

アミノ態窒素の測定法の検討

早川 横*, 河嶋 優美*, 片山 貴之, 山崎 幸彦*

Investigation of Methods for Determining Amino Nitrogen of Amino Acid

Akira HAYAKAWA*, Yuumi KAWASHIMA*, Takayuki KATAYAMA* and Yukihiko YAMAZAKI*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

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

Protein degradation products are classified differently in the Customs Tariff Schedule depending on the extent of degradation. The level of degradation can be determined by measuring the content ratio of amino nitrogen (AN), derived from free amino acid, to total nitrogen (TN) in the sample. In this study, using several types of peptone as analytical samples, we examined the following three methods of measuring AN: the Van Slyke method, the ninhydrin colorimetric method, and the formol titration method. In the case of the calibration curve method, when methionine was used as a standard amino acid for preparing the calibration curve, quantitative values of AN obtained by the ninhydrin colorimeter method and the formol titration method were smaller than those determined by the Van Slyke method. When using amino acid compositions prepared based on amino acid ratios which were calculated for each peptone, quantitative values of AN determined by the Van Slyke method and the formol titration method were very similar.

1. 緒 言

たんぱく質を酸又は酵素により分解したものは、その分解の程度により関税分類上の取り扱いが異なっている。そのため、たんぱく質の分解の程度を知ることは品目分類を行う上で重要な情報である。たんぱく質の分解の程度は、試料の全窒素分 (TN) に対する遊離アミノ酸由来のアミノ態窒素 (AN) の含有割合を求ることで、指標となる値を得ることができる。

現在、AN 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を用いて行っている。この方法は、アミノ酸のアミノ基が酢酸酸性下で亜硝酸と反応して生成する窒素ガスを測定し、AN を定量する方法であり、検量線作成用の標準アミノ酸としてメチオニンを使用している。一方、AN の定量法にはバンスライク法のほか、ニンヒドリン比色法、ホルモール滴定法などが知られている¹⁾。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成する青紫色の色素 (Diketohydridylidenediketohydridamin : DYDA) の吸光度を分光光度計により測定し、AN を定量する方法である。ホルモール滴定法は、アミノ酸水溶液にホルムアルデヒドを一定量加えた後に、残存するカルボキシル基に対し規定のアルカリ溶液で滴定することで、AN を定量する方法である。

後者の 2 つの方法は、バンスライク法に比べて専用機器を必要

とせず、また迅速かつ簡便な手法である。岩下ら²⁾は、各アミノ酸及びたんぱく質分解物におけるバンスライク法とニンヒドリン比色法による AN の定量結果の比較・検討結果を報告しており、寺野ら³⁾は各アミノ酸におけるバンスライク法、ニンヒドリン比色法及びホルモール滴定法による AN の定量結果の比較・検討結果を報告している。

本研究では、たんぱく質分解物であるペプトンについて、バンスライク法、ニンヒドリン比色法及びホルモール滴定法による AN の定量結果を比較・検討するとともに、検量線作成用の標準アミノ酸をメチオニンから各たんぱく質を構成するアミノ酸混合物に代えた場合の AN の定量結果についても比較・検討したので報告する。

2. 実験

2.1 試料

ペプトン 8 種 (ポテト、大豆、エンドウ、小麦、肉、ゼラチン、カゼイン、アルブミン由来)

2.2 試薬

2.2.1 バンスライク法

亜硝酸ナトリウム (和光純薬)

酢酸 (和光純薬)

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

2.2.2 ホルモール滴定法

ホルムアルデヒド (特級: 和光純薬)

0.05 N 水酸化ナトリウム (和光純薬)

2.2.3 ニンヒドリン比色法

ニンヒドリン (関東化学)

塩化すず (II) 二水和物 (和光純薬)

2-メトキシエタノール (特級: 和光純薬)

2.25 M クエン酸緩衝液 pH 5.10 (和光純薬)

エタノール (特級: 和光純薬)

2.2.4 アミノ酸組成比

20% 塩酸 (和光純薬)

β-メルカプトエタノール (1 級: 和光純薬)

試料希釈用緩衝液: クエン酸ナトリウム緩衝液 pH 2.2 (和光純薬)

2.2.5 アミノ酸

アスパラギン酸、アラニン、アルギニン、グリシン、グルタミン酸、バリン、リシン塩酸塩、ロイシン (関東化学)

プロリン (和光純薬)

2.3 装置及び分析条件

2.3.1 バンスライク法

アミノ酸自動分析計: SUMIGRAPH N-350

(住化分析センター(株)製)

測定条件: 反応部 ; 45°C

カラム槽 ; 120°C

検出器 ; TCD

2.3.2 ホルモール滴定法

電位差自動滴定装置: AT-420WIN (京都電子工業(株)製)

2.3.3 ニンヒドリン比色法

紫外・可視分光光度計: UV-2550 (島津製作所(株)製)

2.3.4 アミノ酸組成比

全自动アミノ酸分析機: JLC-500/V2 (日本電子(株)製)

2.4 実験

2.4.1 検量線作成用の標準アミノ酸として、メチオニンを用いた時 (以下、メチオニン法と略記する) の AN の定量結果の比較

2.4.1(1) バンスライク法

i 試薬の調製

60% 酢酸溶液: 蒸留水 40 ml と酢酸 60 ml を混合する。

40% 亜硝酸ナトリウム溶液: 亜硝酸ナトリウム 40 g を量り取り、蒸留水 60 ml を加え、溶解させる。

ii 検量線の作成

メチオニン約 2.663 g を 250 ml 容メスフラスコに正確に量り取り、蒸留水で定容しこれを標準原液とした (約 100 mgN/100 ml)。この標準原液 10、25、50、75 ml をそれぞれ 100 ml 容メスフラスコに採り、蒸留水で定容し標準液とした。標準原液及び標準液を用いて、アミノ酸自動分析計により窒素ガスを測定し、AN 量と窒素ガスの面積値の関係から検量線を作成した。

iii 試料測定

各ペプトン約 1 g を 100 ml 容メスフラスコに正確に量り取り、蒸留水で定容したものを試料液として、アミノ酸自動分析計により窒素ガスの面積値を測定した。

試料液の窒素ガスの面積値と作成した検量線から AN を算出した。

2.4.1(2) ホルモール滴定法¹⁾

i 検量線の作成

標準原液はバンスライク法と同様の方法で調製した。この標準原液 1、2、3、4、5 ml を採り、蒸留水を加え全量 120 ml としたものを標準液とした。これらの標準液を用いて、電位差自動滴定装置により滴下量を測定し、AN 量と滴下量の関係から検量線を作成した。

ii 試料液の調製

各ペプトン約 1 g を 100 ml 容メスフラスコに正確に量り取り、蒸留水で定容し試料原液とした。この試料原液 5 ml を採り、蒸留水を加え全量 120 ml としたものを試料液とした。

iii 反応及び滴定

0.05 N 水酸化ナトリウム溶液を標準液及び試料液に滴下し、pH 8.40 に合わせた。各溶液にホルムアルデヒド 15.0 ml を加え、150 秒間反応させた後、0.05 N 水酸化ナトリウム溶液を pH 8.40 になるまで滴下し、滴下量を測定した。

試料液の滴下量と作成した検量線から AN を算出した。

2.4.1(3) ニンヒドリン比色法²⁾³⁾

i ニンヒドリン試薬の調製

ニンヒドリン 500 mg にメチルセロソルブ 100 ml を加えたもの (A 液) と塩化第一スズ 200 mg を 2.25 M クエン酸緩衝液 (pH 5.10) 100 ml に溶解したもの (B 液) を調製し、使用直前に A、B 液を混合 (A 液 : B 液 = 3 : 2) したものをニンヒドリン試薬とした。(A 液と B 液を混合した際に、溶液が淡黄色又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ことから、鮮やかな赤色になることを確認し、試料への添加も試薬が赤色を呈しているうちに行った。)

ii 検量線の作成

メチオニン約 180 mg を 100 ml 容メスフラスコに正確に量り取り、蒸留水で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、10 ml をそれぞれ 100 ml 容メスフラスコに採り、蒸留水で定容したものを標準液とした。これらの標準液を用いて、紫外・可視分光光度計により吸光度を測定し、AN 量と吸光度の関係から検量線を作成した。

iii 試料液の調製

各ペプトン約 500 mg を 100 ml 容メスフラスコに正確に量り取り、蒸留水で定容しこれを試料原液とした。この試料原液から、5 ml を 100 ml 容メスフラスコに採り、蒸留水で定容したものを試料液とした。

iv 反応及び測定

試験管中で、標準液及び試料液 2 ml にニンヒドリン試薬 5 ml を添加、沸騰浴中で 30 分間加熱した後、直ちに氷冷し、60% エタノールを用いて 50 ml に定容し、測定波長 570 nm の吸光度

を測定した。冷却から吸光度測定までは、30分以内で行った。
試料液の吸光度と作成した検量線からANを算出した。

2.4.2 検量線作成用の標準アミノ酸として、アミノ酸組成比に基づき調製したものを用いた時（以下、アミノ酸組成比法と略記する）のANの定量結果の比較

2.4.2(1) アミノ酸組成比の算出⁴⁾

i 試料の分解

各ペプトン約3～5mgを加水分解用の分解管に取り、0.02%β-メルカプトエタノール含有の20%塩酸を約15ml加え、分解管を氷冷しながら真空ポンプで脱気し、脱気後145℃で4時間加水分解した。加水分解終了後、分解管中の試料液を蒸発皿に移し塩酸を蒸発させ、3回蒸留水で洗浄し、乾固後pH2.2の試料希釈用緩衝液に溶解し、0.45μmのマイクロフィルターでろ過し、そのろ液をアミノ酸含有量測定用の試料液とした。

ii アミノ酸組成比の算出

全自动アミノ酸分析機を用いて試料液中のアミノ酸含有量を測定し、アミノ酸組成比を算出した。

2.4.2(2) アミノ酸組成比法

2.4.2(1)の結果より、各ペプトンにおいて、含有割合の高いアミノ酸を選択し、アミノ酸組成比に基づき選択したアミノ酸をAN量が約100mgN/100mlとなるよう250ml容メスフラスコに正確に量り取り、蒸留水で定容し試料原液とした。

2.4.2(3) アミノ酸組成比法によるANの定量結果の比較

2.4.2(2)で調製したものを検量線作成用の標準アミノ酸に用いて、2.4.1と同様の操作によりANを算出した。

3. 結果及び考察

3.1 メチオニン法によるANの定量結果の比較

今回使用したペプトン（8種）におけるバンスライク法、ホルモール滴定法及びニンヒドリン比色法の検量線及び測定結果をFig.1～3及びTable 1に示す。

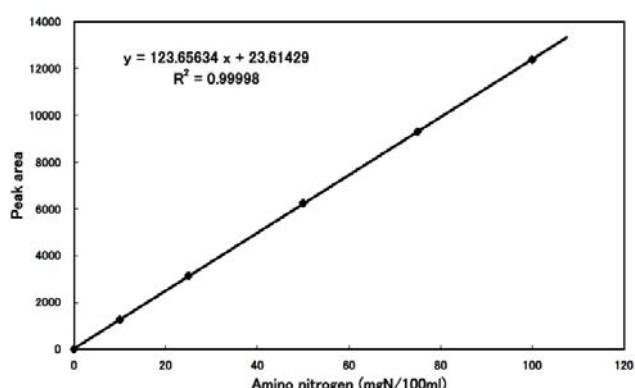


Fig.1 Calibration curve by Van Slyke method (standard amino acid is methionine)

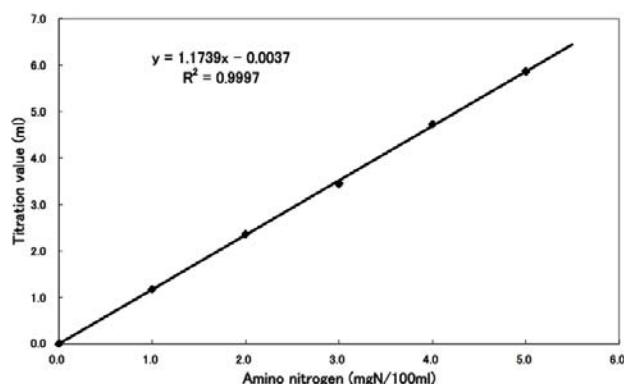


Fig.2 Calibration curve by formol titration method (standard amino acid is methionine)

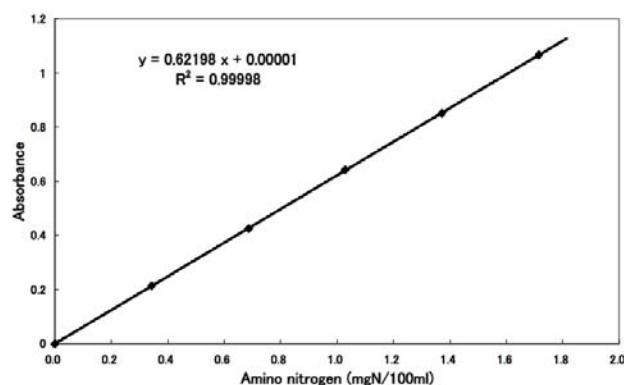


Fig.3 Calibration curve by ninhydrin colorimetric method (standard amino acid is methionine)

Table 1 Comparison of AN values of the three methods (standard amino acid is methionine)

Sample	AN (%)		
	Van Slyke method	Formol titration method	Ninhydrin colorimetric method
Pea	4.29	3.07	2.61
Albumin	6.39	5.88	4.42
Potato	6.22	4.96	4.74
Soybean	3.35	2.69	1.82
Gelatin	2.80	2.14	1.89
Casein	6.33	5.58	3.94
Wheat	2.12	1.63	1.26
Meat	3.73	3.08	2.57

いずれの方法においても、得られた検量線の相関係数は0.9997～0.9999と良好な相関関係を示した。しかし、ホルモール滴定法及びニンヒドリン比色法のANの定量値は、いずれのペプトンにおいてもバンスライク法のANの定量値より低く、バンスライク法のANの定量値と比較して、ホルモール滴定法で-0.49～-1.26%、ニンヒドリン比色法で-0.86～-2.39%であった。

この要因として、岩下ら²⁾及び寺野ら³⁾は、分析法の違いによるアミノ酸の反応性及び回収率の違いを指摘している。例えば、リシンの回収率は、バンスライク法で199%、ホルモール滴定法

で151%、ニンヒドリン比色法で108%であり、プロリンの回収率は、バンスライク法で0%、ニンヒドリン比色法で10%、ホルモール滴定法で44%である^{1), 2)}。そのため、今回使用したペプトン(8種)についても、各ペプトンに含まれ、反応に寄与しているアミノ酸と検量線作成用の標準アミノ酸に用いたメチオニンとの反応性及び回収率の差が、3つの方法におけるANの定量値に影響していると考えられる。

3.2 アミノ酸組成比法によるANの定量結果の比較

3.2.1 アミノ酸組成比の算出

各ペプトンのアミノ酸組成比の結果から選択したアミノ酸及び含有率をTable 2に示す。

Table 2 Content ratio of the main amino acid contained in each peptone

Amino acid	Sample (%)							
	Pea	Albumin	Potato	Soybean	Gelatin	Casein	Wheat	Meat
Asparagine	28.7	15.5	30.4	25.5		11.4		
Glutamic acid	47.6	37.0	27.8	43.5	16.4	36.0	76.1	22.6
Glycine					36.4			38.2
Alanine					14.3			17.1
Valine						10.6		
Leucine		17.5	23.7	15.2			13.3	
Lysine		14.7	18.1				12.0	
Arginine	23.7			15.8	12.9			
Proline		15.3			20.0	16.7	23.9	22.1

3.2.2 バンスライク法におけるメチオニン法とアミノ酸組成比法による比較

今回使用したペプトン(8種)におけるメチオニン法とアミノ酸組成比法のANの定量結果をFig.4に示す。

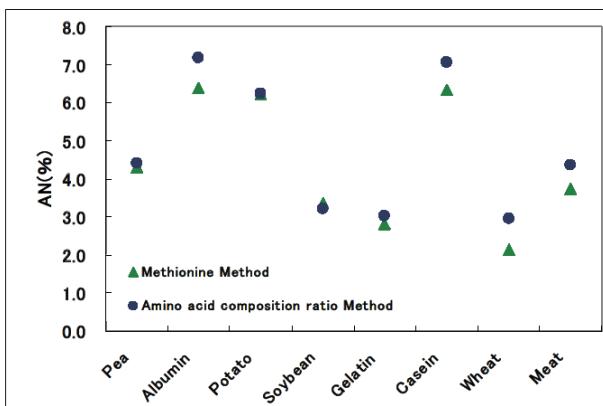


Fig.4 Relationship between methionine method and amino acid composition ratio method for each peptone. Methionine method (▲): Standard amino acid is methionine. Amino acid composition ratio method (●): Standard amino acid is based on the amino acid composition used for the standard.

プロリンの存在比が高いアルブミン、ゼラチン、カゼイン、小麦、肉由来のペプトンにおいて、アミノ酸組成比法によるANの定量値は、メチオニン法より高い値となった。

このことから、バンスライク法では全く反応しないプロリンの影響が示唆された。

3.2.3 アミノ酸組成比法によるANの定量結果の比較

今回使用したペプトン(8種)におけるアミノ酸組成比法によるANの定量結果をTable 3に示す。

Table 3 Comparison of AN values of the three methods (standard amino acid is based on the amino acid composition ratio)

Sample	AN (%)		
	Van Slyke method	Formol titration method	Ninhydrin colorimetric method
Pea	4.40	3.92	2.86
Albumin	7.18	7.21	6.25
Potato	6.24	5.82	4.80
Soybean	3.21	2.89	2.04
Gelatin	3.02	3.05	2.30
Casein	7.07	6.74	5.93
Wheat	2.96	2.91	1.81
Meat	4.35	3.91	3.38

各ペプトンにおいて、ニンヒドリン比色法のANの定量値は、バンスライク法のANの定量値と比較して-0.72 ~ -1.54%となった。一方、ホルモール滴定法のANの定量値は、ポテト由来のペプトンではバンスライク法のANの定量値と比較して-0.62%となったが、その他のペプトンにおいては、差が0.03 ~ 0.48%となり、アルブミン、ゼラチン及び小麦由来のペプトンにおいては、バンスライク法のANの定量値と近似する結果となった。

ニンヒドリン比色法のANの定量値が他の二法と比較して低くなった要因に、岩下ら²⁾はバンスライク法やホルモール滴定法において使用した酸やアルカリが、ペプトンに含まれるアミノ酸の二量体や三量体のペプチド結合を開裂させ、生じた一級アミンの影響を指摘している。

今回の研究では、2.4.2における混合アミノ酸の調製において全アミノ酸ではなく、含有率の高いアミノ酸のみを検量線作成用の標準アミノ酸として使用しており、全アミノ酸を使用した場合と特定のアミノ酸を使用した場合におけるANの定量結果について、今後検討する必要があると思われる。

4. 要 約

ペプトンについて、検量線作成用の標準アミノ酸にメチオニンを用いて、バンスライク法、ホルモール滴定法及びニンヒドリン比色法においてANの定量を行ったところ、バンスライク法のANの定量値と比較してホルモール滴定法及びニンヒドリン比色法のANの定量値は低い結果となった。要因として、各分析法において、アミノ酸の種類によって反応性に差が生じることが示唆された。

各ペプトンのアミノ酸組成比を算出し、そのアミノ酸組成比に基づき、アミノ酸を混合したものを検量線作成用の標準アミノ酸に用いて、ANの定量を行ったところ、バンスライク法とホルモール滴定法でほぼ近似する結果となった。

本研究では、各ペプトンの構成アミノ酸から含有率の高いアミ

ノ酸のみを標準アミノ酸に使用しており、含有率の低いアミノ酸を考慮していないため、分析試料中の構成アミノ酸全てを考慮する標準アミノ酸の調製方法を今後検討する必要がある。

文 献

- 1) 菅原龍幸, 前川昭男：“新 食品分析ハンドブック”, (2000), (建帛社).
- 2) 岩下伸行, 片山貴之, 赤崎哲也, 朝長洋祐: 関税中央分析所報, **45**, 49 (2005).
- 3) 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).
- 4) 鈴木忠直, 安井明美: 食品総合研究所 研究報告, **59**, 43 (1995).