UDC 576 : 543.422.5.062[547.466.2]

由比顕之介：ハロゲンサリチルアルデヒドの研究(第4報^{*1}) 3,5-ジブロム
サリチルアルデヒドによるアミノ酸の比色定量

Kennosuke Yuhi : Studies on Halosalicylaldehyde. IV. Spectrophotometric
Determination of Amino Acids by 3,5-Dibromosalicylaldehyde.

(Medical Research Section of Labor, Hospital of Yawata Iron & Steel Co., Ltd.^{*2})

The conditions under which 3,5-dibromosalicylaldehyde undergoes coloration with amino acid were examined and the aldehyde was found to be utilizable as a reagent for determination of amino acid. Determination conditions were established for lysine, arginine, serine, and glycine and the determination was carried out on standard amino acid solution. Determinable limit was 5~100 γ in neutral and basic amino acids. Acidic amino acids, proline, and hydroxyproline do not undergo this coloration.

(Received June 11, 1960)

前報¹⁾において 3,5-ジブロムサリチルアルデヒドによりアミノ酸が呈色することを報告したが、その発色条件を検討しアミノ酸の定量にも用いることを知った。

アミノ酸の比色定量にはニンヒドリン²⁾、ナフトキノンスルホン酸³⁾、2,6-ジニトロフルオルベンゼン⁴⁾等が用いられているが、いずれも試薬が不安定であり定量操作に熟練を要する欠点がある。

本法は感度においてニンヒドリン法におよばない欠点はあるが、試薬の安定性、定量操作の簡易な点で常備する試薬として適している。

アミノ酸はアミンに比し呈色の pH 域が広く、pH 4~8 で発色するが、その間ピークを示さないので再現性のよい pH 5.25 において定量を行なった。Fig. 1 のように 400~500 m μ に吸収を示し極大値は 440 m μ 付近に示されるが、紫外部に吸収を示さない点がアミンの吸収曲線と異なっている。

一般に塩基性アミノ酸の方が中性アミノ酸より本試薬により良く呈色し、酸性アミノ酸、プロリン、ヒドロキシプロリンは呈色しない。アミン類に比しアミノ酸は呈色しにくく、加温温度 80 $\pm$ 2 $^{\circ}$ 、加温時間 10 分を要する。

実 験 の 部

試 薬 a) 0.2% DBSA 溶液：精製した 3,5-dibromosalicylaldehyde 0.2 g を EtOH 100 cc に溶解、冷暗所に保存する。

b) 酢酸緩衝液 (pH 5.20 $\pm$ 0.05)：特級 AcOH 1 cc、試薬一級 AcONa 10 g を蒸留水 200 cc に溶解する。

装 置 Beckman 型日立分光光度計 EPU-2 型、比色用セルには 1 cm 石英製を用いた。

アミノ酸標準液 宝製薬 K.K. 製試薬アミノ酸を用いて 100 γ /cc の濃度のものを調製した。

定量操作 中性の検液および蒸留水のおおの 1 cc をとりそれぞれに酢酸緩衝液 0.1 cc、試薬 1 cc を加えよく攪拌し EtOH (95%) で全量 5 cc とする。これをあらかじめ 80 $^{\circ}$ に調節した湯浴中で 10 min 加温発色させ、冷水中で冷却、蒸留水の方をブランクとして 440 m μ で吸光度を測定し検量線より濃度を算定する。

吸収曲線の作製 各アミノ酸標準液 1 cc および蒸留水 1 cc につき上記定量操作を行ない発色させ、蒸留水の方をブランクとして各波長における吸光度を測定し、吸収曲線を作製した。アミノ酸はすべて 440 m μ 付近に極大吸収を示す (Fig. 1)。

検量線の作製 アミノ酸標準液 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 cc をとり、それぞれに上記定量操作を行ない発色させ、吸光度を測定し図示すると Fig. 2 のように直線で表わされる。

pH の影響 種々の pH の緩衝液 0.1 cc を加え他の条件は変えずに定量操作を行ない、呈色におよぼす

*1 第 80 回日本薬学会年会で発表(1960)、第 3 報：本誌 80, 702(1960)。

*2 4 Haruno-machi, Yawata, Fukuoka-ken.

1) 塚本, 由比：本誌 79, 1294(1959)。

2) 山岸：本誌 74, 27(1954); S. Moore, W. H. Stein : J. Biol. Chem. 176, 367(1954)。

3) M. Schnall, E. G. Wollesh : Anal. Chem. 29, 1509(1957)。

4) A. L. Levy : Nature 174, 126(1954); W. A. Schroeder : J. Am. Chem. Soc. 75, 4612(1953)。

Fig. 1.

Absorption Spectra of Amino Acids
colored by This Method

Fig. 2.

Standard Curves for Estimation
of Amino Acids at 440 mμ

Table I. Effect of pH on Absorbance

pH	Glycine	Serine	Arginine	Lysine
3.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3.7	0.05	0.04	0.04	0.04
4.1	0.13	0.16	0.15	0.220
4.8	0.155	0.195	0.220	0.300
5.0	0.160	0.200	0.220	0.320
5.3	0.165	0.205	0.225	0.325
5.9	0.165	0.200	0.225	0.325
7.0	0.150	0.175	0.170	0.300
9.0	0.00	0.000	0.00	0.00

Table II. Absorbance of Amino Acid Solutions ($2 \times 10^{-5} M$)
colored by This Method

Amino acid	Absorbance	Amino acid	Absorbance
DL-Alanine	0.107	Glycine	0.198
L-Leucine	0.198	DL-Serine	0.210
L-Phenylalanine	0.297	L-Cystine	0.072
DL-Threonine	0.131	L-Methionine	0.142
DL-Tryptophan	0.367	L-Arginine·HCl	0.431
L-Tyrosine	0.324	L-Lysine·HCl	0.584
L-Valine	0.246	L-Histidine·HCl H ₂ O	0.316

pH の影響をみたが、Table I のように pH 4~8 の間で発色する。数回この操作を行ない最も安定した呈色を示す pH 5.2 ± 0.05 の前記緩衝液を採用した。最終液の pH はこの場合 5.2 ± 0.1 を示す。

各アミノ酸同一 mol 濃度液の呈色度 各アミノ酸 2×10^{-5} mol を含む最終液の呈色度を比較すると Table II のように、中性アミノ酸より塩基性アミノ酸が著しく呈色が良く、酸性アミノ酸、プロリン、ヒドロキシプロリンは全く発色せず、この点がヒドロリンと非常に異なっている。

終始御指導を賜りました福岡大学薬学部 塚本起夫教授に謝意を表します。

八幡製鉄所病院労働医学研究課