

were coloured with ninhydrin and their coloured spots were extracted with pyridin and quantitatively analysed by colorimetry. The recovery was 84~115%.

文 献

- 註 1) 坂本：電氣泳動によ小濾紙上アミノ酸の分離について（第一報）
鹿兒島縣大. 短期大学部紀要, 第二号 (1951).
-

Separated Amino-acids by Electrophoresis.

- A: protein hydrolysates; in Sørensen's buffer (pH. 7,8)
100V, 2hrs.
- B: protein hydrolysates; in Sørensen's buffer (pH 6,6)
100V, 3hrs.
- C: protein hydrolysates; in Sørensen's buffer (pH 5,9)
100V, 2hrs.
- D: hrotein hydrolysates; in Mc Ilvaine's buffer (pH 3,8)
100V. 2.5hrs.
- E: protein hydrolysates; in Sørensen's buffer (pH 7,8)
400A, 2hrs.
- F: protein hydrolysates; in Sørensen's buffer (pH 6,6)
400V, 2hrs.
- G: protein hydrolysates; in Sørensen's buffer (pH 5,9)
400V, 2hrs.
- H: protein hydrolysates; in Mc Ilvaine's buffer (pH. 3,8)
400, 2hrs.
- I: neutral amino-acids (serine & glycine)
in 5N CH₃COOH sol, 400V, 3.5hrs.

A

(+)

(-)

B

(+)

(-)

C

(+)

(-)

D

(+)

(-)

E

(+)

(-)

F

(+)

(-)

G

(+)

(-)

H

(+)

I

(+)

総 括

- (1) 300~450V 直流を用ひ濾紙上アミノ酸の分離を行つた。
- (2) 400V 直流を用ひ5 N醋酸中にて純粹中性アミノ酸混合物を等電点の差により3群に分離した。
- (3) 400V 直流を用ひpH 3.8 に於てアスパラギン酸、グルタミン酸を分離した。
- (4) 蛋白質加水分解物(5%ヒスチジン塩酸塩添加)を400V 直流を用ひ、pH 6.6 及び pH 3.8 に於てアスパラギン酸、グルタミン酸を分離した。
- (5) 蛋白質加水分解物を pH 6.6 にて通電し、分離したアスパラギン酸、グルタミン酸のニンヒドリン呈色部分をピリジンにて抽出比色定量を行い、回収率 84~115%を得た。

なほ、最後にこの実験に多くの協力を載いた浜田安氏に感謝の意を表する次第である。

Summary

We had already experimented that several amino-acids on the filter-paper were separated in various pH through the difference of their isoelectric points, with 100V direct current. The results were as follows;

1) The displacement degrees of amino acids from their original points increased in direct proportion to the time in which the current was on.

2) In the case of pure amino acids mixture, diamino-monocarboxylic acids, monoamino-monocarboxylic acids and cystine, and monoamino-dicarboxylic acids were separated from one another.

3) In pH 7.8, the protein hydrolysates were separated into three groups, which respectively contain monoamino-dicarboxylic acids, monoamino-monocarboxylic acids and cystine, and diamino-monocarboxylic acids.

4) In pH 5.9, the protein hydrolysates were separated into three groups, which respectively contain monoamino-dicarboxylic acids, monoamino-monocarboxylic acids and cystine, and hexon-bases.

5) In the case of protein hydrolysates (5mg/cc histidine HCl salt added), histidine was separated from other amino acids groups in pH 6.6.

6) After electrophoresis in pH 7.8, arginine and lysine were separated in the solvent of 20% phenol by paper-partition chromatography method. This time we separated them with higher current 300~450V D. C.

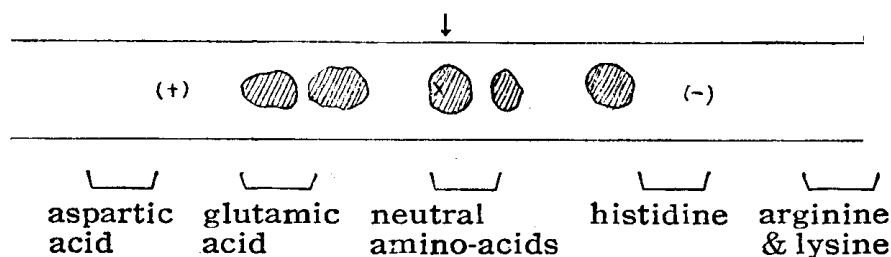
1) The pure neutral amino acids were separated into three groups in 5N acetic acid solution.

2) Aspartic acid and glutamic acid were separated in pH 3.8.

3) Aspartic acid and glutamic acid were separated severally from protein hydrolysates (5% histidine HCl salt added) in pH 6.6 & pH 3.8.

4) After electrophoresis, separated aspartic acid and glutamic acid

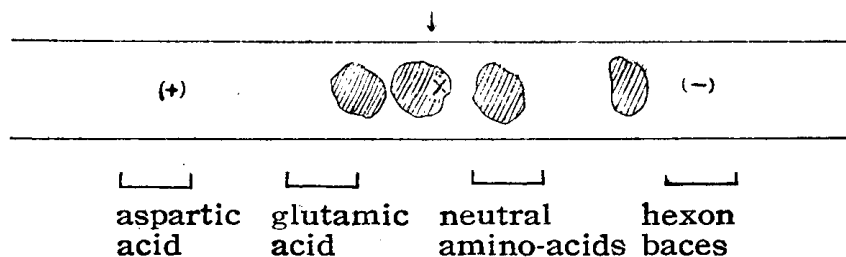
Fig. 3. in Sørensen's buffer (PH6,6) 400V, 2hrs.



(2) pH 3.8 に於ける分離

蛋白質加水分解物 1/1000 cc を原点に滴下し、pH 3.8 のクエン酸リン酸緩衝液中で 400 V 直流を 2 時間 30 分通電した結果、Fig. 4 の如く原点附近にグルタミン酸、陽極側にアスパラギン酸、陰極側に中性アミノ酸ならびにヘキソン塩基群を分離出来た。

Fig. 4. in Mc Ilvaine's buffer (PH. 3,8) 400V, 2.5hrs,



Ⅲ. アスパラギン酸、グルタミン酸の定量

蛋白質加水分解物 1/1000 cc 中に 10~20r のアスパラギン酸、グルタミン酸を含む様調製する。1/1000 cc を原点に滴下し、pH. 6,6 のリン酸緩衝液中にて 400 V 直流を 2 時間 30 分通電し分離を行ふ。これと並行し 1/1000 cc 中 5r、10r、15r、20r、25r、30r を含む標準液を同様通電分離する。次に濾紙を風乾後 0.5% ニンヒドリンブタール溶液を噴霧呈色させ、呈色部分を細かく切り取り試験管中にとり、ピリジンにて抽出、濾過後 5cc とし、光電比色計にて標準液と比色定量を行い回収率 84~115%を得た。

考 察

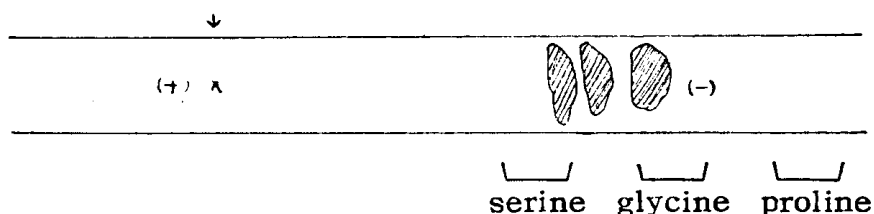
各アミノ酸の定性検出は前報と同様の方法を用いた。此の度も主にリン酸緩衝液を用いたが pH 6~7 附近では、各アミノ酸の等電点に最も影響の少ないペロナールソーダ緩衝液を用いると良好である。450 V 迄電圧を高めた利点としてアスパラギン酸、グルタミン酸の分離が行はれたので、ニンヒドリン呈色部分の抽出比色定量を行つたが、これは試料 10~30r 以内で Lambert-Beer の法則が成立したことにもよる。電圧の昇降の泳動に対する影響については、各アミノ酸の等電点、特に使用する緩衝液によつて微妙な影響をうけるので、pH による影響と同様定量的表現は差し控えることにし、目下検討を行つている。

なおこの場合グリシンの代りにアラニン、ヴァリン、ロイシン、チロジン、プロリン、トリプトファン、セリン、シスチン、メチオニンの如き中性アミノ酸を用いても同様の結果が得られた。

(2) 中性アミノ酸の分離

中性アミノ酸中プロリン、グリシン、セリン各溶液を滴下し、5 N 醋酸中にて3時間30分400 V 直流を通电した結果、Fig. I の如く原点より陰極側に順にセリン、グリシン、プロリンを分離した。

Fig. 1, in 5N acetic acid solution, 400V, 3.hrs.

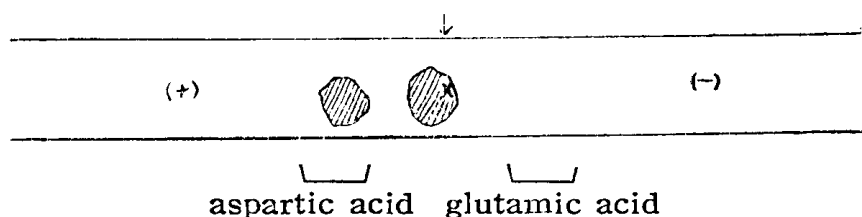


なおこの場合グリシンの代りにアラニン、ヴァリン、ロイシン、トリプトファンを使用しても同様に分離することを確認した。

(3) 酸性アミノ酸の分離

グルタミン酸、アスパラギン酸各溶液を原点に滴下し、pH 3.8 のクエン酸-リン酸緩衝液中にて400 V 直流を2時間通电した結果、Fig. 2 の如く原点より陽極側に順にグルタミン酸、アスパラギン酸を分離した。

Fig. 2. in Mc Ilvaine's buffer (PH.3,8) 400V, 2hrs.



II. 蛋白質加水分解物の分離

蛋白質加水分解物として新鮮卵白10 g を25 %塩酸で100°C、25時間分解後、脱色25cc に濃縮したものをを用いた。この場合供試液中ヒスチジン含量少なきため、分解液1 cc に対し5 mg のヒスチジン塩酸塩を添加使用した。

(1) pH 6,6 に於ける分離

蛋白質加水分解物1/1000cc を原点に滴下し、pH 6,6 のリン酸緩衝液中で400 V 直流を2時間通电した結果、Fig. 3 の如く原点附近に中性アミノ酸群、陽極側にグルタミン酸、アスパラギン酸、陰極側に順にヒスチジン、チアミノ酸を分離した。

電気泳動による濾紙上アミノ酸の 分離について (第二報)

The Separation of Amino-acids on the Filterpaper by Electrophoresis (2nd Report)

坂 本 清
Kiyoshi Sakamoto
梶 原 和 子
Kazuko Narahara

前報¹⁾に於て著者は 100V 直流を用いて濾紙上アミノ酸の分離を行つた結果を報告したが、その後 300~450V の直流を用いて同物質の分離を試みた結果、更に数種の純粹中性アミノ酸群を夫々分離し、又蛋白加水分解物に於てアスパラギン酸、グルタミン酸の容易に分離することを利用してニンヒドリン呈色部分の抽出比色定量を行い良好な結果を得たので報告する。

実 験 部

通電装置として前報と同じく炭素電極を石膏を以て封じたガラス管中に挿入し、緩衝液を満したペトリ皿に立てる。濾紙(東洋濾紙、No. 50, 2×30cm)はガラス板間に挟み、又装置全体も可及的温度湿度を同条件にする為密閉槽を用いたが、完全な一定条件は期待出来なかつた。

I. 純粹アミノ酸混合物の分離

供試液としてリジン、アルギニン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸各塩酸塩、グリシン、アラニン、ヴァリン、ロイシン、チロジン、プロリン、トリプトファン、セリン、シスチン、メチオニンの各々 50mg を 5cc の水に溶かし(不、難溶性アミノ酸は塩酸酸性水溶液)、使用に際しては 1/1000cc を滴下した。

(1) 酸性、中性、及びアルカリ性アミノ酸相互の分離。

100V 直流を用いた時と同様緩衝液を用い、400V 直流を 1 時間通電した後、ニンヒドリンを噴霧呈色させ、前報と同様の結果を得た。(Table. I)

Table. I.

使用アミノ酸	PH	移動位置		
		陰極側	中央部	陽極側
アルギニン リジン ヒスチジン グリシン	7.6	アルギニン リジン	ヒスチジン	グリシン
ヒスチジン グリシン アスパラギン酸	6.6	ヒスチジン	グリシン	アスパラギン酸