

ニンヒドリン法による絹のアミノ末端基の定量

清水慶昭・道明美保子・並河亮介

Determination of the Amino End Group in
Silk by the Ninhydrin Method

Yoshiaki SHIMIZU, Mihoko DOHMYO
and Ryosuke NAMIKAWA

(sept. 24, 1986受理)

昭和62年3月15日

滋賀県立短期大学学術雑誌第31号抜刷

ニンヒドリン法による絹のアミノ末端基の定量

清水 慶昭・道明美保子・並河 亮介

Determination of the Amino End Group in Silk by the Ninhydrin Method

Yoshiaki SHIMIZU, Mihoko DOHMYO
and Ryosuke NAMIKAWA

(sept. 24, 1986受理)

1. はじめに

一般に、繊維中の末端基の正確な含有量を知っておくことはその繊維の染色挙動を予測したり、品質管理をする上において重要なことと考えられる。アミノ末端基の定量に関しては電位差滴定や電導度測定によるのが普通であるが、これらの方法には末端アミノ基以外の塩基性基を区別できないなどの欠点がある。蛋白繊維についてはそのほかに1-フルオール-2, 4-ジニトロベンゼンを用いる、いわゆる *DNP* 法がよく用いられるが、時間がかかり、また熟練が要求される。

ニンヒドリン反応は蛋白質やアミノ酸の定性・定量に不可欠の反応である。この反応を *Knott* ら¹⁾はポリアミド6および6, 6の末端アミノ基の定量に応用し、精度や再現性もよく、迅速・簡便に定量できることを明らかにした。そこで、著者らはこの方法を絹に適用し、絹の末端アミノ基の定量を試みた。

2. 実 験

2. 1 試 料

用いた絹試料は家蚕糸、柞蚕糸および家蚕絹布 (14目付羽二重) で、いずれも 0.01 規定の炭酸ナトリウム水溶液と 0.01 規定の炭酸水素ナトリウム水溶液の等容積混合液中で 90 min 煮沸処理後、充分水洗し、乾燥後、細断したものである。

ニンヒドリン、グリシンなどの試薬は全て特級試薬を用いた。

2. 2 グリシン溶液

グリシン $2 \times 10^{-4} \text{ mol}$ を pH 5.5 の 4 N-酢酸緩衝溶液 100 ml に溶解して調整した。グリシン濃度は $2 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ である。

2. 3 ニンヒドリン試薬

ニンヒドリン 2 g をメチルセロソルブ 75 ml に溶解し、塩化第一錫 0.04 g と共に 100 ml メスフラスコ

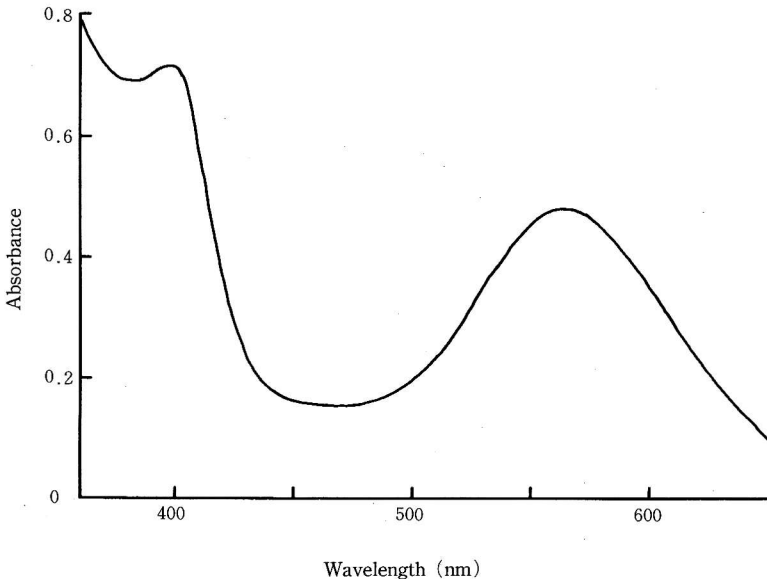


Fig.1 Spectrum of the colouring matter formed by the reaction of glycine with ninhydrin

中に入れ、酢酸緩衝溶液で定量したものをニンヒドリン試薬とした。

2. 4 ニンヒドリン反応と絹のアミノ末端基定量法

ニンヒドリンはアミノ酸と反応して *Ruhemann's purple* という色素を生成する。このものは **Fig. 1** に示したように 565 nm に最大吸収を示す。また、ニンヒドリンと蛋白質が反応するのは結局、蛋白質中のアミノ基との反応であり、この方法をアミノ末端基の定量に利用できる由縁である。ただし、ニンヒドリンが絹中リジンの ϵ -アミノ基とも反応するかどうかについては確認できていない。リジン、ヒスチジン、アラニンの3種のアミノ酸についてニンヒドリン反応させたとき、分子吸光係数は 1.60×10^4 , 1.54×10^4 , $1.93 \times 10^4\text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ であったので、少なくとも遊離アミノ酸の状態ではリジン中の α -アミノ基か ϵ -アミノ基、ヒスチジンのイミノ基か α -アミノ基のそれぞれ1個の官能基しか反応していない勘定になる。

絹の末端アミノ酸の1つとしてグリシンを選び、各種濃度のグリシン溶液を調整し、ニンヒドリン反応を行わせた。ニンヒドリンはアミノ酸が共存しなくても溶存酸素によって酸化され黒褐色に変色する (**Fig. 2**) に加熱前後のニンヒドリン溶液の可視吸収スペクトル

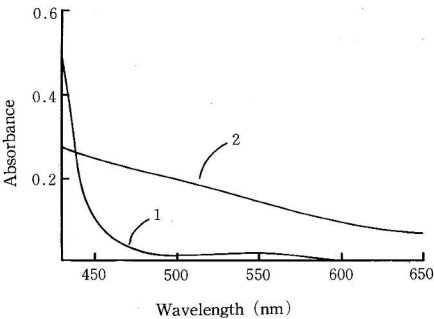


Fig.2 Spectra of the ninhydrin solution

- 1 : before heating
2 : after heating

を示した。それ故、ブランク溶液(ニンヒドリン試薬に酢酸緩衝溶液を加え、加熱後冷却し、蒸留水で 100 ml に定容した溶液)の 565 nm における吸光度 A' を、グリシンとの反応後の溶液の同波長における吸光度 A から差引かねばならない。横軸にグリシン濃度を、縦軸に吸光度($A-A'$)をとって作成した検量線を基に絹のアミノ末端基量を定量した。

なお、*Ruhemann's purple* は充分堅ろうな色素であるが、呈色後長時間放置すると、**Table 1** に示したように著しく劣化するので、検液の比色は直ちに行うよ

Table 1 Degradation of the *Ruhemann's purple*

Elapse time after the colouration (day)	Degradation (%)
2	23.3
5	55.6

にした。

2. 5 グリシンとニンヒドリンの反応時間

グリシン溶液 1.5 ml にニンヒドリン試薬 3.5 ml を加え、1, 2, 3 *hr* 加熱後、直ちに冷却し、蒸留水にて 100 ml に定容し、比色して吸光度 A_1, A_2, A_3 を得た。また、ブランクテストによって吸光度 A'_1, A'_2, A'_3 を得、 $A-A'$ を計算した結果を **Table 2** に示した。

Table 2 Rate of the reaction of glycine with ninhydrin

Absorbance	Time		
	1 hr	2 hr	3 hr
A	0.334	0.426	0.448
A'	0.009	0.071	0.113
A - A'	0.325	0.355	0.335

A : Absorbance of the solution after the reaction of glycine with ninhydrin

A' : Absorbance of the blank solution after heating

この結果から、2 *hr* で反応は完結していると考えられる。1 *hr* 後と3 *hr* 後の吸光度の間に大きな差がないので、グリシンとニンヒドリンの反応時間を1 *hr* 30 *min* とする。

2. 6 検量線

グリシン溶液 $0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5\text{ ml}$ にニンヒドリン試薬 $1.2, 2.3, 3.5, 4.7, 5.8\text{ ml}$ をそれぞれ加え、1 *hr* 30 *min* 加熱し、冷却後 100 ml に定容し、比色した。2.5 と同様の方法でブランク液の吸光度を差引いて得られた吸光度を、グリシン濃度に対してプロットしたのが **Fig. 3** である。

このように、良好な直線関係が得られた。最小自乗法により求めたこの直線の式は次の通りである。

$$A = 1.244 \times 10^4 [G] - 0.0288 \quad (1)$$

ここで、 $[G]$ はグリシン濃度 (mol/l) を示す。

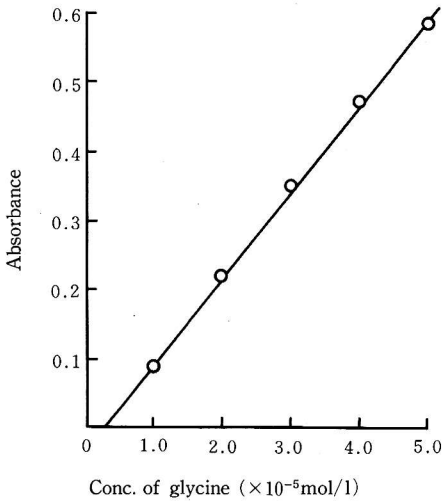


Fig. 3 Calibration curve

3. 実験結果および考察

絹試料 20 mg を精秤し、試験管中に入れ、ニンヒドリン試薬 2 ml と酢酸緩衝溶液 2 ml を加え、湯浴中で加熱 (0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 hr) 後、冷却し、3号のガラスフィルターでろ過した。ろ液を 100 ml メスフラスコで受け、蒸留水で試料を洗浄した。洗液も含めて定容し比色した。(吸光度を A とする)。 A からブランク液の吸光度 A' を差引いた値を時間に対してプロットしたのが Fig. 4 である。吸光度は時間と共に増加するが、3 hr までとそれ以後では増加の傾向を異にする。これは 3 hr までは反応の進行による吸光度の増加であるが、それ以後の増加は絹の部分的溶解 (および加水分解) によるアミノ末端基の増加によるものと考えられる。すなわち、5 hr 加熱後の絹試料にはこのことを裏付けるような状態の変化が観察された。従って、反応は 3 hr で終結していると見做し、3 hr 後の吸光度を(1)式に代入して求めたグリシン濃度 $[G]$ を、さらに次式に代入してアミノ末端基量を算定した。得られた値を、Table 3 に示した。

$$\text{アミノ末端基量 (当量/g 絹)} = [G] \times \frac{100}{1000} / \text{絹重量} \quad (2)$$

家蚕糸と家蚕絹布のアミノ末端基量は殆ど等しく、約 1.5×10^{-4} 当量/g 絹である。この値は C. I. Acid Orange 7 の飽和吸着量から求めた 1.4×10^{-4} 当量/g 絹²⁾ に極めて近い値である。それに対して柞蚕糸のアミノ末端基量は 1.3×10^{-4} 当量/g 絹で家蚕糸、家蚕絹布のそれに比べ若干低い値となっている。文献³⁾中には、全塩基性アミノ酸の量は柞蚕糸の方が家蚕糸より圧倒的に多いというデータが記載されている。絹は産

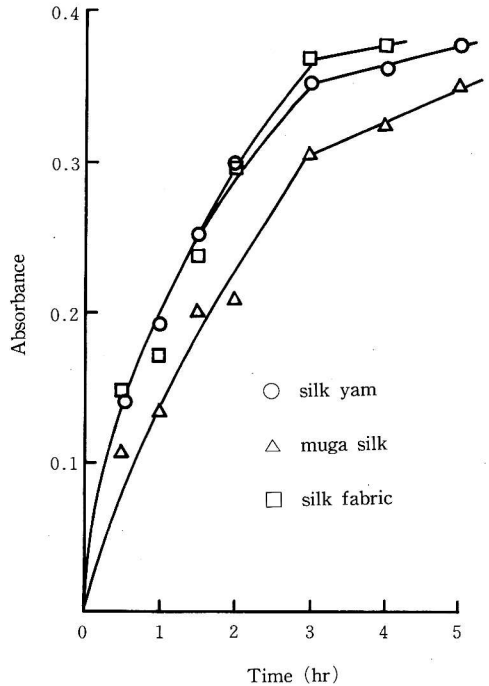


Fig. 4 Changes in absorbance with time in the reaction of silk with ninhydrin

Table 3 Amino end group content in silk samples

Silk sample	Amino end group content (eq./g silk)
silk yarn	1.45×10^{-4}
silk fabric	1.50×10^{-4}
tusser silk yarn	1.27×10^{-4}

地などによってその組成が異なるので、今回用いた柞蚕糸がたまたまアミノ末端基量の少ないものであったのかもしれない。

4. おわりに

ニンヒドリン法により絹のアミノ末端基を定量することができた。しかしながら、加熱時間が 3 hr を越えるとブランク液でも沈殿が生じたり、絹においては変色したりするという現象が見られた。プロピオン酸、プロピオン酸ナトリウムを加える系 (Knott¹⁾ が用いた系) を用いたり、3.0% アセトン溶液、2.5% n -ブタノール溶液にニンヒドリンを溶解するといったような工夫をしたが、逆に再現性が良くないなどの問題が発生した。すなわち、ポリアミド 6 および 6, 6 への適用に関しては何ら問題がなかったニンヒドリン法であるが、絹へ適用する場合には更に反応条件を改善する余

地がある。それにも拘わらず、迅速にしかも簡単にアミノ末端基を定量できるという点で、本実験条件下でもニンヒドリン法は価値あるものと考えられる。

謝 辞

絹のアミノ末端基定量へのニンヒドリン法の利用に関する示唆を与えて下さった日本女子大学教授砺波宏明先生に深く感謝の意を表す。また、本実験に協力していただいた昭和60年度本学工業部工業化学科卒業生山本ゆかり、吉村登志子両嬢にお礼申し上げる。

文 献

- 1) J. Knott and V. Rossbach : *Angewandte Makromol. Chem.*, 86 (1980), 203—213.
- 2) 清水慶昭・清水久美子・奥 昌子・木村光雄 : *日蚕雑*, 52 (1983), 226—232.
- 3) 北條舒正編 : “統 絹糸の構造”, 信州大学繊維学

部 (1980), P. 551.

Summary

By ninhydrin method the content of amino end group in silk was determined.

Glycine was selected as the representative of terminal amino acids, was allowed to react with ninhydrin reagent. Calibration curve was prepared by plotting with absorbance at 565 nm as ordinate and the concentration of glycine as abscissa.

As a result it was found that the contents of amino end group in silk yarn, silk fabric and tussier silk yarn were 1.45×10^{-4} , 1.50×10^{-4} and 1.27×10^{-4} eq./g, respectively. Ninhydrin method is suitable to determine amino end group in silk because the rapidity and the simplicity of use, though this method contains a few problem.