

## 炭酸塩岩石より抽出したアミノ化合物の脱灰法について

寺島 美南子\*

Desalting Procedure for Amino Compounds  
Extracted from Carbonate Rocks

Minako TERASHIMA

## Abstract

When amino acids in carbonate rocks are extracted with 6N HCl, a large quantity of Ca ion is dissolved into supernatant. Several methods for desalting in supernatant have been studied in this paper. The results are summarized as follows.

If the ion exchange method is used for removing Ca ion, the bigger the column size, the more amount of amino acids is lost. Comparing with the two precipitate methods; calcium oxalate and calcium fluoride, the former is more excellent than the latter.

It is desirable to use 1N HCl for desalting, in the case of extracting amino acids from HCl insoluble residue.

While the ion exchange method is the most excellent in treating 50 g sample, the calcium oxalate precipitate method is the most excellent in dealing with 10 g sample.

## 要 旨

6 N塩酸で加水分解してアミノ酸を抽出する方法を石灰岩中のアミノ酸の分析に適用すると、塩酸により多量のカルシウムが溶解する。このカルシウムイオンを除去する方法について2~3の検討を行い、次のような結果が得られた。

イオン交換樹脂により脱塩を行う場合には、イオン交換カラムのサイズが大きくなるほどアミノ酸の損失が多い。

沈殿法によりカルシウムイオンを除く方法は、ふっ化カルシウムとしてよりもしゅう酸カルシウムとして沈殿させて除去する方法の方が良い。

塩酸不溶解残さからアミノ酸を抽出する方法は、塩酸濃度が希薄なほどアミノ酸の損失が少ない。

試料10 gぐらゐを処理する場合は、直接イオン交換法が良く、試料50 gぐらゐを処理する場合は、しゅう酸カルシウム分離-イオン交換法がすぐれている。

## 1. ま え が き

化石からアミノ酸を抽出しペーパークロマトグラフィーで定量する方法は、藤原ら(1963, 1959)によって、堆積岩についての方法は市原(1969)によってすでに詳

しく報告されている。ペーパークロマトグラフィーは簡便な方法で広くもちいられているが、定量誤差が大きい。より正確に定量する方法として、ガスクロマトグラフやアミノ酸自動分析計による定量法がある。ガスクロマトグラフは微量の試料を短時間で定量できるので地質学試料の分析に適しているが、機器に導入するために揮発性物質にする操作がはな雑なことで、その前処理のためアミノ酸の回収率が悪くなるという欠点がある。アミノ酸自動分析計(光電比色方式の全自動液体クロマトグラフを含む)により定量を行う方法はこのような前処理を必要としないが、ペーパークロマトグラフやガスクロマトグラフに比べて多くの試料を必要とする。

地質学試料からアミノ酸を抽出する方法としては、6 N塩酸で加水分解したのち、イオン交換樹脂で脱塩する方法がもちいられている。堆積岩に含まれているアミノ酸含有量は市原(1972), RITTENBERG(1963)によると地質時代が古くなるに従って指数関数的に減少している。したがって、アミノ酸自動分析計で地質学試料中のアミノ酸を定量する場合、現世試料では数100 mgで十分であるが、古生代の試料では数10 gから数100 gを必要とする。試料中のアミノ酸含有量が少なくなるに従って、加水分解の規模と脱塩の規模が大きくなる。泥質岩の場合には、6 N塩酸に溶解しない無機塩類が多いので、大部分の無機残さを遠心分離またはろ過によって除くことが

\* 技術部

できる。しかし、炭酸塩岩の場合には塩酸に炭酸カルシウムが溶けてしまうので、脱塩の規模は泥質岩の場合よりもさらに大きくなり、それに伴ってアミノ酸の回収率が低下する。筆者は多量の石灰岩からアミノ酸を抽出する場合の脱塩方法について種々検討を行った。

その結果、アミノ酸含有量の多い試料については直接イオン交換法が良く、含有量の少ない試料はしゅう酸カルシウム分離—イオン交換法がすぐれていることが明らかとなったので報告する。

## 2. 試薬

加水分解用共沸点塩酸 (6 N) : 全ガラス製蒸留装置で塩酸 (1 + 1) を 2 ~ 3 回蒸留し、108.6°C における共沸混合物を集める。

アミノ酸標準溶液 (0.1  $\mu\text{mol/ml}$ , プロリンのみ 0.2  $\mu\text{mol/ml}$ ): 協和醸酵の試薬アミノ酸セットからそれぞれのアミノ酸 100  $\mu\text{mol}$  を 1 l メスフラスコに正確にはかりとり、濃塩酸 1 ml を加えて溶かし、蒸留水でうすめて正確に 1 l とする。

くえん酸緩衝液, pH 5.28, 4.25, 3.28: 和光純薬製のアミノ酸自動分析用10倍濃縮液 (500 ml 入) を蒸留水で10倍にうすめたのち pH を正確に調整する。

くえん酸緩衝液 pH 4, 80: くえん酸ナトリウム 98.5 g を加温した蒸留水 500 ml にとかし、濃塩酸 31.3 ml を加え、ブリッジ 5 g (温水にとかしたものを), n-カプリル酸 0.5 ml を加えたのち、蒸留水で 5 l にし pH を正確に調整する。

ニンヒドリン試薬: 和光純薬製の 1 l 入アミノ酸自動分析用を使用する。

## 3. 装置および測定条件

装置: 日本電子 5 AUH 型液体クロマトグラフ

測定条件: 固定相・JEOL レジン LC-R-I

溶離相・クエン酸ナトリウム緩衝溶液

① pH 5.28 (0.35 N Na) 塩基性アミノ酸

①' pH 3.25 (0.2 N Na) 中酸性アミノ酸

② pH 4.25 ( " ) "

③ pH 4.80 ( " ) "

緩衝溶液切換時間・

①' → ② 120分, ② → ③ 40分

カラム寸法・ショートカラム 60°C

ロングカラム 40° → 60°C (切換時間 50分)

反応槽温度・95°C

光路長・2 mm

波長・570 nm, 440 nm

記録速度・12 cm/時間

## 4. 実験

### 4.1 試料およびその調整法

#### 4.1.1 試料

五日市石灰岩, 東京都五日市樽より採取, 中生代, ジュラ紀

小池石灰岩 (小池—22) 福島県鹿島町より採取, 中生代, ジュラ紀

喜界島石灰岩 (Ki—51), 鹿児島県喜界島より採取, 新生代, 第四紀

#### 4.1.2 試料の調整法

露頭より採取した岩石試料 (2 ~ 3 kg) の表面をカッターで削り取る。3 N 塩酸で表面を洗い、水洗したのち風乾する。ジョークラッシャーで粗砕した岩片を磁製のボールミルに入れ、約 8 時間粉碎して 100 メッシュアンダーの粉末試料とする。分析試料にはこの粉末を 70°C で 8 時間乾燥したものをもちいた。

### 4.2 加水分解法

#### 4.2.1 還流法

粉末試料 50 g (五日市石灰岩) を 500 ml 丸底フラスコにはかりとり、共沸点塩酸を加えて溶かし、さらに過剰の塩酸を加え (塩酸量約 350 ml), コンデンサーを連結し、マントルヒーターで加温して 24 時間加水分解を行う。

#### 4.2.2 アンプル法

粉末試料 10 ~ 20 g (喜界島試料 ki-51, 小池試料) を 1.5 × 15 cm のアンプル数本にはかりとり、試料の約 7 倍量の共沸点塩酸を加え、アンプルの管内を減圧にして封じる。108°C の定温乾燥器内で 24 時間加水分解を行う。

### 4.3 分解法

#### 4.3.1 直接イオン交換法—方法 I

五日市石灰岩 50 g は 4.2.1 の方法で、喜界島 ki-51 試料 10 g は 4.2.2 の方法で加水分解を行う。遠心分離によって上澄液と沈殿とに分離し、上澄液中の塩酸を湯浴またはロータリーエバポレーターによりできるだけ除く。

この濃縮液を蒸留水で希釈し pH 5 以上に調整し、H<sup>+</sup> 型にした強酸性陽イオン交換樹脂 Dowex 50 W × 8 100 メッシュ (五日市試料は、樹脂 1,500 ml を直径 5 cm × 50 cm のカラム 2 本に充填する。喜界島 ki-51 試料は樹脂約 300 ml を直径 2 × 30 cm のカラム 3 本に充填する) に吸着させ、Cl<sup>-</sup> イオンがなくなるまで水洗したのち、2 N アンモニア水でアミノ酸を溶出する。湯浴またはロータリーエバポレーターによりアンモニアを除く。蒸発残さを蒸留水にとかしろ過してもう一度蒸発乾固する。この蒸発残さを 1/100 N 塩酸 7 ml を加えてとかし、その

うちの 1 ml を機器にサンプリングして 3 の測定条件に従ってアミノ酸の分離定量を行う。

4.3.2 ふっ化カルシウム分離-イオン交換法一方法 II

五日市試料 50 g を 4.2.1 の方法で、小池-22 試料 20 g を 4.2.2 の方法で加水分解を行う。加水分解溶液をビーカーに移し湯浴で最初の溶液量の約 7 分の 1 ぐらいまで濃縮する。濃縮液を 500 ml ポリエチレンビーカーに移し蒸留水で希釈する。濃ふっ化水素酸を五日市試料に対しては 37 ml、小池-22 試料に対しては 14.8 ml 加える。生じたふっ化カルシウムの沈殿を遠心分離 (3,500 prm, 15 分) によって除く。上澄液をビーカーに移し湯浴上で蒸発乾固する。蒸発残さを蒸留水で溶かしさらに希釈し濃水酸化ナトリウム溶液数滴を加えて pH を 5 以上に調整する。これを H<sup>+</sup> 型にした強酸性陽イオン交換樹脂<sup>注1)</sup> (五日市試料: 樹脂量 100 ml, 2×50 cm カラム, 小池-22 試料: 樹脂量 50 ml, 2×30 cm カラム) に吸着させ、以下 4.3.1 の場合と同様の操作を行ってアミノ酸の分離と定量を行う。

4.3.3 しゅう酸カルシウム分離-イオン交換法一方法 III

五日市試料 50 g を 4.2.1 の方法で、小池-22 試料 20 g を 4.2.2 の方法で加水分解する。加水分解溶液をビーカーに移し濃縮する。蒸留水で希釈し、特級しゅう酸を五日市試料に対して 63 g、小池-22 試料に対して 25.2 g を加えて湯浴上で 30 分間加温する。生じたしゅう酸カルシウムの沈殿を遠心分離 (3,500 r. p. m, 15 分) により除き、上澄液を湯浴またはロータリーエバポレーターで蒸発乾固する。4.3.2 と同様に pH の調整を行い、カラムサイズを決めて脱塩とアミノ酸の溶出を行う。以下 4.3.1 の場合と同様の操作を行ってアミノ酸の分離と定量を行う。なお、本法によるアミノ酸の回収率を知るために次の実験を行った。特級塩化カルシウム 55.5 g を 200 ml の蒸留水にとかし、0.1 μmol アミノ酸標準溶液 10 ml を加える。しゅう酸 63 g を加え湯浴で 30 分加温したのち、以下上記と同様の操作を行ってアミノ酸の分離と定量を行う (第 2 表-V)。

4.3.4 塩酸不溶解残さ加水分解-イオン交換法一方法 IV

五日市試料 100 g、小池-22 試料 20 g を 3 N 塩酸または 1 N 塩酸に溶かし、重量を秤ったガラスフィルターでろ過する。水で洗浄した後 100°C で 4 時間乾燥後秤量し残

注1) 妨害元素などの影響で終点が見にくい、EDTA によってフッ酸と未反応のカルシウムの量を求め、さらに他の無機塩類の量をプラスしてカラムサイズを決定した。

さの量を求める (遠心分離により塩酸不溶解残さを分離してもよい)。このようにして得られた塩酸不溶解残さの一部を 20 ml 入りのアンプルにはかりとり、共沸点塩酸を加え減圧にして封じる。108°C に調整した定温乾燥器内で 24 時間加水分解する。ロータリーエバポレーターで加水分解溶液中の塩酸を除去したのち、H<sup>+</sup> 型強酸性陽イオン交換樹脂約 30 ml で脱塩を行う。ろ液 (または上澄液) を湯浴上で蒸発乾固する。蒸発残さを蒸留水にとかし H<sup>+</sup> 型強酸性陽イオン交換樹脂約 1,500 ml で脱塩する。脱塩を行い 2 N アンモニア水でアミノ酸を溶出した溶液を湯浴またはロータリーエバポレーターで蒸発乾固する。以下 4.3.1 の方法に従ってアミノ酸の分離と定量を行う。

5. 結果と考察

実験結果を第 1 表と第 2 表 (第 1 図と第 2 図) に示す。総アミノ酸の検出量は五日市試料では、直接イオン交換法<塩酸不溶解残さ (3 N 塩酸) 加水分解-イオン交換法<ふっ化カルシウム分離-イオン交換法<塩酸不溶解

第 1 表 五日市試料中のアミノ酸

		I	II	III	IV-1	IV-2	IV-3
シスチン + オルニチン	(Lys + Orn)	0.12	0.30	0.26	0.17	0.21	0.04
ヒスチジン	(His)	+	0.04	0.04	0.07	0.05	0.01
アルギニン	(Arg)	—	0.07	0.21	0.12	0.12	—
アスパラギン酸	(Asp)	0.05	0.41	0.42	0.03	0.50	+
スレオニン	(Thr)	0.15	0.10	0.11	0.25	0.24	+
セリン	(Ser)	0.30	0.51	0.41	0.52	0.51	0.07
グルタミン酸	(Glu)	0.38	0.65	0.63	0.19	0.54	—
プロリン	(Pro)	0.21	0.22	0.27	0.21	0.26	—
グリシン	(Gly)	0.71	1.04	0.96	0.74	0.95	0.17
アラニン	(Ala)	0.44	0.39	0.47	0.34	0.44	0.08
シスチン	(Cys)	—	—	—	—	—	—
バリン	(Val)	0.30	0.20	0.28	0.29	0.28	+
メチオニン	(Met)	0.04	—	—	0.02	0.01	—
イソロイシン	(I leu)	0.21	0.15	0.19	0.21	0.17	0.04
ロイシン	(Leu)	0.38	0.33	0.35	0.41	0.34	0.04
チロシン	(Tyr)	—	0.06	0.05	0.06	0.03	—
フェニルアラニン	(Phe)	0.10	0.14	0.16	0.15	0.13	—
total		3.39	4.61	4.81	3.78	4.78	0.45

I 直接イオン交換法一方法 I

II フッ化カルシウム分離-イオン交換法一方法 II

III シュウ酸カルシウム分離-イオン交換法一方法 III

IV-1 塩酸不溶解残さ加水分解-イオン交換法 (3 N HCl) 一方法 IV-1

IV-2 塩酸不溶解残さ加水分解-イオン交換法 (1 N HCl) 一方法 IV-2

IV-3 3 N HCl 処理の上澄液

単位 μmol/100 g

第2表 小池試料と喜界島試料中のアミノ酸、シュウ酸カルシウム沈殿法によるアミノ酸の回収率

方法 アミノ酸	試料 小池-22 ( $\mu\text{mol}/100\text{g}$ )				喜界島 Ki-51 ( $\mu\text{mol}/10\text{g}$ )		St (%)
	II	III	IV-1	IV-2	I	II	
Lys+Orn	0.42	0.51	0.43	0.58	0.42	0.37	65
His	0.14	0.10	—	0.14	0.11	0.04	42
Arg	0.24	0.11	0.26	0.26	0.14	—	68
Asp	0.08	0.60	—	0.09	2.05	2.18	71
Thr	0.27	0.30	0.34	0.31	0.82	0.54	66
Ser	1.06	1.09	0.69	0.99	1.28	0.93	80
Glu	0.26	0.61	0.08	0.69	2.10	1.55	68
Pro	0.24	0.54	0.26	0.27	0.89	0.66	82
Gly	1.12	1.33	1.20	1.24	1.75	1.78	80
Ala	0.62	0.78	0.60	0.71	2.11	1.49	84
Cys	0.09	—	—	0.10	—	—	—
Val	0.33	0.41	0.51	0.41	0.97	0.84	78
Met	—	—	—	0.05	0.13	0.11	—
I leu	0.27	0.25	0.26	0.23	0.33	0.42	75
Leu	0.39	0.45	0.43	0.45	0.86	0.91	77
Tyr	0.12	0.15	0.09	0.07	0.18	0.09	3
Phe	0.20	0.17	0.17	0.19	0.29	0.30	69
total	5.85	7.40	5.32	6.78	14.43	12.21	

- I 方法—I
- II 方法—II
- III 方法—III
- IV-1 方法IV-1
- IV-2 方法IV-2
- V シュウ酸カルシウム沈殿法による回収率

残さ (1 N 塩酸) 加水分解—イオン交換法<しゅう酸カルシウム分離—イオン交換法の順序である。小池-22試料では、塩酸不溶解残さ (3 N 塩酸) <ふっ化カルシウム分離—イオン交換法<塩酸不溶解残さ (1 N 塩酸) <しゅう酸カルシウム分離—イオン交換法の順序である。喜界島 ki-51 試料の総アミノ酸の検出量は、直接イオン交換法>ふっ化カルシウム沈殿—イオン交換法の関係になっている。各方法による検出量の順序は五日市試料と小池-22試料においてはまったく同じであるが、喜界島 ki-51 試料における検出量の順序は五日市試料の場合と反対の結果を示している。すなわち、五日市試料 (50 g) においては、ふっ化カルシウム分離—イオン交換法によるアミノ酸の検出量の方が直接イオン交換法によるよりも多いが、喜界島 ki-51 試料 (10 g) においては、むしろ後者の方法によるアミノ酸の検出量の方が多いという結果を示している。直接イオン交換法によるアミノ酸の検出量が、喜界島 ki-51 試料に比べ五日市試料において減少している原因の一つに脱塩の規模の大きさが考えられる。五日市試料は喜界島試料の脱塩の規模の約5.5倍、すなわち、5×50 cm カラム2本、1,500 ml のイオン交換

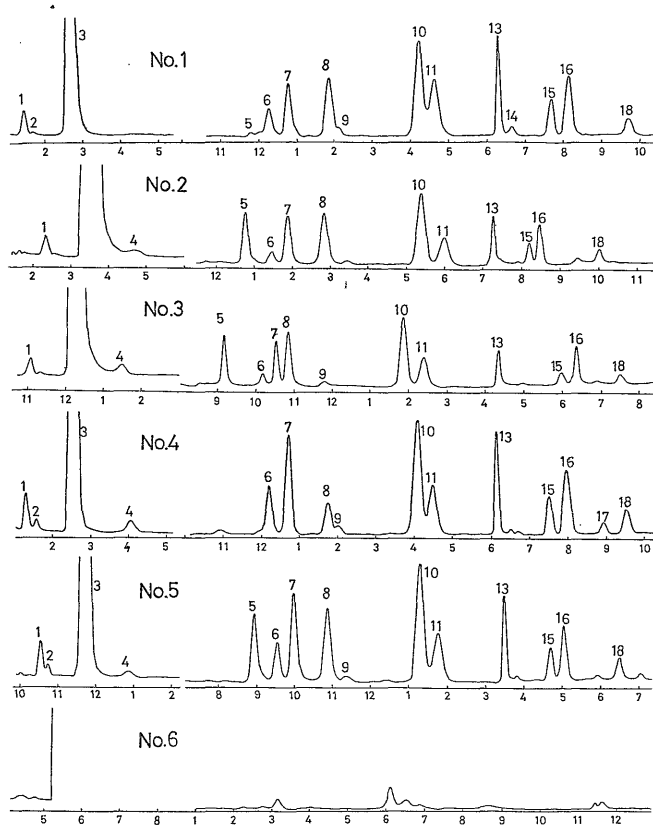
樹脂をもちいて脱塩を行っている。イオン交換カラムの規模が大きくなれば、当然偏流がおり、トンネル現象が生じて十分なイオン交換が行われていないため、アミノ酸の回収率が低下することが考えられる。また、イオン交換カラムのサイズが大きくなれば2 N アンモニア水によるアミノ酸の溶出液量が増加する。したがって、加熱による濃縮時間が増加するため、熱に不安定なアミノ酸が分解し、回収率が低下する原因となる。直接イオン交換法による検出量が他の方法によるよりも減少しているアミノ酸は、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、グリシン、チロシンなどである。とくに減少が著しいのは塩基性アミノ酸のヒスチジンとアルギニン、酸性アミノ酸のアスパラギン酸である。アスパラギン酸、リジン、セリン、アルギニン、チロシン等の検出量が減少しているのは、これらのアミノ酸が熱的に不安定なことが原因の一つになっているものと思われる。また藤原(1959)によると、脱塩に  $\text{H}^+$  型強酸性陽イオン交換樹脂をもちいることによって、酸性アミノ酸がいちじるしく失なわれる。

カルシウムをふっ化水素酸によりふっ化カルシウムとして沈殿させる方法のアミノ酸の検出量は、3 N 塩酸不溶解残さよりアミノ酸を抽出する方法より多く、1 N 塩酸不溶解残さよりアミノ酸を抽出する方法より少ない。この方法により小池-22試料では酸性アミノ酸のアスパラギン酸とグルタミン酸の検出量が著しく減少しているが、五日市試料ではその傾向はみられない。塩酸不溶解残さ (1 N) 加水分解—イオン交換法やしゅう酸カルシウム分離—イオン交換法に比較すると、アラニンとバリンが多少低い値を与えている。この方法のイオン交換カラムの規模は直接イオン交換法の約5分の1である。

カルシウムをしゅう酸カルシウムの沈殿として除く方法は、全体を通じてもっとも検出量が多い。小池-22試料においては、アルギニンが他の方法に比べ約半分に減少、プロリンが約2倍に増加している。これらの原因については不明である。イオン交換法カラムのサイズはやはり直接イオン交換法の約5分の1になる。

第2表と第3図にしゅう酸カルシウム分離—イオン交換法による各種アミノ酸の回収率を示した。シスチンとメチオニンは石灰岩にはあまり含まれないので求めなかった。平均回収率は71.9% (チロシンのをのぞく) で、この方法によりかなりのアミノ酸が失われることがわかる。とくにヒスチジンがかなり低い値を示している。またチロシンが異常に回収率が悪い原因は不明であるが、このアミノ酸はシスチンとともに水に難溶性のアミノ酸である。この実験で求めた回収率には、しゅう酸カルシ

炭酸塩岩石より抽出したアミノ化合物の脱灰法について (寺島美南子)



第1図 五日市試料中のアミノ酸の液体クロマトグラム

No. 1 五日市-I 試料50gより抽出したアミノ酸混合物を 1/100 N HCl 7 ml にとかし 1 ml を分取。

No. 2 五日市-II 試料50gより抽出したアミノ酸混合物を 1/100 N HCl 10 ml にとかし 1 ml を分取。

No. 3 五日市-III 試料50gより抽出したアミノ酸混合物を 1/100 N HCl 10 ml にとかし 1 ml を分取。

No. 4 五日市-IV-1 試料70gより抽出したアミノ酸混合物を 1/100 N HCl 7 ml にとかし 1 ml を分取。

No. 5 五日市-IV-2 試料78gより抽出したアミノ酸混合物を 1/100 N HCl 10 ml にとかし 1 ml を分取。

No. 6 五日市-IV-3 試料70gより抽出したアミノ酸混合物を 1/100 N HCl 7 ml にとかし 1 ml を分取。

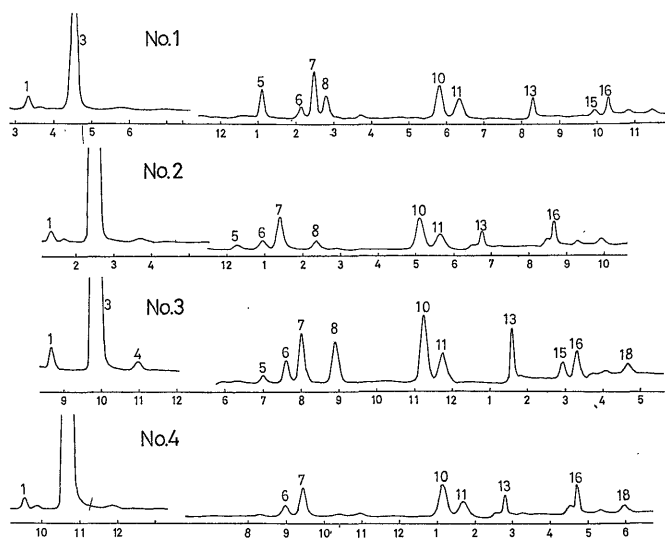
注1) ピーク高と溶出時間は、ニンヒドリン試薬の退化やクエン酸緩衝液の pH によって同じアミノ酸の濃度でも異なる。

注2) 1, リシン+オルニチン 2, ヒスチジン 3, アンモニア 4, アルギニン 5, アスパラギン酸 6, スレオニン 7, セリン 8, グルタミン酸 9, プロリン 10, グリシン 11, アラニン 12, シスチン 13, バリン 14, メチオニン 15, イソロイシン 16, ロイシン 17, チロシン 18, フェニールアラニン 19,  $\beta$ -アラニン

ウム沈殿によるアミノ酸の吸着による損失の他に、イオン交換樹脂による脱塩にともなう損失も含まれている。

塩酸不溶解残さを加水分解してアミノ酸を抽出する方法は、有機物が炭化している時代の古い岩石、すなわち小池-22試料と五日市試料についてのみ行った。脱灰にもちいた塩酸の濃度は 3 N と 1 N である。検出量は 2 試料とも、3 N < 1 N の結果が得られた。塩酸で処理する

ことによって酸性のアミノ酸が減少しているが、1 N よりも 3 N で処理した場合に著しく減少しており、またグルタミン酸よりもアスパラギン酸にその傾向が著しくみられる。酸性アミノ酸の回収量が酸処理によって著しく減少するのは、石灰岩中における酸性アミノ酸の存在状態に関係があるのかも知れない。一般に現世の炭酸塩堆積物は酸性アミノ酸に非常に富んでいるが、これは



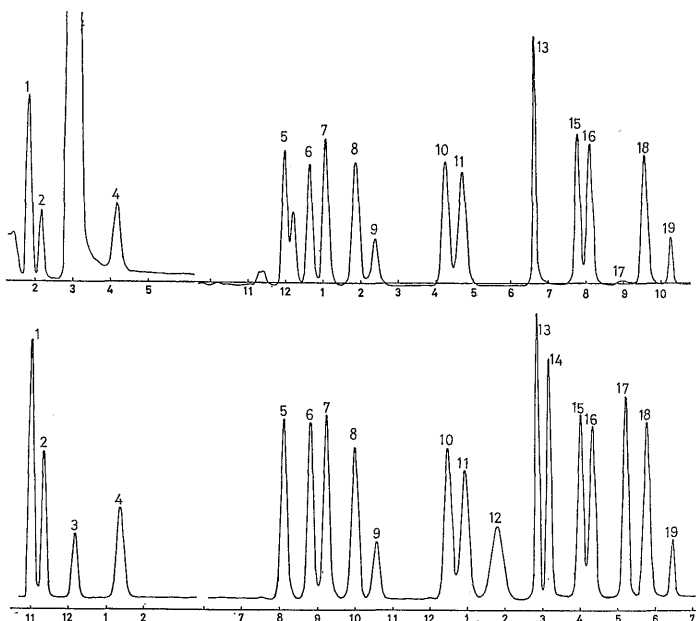
第2図 小池試料中のアミノ酸の液体クロマトグラム

No. 1 小池22-II 試料20gより抽出したアミノ酸混合物を 1/100 N HCl 10 ml にとかし 1 ml を分取。

No. 2 小池22-III 試料20gより抽出したアミノ酸混合物を 1/100 N HCl 10 ml にとかし 1 ml を分取。

No. 3 小池22-IV-1 試料8.2gより抽出したアミノ酸混合物を 1/100 N HCl 7 ml にとかし 1 ml を分取。

No. 4 小池22-IV-2 試料20gより抽出したアミノ酸混合物を 1/100 N HCl 10 ml にとかし 1 ml を分取。



第3図 アミノ酸標準試料の液体クロマトグラムとシュウ酸カルシウム沈殿法によるアミノ酸の回収率を示す液体クロマトグラム  
上：シュウ酸カルシウム沈殿法  
下：アミノ酸標準試料

MITTERER (1972) によると酸性アミノ酸に富んだタンパク質が炭酸塩鉱物に吸着されて存在しているためとしている。もし、酸性アミノ酸の大部分が吸着により存在しているならば、酸処理によって著しく失われることが十分考えられる。

またこの方法は下記のような重要な問題点を含んでいる。すなわち、塩酸処理によって遊離のアミノ酸とタンパク質の可溶性画分が除かれるということである。秋山 (1971) は貝殻化石 (1~10 g) を 2 N 塩酸で処理し遠心分離を行って残さと上澄液に分離し、残さより得られるアミノ酸をタンパク質不溶性画分、上澄液より得られるアミノ酸を遊離アミノ酸+タンパク質可溶性画分とすると、洪積世試料では、遊離アミノ酸画分：タンパク質可溶性画分：タンパク質不溶性画分は 42.4%：51.2%：6.4% であるが、ジュラ紀の試料では 43.2%：30.8%：26.0% になると報告している注2)。このような結果から推定すると、塩酸不溶解残さのみを加水分解して得られたアミノ酸は遊離アミノ酸と可溶性タンパク質アミノ酸が含まれないのであるから、塩酸不溶解残さ加水分解—イオン交換法による検出量は当然ふっ化カルシウム分離—イオン交換法による値よりも少ない結果が予想される。しかし、今回の実験結果は第1表、第2表に示すように予想とは反対の結果が得られた。

第1表のIV-3欄に3 N 塩酸にとけるアミノ酸、すなわち、遊離のアミノ酸の検出結果を示した。遊離のアミノ酸は総アミノ酸量の約10.6%を占めている。検出されたアミノ酸はリジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、スレオニン、セリン、グリシン、バリン、イソロイシン、ロイシンで、アスパラギン酸、スレオニン、バリンは痕跡程度であった。この結果は、上記の秋山の結果に比べると非常に低く、約半分である。これは脱塩法を直接イオン交換法によったためと思われる。

## 6. ま と め

石灰岩中のアミノ酸を定量する場合、とくに、含有量が微量なため多量の試料を処理しなければならない場合の脱塩法について検討を行った。その結果はつぎのようにまとめられる。

- ①総アミノ酸の検出量は試料の採取量にかかわらず、しゅう酸カルシウム分離—イオン交換法による値が一番良い結果を示した。
- ②五日市試料 (50 g) と喜界島試料 (10 g) において、直接イオン交換法とふっ化カルシウム分離—イオン交換法による検出量は逆の結果を示している。この原因とし

注2) 上澄液中のカルシウムをふっ化カルシウムとして除いている。

ては、イオン交換カラムサイズの増大によるアミノ酸の損失と、溶出液の濃縮時間の増加によるアミノ酸の分解が考えられる。

③カルシウムイオンを沈殿として除く方法は、ふっ化カルシウムとして除く方法よりも、しゅう酸カルシウムとして除く方法の方が検出量が多いという結果が得られた。

④塩酸不溶解残さを加水分解しアミノ酸を抽出し定量する方法は、遊離のアミノ酸と可溶性タンパク質アミノ酸を含んでいないにもかかわらず、ふっ化カルシウム分離—イオン交換法よりも検出量が多いという結果が得られた。

⑤脱塩法の違いにより各種アミノ酸に検出量の差が生じた。たとえば、グリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、フェニールアラニンなどは、各方法を通じて比較的近似の値を与えているが、酸性アミノ酸は塩酸処理、ふっ化カルシウム沈殿法により著しく収量を減じた。

今回の実験はおもに全アミノ酸の回収量を中心に検討を行った。多量のカルシウムイオンを除く場合、大型のイオン交換カラムで脱塩を行うとアミノ酸の損失が大きく、沈殿として除く方がよい。沈殿法はふっ化カルシウムとしてよりもしゅう酸カルシウムとして除く方法の方がすぐれているという結果が得られた。

3 N と 1 N 塩酸不溶解残さ加水分解物より得られたアミノ酸の検出量とアミノ酸組成の違いが示すように、塩酸の濃度の違いによって、遊離アミノ酸：可溶性タンパク質アミノ酸：不溶性タンパク質アミノ酸の占める割合は異なってくるものと思われる。したがって、今後アミノ酸の存在状態別に分離する方法を検討し、これまでに得られた化石についての結果と比較したいと考えている。

本研究をすすめるに当たり、藤貫正技官より有益な助言をいただいた。化学課長竹田栄蔵技官には、本稿を御校閲いただき、数多くの助言をいただいた。これらの方々にお礼申し上げる。

## 文 献

- 秋山雅彦 (1971) : 古生化学の研究とその課題。地質雑, vol. 77, p. 563-572.
- 藤原隆代・井尻正二 (1959) : 歯の化石にふくまれている蛋白質の分析法。地球科学, no. 40, p. 20-31.
- (1963) : 化石に含まれているアミノ酸の定量分析法について (第一報) ペーパークロマトグラフィーによる定量法。資源研彙

報, no. 60, p. 52-58.

市原優子 (1969) : 堆積岩に含まれているアミノ酸  
の分析法. 地球科学, vol. 23, p. 69-79.

—— (1972) : 日本の新生代層に含まれている  
アミノ酸. 地球科学, vol. 26, p. 69-79.

MITTERER, R. M. (1972): Biogeochemistry of

aragonite mud and oolites. *Geochim.  
Cosmochim. Acta*, vol. 36, p. 1407-1422.

RITTENBERG, S. C., et al. (1963): Biochemistry of  
sediments in experimental Mohole. *Jour.  
Sed. Petr.*, vol. 33, p. 140-172.