

# 蛋白分解液より陰イオン交換樹脂による酸性アミノ酸 の分離とピロリドンカルボン酸法 による定量について

中村亮八郎・大原 嘉典・竹林 克明

On the Separation and Determination of Acidic Amino Acids  
by the Anion Exchange Resin and Pyrrolidonecarboxylic  
Acid Method in the Protein Hydrolysate  
RYOHACHIRO NAKAMURA, YOSHINORI OHARA, and  
KATSUAKI TAKEBAYASHI

## 緒 言

蛋白又は biological fluids 中に含まれる酸性アミノ酸は、通常グルタミン酸及びアスパラギン酸の2種であつて、その定量法は多数提案されて居り、実際の分析例としては、微生物による bioassay<sup>(1)</sup> 又は isotope dilution method<sup>(2)</sup> によるものが比較的多いが、本邦では未だ一般に直ぐ行い得る方法とは言い難い。

また化学的方法では、従来からの単離法<sup>(3)(4)</sup>が最も屢々用いられて居るが、分析量、操作、他のアミノ酸の妨害等の点に難点がある。そのほか直接定量法として挙げられる主なものは、グルタミン酸で、 $\text{NaNO}_2$  及び  $\text{K-MnO}_4$  処理により琥珀酸に変じ、銀塩とし銀滴定する方法<sup>(5)</sup>、chloramine T 処理後加水分解して琥珀酸を得、succinic dehydrogenase を作用させて検定する方法<sup>(6)</sup>、ニンヒドリンで酸化後、dinitrophenylhydrazine と反応させ hydrazone を比色する方法<sup>(7)</sup>等があり、アスパラギン酸では、臭素水及び  $\text{KMnO}_4$  酸化で dibromo-oxalacetic acid とし、dinitrophenylhydrazine と反応後比色する方法<sup>(8)</sup>、アルコール性ジメチル硫酸でマレイン酸とフマル酸の混合物となし polarograph による方法<sup>(9)</sup>、フマル酸に変じて比色する方法<sup>(10)</sup>、aspartase による方法<sup>(11)</sup>等があるが、これ等は概して操作繁雑で例数は尠い。

近來クロマトグラフ法の進歩に伴い、この2種のアミノ酸の等電点が著しく酸性側にある性質を利用して、酸性アルミナ<sup>(12)(13)(14)</sup>或は陰イオン交換樹脂<sup>(15)(16)(17)</sup>を用いて、アミノ酸混合液中より、両酸のみを吸着して group separation を行うことが可能となつた。後者については分離部に対し、更に溶出後分別結晶する<sup>(18)</sup>、或は液体クロマトグラフ法により、両酸の等電点の差を利用して、適当な溶剤で溶出する<sup>(19)(20)</sup>、或は両酸混合溶液を濾紙上に展開して分離後更に濾紙より溶出する<sup>(21)</sup>等により、両酸を相互に分離した後、適当な方法で定量する

ことが提案されて居る。これ等は、両酸をほぼ同時に定量し得るので、個別的な化学定量法よりも簡便であるが、前者は試料の量、精度等の点で、後二者は操作繁雑で特別の注意を要する点その他で一長一短を免れない。

筆者等は酸性アミノ酸定量法の簡易化を目的として、先づピロリドンカルボン酸法（以下環化法と略称）によるグルタミン酸の直接定量法<sup>(22)</sup>を検討したが、グルタミン酸をその等電点附近で加熱して、pyrrolidone carboxylic acid に変じ、加熱前後のアミノNの差を Van Slyke 法で求めてグルタミン酸Nとする本法は、半定量法として比較的簡単且つ正確であることを確め得た。本法を蛋白分解液の陰イオン交換樹脂による酸性アミノ酸の group separation 区分に適用し、全アミノNよりグルタミン酸Nを減じてアスパラギン酸Nを求め、両酸の同時定量を試みたが、この組合せは半定量法として充分実用し得ること、並に嘗てケラチン分解液について行つたアルミナ吸着法<sup>(13)(23)</sup>よりも操作が簡易であることを認めた。

なお環化法を直接蛋白分解液に適用すれば、単離法<sup>(4)</sup>吸着法<sup>(12)</sup>と同様に、シスチンの存在により妨害され結果の補正を必要とするが、樹脂型式を選択してこれが酸性アミノ酸部に混入することを防ぎ得た。

以下にその実験成績の概要を述べることにする。

## I. 環化法によるグルタミン酸の定量について

グルタミン酸を含む水溶液を、pH 3.3, 125°C で、封管中に加熱すれば、前記の如く環化してアミノNの損失がおこる。この際の加熱時間、他のアミノ酸の影響、蛋白分解液に対する応用等につき検討した。

### グルタミン酸のアミノN損失

純グルタミン酸及びその Na 塩の水溶液数 cc を硬質試験管にとり、B.P.B. で pH 3.3 に調節し、熔封後、125°C $\pm$ 3°C の油浴に浸し、加熱時間と環化程度の関係

を求めると第1表の如くで、数回実験の結果、実用上は、4時間の処理で損失92%を適当と認め、以後この数値を用いた。

第1表 グルタミン酸のアミノN損失

時間 hrs	残留アミノN	アミノN損失
	γ	%
0	197	—
1	86	56
2	29	85
4	14	92 (平均)
8	14	92 (91.7)

第2表 カゼイン分解液におけるシスチンのアミノN損失

分解液 cc	添加シスチン N, γ	アミノN損失		
		カゼイン, γ	シスチン, γ	シスチン, %
1.0	88	72	50	57
0.9	88	64	52	59
0.8	93	57	55	59
0.8	83	57	49	59
0.7	83	51	48	58
0.6	79	42	47	59
0.5	79	36	49	62
0.4	79	28	48	60

ン酸の環化度はその量にかかわらず、カゼイン中の含量を無視すれば、シスチンはアミノN計算量の平均59%を失うことになり、従つてその1mgはグルタミン酸0.78mgに相当することとなつた。この数値は原著者の夫に比し低目であるが、シスチン含量を無視し得ない場合は、分解液のシスチンを定量し、この割合でグルタミン酸含量を補正せねばならぬ。

蛋白分解液における回収

カゼイン及びシスチン含量の多い兎毛ケラチンの分解液を用いて、添加グルタミン酸の回収率を測定した結果

第3表 回収試験

蛋白質 γ	添加ミグ ン酸 γ	アミノN			グルタミン酸			回収率 %
		全	残留	損失	実験値	蛋白中 の量	差	
カゼイン	4100	0	359	283	76	867	—	—
	2040	2000	351	134	217	2476	431	2045
兎毛	4000	0	222	145	77	878	—	—
	3200	800	212	83	129	1472	702	770

シスチンのアミノN損失 本法をアミノ酸混  
合液に用いる場合、シスチン  
のみが同様の挙動を示して  
定量を妨害することを確か  
めたので、蛋白分解液その  
他について、グルタミン酸  
のみを定量する場合もある  
ことを考慮し、シスチンの

妨害度を測定した。即カゼインHCl分解液の種々の量並にこれに純シスチンを加えたものを全容約5ccとし、アミノN損失を求めると第2表の如くであつて、本処理によるシスチンのアミノN損失は概ね一定で、且つグルタ

は第3表に示す通りで、各々数回の実験値の平均は99%であつた。従つて本法は、シスチン含量の補正をすれば、蛋白分解液その他アミノ酸混合液におけるグルタミン酸の半定量に充分使用し得ることが認められた。

II. Amberlite IR 4B による酸性

アミノ酸の分離について

アミノ酸混合液より酸性アミノ酸の group separation を行うため、陰イオン交換樹脂 Amberlite IR 4B を用い、カラム法によつて、分離の条件、定量法への適用等につき検討した。

樹脂交換能

グルタミン酸ソーダ水溶液を通過検液とし、HCl, NaOH 等の屢々用いられる再生剤を主として、樹脂の交換能及び再生法との関係等を求めた。多価のイオンは脱離困難なので始から除外した。常法により、新しい樹脂をHCl, NaOH で交互に洗滌した後、最後にHCl洗で止

第4表 樹脂交換能

通過液	型式	再生剤	交換能 mg	文献
グルタミン酸 mg/cc, aq. sol.	R-CO <sub>3</sub> N-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		20	(15), (18)
	R-Cl N-HCl		20	(16), (19), (20)
通過速度 cc/min.	R-Cl* N-HCl		35~40	*水700ccでCl freeまで洗ふ
	R-Ac N-NaOAc		40	(20)
	R-OH N-NaOH		40	(17), (21)

め、洗液のClイオンがほぼ無くなるまで、多量の水で洗つた。一方、内径約5mm、長さ約40cmの硝子管の下端近くを絞つてカラムとし、脱脂綿少量を絞つた部分まで押し込んで底とし処理した樹脂の風乾量0.5gを詰め、気泡の進入を防ぐために常に水で被覆した。カラムの上端をゴム管で分液漏斗の脚に接続し、これに再生剤又は検液を入れ、カラム流下速度を活栓で調節した。

再生はすべて1N-水溶液25ccと水50ccの2cycle後、更に水150ccを通して行い、終了後直に検液を通過させ、流出液がニンヒドリン陽性を呈するまでの通過液中のグルタミン酸量を以て、この条件における交換能と定めた。

実験結果は第4表の通りであるが、樹脂型式は、とりあえず再生剤の陰イオンで表した。同表によれば、R-Cl\*, R-Ac, 及びR-OH型がほぼ能力等しく、他は低下した。併し前者は再生に多量の水を要するので、後二者を適当と認め、以後は専ら、Na-acetate, 及びNaOH再生の樹脂を用いた。

本条件下の交換能は、グルタミン酸0.56m-mol/g樹脂で、平衡交換容量5.2m-eq./gよりは当然少い。

樹脂による交換及び溶出

酸性アミノ酸の分離・定量は蛋白分解液について行われることが多いので、カゼイン及び兎毛ケラチン分解液を用いて、R-Ac, R-OH 型の分離能を検した。この二者を選んだのは前者はシスチンに乏しく、且つ屢々交換を妨害する多価の磷酸イオンを含むこと、後者は逆にシスチンに富むこと等を考慮したためで、蛋白を 6 N-HCl 20 倍量と封管中で、100~105°C に 30 時間加水分解した濾液を検液とした。カラムは実施の便宜上内径約 9mm の硝子管を用い、樹脂 2g を詰め、再生剤は交換能測定の場合の倍量を通した。

分解液を減圧で濃縮し HCl を駆出後、水を加え、未だ強酸性の溶液一定量を pH を調節せずにカラムを通し、続いて同容の水で洗った。次に酢酸を流下して吸着部を溶出し、通過部、溶出部を濃縮後濾紙上に二次元展開し、分離状態を判定した。

R-OH 型と R-Ac 型のカゼイン分解液に対する分離能はほぼ同等であるが、前者の通過液の pH はほぼ 7~8 であるに対し、後者では 5~6 であつた。

ケラチン分解液の場合はこれと稍異り、両型樹脂の通過及び溶出液をそれぞれ濃縮又は乾固すると、水不溶の結晶が前者では溶出液に後者では通過液に相当量現れた。これは酸可溶、ニトロプルシッド反応陽性で、シスチンであることを確認したが、濾紙に展開した結果もこれに一致した。即シスチンの挙動は両型で反対となり、R-OH 型では交換吸著され、酸溶出によつて酸性アミノ酸部に混入して来るのに対し、R-Ac 型ではその儘通過して、中性、塩基性アミノ酸部に含まれることが見出された。シスチンの等電点は中性アミノ酸より酸性側にあり、R-OH 型による交換時の pH によつて、カラム内で陰イオン化又は析出沈澱するのが斯かる現象の一因で

第 5 表 交 換 及 び 溶 出

試 料	樹 脂	交 換	樹 脂	交 換	溶 出	*濾紙斑点(ニンヒドリン)				
						asp.	glut.	cyst.	その他の アミノ酸	
カゼイン 25 cc, 90 mg	(カラム) R-OH 0.5 g	通過部	(カラム) R-Ac 1.0 g	通過部	→	-	-	-	卅	
				吸着部	N-AcOH 60 cc	→	卅	卅	-	-
					更に N-HCl 20cc	→	-	±	-	-
				吸着部	N-HCl 20 cc	→	+	+	-	±
同 上	(添 加) R-OH 0.5 g	通過部	(カラム) R-Ac 1.0 g	通過部	→	-	-	-	卅	
				吸着部	N-AcOH 60 cc	→	卅	卅	-	-
					更に N-HCl 20cc	→	-	±	-	-
				吸着部	N-HCl 20 cc	→	+	+	-	-
同 上	(カラム) R-Ac 2.0 g 又は R-OH 2.0 g	通過部	通過部	→	→	-	-	-	卅	
				吸着部	2N-AcOH 60 cc	→	卅	卅	-	-
					更に N-HCl 20cc	→	-	-	-	-
ケラチン 25 cc, 100mg	(カラム) R-OH 2.0 g	通過部	通過部	→	→	-	-	±	-	
				吸着部	2 N-AcOH 60 cc	→	卅	卅	+	-
					→	→	-	-	-	-
同 上	(カラム) R-Ac 2.0 g	通過部	通過部	→	→	-	-	+	卅	
				吸着部	2 N-AcOH 60 cc	→	卅	卅	-	-
					更に N-HCl 20cc	→	-	-	-	-

\* ペーパークロマトグラフィー (一次元フェノール・二次元ブタノール-酢酸)

成績の大要は第 5 表の通りである。先づ Cl イオン及びフミンを除去しようとして<sup>(17)(21)</sup> R-OH 型樹脂の少量を通すか、又は分解液にこれを添加し、次に R-Ac 型で目的部を捕えようとしたが、第一の樹脂で酸性アミノ酸の一部が交換され、却つて操作が繁雑になつたので、以後は検液中の陰イオン(主として Cl イオン及び酸性アミノ酸)概量の 1.5~2 倍当量の樹脂を 1 回通すこととし、ほぼ所期の目的を達した。

あると推定される。

溶出液を環化法で定量する場合、シスチンの混入を避けるべきで、結局 R-Ac 型をより適当と認め、以後はすべてこの型によつた。

また溶出は一般に強酸、強アルカリ類によつて行われるが、樹脂に沈着したフミンの溶出を可及的に抑えること、カラム内のイオンの種類を増さぬこと、及び以後の定量操作等を考慮して、酢酸を選んだ。念のため酢酸溶

出後の樹脂に更に HCl を通したところ、フミンはすべて溶出したが、溶出液の濾紙展開で、ニンヒドリン陽性物質は全然見当らなかつたから、吸着アミノ酸の酢酸溶出は概ね完全であると見做した。

III. 蛋白分解液における定量について

環化法及びイオン交換分離法は、それぞれ蛋白分解液に応用し得ることが明になつたので、両法の組合せによるグルタミン酸とアスパラギン酸の同時定量の可能性、定量条件等を吟味した。樹脂は R-Ac 型で、カラム、環化操作その他は前実験に準じて行つた。

樹脂の N 溶出

イオン交換樹脂に酸、アルカリ処理を繰返すと、その一部が次第に崩壊して溶出することは既に知られて居るが、IR 4 B は分子内に N を有するから、若しアミノ N の測定に影響する物質が樹脂自身から溶出するならば、定量操作に新たな考慮を必要とする。この点につき、幾度も使用した樹脂によつて確めた結果は第 6 表の如くで、2N-酢酸又は 0.25 N-HCl の通過により、ほぼ同程度の全 N 少量の溶出を見たが、Van Slyke 法によるアミノ N としては実験誤差の範囲内であつた。微量定量のため

第 6 表 樹脂の溶出 N

樹脂量	溶 出	分析量	アミノ N		全 N	濾紙斑点 (ニンヒドリン)
			バンスライク法	ナフトキノ法		
2.0 g	N-AcOH, 60 cc	1/20	trace	trace	8~11γ	なし
2.0 g	0.25 N-HCl, 60 cc	1/20	trace	—	6~10γ	なし

に Folin のナフトキノ比色法<sup>(24)</sup>を選び、一旦酢酸を溜去<sup>(25)</sup>した試料を比色したが、同様の結果を得、本定量には樹脂のアミノ N 溶出を無視し得ること、また溶出区分の全 N を以てアミノ酸を定量する試み<sup>(19)(21)</sup>は特に注意を要することが知られた。

樹脂より酸性アミノ酸の回収

純グルタミン酸及びアスパラギン酸の混合水溶液を樹

第 7 表 回 収 試 験

測 定 法	I		II		
	樹 脂 通 過	対 照	樹 脂 通 過	対 照	
試 料	asp.-N 0.94 mg glut.-N 0.95 mg	同左	asp.-N 0.19 mg glut.-N 0.95 mg	同左	
バンスライク法	分 析 量	1/20	同左	1/5	同左
	全 ア ミ ノ N, γ	94	95	230	233
	残 留 ア ミ ノ N, γ	—	—	52	53
	損 失 ア ミ ノ N, γ	—	—	178	180
	グ ル タ ミ ン 酸-N, γ	—	—	193	195
	ア ス パ ラ ギ ン 酸-N, γ	—	—	37	38
ナフトキノ法	分 析 量	1/100	同左	—	—
	全 ア ミ ノ N, γ	19.4	19.0	—	—
回収率	バンスライク法, %	99	100	asp. 97 glut. 101	102 100
	ナフトキノ法, %	102	100	—	—

第 8 表 カゼイン分解液における定量

試 料	化学用, HCl 分解液		粗製品, HCl 分解液		
	分 離 法	直接法	分 離 法	直接法	
測 定 法	バンスライク法	ナフトキノ法	分 離 法	直接法	
樹 脂 通 過 量	90 mg, 20 cc	同左	同左	71 mg, 20 cc	同左
陰イオン/交換能 (m-eq)	0.9/2.2	同左	—	0.85/2.2	—
分 析 量	1/25	1/100	1/25	1/25	1/25
全 ア ミ ノ N, γ	104	26.5	378	68	242
残 留 ア ミ ノ N, γ	30	8.0	305	18	190
損 失 ア ミ ノ N, γ	74	18.5	73	50	52
グ ル タ ミ ン 酸-N, γ	80	20.1	79	54	56
ア ス パ ラ ギ ン 酸-N, γ	24	6.4	—	14	—
グ ル タ ミ ン 酸, %	23.5	23.4	23.4	19.9	20.6
ア ス パ ラ ギ ン 酸, %	6.3	6.6	—	4.7	—

脂に通し、水洗後 2N-酢酸 60 cc で溶出し、一部をとり環化法で両酸を定量した結果、並に対照として、混合液を樹脂を通さずに直接定量した結果は第 7 表の示す通りで、両者ともほぼ満足すべき回収率を得た。なお樹脂を HCl で更に溶出し濾紙に展開したが、残留アミノ酸は見られなかつた。

従つて樹脂表面におけるアミノ酸の不可逆的交換<sup>(20)</sup>を考慮する必要なく、且つ両酸の交換溶出は定量的であると認められた。

カゼイン及びケラチン分解液における定量

以上の実験結果から、蛋白分解液に対する本法の適用は概ね可能であることを知つたので、カゼイン(第 8 表)及び兎毛ケラチン(第 9 表)の HCl 分解液適量につ

第9表 ケラチン分解液における定量

測定法	分離法	直接法
樹脂通過量	80 mg, 20 cc	同左
分析量	1/25	1/20
全アミノN, γ	65	222
損失アミノN, γ	37	77
グルタミン酸, γ	421	504*
アスパラギン酸, γ	238	—
グルタミン酸, %	13.1	12.6
アスパラギン酸, %	7.4	—

\* シスチン含量 12% で補正

Cl<sup>-</sup>イオン量と酸性アミノ酸推定量を合すれば、樹脂通過液の陰イオン当量は、交換能の約半分であつた。表中、化学用カゼインの場合以外はすべて Van Slyke 法でアミノNを測定した。なお参考のため分解液を直接環化法で定量しグルタミン酸のみを求めた結果をも、直接法として併記したが、分離法とはほぼ一致した数値を与え、またナフトキノン法が、本条件で、微量定量に用い得ることも明となつた。

ケラチン分解液も同様であるが、直接法では、分解液中のシスチンを Sullivan のナフトキノンの比色法<sup>(26)</sup>で定量し、前記の補正值によつてグルタミン酸量を算出した。なお何れの場合も、通過及び溶出液を濃縮し、その一部を二次元展開して目的部の分離を確かめ、また樹脂を HCl で再溶出して、残留アミノ酸の無いことを認めた上で定量を行つた。

#### 考 察

2種の蛋白の酸性アミノ酸含量を比較的最近の数値と比較すれば第10表の如くで、試料の相違を考えると、

第10表 カゼイン及び兎毛中の含量, %

試料	アミノ酸		文 献
	グルタミン酸	アスパラギン酸	
カゼイン	23.5	6.3	
カゼイン	21.1~24.4	6.8~7.5	(27)
カゼイン	22.0	7.2	(4), (28)
兎毛	13.1	7.4	
兎毛	15	6	(29)
兎毛	12~16	4~7	(23)

カゼインでは大差なく、前記の実験成績とから、本法を比較的正確な半定量法として、蛋白分解液に適用し得る。また兎毛では、採毛条件により若干の変動がある<sup>(23)</sup>と思はれる。

イオン交換又はアルミナ吸着によつて捕えられる酸性アミノ酸がこの種のみであることは、従来の例<sup>(13)(14)(17)</sup><sup>(30)</sup>に徴しても明であるが、検液のカラム通過に際し、

いて、酸性アミノ酸の分離定量を実施した。使用樹脂量は2gで、分解液の中和と滴定から得られた

樹脂の再生不完全の時は酸性アミノ酸の一部は逸出し、又操作不備のため分離部に他のアミノ酸等が混入することもあり、分離能の判定を併行する方が安全である。

本法は純アミノ酸を用いて、誤差は ± 3% 以内、通常 0.1~0.3 g の蛋白を分解すれば、充分定量に間に合う。微量にはナフトキノン比色法で、10γ以下のアミノNを測定し得る。

アミノNに影響するアンモニア、第一級アミン等は樹脂を通過する。シスチンも同様であるが、通過部における他のアミノ酸定量に際して往々妨害となるから、これを効果的に除く必要もおこるのであろう。

#### 分離・定量の一例

蛋白の分解液より、原蛋白として 80~150 mg 相当量をピペットし、浴温 60°C 付近で減圧濃縮し、HCl を駆出した後、水 20 cc に溶す。これを再生樹脂 2 g を詰めたカラムに cc/min. の速度で通す。蛋白分解液に使用した樹脂は次の如く再生する。樹脂 2 g に対し、N-HCl 50 cc, 水 100 cc で 4 cycle, 更に水 100 cc を通してから、N-Na-acetate 50 cc, 水 100 cc で 2 cycle, 最後に水 300 cc を通し、直ぐ使用する。

試料通過後、続いて同容の水で洗い、合して通過液とする。樹脂には更に 2N- 酢酸 60 cc を通し、溶出液とする。後者を濃縮し 10 cc に fill up する。乾燥濾紙で濾過し、濾液 2 cc を更に 10 cc に fill up し、その 2 cc につき、ミクロの Van Slyke 装置でアミノNを測る。他の 2 cc を試験管にとり、B.P.B. で pH 3.3 に調節後密封し、125°C の油浴に4時間処理後、10 cc に fill up し、その 2 cc につき同様にアミノNを測定する。

ナフトキノン法を用いる場合は、溶出液の酢酸を駆出後同様に処理する。但し比色に光電比色計を用いれば、上記の約 1/5 以下の scale で行う。

#### IV. 総 括

蛋白分解液その他に含まれるグルタミン酸及びアスパラギン酸の半定量法として、環化法とイオン交換法の組合せにつき検討した。

環化法によつてグルタミン酸を定量し得るがシスチンにより妨害され、その含量にもとずく補正を要した。

Na-acetate で再生した Amberlite IR 4B により、酸性アミノ酸のみが定量的に捕集、且つ酢酸で溶出され、この際シスチンの混入はおこらなかつた。

従つて分離部に環化法を適用すれば、両アミノ酸の同時定量が可能となり、充分実用に適することが明になつた。

#### 文 献

- (1) Brand et al: J. Am. Chem. Soc. 67, 1524

1945. その他
- (2) Shemin : J. Biol. Chem. 159, 439 (1945). その他
- (3) Jones & Moeller : J. Biol. Chem. 79, 42 (1928). Jukes : *ibid.* 103, 425 (1933).
- (4) Bailey, Chibnall, Reeds & Williams : Biochem. J. 37, 360 (1943).
- (5) Arhino : C. A. 33, 6198 (1939).
- (6) Cohen : Biochem. J. 33, 551(1939).
- (7) Blanche et al : J. Biol. Chem. 164, 331 (1944).
- (8) Pucher & Vickery : Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 6, 288(1934).
- (9) Wårshowsky : Anal. Chem. 19, 161, 1947; *ibid.* 20, 341(1948).
- (10) Friedberg & Marshall: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 74, 446(1950).
- (11) Krebs : Biochem. J. 47, 605(1950).
- (12) Wieland : Ber. 75, 1001(1942) ; *ibid.* 76, 823(1943) ; Naturwiss. 30, 374(1942).
- (13) Darling : Acta Physiologica Scandinavica 10, 91(1945).
- (14) Turba & Richter : Ber. 75, 340 (1942).
- (15) Cleaver : J. Am. Chem. Soc. 67, 1343 (1945).
- (16) Tiselius, Drake, & Nagdahl : Experimentia 3, 21(1947).
- (17) Kunnin : Anal. Chem. 21, 87(1949) ; *ibid.* 22, 64(1950).
- (18) Cannan : J. Biol. Chem. 152, 401(1944).
- (19) Drake : Nature 160, 602(1947).
- (20) Partridge & Brimley : Biochem. J. 44, 513(1949).
- (21) 田中, 香月, 江頭 : 日化, 74, 53(1953).
- (22) Olcott : J. Biol. Chem. 153, 71(1944) ; *ibid.* 157, 265(1945).
- (23) 中村 : 日本畜産学会講演, 昭 27, 4 月.
- (24) Frame, Russel, & Wilhelmi : J. Biol. Chem. 149, 255(1943) ; *ibid.* 156, 467(1944).
- (25) Danielson : J. Biol. Cem. 101, 507(1933).
- (26) Sullivan : J. Biol. Chem. 117, 423(1937).
- (27) Gordon et al. : J. Am. Chem. Soc. 71, 3293(1949).
- (28) Hac & Snell ; J. Biol. Chem. 159, 291 (1945).
- (29) 佐竹 : クロマトグラフ(1952).
- (30) Stein & Moore : J. Biol. Chem. 176, 337 (1948) ; *ibid.* 192, 663(1951).

### Summary

The separation of glutamic and aspartic acid with the anion exchange resin was investigated, following their determination by the pyrrolidonecarboxylic acid method (Olcott, 1944) in the protein hydrolysate.

Olcott's method was ascertained to be a simple and rather accurate one for the determination of glutamic acid, but interfered by the existence of cystine, showing the necessity of corrections for glutamic acid values on the cystine content in the analysed solution.

The group separation of glutamic and aspartic acid was effectively performed through the column of an anion exchange resin, Amberlite IR 4B, regenerated with Na-acetate. This separated fraction was found to contain no cystine, which was contaminated with the NaOH regenerated resin. The eluate from the column with acetic acid was treated according to Olcott's method, and subtracting glutamic nitrogen from total amino nitrogen measured by Van Slyke's method, was calculated aspartic nitrogen.

Applications of Olcott's method to acidic group of casein and keratin hydrolysates separated with Amberlite IR 4B gave satisfactory results for the simultaneous semi-quantitative determination of these amino acids.