

インドフェノール青吸光光度法を用いたアミノ酸・タンパク質中の窒素の定量

松浦 紀之 (奈良女子大学附属中等教育学校)

あらまし

河川水中のアンモニア態窒素 NH_4^+ の定量測定で用いるインドフェノール青吸光光度法を応用することで、タンパク質やアミノ酸中の窒素の含有量を測定できないか検討した。検量線から求めたアラニン中の窒素の含有量は理論値と一致し、再現性もあったことから、タンパク質中の窒素の定量に利用できることが分かった。この方法は、ケルダール法と比べ 1/100 程度の窒素含有量の測定が可能であったことから、低濃度の測定に向いていることが分かった。

キーワード

インドフェノール青吸光光度法 タンパク質 アミノ酸 窒素定量

1. はじめに

タンパク質に含まれている窒素の割合は約 16% で、タンパク質の種類に関わらずほぼ一定である¹⁾。この特徴を利用して食品中のタンパク質量を求める方法として、ケルダール法がある²⁾。この方法は、タンパク質中に含まれる窒素を定量して、求めた値に係数(窒素-タンパク質係数)をかけることで、タンパク質量を見積もる。精度良い測定法であるが、ケルダール蒸留装置という大掛かりな装置が必要である(図1)。そこで、河川水中のアンモニア態窒素(アンモニウムイオン NH_4^+) の定量測定で用いるインドフェノール青吸光光度法を応用することで、タンパク質やアミノ酸中の窒素量を測定できないか検討した。

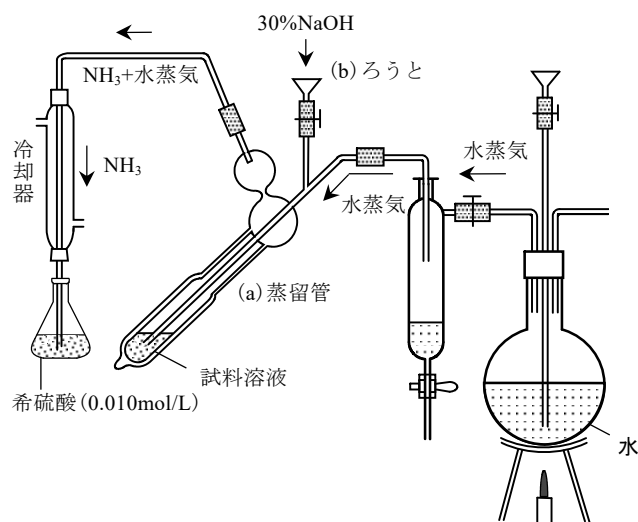


図1. ケルダール窒素蒸留装置

2. 実験方法

実験で用いた薬品は、購入したものをそのまま用いた。溶液の吸光度測定は、Shimadzu UVmini1240 を用いた。溶液の pH 測定は、pH メーター (HORIBA B-211) を用いた。

実験1. タンパク質(小麦粉)の分解

分解フラスコに薬包紙に包んだ試料(小麦粉 1.0 g) と分解促進剤 ($\text{K}_2\text{SO}_4 : \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} = 9 : 1$ で混合) 1.0 g, 濃硫酸 20 mL を入れ、ガスバーナーで強熱した。反応物が黒色から褐色を経て緑色溶液になったあと、さらに 30 分加熱を続けた。冷却後、反応溶液をイオン交換水で希釈してメスフラスコを用いて 100 mL にした。この操作は 3 回以上行い、再現性があることを確かめた。試料を含まず、他の条件を同じにした空試験を行った。

実験2. ケルダール法によるタンパク質の定量

実験1で希釈した試料溶液 5.0 mL をケルダール窒素蒸留装置の蒸留管(図1(a))に入れ、30% 水酸化ナトリウム水溶液(図1(b)から滴下)と混合して蒸留した。発生したアンモニアは、三角

フラスコに入れた 1.0×10^{-2} mol/L 硫酸水溶液 10.0 mL に吸収させた。この溶液を 1.0×10^{-2} mol/L 水酸化ナトリウム水溶液で滴定した(逆滴定)。この操作は、3 回以上行い測定値の平均値を求めた。同じ条件で、試料溶液を含まない空試験を行った。

実験3. インドフェノール青吸光光度法によるアンモニウムイオンの定量⁵⁾

リン酸緩衝液: 30.0 g (7.90×10^{-2} mol) のリン酸三ナトリウム十二水和物 $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 30.0 g (1.00×10^{-1} mol) のクエン酸三ナトリウム二水和物 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3.0 g (8.10×10^{-3} mol) のエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ をイオン交換水に溶かして全体を 1.00 L とした。

フェノール-ニトロプルシドナトリウム溶液: 30.0 g (3.20×10^{-1} mol) のフェノールをリン酸緩衝液に溶かしたあと、0.10 g (3.4×10^{-4} mol) のペンタシアニドニトロシル鉄(III)酸ナトリウム

二水和物 $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を加えて溶かし、さらにリン酸緩衝液で全体を 500 mL とした。

次亜塩素酸ナトリウム溶液：2.34 mL の次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (0.08~0.11 v/w%) と 13.56 mL の 30%水酸化ナトリウム水溶液にイオン交換水に加え、全体を 300 mL とした。

・硫酸アンモニウム標準液

330 mg の硫酸アンモニウムに蒸留水を加えて全体を 500 mL とし保存用の溶液を調製した。この保存用の溶液 1.0 mL には、180 μg のアンモニウムイオンを含んでいるので、この溶液 10 mL を 100 mL に希釈すると、1.00 L に 18.0 μg の NH_4^+ を含む。

・塩化アンモニウム標準液

267 mg の塩化アンモニウムにイオン交換水を加えて全体を 500 mL とし保存用の溶液を調製した。この保存用の溶液 1.0 mL が 180 μg のアンモニウムイオンを含んでいるので、この溶液 10 mL を 100 mL に希釈すると、1.0 mL に 18.0 μg の NH_4^+ を含む。

<検量線の作成>

NH_4^+ が 5~50 $\mu\text{g}/5\text{ mL}$ の測定範囲に収まるように、実験を行った。5 本の試験管に NH_4^+ の含有量がそれぞれ 9, 18, 27, 36, 45 μg となるように、硫酸アンモニウム標準液 (または塩化アンモニウム標準液) をそれぞれ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL 入れ、これにイオン交換水を加え全量を 5.0 mL とした。これらの試験管に 2.0 mL のフェノールニトロプルシドナトリウム溶液と 3.3 mL の次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えて攪拌した。30°C の水浴中で 45 分間放置したあと、分光光度計を用いて 635 nm の吸光度を測定した。

<試料溶液の吸光度測定>

試験管に実験 1 の試料溶液 5.0 mL (NH_4^+ を 5~50 μg 含むように希釈した) を入れ、水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 7 付近に調整した (実験 1 の試料溶液は、硫酸が含まれているので、はじめは酸性溶液である)。これに 2.0 mL のフェノールニトロプルシドナトリウム溶液と 3.0 mL の次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えて攪拌した。30°C の水浴中で 45 分間放置したあと、分光光度計を用いて 635 nm の吸光度を測定した。

3. 結果と考察

(1) タンパク質 (小麦粉) の分解

小麦粉に濃硫酸と分解促進剤を加えて高温で加熱すると、小麦粉は分解され、黒色から褐色溶液を経て緑色溶液になった (図 2)。このとき、小麦粉中の窒素はアンモニアに変化し、溶媒の硫

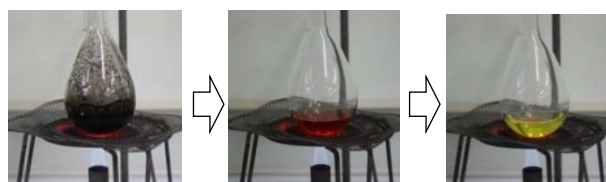


図 2. 硫酸による小麦粉 1.0 g の分解の様子 (左:加熱直後, 加熱 1 時間後, 右:加熱 1 時間 30 分後)

酸と反応しアンモニウム塩 (硫酸アンモニウム (NH_4)₂SO₄) となる。分解反応はアミノ態窒素と呼ばれる 3 価の窒素でのみ起こり、アゾ化合物やニトロ化合物では起こらないので、選択的な窒素の定量に応用できる³⁾。無機物である一酸化窒素や二酸化窒素などの窒素酸化物、窒素 N₂ も定量できないため、タンパク質内の窒素の定量測定では有利に働く。

(2) ケルダール法によるタンパク質の定量

ケルダール法は、日本工業規格によって規定された、食品中のタンパク質を調べる一般的な方法である。精度が高い方法とされるが、具体的な精度について記載された文献が手元になかったため、精度についても検討した。

小麦粉 (市販の薄力粉および強力粉, 日清製粉) を実験 1 の方法で分解し、実験 2 の方法 (ケルダール法) を行った。実験の結果、小麦粉中のタンパク質はそれぞれ、8.7 %, 11.4 % となり、文献¹⁾ の値とほぼ一致した (表 1)。

表 1. ケルダール法で求めた小麦粉中のタンパク質の割合 (%)

	薄力粉	強力粉
実験値	8.7	11.4
文献値 ²⁾	8.0	11.7

ケルダール法の精度の確認は、次の方法で行った。2 種類の小麦粉および含まれている窒素の含有量が分かっているアミノ酸 (アラニン C₃H₇NO₂) について、実験 1 により分解後、希釈した溶液を用いて実験 2 の実験を 5 回行い、その蒸留液を同一人物がそれぞれ滴定した結果を検討した。5 回の実験結果のばらつきが小さく、アラニン中の窒素の含有量の誤差から、ケルダール法はとても精度よく測定できる方法であることが分かった (表 2)。

(3) インドフェノール青法によるアミノ酸中の窒素の定量

実験 2 のケルダール蒸留装置によるタンパク質の定量実験は、原理は簡単であるものの、大掛

表 2. ケルダール法による小麦粉, アラニン中に含まれる窒素の割合 (%)

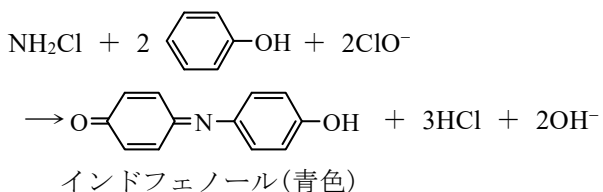
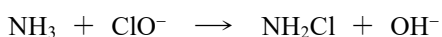
滴定回数	薄力粉	強力粉	アラニン
1 回目	1.53	1.99	15.49
2 回目	1.52	2.02	15.60
3 回目	1.52	1.98	15.77
4 回目	1.54	2.02	15.52
5 回目	1.55	2.00	15.74
平均	1.53	2.00	15.62
標準偏差	0.0057	0.0081	0.056

アラニン中の N 含有量は, 15.73% (理論値)

アラニンの分子式は $C_3H_7NO_2$

かりな装置が必要で, 蒸留操作に慣れる必要がある。そこで, 溶液中の化学種を定量する方法として一般的である比色法に着目した。比色法とは, 調べたい化学種の様々な濃度の溶液を準備し, 発色試薬を加えることで溶液を着色し, その色の濃さを比較することで, 目的の化学種を定量する方法である。溶液の色の濃さは分光光度計で測定する。分光光度計の代わりに, 安価な LED とフォトダイオードから自作できる簡易比色計でも測定可能である。そこで, 比色法の中で河川水中のアンモニア態窒素 NH_4^+ を定量する方法であるインドフェノール青吸光光度法^{4,5)}が, タンパク質やアミノ酸の定量に応用できないかと考えた。

インドフェノール青吸光光度法は, NH_4^+ を次亜塩素酸塩の共存のもとでフェノールと反応させ, 生じた青色のインドフェノールの吸光度を測定して定量する方法である。



実験 1 でタンパク質を分解することで得たアンモニウム塩を水溶液にすることで, 含まれる NH_4^+ の定量を行うことができる。様々な濃度の NH_4^+ を含む標準溶液 (比較検討のために, 硫酸アンモニウムと塩化アンモニウムの 2 種類) を用いて検量線を作成すると, どちらのアンモニウム塩でも NH_4^+ の濃度と 635 nm の吸光度には直線関係があり, 再現性もあった (図 3)。分子量 (窒素含有量) が分かっているアミノ酸の一種, アラニ

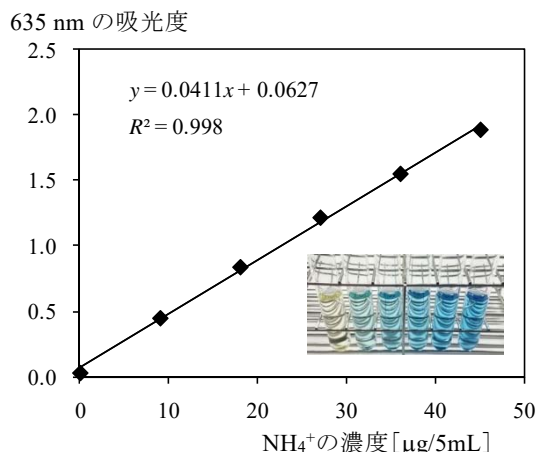


図 3. 水溶液中の NH_4^+ (硫酸アンモニウム) の濃度と 635 nm の吸光度の関係

表 3. インドフェノール青吸光光度法によるアラニン $C_3H_7NO_2$ 中の窒素の割合 (%)

実験値	化学式から求めた理論値
15.68	15.73

ン ($C_3H_7NO_2 = 89.09$) について, 窒素の含有量を求めてみると, 誤差 0.45% で測定できた⁶⁾ (表 3)。

さらに, タンパク質 (小麦粉) 中の窒素の含有量を求めると, ケルダール法と一致し, タンパク質中の窒素量の定量が可能であることが分かった。

実験条件について詳細に検討した結果, 試薬溶液の pH が 7 以下だと, 発色試薬を加えた後に褐色の沈殿が生じ, pH が 12 以上だと, 青色の発色が弱くなった。様々に pH を変えた比較実験の結果, 測定する際の溶液の pH が 11.0~11.8 のときに最も発色がよく, 定量的に測定ができることが分かった (発色試薬自体が塩基性であるため, 測定直前の溶液は塩基性になる)。また, 使用する次亜塩素酸ナトリウム中の塩素量 (有効塩素濃度という) は, 0.08~0.11 w/v % の範囲外の場合は, 青色の発色が弱くなった。さらにこの方法では, 実験 2 のケルダール法に比べ測定試料溶液の濃度を 1/40~1/100 にして測定することができるため, 微量の試料しかない場合にとっても有効な方法であることも分かった。

4. まとめ

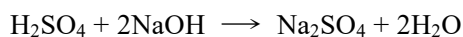
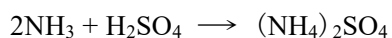
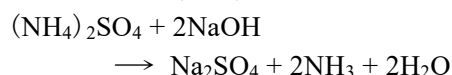
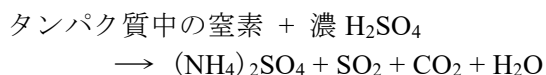
河川水中のアンモニア態窒素の定量測定で用いるインドフェノール青吸光光度法を応用して, タンパク質・アミノ酸中の窒素の含有量を精度よ

く求めることができた。ケルダール法と比べ1/100程度の窒素含有量の測定が可能であり、低濃度の測定に向いていることが分かった。

ケルダール法は、タンパク質を分解して得たアンモニウム塩に強塩基を加えて蒸留する操作を行うため、多量のタンパク質試料が必要となる。一方、本方法はケルダール法に比べ微量の試料でも測定可能という利点がある。実験操作が比較的簡単であることから、生徒の探究活動のテーマとして、河川水中の生活廃液（その多くはタンパク質を含む有機化合物）の微量測定などの教材にもなり得る。

参考文献・注釈

- 1) 日本食品標準成分表 2015年版(七訂), 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会報告, 2014
- 2) 片山榮子ら編著, 食品科学実験第2版, 地人書館, 2003.
- 3) ケルダール法の原理…タンパク質を含む食品に濃硫酸を加えて加熱分解して、タンパク質中の窒素を硫酸アンモニウム(NH₄)₂SO₄にする。これに強塩基の NaOH 水溶液を加えて水蒸気蒸留することでアンモニア NH₃ を発生させて、硫酸 H₂SO₄ と中和させる。このとき中和せずに残った硫酸の量は NaOH 水溶液で滴定することで求め、一定の係数(窒素-タンパク質換算係数)を掛けることで、はじめの食品中のタンパク質量(粗タンパク質量) [%]を見積もる。



粗タンパク質量(%) =

$$0.14 \times (a - b) \times f \times \frac{100}{5.0} \times \frac{100}{w} \times \frac{1}{1000}$$

×(窒素-タンパク質換算係数)

a : 空試験のときの 0.010mol/LNaOH 標準溶液の滴定量[mL]

b : 本試験のときの 0.010mol/LNaOH 標準溶液の滴定量[mL]

f : 0.010 mol/L NaOH 標準溶液のファクター

w : 試料の質量[g]

0.14 : 0.010 mol/L NaOHaq 1 mL に相当する窒

素量[mg]

- 4) 日本分析化学会北海道支部, 水の分析第5版, 化学同人, 2005.
- 5) 半谷高久, 小倉紀雄, 第3版水質調査法, 丸善, 1995.
- 6) アラニン 1.00 g を実験1により分解し, 100.0 mL の溶液に調整した。このとき含まれる窒素 N は 15.73 mg に相当する。このうち 5.00 mL を測りとり 40 倍に希釈(200 mL にする)と, N は 0.7865 mg = 786.5 μg に相当する。このうち 5.00 mL には N が 19.66 mg 含まれるので, NH₄⁺ に換算すると, 25.28 μg となる。