述の如き方法で幽門垂エクス中からアルギニンを単離するとに成功したが、分離法としては収量を考慮する必要があるので試料エクス中のアルギニンを *Lactobaci-*

Fig. 1. Arginine mono-hydrochloride

illus arabinosus による bioassay 法で定量した。即ち試料エキスを酢酸鉛による沈澱を除いた濾液に硫化水素を通じて鉛を除去した後 pH 6.8 に調整し, assay の試料にした。測定の結果エキス乾物 100 g 中 1.85 g の遊離アルギニンが存在することを知った。なお試料を加水分解したものでは 2.12 g であった。前述の分離実験では試料 200 g を使用しフラビアンネートとして 2.5 g を得たのでアルギニンとしては 0.88 g に該当し, なおこれは供試エキに含まれる総アルギニンの約 76 % に相当する。分離法の概要を示すと Diagram 1. の通りである。

5. アルギニン分離過程に於ける各成分の分配: 前記著者等の方法に従つて幽門垂エキスよりアルギニンを分離する場合, 各処理工程に於てアルギニン, 及びその他試料中の窒素化合物が如何に分配され又は脱落するかを濾紙クロマト法により

Diagram 1. General scheme for separation of arginine

追及した。結果は Table 1 の通りである。なお各物質の検出はニンヒドリン反応と坂口反応によつた。前記の分離操作を少くし吟味するに、まず pH 5.0 に於いて一旦活性炭処理を行つたが、この活性炭を pH 8.0 (バリタを使用) に於て 80 % アセトンで溶離試験したところ、その中にチロジン、ゼリン、アスパラギン酸を認めたがアルギニンは検出されなかつた。即ち pH 5.0 於ける活性炭処理でアルギニンは吸着されない。次に pH 8.0 に於て吸着せしめた活性炭を pH 2.0 の酸性アセトン溶液で抽出した部分には、オクトピンとメチルグアニジンが新たに検出されたがこれは之等の物質が処理中に新生したものか或いは濃縮によつて現われたものかは明確には知り得なかつた。又アルギニンとアグマチンの混在しているものにフラビアン酸を加えると常に両物質が共に不溶性のフラビアンネートとして析出することが濾紙クロマトによつて知られた。更にアルカリ性に於て活性炭に吸着された部分にピクリン酸を加えて不溶性のピクレートを作

り、常法により分解し濾紙クロマトを行ってみたところ之等の中にはアグマチン、リジン、シスチン、アルカイン、メチルグアニジンが含まれていた。依つてアルギニンからアグマチンを除去するためには前処理としてピクレートを作る必要があることを確かめた。

要 約

カツオ幽門垂エキスからアルギニンを分離するためには共存するアグマチンの除去が必要である。そのための前処理として pH 8.0 で活性炭に吸着せしめた両者を酸性アセトンにより溶出し、これにピクリン酸を加えて共存するアグマチンをピクレートとして除去した後アルギニンをフラビネートとして他の夾雑物から分離する方法を考案した。本法によつてカツオ幽門垂エキス中のアルギニンを約 76% の収量を以て分離することができた。

本研究に当り終始御指導を賜つた本学教授柏田研一博士に深謝する。なお本研究費の一部は文部省科学研究費によつた。

文 献

- 1) 柿本大壺：水間 博：本誌 22, 316 (1956).
- 2) 柿本大壺：本誌, 20, 713 (1954).
- 3) 赤堀研究室編：生化学薬品調製法, p. 93.
- 4) 赤堀四郎：蛋白質化学, 136—137.