

アミノ酸のニンヒドリン反応における色調の相違

石井 豪 河合 舞子 原 京伽 山本 翔子 渡辺 瑞生

指導教員 三宅 美緒 内村 政司

要約

ニンヒドリン反応とは、ニンヒドリンと α -アミノ酸によって、青紫色の色素を生じ、ルーヘマン紫を生じさせる反応である。私たちはそのニンヒドリン反応に興味を持った。フェニルアラニン、トレオニン、メチオニン、グルタミン酸は青紫色に呈色するが、リジンは褐色に呈色する。そこで、私たちはその原因を明らかにしたいと思った。まず、リジンと同じ塩基性アミノ酸の呈色を調査し、次にアミノ酸の電荷をそろえ、またアミノ酸を双性イオンの状態にするために、リン酸緩衝溶液を加え実験した。次に、しかし、これらの実験では、リジンだけが違う反応をする原因はわからなかった。

次に、私たちは副生成物が発生しないようにするために還元剤を利用した。その結果、リジンについても他のアミノ酸と同様にルーヘマン紫に由来する呈色を示した。しかし、湯浴を一定時間以上行くと、色が褐色に変化した。

Abstract

Ninhydrin Reaction is reaction that Ninhydrin and α -amino acid make Ruhemann's purple which is purple blue pigment. We were interested in the Ninhydrin Reaction. Phenylalanine, threonine, methionine, and glutamic acid become purple in color. But, lysine become brown. So, we wanted to investigate the cause. First, we align electric charge of them, and we add phosphoric acid buffer solution to amino acid in order to make amino acid zwitterion. Second, we used the same basic amino acid as lysine. In these experiments, we couldn't understand the cause of that. Third, we used reducing agent in order not to generate by product. As a result, peak of the absorbance of the lysine is the same as others. It means Ruhemann's purple is produced. But, we heat it with hot water bath for more than a specific time, lysine's color changed into brown.

キーワード ニンヒドリン反応, アミノ酸, ルーヘマン紫, 還元剤

Keywords Ninhydrin Reaction, amino acid, Ruhemann's purple, reducing agent

1.序論

ニンヒドリン反応とは、ニンヒドリンと α -アミノ酸によって起こる呈色反応である。反応するとルーヘマン紫が生じ、青紫色に呈色する。(図1)。五種類のアミノ酸(グルタミン酸、トレオニン、メチオニン、リジン、フェニルアラニン)に対してニンヒドリン反応を行った先行研究では、リジンのみ褐色に呈

色することが確認された。本研究ではより客観的なデータを得るため、分光光度計を用いて吸光度を測定した。また、リジンのみピークや色調が異なった原因について、様々な条件下でニンヒドリン反応を行い、それらの吸収スペクトルを比較検討した。

表1. α-アミノ酸

名称	側鎖 R-	分子量	等電点
トレオニン	-CH(OH)CH ₃	119	6.1
リジン	-CH ₂ (CH ₂) ₃ -NH ₂	146	9.7
グルタミン酸	-(CH ₂) ₂ COOH	147	3.2
メチオニン	-CH ₂ CH ₂ -S-CH ₃	149	5.7
フェニルアラニン	-CH ₂ -C ₆ H ₅	165	5.5
ヒスチジン	-CH ₂ -C=CH-N=CH-NH 	155	7.6
アルギニン	-(CH ₂) ₃ -NH-C(NH ₂)=NH	174	10.8



図1. ニンヒドリン反応

2. 研究内容

予備実験：石英セルを用いた色調の観察

<方法>

まず、精製水100 mLに対してニンヒドリン0.1 gを溶かしたニンヒドリン溶液を調整した。

次に、0.050 mol/Lのアミノ酸溶液を100 mL調整した。そして、アミノ酸溶液1 mLとニンヒドリン溶液3 mLを混合し、4分間、湯浴した。色の変化を目視で確認した後、分光光度計で波長と吸光度の関係を調べた。なお、使用したアミノ酸は、先行研究で用いられた、グルタミン酸、トレオニン、メチオニン、リジン、フェニルアラニンの5種類である。

<使用器具・薬品>

器具：紫外可視分光光度計（島津製作所UV-1800）

試験管、ガラス棒、葉さじ、ビーカー、三脚、こまごめピペット、メスフラスコ、薬包紙、メートルグラス、ガスバーナー、石英セル

試薬：0.1 %ニンヒドリン溶液、精製水、

上記五種のアミノ酸

<結果・考察>

目視の結果、リジンのみ他の四種のアミノ酸の青紫色とは異なる赤紫色が観察された(表2)。また、このまま分光光度計で吸光度を測定するには色が濃すぎ、ピークの情報が読み取れないものがあった。そのため、希釈を行い波長と吸光度の関係が分かるようにした。

表2. 目視

アミノ酸	色
トレオニン	濃い紫
リジン	赤紫
グルタミン酸	薄紫
メチオニン	黒に近い紫
フェニルアラニン	紫

分光光度計でスペクトルを測定した結果、四種のアミノ酸は同じような波長（400 nm, 570 nm）にピークが観測されたが、リジンのみ480 nmにピークが観測された(図2)。400 nm, 570 nmのピークはルーヘマン紫による吸収と考えられる。

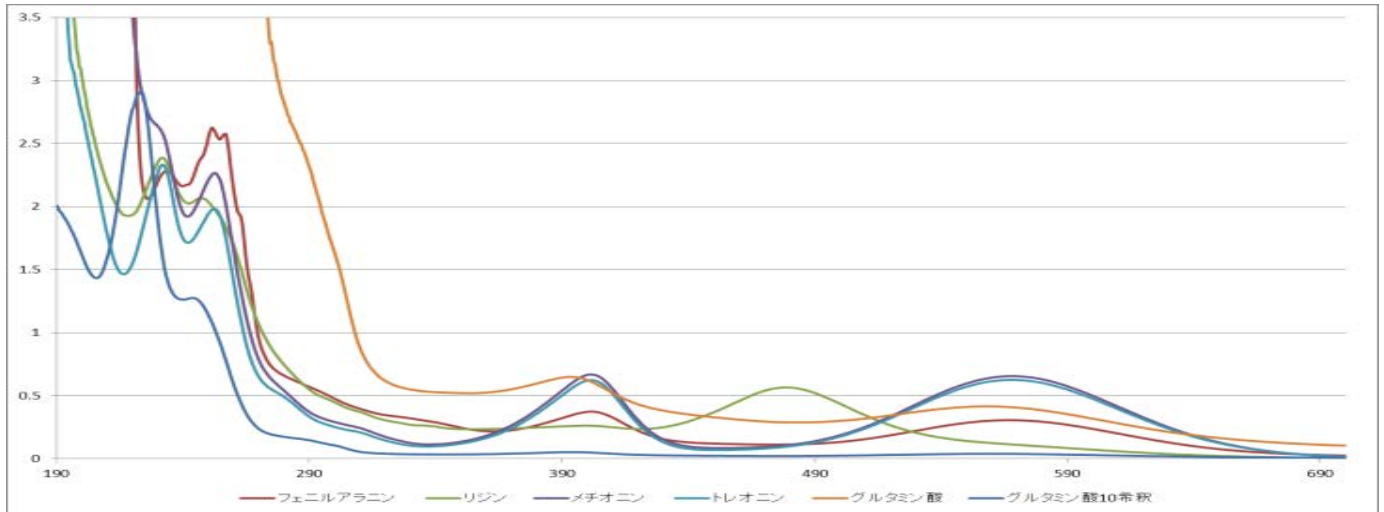


図2.分光光度計での測定 (縦軸: Abs, 横軸: 波長 /nm)

アミノ酸の性質を調べたところ、アミノ酸の溶存構造がニンヒドリン反応に対し影響を及ぼすのではないかと考えた。アミノ酸は溶液のpHにより様々な構造を取っている(図3)。また、双性イオンの構造型のpHを等電点といい、アミノ酸の種類によって値が異なる(図4)。この実験で用いたアミノ酸の中

で唯一リジンの等電点のみ9.74と塩基性アミノ酸であったため、水溶液中では他のアミノ酸とは異なる溶存構造をとることが考えられ、それがニンヒドリン反応の呈色に影響しているのではないかと考えた。そこで、以下のような仮説を立て実験1, 2を行った。

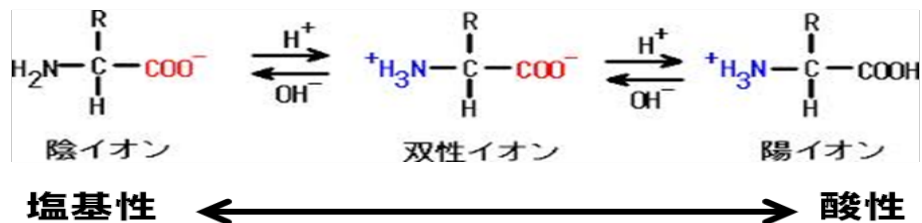


図3.アミノ酸のイオンの状態と液性

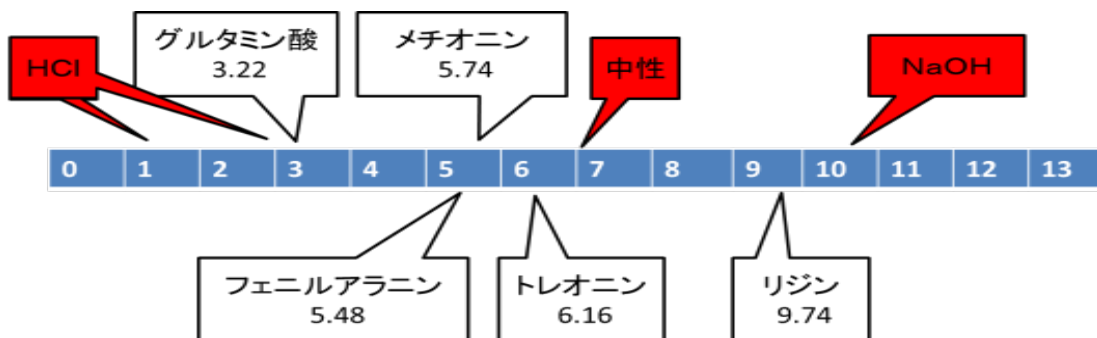


図4.pH とアミノ酸の等電点

実験1：塩基性アミノ酸でニンヒドリン反応

<仮説>

リジンと同じ塩基性アミノ酸である、アルギニン、ヒスチジンについてニンヒドリン反応を行えば、リジンと同じ波長にピークが観測されるのではないかと考えた。

<方法>

予備実験と同様に 0.050mol/L のアミノ酸溶液を調整し、その溶液 3 mL とニンヒドリン溶液 1 mL を混合し、4 分間湯浴した。色の変化を目視で確認した後、分光光度計で波長と吸光度の関係を調べた。

<結果・考察>

褐色に呈色したリジンと異なり、ヒスチジンは赤紫色に呈色し、アルギニンは目視で確認できるほど

の色の変化は起こらなかった。吸光度を測定すると、ヒスチジンは 400 nm と 570 nm に、アルギニンは 370 nm にピークがそれぞれ観測され、リジンとは異なるスペクトルが得られた。他のアミノ酸と比較すると、リジンとアルギニン以外はすべて 400 nm, 570 nm にピークが観測された。これらは、ルーヘマン紫に由来する吸収であると考えられる。しかし、リジンは 480 nm, アルギニンは 370 nm にピークが観測された。これは副生成物が生成されたと考えられる。そのため、副生成物が生成しない方法でニンヒドリン反応を行えば、ルーヘマン紫のピークが観測されるのではないかと考えられる。



図 5.塩基性アミノ酸

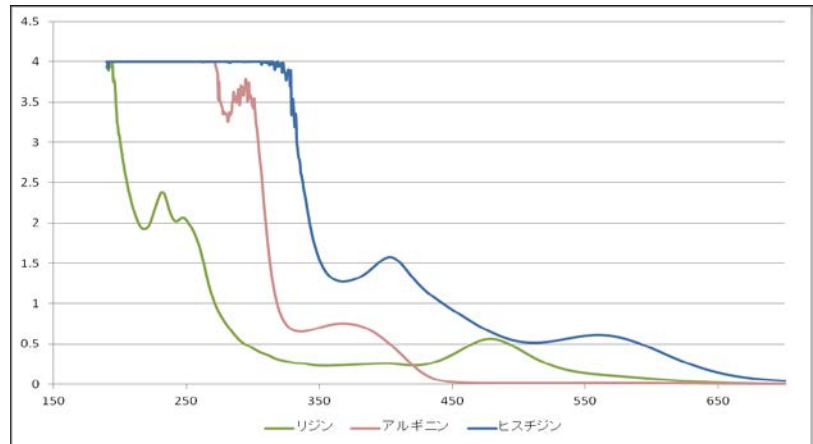


図 6.塩基性アミノ酸 (縦軸: Abs, 横軸: 波長 /nm)

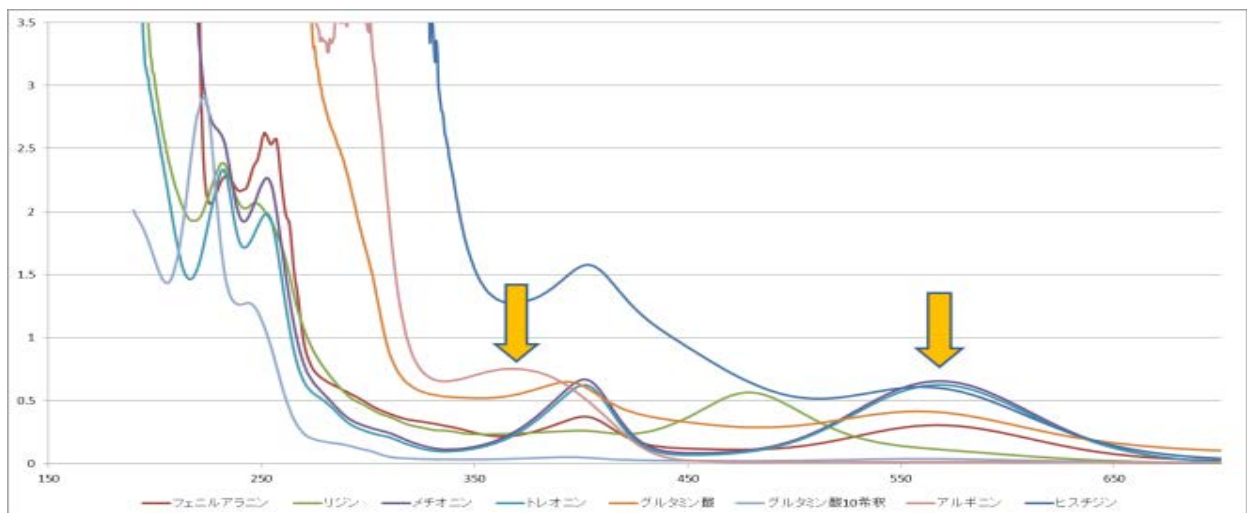


図 7.他のアミノ酸との比較 (縦軸: Abs, 横軸: 波長 /nm)

実験2：アミノ酸の電荷を揃えて、ニンヒドリン反応

<仮説>

(図4)から分かるように、この実験で用いた五種のアミノ酸の中でリジンの等電点のみ 9.74 と塩基性であることが分かった。そのため、水溶液中では他のアミノ酸とは異なるイオンの状態であり、それが影響しているのではないかと考えた。そこで、アミノ酸の電荷を揃えて、ニンヒドリン反応を行えば、リジンも他のアミノ酸同様のピークになるという仮説を立てた。この実験ではアミノ酸のイオンの状態を、陽イオン型(酸性側)、陰イオン型(塩基性側)、双性イオン型(等電点)の3つの状態に揃えた。

<方法>

陽イオン型に揃える時には HCl(aq) (pH1.63) を、陰イオン型に揃える時には NaOH(aq) (pH 12.73) を五種類のアミノ酸溶液に、各々の等電点に対して陽イオン型の時は pH が小さく、陰イオン型の時は pH が大きくなるよう加えた。また、双性イオン型に揃えるためリン酸緩衝溶液を作成し、アミノ酸に加えた。リン酸緩衝溶液は、リン酸二水素カリウム水溶液とリン酸水素二ナトリウム水溶液を特定の割合で混合し、メチオニンの等電点である pH が 5.74 の水溶液を調製した。その溶液 3 mL とニンヒドリン溶液 1 mL を混合し、4 分間湯浴後、分光光度計

を用いてスペクトルを測定した。

<結果>

HCl(aq) 湯浴後の溶液は全てうすい黄色となった(図8)。また、全て同じスペクトルであり、ルーヘマン紫のピークが観測されていないので(図9)、ニンヒドリン反応はしていないことが分かった。

NaOH(aq) 湯浴後の溶液はリジンのみ薄い赤色になり、他の溶液は変化しなかった(図10)。

また、330 nm にピークが観測されたが、他のアミノ酸溶液は、全て同じスペクトルであり、ルーヘマン紫のピークが観測されていないので(図11)、ニンヒドリン反応はしていないことが分かった。

双性イオン 図を比較すると、同じようなスペクトルの形をしていた(図12,13)。このことからリン酸緩衝溶液はニンヒドリン反応に影響しないことが分かった。

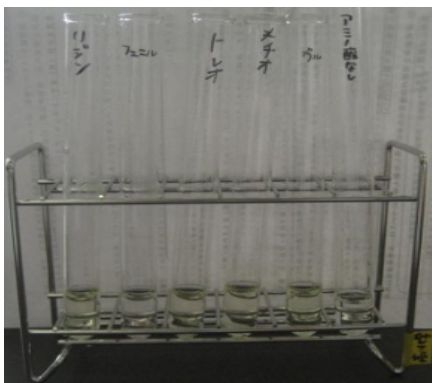


図8. アミノ酸 - HCl(aq)(湯浴後)

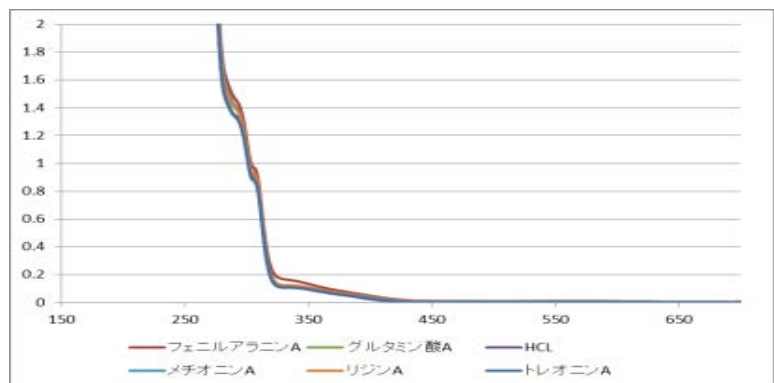


図9. アミノ酸 - HCl(aq)
(縦軸: Abs, 横軸: 波長 /nm)

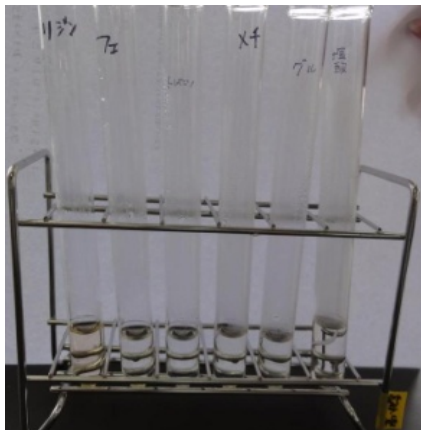


図 10. アミノ酸 - NaOHaq(湯浴後)

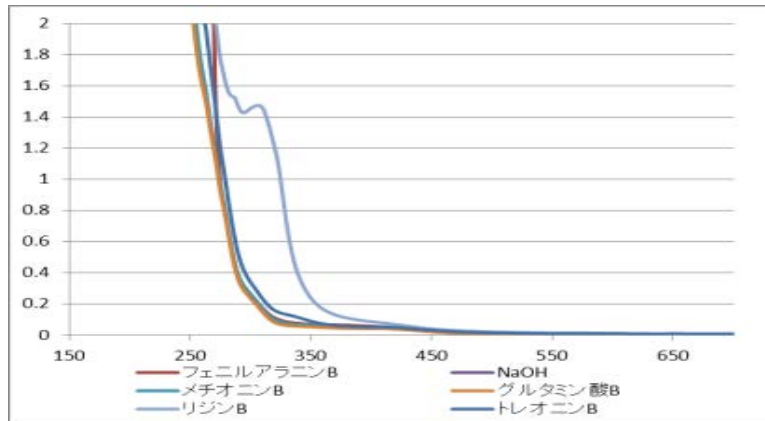


図 11. アミノ酸 - NaOHaq
(縦軸: Abs, 横軸: 波長 /nm)

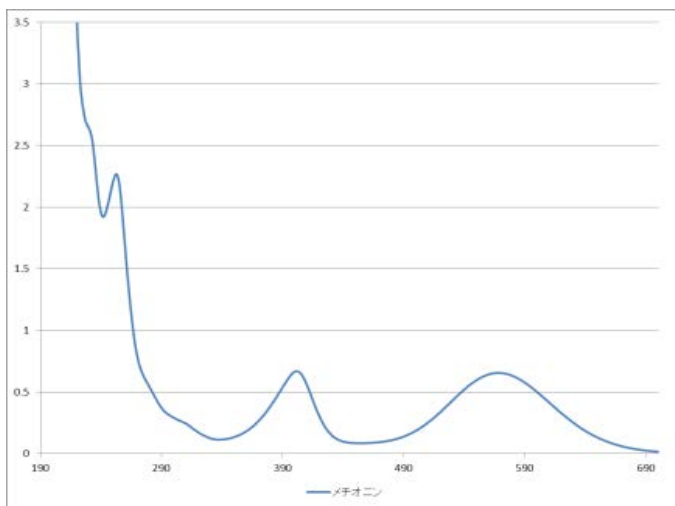


図 12. メチオニン水溶液
(縦軸: Abs, 横軸: 波長 /nm)

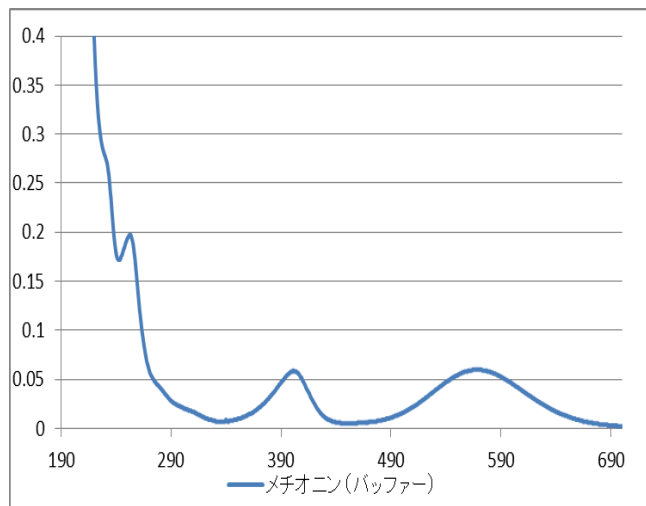


図 13. メチオニンリン酸緩衝溶液
(縦軸: Abs, 横軸: 波長 /nm)

<考察>

陽イオン型、陰イオン型で、ニンヒドリン反応が進行しなかったのは、HClaq と NaOHaq の濃度が濃すぎため、ニンヒドリンが壊れたことが原因と考えられる。また、NaOHaq を加えた実験では、リジンのみ薄い赤色になり、330 nm にピークが観測された。しかし、今までの実験で 330 nm にピークが観測されていないことから、これは副生成物のピークであると考えられる。

また、双性イオン型の実験では、水のかわりにリン酸緩衝溶液を用いてニンヒドリン反応を行い、水の時とほぼ同じスペクトルが得られた。この結果より、リン酸緩衝溶液はニンヒドリン反応に影響しないことが分かった。しかし、リジンの等電点付近に緩衝能を有する緩衝液の調整が上記のリン酸緩衝溶液では不可能であり、別の緩衝液系を用いる必要がある。

実験 3 : 還元剤を用いてニンヒドリン反応

<仮説>

アミノ酸の構造からニンヒドリン反応まで範囲を広げて調べたところ、JIS 規格に還元剤として、塩化スズ (II) やアスコルビン酸 (ビタミン C) を用いたニンヒドリン反応が記載されており、これに基づいた実験を行ってみようと考えた。実験 1, 2 の結果から考察すると、リジンの 330nm や 480 nm のピークは副生成物の影響であると考えられる。このため、還元剤を用いて副生成物が発生しない条件下で実験すれば、リジンは紫色になり、ルーヘマン紫の 400 nm, 570 nm のピークが観測されるという仮説を立てた。



図 14.リジン
(還元剤存在下, 湯浴 1 分後)

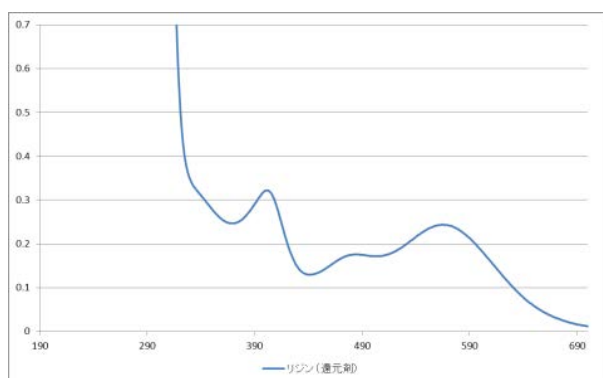


図 15.リジン (還元剤存在下)
(縦軸: Abs, 横軸: 波長 /nm)

<方法>

還元剤としてアスコルビン酸 (ビタミン C) をリジンに加え、ニンヒドリン反応を行った。

<結果・考察>

リジンは還元剤を入れると 90 秒までは青紫色だったが、時間の経過とともに赤紫, 褐色に変化した (図 14)。また, 90 秒で加熱をやめて吸光度の測定をしたところ, 先の研究で見られた 480 nm には吸収が見られず, ルーヘマン紫の発色の特徴である 400 nm と 570 nm のピークが観測された (図 15)。ルーヘマン紫が生成するには, 還元型ニンヒドリンの存在が非常に重要な要素であると考えられる。しかし, 湯浴を 90 秒以上行くと, 褐色に変色したため, 還元型ニンヒドリンの存在が十分でなく, 最終生成物であるルーヘマン紫が生成しなかった可能性が考えられる。

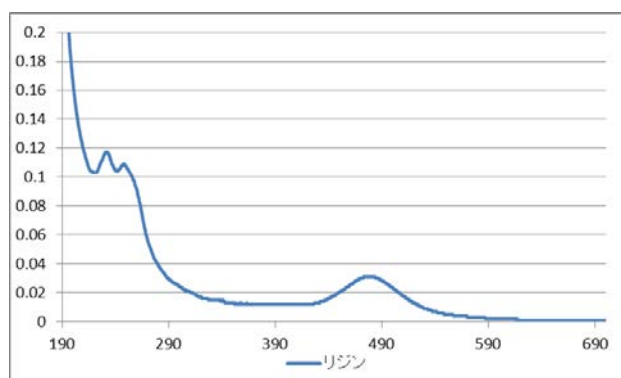


図 16.リジン (還元剤なし)
(縦軸: Abs, 横軸: 波長 /nm)

3.結論・今後の課題

アミノ酸の構造に着目した実験 1, 2 では, ニンヒドリン反応を行ってもリジンは褐色のままで, 吸光度も他のアミノ酸とは異なるピークが観察された。

還元剤を用いた実験 3 では, ニンヒドリン反応を行うとリジンについても青紫色の呈色が観察された。また吸収スペクトルを測定した結果, ルーヘマン紫に帰属されるピークが観測された。すなわちルーヘマン紫の生成を支持する結果を得ることができた。今後の課題として, 実験 1 で用いた塩基性アミノ酸であるアルギニン, ヒスチジンについても, 実験 3 の還元剤を用いてニンヒドリン反応を行い, 青紫色になるか確認する必要がある。

また, 実験3で, 湯浴を90秒以上行くと褐色に変色したため, 還元剤の加熱による影響についても調査する。また, 別の文献に記載されていた還元剤として塩化スズ(Ⅱ)を用いた場合についても同様の実験を行い, 比較する。これらの結果を踏まえ, リジンで見られたニンヒドリン反応における呈色の違いの原因を明らかにする。

4.参考文献

・JIS 規格:

ピリジンの純度検定 K8777-2011-01
ニンヒドリンのアミノ酸分析適合性試験
K8870-2012-01

・教育現場からの化学 Q&A

(社団法人日本化学会 村田 誠四郎
丸善株式会社)

・ニンヒドリンによるカルボン酸ヒドラジドの呈色反応 (辻 章夫, 北条 正躬)

・ニューステージ新化学図表 (株式会社 浜島書店)

・炉紙上のアミノ酸のニンヒドリン反応に関する研究 (Ⅳ) アミノ酸のペパークロマトグラフィーにおいて展開溶媒が異なると, ニンヒドリン呈色反応の色調も異なってくる原因について

(鹿児島大学理学部紀要 1968-12 金田 信;
富永 直)

・REACTION OF NINHYDRIN WITH PEPTIDES

(鹿児島大学理学部紀要.数学・物理学・化学
1988-12-30 YONEZAWA, Hiroo; HASUIKE,
Masako; TATUMOTO, Masashi)

・探究Ⅱ論文集 (金光学園) 2008年

5.謝辞

岡山大学大学院 教育学研究科 教授

喜多 雅一 先生

坪井理研代表 岡山大学名誉教授

坪井 貞夫 先生

神奈川工科大学 非常勤講師

橋爪 史明 先生

岡山大学大学院 自然科学研究科

森 麻美 先生

以上の先生方には, 様々な助言を頂きありがとうございました。先生方のおかげで良い結果を残す事が出来ました。