

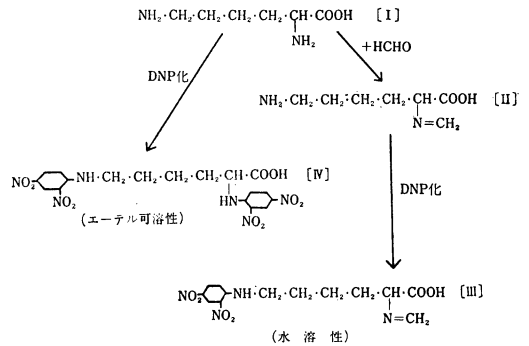
29 2, 4-Dinitrofluorobenzene による遊離 L- リジンの比色定量法について (その1)

北海道立衛生研究所 福 士 敏 雄

緒 言

数多くのアミノ酸の中でリジンだけを単独に定量しなければならぬことが多い。たとえば食品、ことに小麦粉および小麦粉加工製品の蛋白効果を高める目的でその制限アミノ酸であるリジンを添加する場合があるが、このような栄養強化食品の研究あるいは検査分析においてその必要性が高い。しかし複雑な成分組成を有する加工食品中の遊離リジンを比較的簡単に、しかも直接的に測定できる良い方法は見当らない。リジンの化学的定量法としてはフェノール試薬法¹⁾²⁾³⁾があるが、これにも妨害発色する物質が多く、加工食品などに应用するためにはイオン交換樹脂などによってリジン区分を完全に分別してから定量しなければならない。これとは別に F. Sanger⁴⁾ は 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene (2, 4-dinitrofluorobenzene, 以下 DNFB) をもちいて蛋白質を dinitrophenylation (DNP) 化し、加水分解後えられる DNP- アミノ酸をしらべ、蛋白質の構造決定に大きな業績を残したが、この手法はさらに蛋白質ペプチド鎖中のリジン定量に应用され、いわゆる available lysine (有効性リジン) の定量法^{5)~9)}として採用されている。蛋白中の一般のモノアミノ酸は N- 末端アミノ酸を除いて DNP 化されないが、リジンは蛋白中においても遊離の ε-NH₂ 基をもつために、これが DNP 化され、加水分解すると水溶性の ε-DNP- リジンを生ずる。この場合に水溶性 DNP- アミノ酸としてはほかに ε-DNP- システイン、di-DNP- ヒスチジン、im-DNP- ヒスチジン(塩酸加水分解時に分解されやすい) などもあるが、その種類と量が非常に限られるのでそのまま比色定量したり、必要があれば ε-DNP- リジンをさらに分離して定量がおこなわれる。

著者は DNFB による蛋白中リジンの定量原理を遊離リジンの定量に対して応用を試みた。遊離リジン [I] に直接 DNFB を作用させると di-DNP- リジン [IV] を生ずるが、このものは他の多くの DNP- アミノ酸と同様にエーテル可溶性であって、そのままでは分離定量が困難である。すなわちリジンの ε-NH₂ 基だけを DNP 化させるためには α-NH₂ 基を封鎖ないし分解することが必要である。この目的のためにホルマリンを使用した。一般にアミノ酸は中性、常温でホルマリンを加えると α-NH₂ 基はホルムアルデヒドと縮合してメチレン誘導体を形成す



第1図 リジンの DNP 化

る。もちろんこの縮合はメチレン、メチロールあるいはジメチロール体など複雑な平衡にあると考えられているが、この反応により通常の α-モノアミノ酸の NH₂ 基は DNFB によって大部分が DNP 化されなくなり、一部 DNP 化されたものもエーテル可溶性のために水層部にはまったく着色が認められない。これに対してリジンの場合は黄色の水溶性誘導体が一定比率で生成することが明らかとなった。これは ε-NH₂ 基のみが DNP 化された ε-DNP-α-メチレンアミノ誘導体 [III] と推定される。以上の原理にもとづいて遊離リジンの比色定量法の実験、検討をおこなった。

実験および結果

I. 実験における定量基本操作

1. 試 薬

(1) DNFB 溶液：2, 4-dinitro-1-chlorobenzene と KF とから Cook と Saunders による方法¹⁰⁾で合成し、b. p. 136~138°C/2 mm 区分をもちいた。これを試験濃度 % になるようにエチルアルコールに溶解する。

(2) 中和ホルマリン：ホルマリン(特級)を10% Na₂CO₃ で pH 試験紙により pH 6.8~7.0 に中和する。

(3) エーテル：常法により精製し過酸化物を除去したものを使用。

(4) その他 N- 塩酸、重炭酸ナトリウム(重曹)

2. 基本操作

最適の反応および定量条件を求めるためにあらかじめ基本となる一定の操作順を次のように設定した。

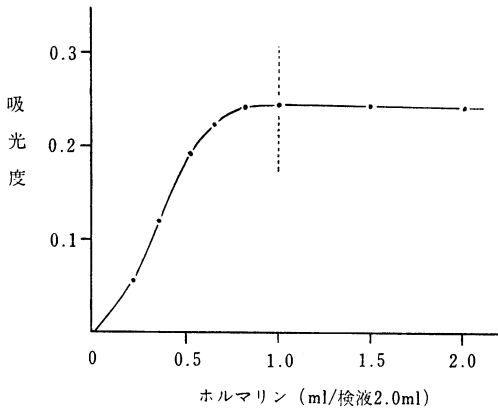
50 ml 共栓付遠沈管に検液としてリジン塩酸塩溶液 2.0

ml をとり、これに中和ホルマリン (1.0 ml) を加えて静かに振りまぜる。ついで重曹 (0.1 g) を添加し振りまぜながら溶解させたのち、DNFB 溶液 (6.0 ml, 検液とホルマリン合計容量の2倍量をもちいてアルコール濃度66%になるようにする) を加え、室温下に暗所で振盪しながら (2時間) DNP 化させる。反応後 N- 塩酸で酸性とし、湯浴によりアルコールとホルマリンの大部分を蒸発させる。次に水を加え数回エーテルで振盪抽出して DNFB, ジニトロフェノール (dinitrophenol) その他を除去する。水層部は加温して残存エーテルを除いたのち、pH を調節して一定量にし、その黄色水溶液について分光光度計 (日立 101形) により 430 m μ における吸光度を測定する。

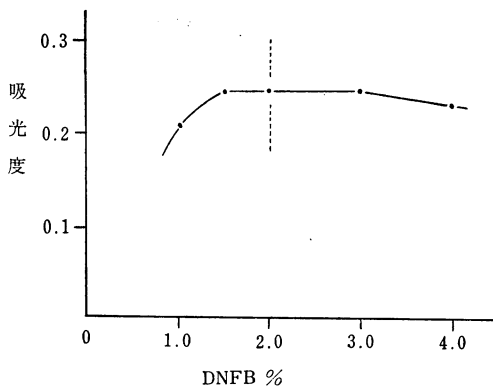
II. 定量条件の検討

1. ホルマリン添加量について

検液 2.0 ml に対し中和ホルマリンの添加量を 0~2.0 ml に変化させた場合に得られる吸光度を第2図にしめした。

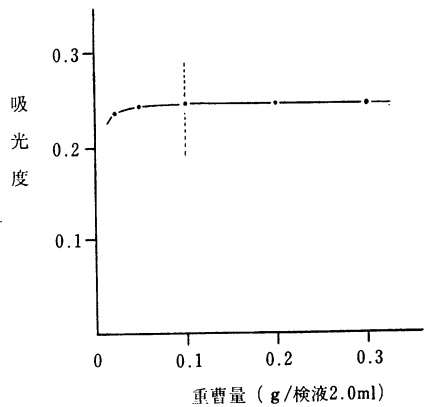


第2図 ホルマリン添加量と呈色度



第3図 DNFB 試薬濃度と呈色度

ホルマリン無添加、すなわち通常の DNP 化をおこなうと di-DNP- リジンのみが生成し、これはエーテル層にとけて濃黄色を呈する。数回のエーテル抽出により水層部はまったく無色透明となる。ホルマリン添加量が増加す



第4図 重曹添加量と呈色度

るにしたがってエーテル層は淡色となり、そり代りに水層部の着色が強くなる。この実験においてホルマリン 1.0~1.5 ml 添加したものがもっとも水層の呈色が強く、エーテル可溶の di-DNP- リジンの生成はきわめて僅少であった。またさらにホルマリンを増加させると DNP 化が若干低下する傾向にある。この場合は ϵ -NH₂ 基の N-メチレン化もわずかに促進されるためと考えられる。以上の結果から検液 2.0 ml に対する中和ホルマリン添加量は 1.0 ml, すなわち検液の1/2容量を使用することにした。

2. DNFB 溶液濃度について

DNP 化におけるアルコール濃度は F. Sanger の条件すなわち66%を原則としたが、これを55%および50%で試みると水層部の呈色も低くなる傾向にあったので、アルコール濃度はすべて66%に一定にしておこなった。DNFB 試薬濃度の決定のために 1.0~4.0 %溶液を使用し、検液 2.0 ml, ホルマリン 1.0 ml, 重曹 0.1g に対し各濃度の DNFB をそれぞれ 6.0 ml 加えて実験した。結果は第3図である。1.5~2.0%濃度がもっとも良好であったので 2.0%に決めた。

3. 重曹添加量について

DNP 化に際して使用する重曹量は 0.02~0.3 g の間で試験した。第4図に見られるように 0.1~0.3 g の間では差が認められなかったが、それ以下ではやや低い値となる。検液 2.0 ml に対し重曹 0.1g を使用した場合、室温でやや溶けにくく、ついで DNFB 試薬を加えると重曹が折出白濁し、完全な飽和状態となる。このために 0.1~0.3 g の添加ではほとんど差異がないものと考えられ、重曹添加量は 0.1g で十分であることがわかった。

4. 反応時間について

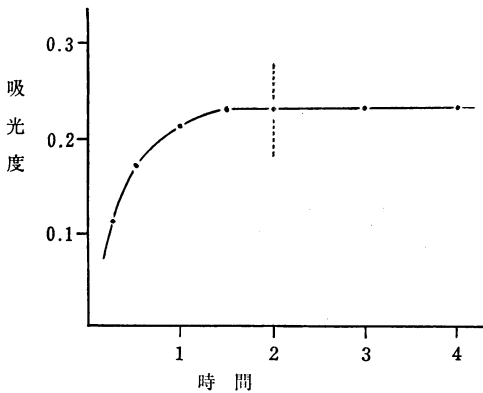
DNFB による DNP 化時間は暗所で2時間室温で振盪するのが一般的である。この実験においても同様に2時間で呈色は最高であり、かつ十分であることを認めた (第5図)。

5. 比色液の pH について

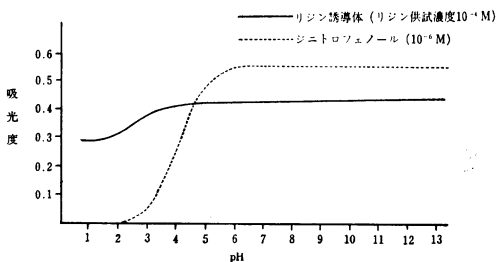
DNP アミノ酸は通常酸性溶液におけるよりもアルカリ

性溶液中における方がその吸光度は高い。それゆえ pH によって吸光度が変化するので定量の場合は pH を一定に調整する必要がある。本定量法において生成する呈色誘導体もまた同じように pH の影響を受ける。また DNP 化反応中にはアミノ酸の有無にかかわらずジニトロフェノールが副生するが、これはアルカリ性で強く黄色に呈色するため、完全にエーテルで抽出除去しないとしばしば誤差の原因となることが多い。リジン呈色物およびジニトロフェノールの各水溶液について pH を変えた場合の吸光度は第6図のとおりであった。

リジン呈色物は pH 4.0 付近を境にして、酸性側では pH の低下とともに吸光度も低くなり、pH 1.0~1.5 の間で安定となる。また pH 4.5~5.0 以上では吸光度が高く、しかも強アルカリ性に至るまでその値はほとんど一定であった。このことから比色液の pH については吸光度が安定であって、かつ高い値をもつ中性~アルカリ域が有利であると一応考えられる。他方副生するジニトロフェノールでは pH 7.0 以上においてほとんど一定値をとり、しかも非常に強く呈色しているが、酸性になるにしたがい減少し、pH 1.0~2.0 ではほとんどまたはまったく呈色をしめさない。



第5図 DNP 化反応時間と呈色度



第6図 溶液 pH と呈色度の変化

以上の結果からアルカリ域で比色することが有利であるが、そのためにはエーテル抽出を十分繰返してジニトロフェノールを完全に除かなければならない複雑さがある。これに対して pH 1.0~2.0 ではリジンによる呈色はいくらか

低下するがジニトロフェノールの影響を受けない利点があり、本法では原則として pH 1.0~2.0 という酸性下で比色をおこなうことにし、とくにリジン含量の少ない検液などについては中性~アルカリ溶液中で比色定量することにした。

第1表 呈色物の光と溶液 pH による影響

条 件	経過時間 pH	0	1	2	3	6
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
(A) 暗 所	1.2	100	100	100	100	99.0
	7.0	100	100	100	100	100
	12.0	100	100	100	100	100
(B) 間接自然光 (明るい窓際)	1.2	100	29.0	23.6	21.6	16.5
	7.0	100	89.0	86.2	85.4	82.8
	12.0	100	66.7	60.6	55.8	55.5
(C) 蛍光灯照明	1.2	100	98.9	97.2	95.5	90.2
	7.0	100	100.0	99.6	99.6	98.2
	12.0	100	99.7	98.5	98.3	95.5
(D) 蛍光灯照明 部分的遮へい	1.2	100	100	100	99.3	98.7
	7.0	100	100	100	100	100
	12.0	100	100	100	100	99.2

6. 光による影響について

一般に DNP アミノ酸類は光に対して不安定であるから実験操作は多くの場合暗所でおこなうのが普通である。この定量法を実施する際にも当然その遮光条件が問題となるので次の実験をおこなった。

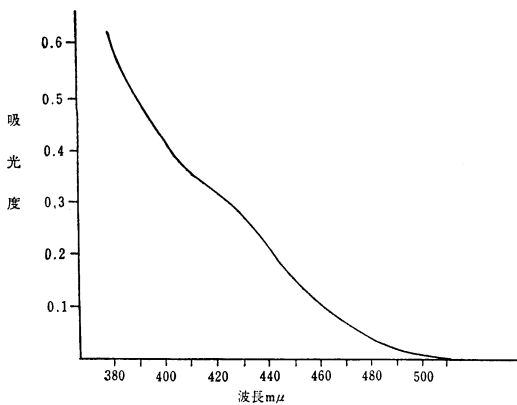
呈色物水溶液の pH をそれぞれ 1.2, 7.0 および 12.0 に調整し、おのおのを比色用キューベット (10×10×45 mm) に入れ下記の条件のもとで白紙上に並べて放置した。

- (A) 完全な暗所におく。
- (B) 非常に明るい間接自然光の窓際に放置。
- (C) 自然光線が入らない室内の実験台上におき、1.5m 上方から蛍光灯 (40 W×4) で照射した。
- (D) (C) と同じ個所にならべ、蛍光灯光線が直接あたらないように上方を厚紙でさえぎり、部分的に遮へいした。

暗所 (A) では6時間ほとんど吸光度の低下は見られなかったが、間接自然光の強い場所 (B) では1~2時間で急速に褪色し、中性溶液中よりもアルカリ性でより不安定であり、酸性ではさらに分解が促進された。蛍光灯下では (B) ほどの分解はないが、呈色は漸減し、pH 1.2 において6時間後に約10%の低下を認めた。また 蛍光灯照明によりかなり明るい室内でも光線が直接あたらないような条件 (D) においては pH に関係なくいずれもほとんど影響をうけなかった。すなわち DNP 化反応は暗所でおこなうべきであるが、以後の操作はかならずしも暗所でなくても良くなるべく自然光の入らない蛍光灯照明の室内で部分的に遮光された物かげの状態であれば5~6時間内はとくに影

響をうけない。

7. 可視部吸収曲線 (第7図)



第7図 呈色物の可視部吸収曲線

III. 定量方式

前記の実験結果から次のように定量方式を設定した。

試薬：中和ホルマリン

重炭酸ナトリウム

2% DNFB アルコール溶液

N-塩酸

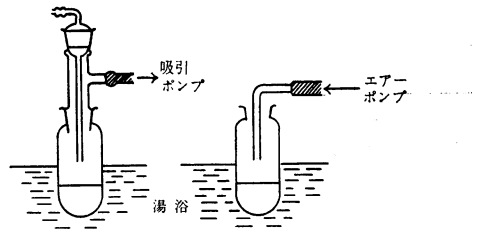
エーテル (過酸化物を含まぬもの)

操作：

- ① 50 ml 共栓付遠沈管に検液^{註(1)} 2.0 ml (リジン 0.05 ~ 0.5 mg) をとり、ホルマリン 1.0 ml 加えて静かに混合させる。次に重曹 0.1 g を入れて溶解させ、最後に 2% DNFB 6.0 ml を加える。
- ② これを暗所で室温のもとに 2 時間振盪する^{註(2)}。
- ③ 反応後 N-塩酸 1.2 ml 添加して酸性とし、湯浴につけ弱く通気^{註(3)} しながらアルコールを蒸発させ数 ml にする^{註(4)}。
- ④ 冷却後水 6.0 ml およびエーテル 20 ml を加えて栓

〔註〕

- (1) 検液はあらかじめ pH 6.8~7.0 に中和したものを供試する。
- (2) 振盪反応の代りにときどき振りまぜながら暗所に静置してもよい。
- (3) 遠沈管内での濃縮またはエーテル除去^⑦の目的には第8図のようにして液面に弱く空気を吹きつける方法がもっとも簡便である。
- (4) DNFB が析出して黄白色に濁濁する程度。
- (5) 中性~アルカリ域で測定する場合はここで pH 調節する。その際は^⑥の操作でさらにエーテル抽出を繰返し吸い出したエーテルにアルカリを加えて振っても着色しないこと、すなわちジトロフェノールが完全に抽出除去されたことを確認する必要がある。通常さらに 2, 3 回エーテル抽出を繰返すとよい。
- (6) リジン含量が比較的高い場合は、主検に検液 1.0 ml と水 1.0 ml をとり、添加実験として検液 1.0 ml に既知量のリジン標準液 1.0 ml を加えておこない、その比較から計算で求めてもよい。



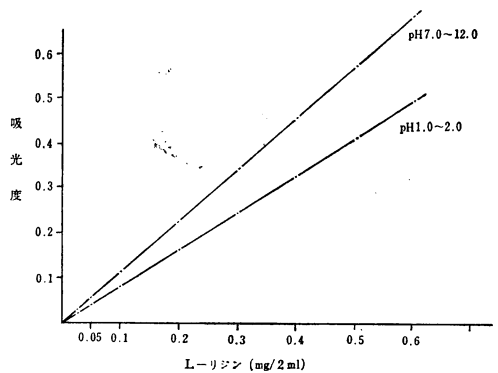
第8図 遠沈管内における蒸発、濃縮法 (液面に弱い気流を吹きつける)

をし、強く振盪抽出する。

- ⑤ エーテル層を駒込ピペットで吸い出し、ふたたびエーテル約 15 ml で振盪する。
- ⑥ エーテル抽出をもう一度同様に繰返す。(計 3 回抽出)
- ⑦ 遠沈管を湯浴につけて残存エーテルを除去する。
- ⑧ 冷後 N-塩酸 2.0 ml 加え^{註(5)}、25 ml メスフラスコに移し、水で標線までみたら。
- ⑨ 分光光度計により 430 mμ における吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線によってリジン含量を求める^{註(6)}。ブランクは 2% DNFB の代りにアルコールを使用、同様操作したものもちいる。

IV. 本法によるリジンの検量線

第9図のとおり検量線は直線をしめた。



第9図 検査線

V. 他のアミノ酸の呈色性について

1. 各種アミノ酸の呈色度比較

各種のアミノ酸および 5'-グアニル酸ナトリウム、5'-イノシン酸ナトリウムについて本法による呈色度を比較した(第2表)。供試量は検液 2.0 ml 中いずれも 0.3 mg である。

大部分のモノアミノ酸ではまったく呈色が認められないが、システインおよびシスチンはリジンに比較してそれぞれ 5.3%, 19.3% の呈色をする。アルギニン、ヒスチジンの両者はきわめてわずかに呈色するが、リジンの 1~2% 程度にすぎない。またグアニル酸、イノシン酸もまったく呈色をしなかった。

第2表 各種アミノ酸と5'-リボヌクレオチドの呈色度比較 (供試量 0.3 mg)

アミノ酸	吸光度	アミノ酸	吸光度
アラニン	0.000	プロリン	0.000
グリシン	0.000	トリプトファン	0.000
ロイシン	0.000	チロシン	0.000
イソロイシン	0.000	メチオニン	0.000
バリン	0.000	システイン	0.013
アスパラギン酸	0.000	シスチン	0.047
グルタミン酸	0.000	アルギニン	0.004
フェニールアラニン	0.000	ヒスチジン	0.003
オキシプロリン	0.000	リジン	0.243
セリン	0.000	5'-グアニル酸 ナトリウム	0.000
スレオニン	0.000	5'-イノシン酸 ナトリウム	0.000

2. シスチンによる妨害呈色除去についての一方法

シスチンはリジンの約1/2程度の呈色をしめすので、遊離のシスチンを含む試料ではリジン定量値に影響をあたえる。シスチンは通常の DNP 化では di-DNP- シスチンとなりエーテル層にただちに移行し、水層が呈色することはないが、ホルマリン添加をとまうと一部水溶性誘導体を生じて妨害呈色となる。しかしリジン呈色物は pH にかかわらずブタノールに可溶であるが、シスチンのそれはアルカリ性水溶液からは n-ブタノールに移行しないことがわかり、この性質を利用して両者の分離が可能である。両者を含む水溶液をアルカリ性とし、これに無水芒硝および n-ブタノールを加えて振盪後遠心分離をおこない、上層のブタノールを一定量にしてこれを比色すればシスチンの影響を除くことができる。この場合の検量線も直線をしめした。

考 察

本定量法における呈色はニンヒドリン法あるいはフェノール試薬法などの複雑な化学反応による発色とは異なり、リジンそのものに結合したジニトロフェニール基に由来する黄色呈色物を比色するというもので、前二者に比べて定量感度が若干低い。このホルマリン存在下の DNP 化反応はリジンの2個の NH₂ 基の pK 値の相異にもとずくと考えられ、ある範囲の条件下では一定の平衡が成立しているため微量の di-DNP- リジンの生成も認められたが、一方においては両 NH₂ 基ともにホルマリンが反応して DNP 化されていないものも当然生成していると思われる。しかし飽和に近い重曹アルカリ性の条件下でホルマリン添加、DNP 化することにより一定比率で水溶性呈色物が生成することは、検量線が非常に良好な直線となることから説明できる。アルギニンとヒスチジンはリジンの 1/100~2/100 の呈色が見られるが、一般にアルギニンは重曹下の DNP 化でグアニジン基は DNP 化されず¹¹⁾、

またヒスチジンのイミダゾール基は非常に緩慢に反応する¹¹⁾といわれるので、きわめてわずか水層に現われるのは α-NH₂ 基がメチレン化されずに DNP 化されてできた微量の α-DNP- アルギニンおよび di-DNP- ヒスチジンであろうと思われる。後者はエーテルと水の両相に分配される性質を利用しこれを除くことも検討したい。なおシステインとシスチン(除去可能)が主な妨害アミノ酸であるが、リジン強化食品などの抽出検液について実施する場合にこの両アミノ酸が遊離で比較的多量に含有されるということはほとんど考えられないので問題はなかと推察される。

要 約

2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) による遊離リジンの新しい比色定量法について研究した。リジンはホルマリン添加後に DNFB で DNP 化すると一定の比率で黄色の水溶性誘導体が生成するので、これを比色定量することができた。通常のモノアミノ酸はまったく影響をあたえない。アルギニンとヒスチジンはリジンに対して1~2%呈色するにすぎないが、システインとシスチンはそれぞれ5.3%、19.3%呈色する。とくに妨害の大きいシスチンの分離法についても試験した。本定量法はリジン強化食品の研究、検査などに応用できると考えられる。

文 献

- 1) Nelson, J. A., McFarlane, W. D., Boulet, M.: Federation Proc., 5, 148 (1946)
- 2) Kibrick, A. C.: Arch. Biochem., 20, 22 (1949)
- 3) 迫田, 岡田, 占部: 日化 76, 1146 (1955)
- 4) Sanger, F.: Biochem. J., 39, 507 (1945)
- 5) Carpenter, K. J., Ellinger, G. M.: Biochem. J., 61, (1955)
- 6) Bruno, D., Carpenter, K. J.: Biochem. J., 67, 13 (1958)
- 7) Carpenter, K. J.: Biochem. J., 77, 604 (1960)
- 8) Rao, S. R., Carter, F. L., Frampton, V. L.: Anal. Chem., 35, (1963)
- 9) 足立, 中西: 農化, 32, 728 (1958)
- 10) Cook, H. G., Saunders, B. C.: Biochem. J., 41, 558 (1947)
- 11) 水島, 赤堀編: 蛋白質化学, 4, 212, 共立出版

29. A New Colorimetric Method for the Determination of Free L-Lysine using 2,4-Dinitrofluorobenzene (Part 1)

Toshio Fukushi
(Hokkaido Institute of Public Health)

At the general dinitrophenylation of free lysine by 2, 4-dinitrofluorobenzene, di-DNP-lysine which is soluble in ethylether as many other DNP-amino acids is obtained. However, when the dinitrophenylation of lysine was carried out with existence of formaldehyde, it was observed that the water soluble and yellow colored derivertive of lysine was produced at the

constant ratio. This new colorimetric method was studied on the basis of the above principle, and the analytical procedure was established. With this method, most mono-amino acids never interfered, arginine and histidine did not nearly also, but cystine and cysteine interfered to some extent.