

ニンヒドリン比色法によるアミノ態窒素の定量について

岩下 伸行*, 片山 貴之*, 赤崎 哲也*, 朝長 洋祐*

Quantitative analysis of α -Amino Nitrogen of Amino Acid by Photometric Ninhydrin Method

Nobuyuki IWASHITA*, Takayuki KATAYAMA*, Tetsuya AKASAKI*, Hirosuke TOMONAGA*

Central Customs Laboratory, Ministry Of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

For determining the α -amino nitrogen content of amino acid contained in various imported protein products, we have used an automatic α -amino nitrogen quantitative system based on the Van Slyke method. This analytical method using special equipment as mentioned above takes a long time. To replace this method, we studied the applicability of the photometric ninhydrin method, which can measure the amino acid content more efficiently and conveniently. It was confirmed that the photometric ninhydrin method gave as good yields of α -amino nitrogen for most amino acid samples as the Van Slyke method. Subsequently, the amino acid contents of imported products were measured, producing lower quantitative yields than those by the Van Slyke method. Based on these results, the effects of residual proteins in sample solutions were verified and it was suggested that there is a difference in the reactivity to nitrogen of peptide bond between the photometric ninhydrin method and the Van Slyke method.

1. 緒 言

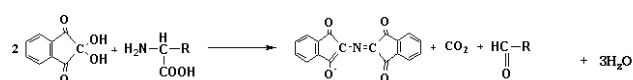
たんぱく質分解物は、分解の程度により関税率表第21類または第35類等に分類されるが、これらの税表番号間においては、税率格差が大きいことから、たんぱく質の分解の程度を知ることが、品目分類を行う上で重要な情報である。たんぱく質は、酸または酵素等により加水分解され、遊離アミノ酸を生じる。たんぱく質中の窒素に着目し、試料全体の窒素分(TN)に対する、遊離アミノ酸の α -アミノ基に由来するアミノ態窒素(AN)の割合を求めることで、分解の程度の指標となる値を得る事が出来る。

現在、アミノ態窒素の定量は、バンスライク法を利用したアミノ態窒素自動分析計により行っている。この方法は、酢酸酸性下、亜硝酸ナトリウムから生成する亜硝酸と、アミノ酸のアミノ基が反応して生成する窒素ガスを測定してアミノ態窒素を定量する方法である(Scheme 1)。



Scheme 1

一方、ニンヒドリン比色法は、アミノ酸とニンヒドリンとの反応によって生ずる青紫色の色素(Diketohydrindyliden diketohydrindamin: DYDA)の吸光度を分光光度計を用いて測定することによりアミノ態窒素を定量する方法であり、前者の手法に比べて特殊な専用機器を必要とせず、また迅速で簡便な手法である。(Scheme 2)



Scheme 2

本研究では、ニンヒドリン比色法並びにバンスライク法により、各アミノ酸及びたんぱく質分解物中のアミノ態窒素を定量し、両分析法の定量性を比較・検討したので報告する。

2. 実 験

2. 1 分析試料

アスパラギン、アスパラギン酸、アラニン、アルギニン、イソロイシン、オルニチン、グリシン、グルタミン、グルタミン酸、シスチン、セリン、チロシン、トリプトファン、トレ

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-5

オニン、バリン、ヒスチジン、フェニルアラニン、プロリン、
リジン、ロイシン（関東化学）
グリシルグリシン（東京化成）
たんぱく質の分解物：8 検体（輸入品）
プロテオースペプトン（和光純薬）
ラクトアルブミン水解物（和光純薬製）

2. 2 試薬

2. 2. 1 パンスライク法

亜硝酸ナトリウム（和光純薬製）

酢酸（和光純薬製）

2. 2. 2 ニンヒドリン比色法

ニンヒドリン（和光純薬製）※

塩化すず（Ⅱ）二水和物（和光純薬製）※

2-メトキシエタノール（和光純薬製）※

2.25Mクエン酸緩衝液 pH5.10（和光純薬製）※

（※アミノ酸自動分析用のもの。）

エタノール（特級：関東化学製）

セルロース透析チューブ（孔径 2.4 Å：三光純薬）

2. 3 分析装置及び分析条件

2. 3. 1 パンスライク法

アミノ態窒素自動分析計：SUMIGRAPH N-350

測定条件：反応部：45℃

カラム槽：120℃

検出器：TCD

2. 3. 2 ニンヒドリン比色法

可視・紫外分光光度計：SHIMADZU UV-2550

測定条件：室温

測定波長：570nm

2. 4 実験方法

2. 4. 1 各アミノ酸におけるアミノ態窒素の定量性の比較

(1) パンスライク法

i 試薬の調製

SUMIGRAPH N-350の取り扱い説明書に従って、60%酢酸溶液及び40%亜硝酸ナトリウム溶液を調製した。

ii 検量線

メチオニン（約2.663 g）を正確に量り取り、水で250ml メスフラスコに定容し、これを標準原液とした。この標準原液を、5, 25, 50, 75ml 採り、それぞれ、水で100ml に定容し標準液とした。標準原液と、これから調製した4つの標準液を用いて検量線を作成した。（以下、標準溶液及び試料溶液の希釈溶媒は、蒸留水を用いた。）

iii 試料測定

各アミノ酸500mg 程度（アミノ態窒素量（理論値）により適宜調整）を正確に量り取り、100ml に定容したものを検液として、SUMIGRAPH N-350の測定手順に従い定量を行った。

(2) ニンヒドリン比色法^{1) 2)}

i ニンヒドリン試薬の調製

ニンヒドリン2g にメチルセロソルブ75ml を加えたもの（A液）と塩化第一スズを2.25Mクエン酸緩衝液（pH5.10）25ml に溶解したもの（B液）とを準備し、使用直前に上記A, B液を混合（A：B＝3：1）したものをニンヒドリン試薬とした。

（A液、B液を混合した際に、溶液が赤色になるのを確認し、試料への添加も、試薬が赤色を呈しているうちに行った。淡黄色または、透明に近い状態になったものを加えると、十分な発色が得られない。）

ii 検量線

ロイシン約150mg を正確に量り取り、水で100ml に定容し、これを標準原液とした。この標準原液から、2, 4, 6, 8, 10ml を採り、それぞれ、水で100ml に定容したものを標準液とした。（以下、標準溶液及び試料溶液の希釈溶媒は、蒸留水を用いた。）

iii 反応及び測定

試験管中で、試料液2.0ml にニンヒドリン試薬1.0ml を添加し、沸騰浴中で15分間過熱した後直ちに氷冷し、60%エタノールを用いて50ml に定容し、 $\lambda=570\text{nm}$ の吸光度を測定した。冷却による反応停止から吸光度測定までは、30分以内で行った。

2. 4. 2 輸入品を用いたアミノ態窒素の定量性の比較

(1) パンスライク法

試料約1 g（分解の程度により適宜調整）を正確に量り取り、100ml に定容したものを検液として、アミノ酸測定と同様の操作で定量を行った。

(2) ニンヒドリン比色法

パンスライク法において調製した検液を適宜希釈したものを検液として、アミノ酸測定時と同様の操作で定量を行った。

2. 4. 3 ニンヒドリン比色法の反応条件検討

輸入品サンプルC, Dを用いて、試料溶液量を1ml とし、加えるニンヒドリン試薬を0.5ml～7ml まで増やしたもので測定を行った。なお、試料溶液には、2. 4. 2と同じ溶液を用いた。

2. 4. 4 試料中のたんぱく質が定量値に及ぼす影響の比較

(1) ペプチド態窒素への反応性の比較

グリシルグリシン（303.3mg）を100ml に定容したものをパンスライク法に用い、この原液を20倍希釈したものをニンヒドリン比色法の検液とした。

(2) たんぱく質溶液に添加したアミノ酸の回収率の検証

i たんぱく質原液の調製

ペプトン及びアルブミンをそれぞれ1 g 程度量り採り各々100ml に定容し、これを4倍希釈したものを原液とした。

ii 添加用混合アミノ酸原液の調整

アミノ酸10種（メチオニン、セリン、バリン、ヒスチジン、アラニン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン酸、グリシン、イソロイシン）を、それぞれ100mg 程度正確に量り採り、100ml に定容したものを原液とした。

iii 測定用検液の調製

①バンスライク法

たんぱく質原液25mlを100mlに定容したものをたんぱく質標準液とし、さらに、たんぱく質原液25mlと混合アミノ酸原液25mlとを混合し、100mlに定容したものをたんぱく質アミノ酸混合標準液とした。

②ニンヒドリン比色法

たんぱく質原液を100倍希釈したものをたんぱく質標準液とし、この100倍希釈液10mlと混合アミノ酸原液（100倍希釈したもの）10mlとを混合し、100mlに定容したものをたんぱく質アミノ酸混合標準液とした。

(3) アミノ酸を除去したたんぱく質等に対する反応性の検討
輸入品サンプルC, D, G及びペプトン, アルブミンを1g程度量り採り、水（約20ml）に溶解し、セルロース透析膜中で2日間透析を行ったものを原液とした。

バンスライク法には上記原液をそのまま用いた。

ニンヒドリン比色法には、上記原液を20倍希釈したものをを用いた。

3. 結果及び考察

3. 1 各アミノ酸におけるアミノ態窒素の定量性の比較

3. 1. 1 バンスライク法

Fig.1に示す様に、メチオニンを標準とした場合、アミノ体窒素量とピーク面積値との間には、良い相関の検量線が得られ、また Table 1に示される様に、アミノ酸全体としても非常に良い回収率が得られているが、グルタミン、リジン、オルニチンで回収率が100%を超え、逆にプロリン、シスチンで低くなっているのがわかる。

このことからリジン、オルニチンの側鎖にある一級アミンも反応していると考えられる。また、グルタミンの側鎖にあるアミド結合状態にある窒素も回収されていることが示唆された^{3) 4)}。一方で、グルタミンと同様、側鎖にアミド結合を有するものにアスパラギンがあるが、回収率はほぼ100%であった。グルタミン及びアスパラギンのアミド結合の違いとしては、加水分解の受けやすさ等が考えられ、グルタミンでは反応中に加水分解によりアンモニアを生じ、これが回収されたため等の理由が考えられる。

また、プロリンは検出されていないことから、バンスライク法では二級アミンは反応しないものと考えられる。

シスチンが、低回収率であった理由は、本報告では判らなかった。

以上のことから、バンスライク法においては、リジン、グルタミンを多く含む試料の場合では、検量線の作製に使用したアミノ酸の種類によって、定量値が高くなると考えられる。

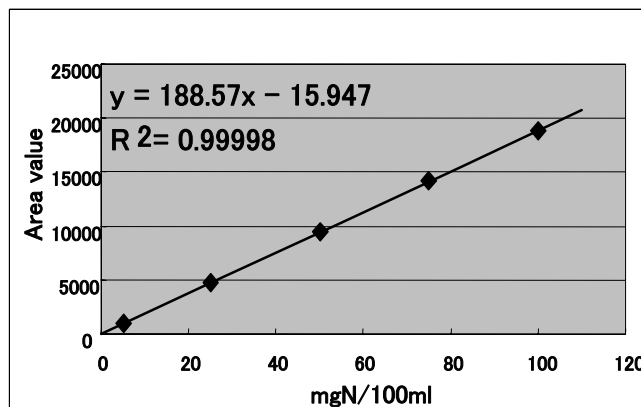


Fig.1 Calibration Curve of Methionine by Van Slyke Method

Table 1 Recovery of α -Amino Nitrogen by Van Slyke Method

Amino acid	Number of Nitrogen and Amino Group in Molecule			Recovery of α -Amino Nitrogen (%)
	N	$-\text{NH}_2$	$\alpha\text{-NH}_2$	
Ornithine	2	1	1	204
Lysine	2	1	1	199
Glutamine	2	0	1	184
Threonine	1	0	1	105
Glycine	1	0	1	105
Tryptophan	2	0	1	104
Isoleucine	1	0	1	102
Serine	1	0	1	102
Aspartic acid	1	0	1	101
Alanine	1	0	1	101
Histidine	3	0	1	101
Methionine	1	0	1	100
Valine	1	0	1	100
Asparagine	2	0	1	100
Arginine	4	0	1	99.8
Glutamic acid	1	0	1	99.5
Phenylalanine	1	0	1	97.4
Leucine	1	0	1	97.4
Tyrosine	1	0	1	85.6
Cystine	2	0	2	50.5
Proline	1	0	0	0

3. 1. 2 ニンヒドリン比色法

ニンヒドリン比色法における検量線及び測定結果を Fig.2及び Table 2に示す。

ロイシンを用いた場合のアミノ態窒素量と吸光度との間には、相関性の良い検量線が得られ、各アミノ酸のアミノ態窒素も良い回収率が得られている。また、バンスライク法とは異なり、グルタミン、リジン、オルニチンにおいて、ほぼ100%に近い回収率が得られていることから、ニンヒドリン比色法では側鎖にある一級アミン及びアミド態窒素との反応性は低いと思われる^{2) 4)}。プロリンで低回収率となっていること及びフェニルアラニン、チロシン、トリプトファンといった、側鎖に芳香環を持つものについては、発色生成物の DYDA とは異なる領域に紫外吸収を有する色素を副生しているためであると考えられる⁵⁾。

アスパラギン、シスチンで低い回収率となった原因は明らか

ではない。

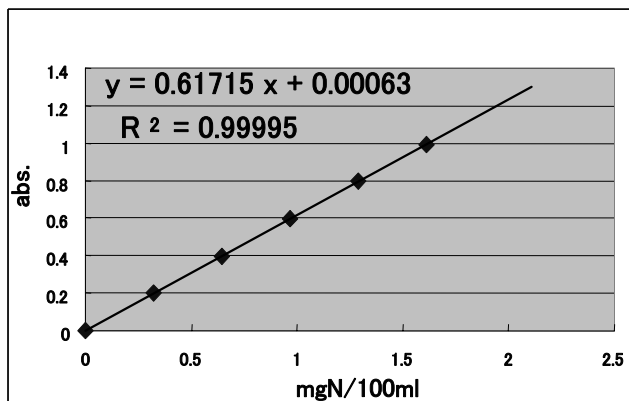


Fig.2 Calibration Curve of Leucine by Photometric Ninhydrin Method

Table 2 Recovery of α -Amino Nitrogen by Photometric Ninhydrin Method

Amino acid	Number of Nitrogen and Amino Group in Molecule			Recovery of α -Amino Nitrogen(%)	Coefficient of Variation
	N	-NH ₂	α -NH ₂		
Ornithine	2	1	1	112	0.75
Lysine	2	1	1	108	0.24
Valine	1	0	1	101	0.95
Histidine	3	0	1	101	0.92
Alanine	1	0	1	101	0.96
Isoleucine	1	0	1	101	1.54
Leucine	1	0	1	100	-
Methionine	1	0	1	99.9	1.76
Arginine	4	0	1	99.8	0.32
Glycine	1	0	1	99.3	2.70
Glutamic acid	1	0	1	98.2	0.42
Serine	1	0	1	97.6	0.53
Threonine	1	0	1	96.8	0.47
Aspartic acid	1	0	1	96.7	1.05
Glutamine	2	0	1	96.0	1.04
Phenylalanine	1	0	1	92.6	0.70
Tyrosine	1	0	1	91.1	1.44
Tryptophan	2	0	1	89.3	0.48
Asparagine	2	0	1	64.1	0.74
Cystine	1	0	1	45.9	1.23
Proline	1	0	0	10.1	7.29

3. 2 輸入品を用いたアミノ態窒素の定量性の比較

3. 2. 1 アミノ酸定量時と同条件での比較

今回、比較に用いた輸入品検体の概要を Table 3に示す。

Table 3 Characteristics of samples for comparison

Sample	Main Contents	TN(%) ¹⁾
A	Hydrolysate from Yeast	11.2
B	Amino acid and Sodium chloride	8.3
C	Enzymatic hydrolysate of Casein	14.1
D	Protease from Gelatin and Collagen	17.0
E	Chicken liver powder	10.2
F	Pork liver powder	9.4
G	Peptone from Casein	13.4
H	Silk protein solution	3.4

1) TN(%) is quantitated by Fully Automatic Nitrogen/Protein Rapid Measurement Equipment by The Kjeldahl Method

本研究ではまず、バンスライク法及びニンヒドリン比色法で、5検体（A～E）のアミノ態窒素の定量を行った。その結果を Table 4に示す。

Table 4 Recovery ratio of α -Amino Nitrogen for protein products

Sample	AN(%) ¹⁾		Recovery Ratio(%) ²⁾
	Photometric Ninhydrin Method	Van Slyke Method	
A	4.04	5.12	78.9
B	5.32	5.65	94.1
C	1.79	3.52	51.0
D	0.92	1.78	52.0
E	0.75	1.00	74.9

1) Wt.% of AN against Sample amount

2) Calculated by follows

Recovery Ratio(%)=AN1/ AN2×100

AN1(%) : Determined by The Photometric Ninhydrin Method

AN2(%) : Determined by The Van Slyke Method

検体Bで定量値が近似したものの、全ての検体において、バンスライク法に対するニンヒドリン比色法でのアミノ態窒素の定量値が低くなっていることがわかり、特に検体C、Dについては非常に低い値となった。個々のアミノ酸のアミノ態窒素の回収率の差は小さいことから、輸入品においては、種々の成分が混在していることや、これらの影響でニンヒドリン試薬の活性が阻害されるなどの要因がある場合も考えられ、反応条件の検討を行った。

3. 2. 2 ニンヒドリン比色法の反応条件検討

定量比（バンスライク法から得られたアミノ態窒素量を100とした場合の定量値の比）の小さかった検体C、Dを用いて、反応時に添加するニンヒドリン試薬の量を増やしていき、定量値の変化を検討した結果を Fig.3に示す。

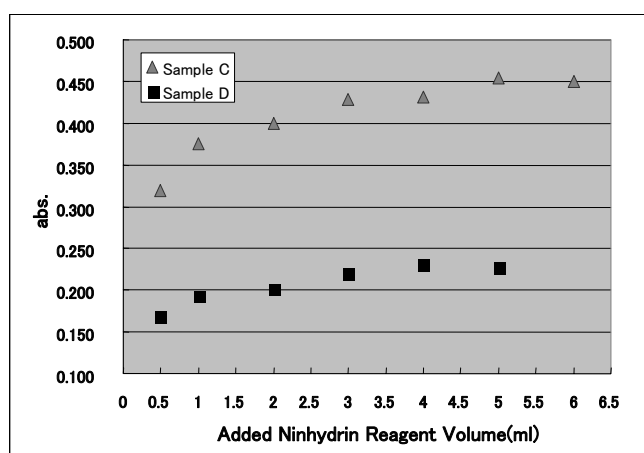


Fig.3 Relationship between absorbance and reagent volume against substrate solution (1ml)

試料量に対して5倍量のニンヒドリン試薬を加えたところで、両検体の吸光度が最大となっていることが判った。

この検討後の条件で、さらに3検体（F、G、H）を追加してアミノ態窒素の定量を行った結果を Table 5に示す。検討後の条件では、5検体（A～E）全てにおいて定量比が改善されているのがわかる。

Table5 Recovery ratio of α -Amino Nitrogen for protein products after consideration

Sample	AN(%)		Recovery Ratio(%) ²⁾
	Photometric Ninhydrin Method	Van Slyke Method	
A	4.70(1.07) ¹⁾	5.12	91.9
B	5.84(0.60)	5.65	103
C	2.89(2.17)	3.52	82.2
D	1.43(1.14)	1.78	80.4
E	0.93(2.79)	1.00	92.5
F	3.92(1.19)	4.83	81.2
G	1.28(0.33)	1.49	86.2
H	1.42(2.86)	1.60	89.0

1) Coefficient of variation

2) Calculated by follows
 $\text{Recovery Ratio}(\%) = \text{AN1} / \text{AN2} \times 100$

AN1(%):Determined by The Photometric Ninhydrin Method

AN2(%):Determined by The Van Slyke Method

従って、以後の実験は、全て検討後の条件で反応を行った。

しかしながら、検討後においても検体Bを除く全ての検体において、バンスライク法よりも定量値が低くなっているという傾向は変わらなかった。Fig.4は、各検体の全窒素量（TN）と、ニンヒドリン比色法とバンスライク法の定量比との関係を示したものであるが、検体の TN が高い程、定量比が小さくなる傾向が見られた。このような傾向は、ニンヒドリン比色法とバンスライク法の、たんぱく質（ペプトン、ペプチド等も含めて）中のペプチド態窒素に対する反応性の違いによるものではないかと考えられた。これは、バンスライク法において、グルタミン中の側鎖のアミド窒素が定量されていると考えられる結果が得られたことから示唆された。

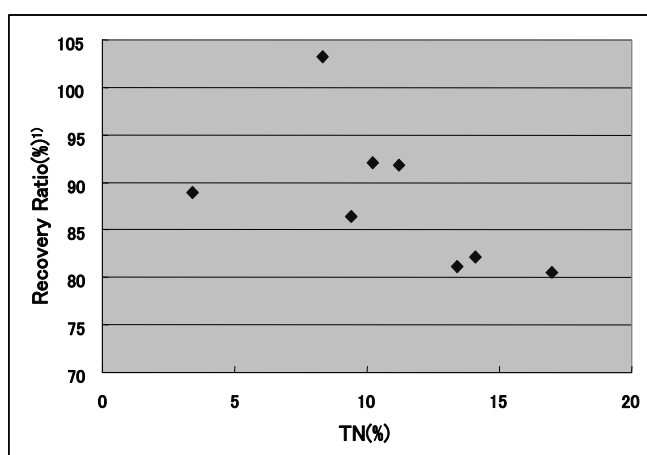


Fig.4 Relationship between Recovery ratio and Total Nitrogen(TN)% of sample

3. 2. 3 試料中のたんぱく質が定量値に及ぼす影響の比較

(1) ペプチド態窒素への反応性

グリシルグリシンを用いて、ニンヒドリン比色法とバンスライク法でANを定量した結果を Table 6に示す。

Table 6 Comparison of Reactivity for Nitrogen of peptide bond

Quantitative Method	Recovery(%)	
	Glycyl-Glycine	Glycine
Van Slyke	138	105
Photometric Ninhydrin	88	99

グリシルグリシンは、グリシン2分子がペプチド結合したものであり、分子中に一級アミンとペプチド態窒素の2つの窒素原子を有するが、両手法において、反応機構上定量されるのは末端の一級アミンのみであり、そのAN回収率もグリシンの回収率に近い値になることが予想された。

しかし、バンスライク法では、30%程度のペプチド態窒素が反応していると考えられる定量結果が得られた。これは、バンスライク法は酢酸酸性条件で反応を行うため、一部の分子で酸加水分解によりペプチド結合が開裂し、生じた一級アミンが定

量された等、何らかの反応によりペプチド態窒素が定量されたことによると思われる。これに対して、ニンヒドリン比色法は、他のジペプチドにおいても、ペプチド態窒素への反応性が低いという結果²⁾が報告されている。

従って、バンスライク法は、たんぱく質中のペプチド態窒素への反応性が、ニンヒドリン比色法よりも高いことが確認された。

(2) たんぱく質溶液に添加したアミノ酸の回収率

試料中のたんぱく質が、アミノ態窒素の定量に影響するのかを検討した結果を Table 7 に示す。

Table 7 Recovery of α -Amino Nitrogen from amino acid added into containing protein sample

Sample	Recovery(%) of added AN	
	Van Slyke Method	Photometric Ninhydrin Method
Peptone	101	100
Albumine	101	104

市販のたんぱく質製品 2 種（ペプトン、アルブミン）を用いて、たんぱく質溶液を調製し、AN の定量を行った。次に、この AN 量既知のたんぱく質溶液に、10 種類（メチオニン、セリン、バリン、ヒスチジン、アラニン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン酸、グリシン、イソロイシン）のアミノ酸から調製した AN 量既知のアミノ酸溶液を添加したもののについて AN も定量した。

つまり、同じ量のたんぱく質溶液からなるものの一方にアミノ酸溶液を添加し、両者の AN 定量値の差が、添加したアミノ酸溶液中の AN 量となっているかを検証した。

たんぱく質溶液中に、ニンヒドリン比色法又はバンスライク法に対して、反応を阻害する様な要因があれば、添加したアミノ酸溶液中の AN は理論上の定量値より低くなることが予想されるが、ニンヒドリン比色法とバンスライク法どちらの手法においても良好な定量性が得られたことから、たんぱく質の存在により両分析法の定量性が低くなることはないことが確認された。

(3) アミノ酸を除去したたんぱく質等に対する反応性の検討

試料溶液中のアミノ酸濃度を透析膜を用いて除き、この透析膜不透過分を検液として定量を行った。透析膜不透過分には、比較的高分子量のたんぱく質成分が存在するため、これを検液とすることで、両定量法のたんぱく質成分への反応性の評価を試みた。その結果を Table 8 に示す。

検体 C で、定量比が 100% を超えているが、他の試料では、いずれもバンスライク法が高い定量値を示す傾向にあり、特にペ

プトン、検体 D においては定量値の差が大きくなっている。一方で、Table 8 の結果は、ニンヒドリン比色法においても、たんぱく質成分中の窒素に対して、ある程度の反応性を有することも示している。これは、たんぱく質のアミノ末端や、リジン、

Table 8 Recovery ratio of α -Amino Nitrogen of dialyzed sample

Sample	Recovery Ratio(%) ¹⁾
peptone	83.2
albumine	98.6
C	105
D	85.4
G	97.8

1) Calculated by follows

Recovery Ratio(%)=AN1/AN2×100

AN1:Determined by Photometric Ninhydrin Method

AN2:Determined by Van Slyke Method

オルニチン等の側鎖のアミンとの反応によるものや、或いは輸入品の場合、構造中に一級アミンを有する添加物の影響等が考えられるが、バンスライク法においても同様のことが考えられる。

従って、上記 3. 2. 3 (1) 及び (3) の結果は、いずれもバンスライク法が、たんぱく質中のペプチド態窒素に対する反応性が、ニンヒドリン比色法よりもやや高いことを示唆している。

4. 要 約

たんぱく質を構成するアミノ酸 21 種類の各々について、ニンヒドリン比色法及びバンスライク法でアミノ態窒素の定量を行ったところ、ニンヒドリン比色法においても、バンスライク法と同様に良好な定量性が得られることを確認した。

実際の輸入品に対して、両分析法によりアミノ態窒素の定量を行った結果、両分析法の定量値が比較的近似した検体が多く見られたものの、ニンヒドリン比色法の定量値が全体に低く、最大 20% 程度の定量差がある検体もあった。

輸入品検体の全窒素量が高いほど、バンスライク法に対するニンヒドリン比色法の定量比は低くなる傾向が見られ、これには、バンスライク法は、たんぱく質中のペプチド態窒素に対する反応性が、やや高いことを示唆する結果が得られた。

従って、ニンヒドリン比色法をバンスライク法の代替分析法とする場合、両者の反応性の違いを考慮する必要があると思われる。

文 献

1) 波多野博行：“アミノ酸自動分析法”，(1964)，(化学同人)。

2) S. Moore, W.H. Stein : *J. Biol. Chem.*, **176**, 367 (1948)。

3) 三浦洋，田村真八郎，剣持久仁子，鈴木忠直，高野和子：食料研究所研究報告，**26**, 29 (1971)。

4) 寺野重造，古川剛，矢島恵子，田村久子：農林規格検査所 調査研究報告，**6**, 605 (1982)。

5) 赤堀四郎，金子武夫，成田耕造：“タンパク質化学 1”，(1969)，(共立出版)。