

メチオニン及び類縁化合物の酸化ボルタンメトリー

今井日出夫[®]，吉田 久信，升 島 努，玉 井 元*

(1982 年 1 月 6 日受理)

グラッシーカーボン電極を用いて，メチオニンとその類縁化合物の酸化ボルタンメトリーについて検討し，薄層フローセルボルタンメトリーによる微量分析への適用を試みた。

メチオニンは，1.2 V *vs.* Ag/AgCl に酸化電流を示し微分パルスポーラログラフ法によるピーク電位は pH が高くなるほど 30 mV/pH 負電位にシフトし，0.1 mM から 1.7 mM の濃度範囲で検討した結果，直線からずれて多少とも飽和の傾向を持つピーク電流-濃度関係が得られた。1.2 V *vs.* Ag/AgCl で定電位電解後，薄層クロマトグラフィー，高速液体クロマトグラフィーで電解酸化生成物を検討した結果メチオニン酸化生成物は，主としてメチオニンスルホキシドであることを確認した。従って 2 電子酸化による反応機構が考えられる。薄層フローセルを用いる定量では，設定電位 1.2 V *vs.* Ag/AgCl において流液として 0.01 M リン酸塩緩衝液 (pH 3.0) を用い，100 pmol~5 nmol で良い直線性が得られ，その c. v. 値は 400 pmol で 4.7% であった。

又メチオニンを含むエレドイシン関連ペプチドとケモタクティックペプチドは pH 4 以上でピーク電流は認められず pH 4 以下でのみピーク電流が現れ，その感度はメチオニンに比べて約 50% 低い。薄層フローセルを用いるこれらの定量では，設定電位 1.2 V *vs.* Ag/AgCl において，流液として 0.01 M リン酸塩緩衝液 (pH 3.0) を用いて，エレドイシン関連ペプチドは 100 pmol~800 pmol，ケモタクティックペプチドは 100 pmol~600 pmol の範囲で直線の検量線を与えるが，それ以上の濃度では直線からずれ，電極表面への吸着の影響が推定された。以上の結果からボルタンメトリーは高速液体クロマトグラフの検出器としてメチオニン及びメチオニン含有低分子量ペプチドの分析に使用できることが確かめられた。

1 緒 言

硫黄含有アミノ酸には，システイン (CyS)，シスチン (CyS-CyS)，メチオニン (Met) などがあり，これまで CyS, CyS-CyS に関するボルタンメトリーは多くの報告が出されている^{1)~3)}。最近 Brabec ら⁴⁾，Reynaud ら⁵⁾ は，カーボンペースト，金，白金電極を用いて Met のボルタンメトリーについて簡単に報告しているが，その詳細な挙動，及び定量性については報告されていない。又 Met 含有ペプチドのボルタンメトリーについての報告は見当たらない。著者らは，生体成分の微量電気分析法研究の一環として，Met とその類縁化合物である *s*-カルボキシメチル-L-システイン，プロピルスルフィド，及びエレドイシン関連ペプチド，ケモタクティックペプチドなどの Met 含有ペプチドについて，サイクリックボルタンメトリー (CV)，微分パルスポーラログラフィー (DPP)，薄層フローセル電解 (TLV) による，

酸化ボルタンメトリーにより，その電極反応機構と定量性及びピーク電位，ピーク電流の温度，pH 依存性などについて検討したのでここに報告する。

2 実 験

2.1 試薬及び試料

標準試薬として，シグマ社の Met，メチオニンスルホキシド (Met→O)，東京化成のメチオニンスルホン (Met→O₂)，プロピルスルフィド，*s*-カルボキシメチル-L-システイン (SCM-CyS)，蛋白質研究奨励会のエレドイシン関連ペプチド (ERP)，ケモタクティックペプチド (CP) を用い，外は試薬特級をそのまま用いた。

2.2 装 置

作用電極は，東海カーボン社の GC-20 (直径 3.15 mm で pH 3.0 マッキルベン緩衝液中 1.4 V，30 分間活性化したもの⁶⁾) を，対極には金板，参照電極は Ag/AgCl (0.1 M KCl) を用いた。CV の測定には扶桑 312 型ポーラログラフと同 321 型電位スキャナーを，TLV 測定には東曹 EC 8 型ボルタンメトリー検出器を用いた。

* 広島大学医学部薬品分析化学教室：広島県広島市南区霞 1-2-3

3 結 果

3.1 CV による Met の検出

0.1 M リン酸塩緩衝液に比較して, 0.01 M リン酸塩緩衝液を用いるとき, 残余電流が減少して酸化波は多少鮮明に観測できる。

Fig. 1 は, 0.01 M リン酸塩緩衝液 (pH 5.0) を用いての 25 °C における CV 図を示す. 判然とした酸化ピーク電流が見られず, その再還元波もない非可逆的な波形であるが, (1.1~1.3) V vs. Ag/AgCl に濃度依存性のある酸化電流が認められる. Met 濃度 (0.2~2.0) mM の範囲で検討した結果, pH 5, 7, 9 において直線からずれわずかに飽和の傾向を示した検量線が得られた。

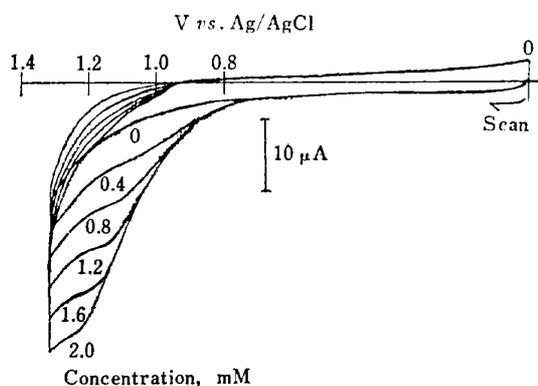


Fig. 1 Cyclic voltammogram of Met
pH 5.0; Scan rate : 30 mV/s

3.2 DPP による Met の定量

Fig. 2, Fig. 3 に Met の DPP (パルス電圧 10 mV, 掃引速度 20 mV/s, パルス間隔 0.5 s) と pH 6, 7, 8 における検量線を示す. DPP を用いることにより, CV では見られなかった鮮明なピークを観測できた. pH 6, 7, 8 において, (0.1~1.7) mM の濃度範囲で検討した結果, 直線からずれわずかに飽和の傾向を示した検量線が得られ, pH が高いほどプロットのこう配は大きく現れた. 又その温度係数は, 室温付近で (1~2) %/deg であり吸着の大きい影響があるとは考えられない. ピーク電位は pH が高いほど 1 pH_u 当たり 30 mV 負電位にずれた。

3.3 Met の電解酸化生成物の検討

Reynaud ら⁹⁾ はアミノ酸の電解酸化について報告し, Met はカーボンペースト電極において RSO_3^- を生成することを推定している。

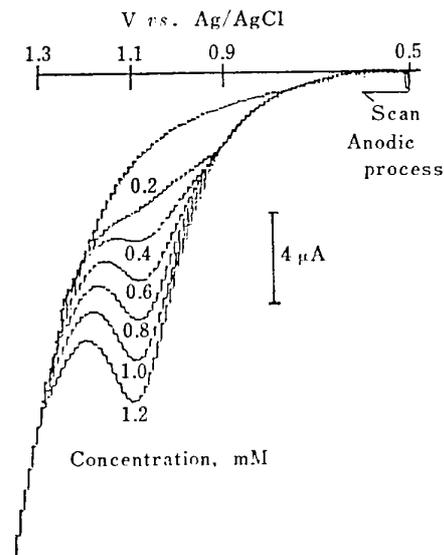


Fig. 2 Differential pulse voltammogram of Met
pH 6.5; Scan rate : 20 mV/s

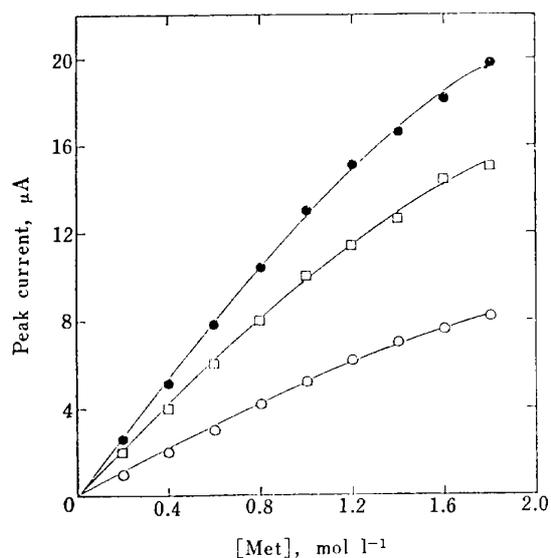


Fig. 3 Calibration curve of Met by differential pulse voltammetry
—○— pH 6.0; —□— pH 7.0; —●— pH 8.0

0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) 5 ml に Met 10 µmol を加えた後, アルゴンで脱気しながら 1.2 V で 5 時間定電位電解を行い生成物の TLC を観測した. 展開溶媒は, プロパノール : 酢酸 : 水 = 4 : 1 : 1 で検出試薬にニンヒドリンを用い, 105 °C で短時間加熱し発色させた. R_f 値はそれぞれ, Met (0.47), Met→O (0.18), Met→O₂ (0.23) であり, 電解生成物を展開させた結果, Met→O に相当するスポットが確認できた. 又充てん剤にスルホン化ポラスポリスチレンポリマーを用いた, 直径 0.75 cm, 長さ 7.5 cm のカラムを用い, 溶離液は

を取ることににより, 1.2 V 付近に濃度依存性のあるピークが確認され, TLV を適用することにより 100 pmol ~ 5 nmol の範囲で直線的な検量線が得られ, 100 pmol のオーダーで定量が可能となること, 400 pmol での c.v. 値 4.7 % と, その再現性が良いことを認めた. 又この電極反応は Met \rightarrow O の生成によるものであることが分かった.

ペプチド中の Met の検出は, 酸化電流を与える他のアミノ酸残基を含まない低分子量ペプチドに関しては, pH 4 以下で可能であり, 又一般に Met に限らず鎖状アルキルチオエーテルは, 1.2 V 付近に濃度依存性のある酸化電流を示すことを認めた. 本法は, HPLC の分離系と組み合わせて Met 及び関連化合物の微量定量に利用できる.

文 献

- 1) C. Mairesse-Ducarmois, G. Patriarche, J. Vandenbalk : *Anal. Chim. Acta*, **71**, 165 (1974).
- 2) D. G. Daivis, E. Bianco : *J. Electroanal. Chem.*, **12**, 254 (1966).
- 3) J. Paradac, J. Koryta : *J. Electroanal. Chem.*, **17**, 167 (1968).
- 4) V. Brabec, V. Mornstein : *Biophys. Chem.*, **12**, 159 (1980).
- 5) J. A. Reynaud, B. Malfog, A. Bere : *J. Electroanal. Chem.*, **116**, 595 (1980).
- 6) 今井日出夫, 吉田久信, 升島 努, 尾和 恵 : 分化, **30**, 561 (1981).
- 7) T. F. Lavin : *J. Biol. Chem.*, **169**, 477 (1947).
- 8) G. Toennies, J. J. Kolf : *J. Biol. Chem.*, **128**, 339 (1939).
- 9) T. F. Lavin : *J. Biol. Chem.*, **151**, 281 (1943).

☆

Oxidative voltammetry of methionine and related compounds. Hideo IMAI, Hisanobu YOSHIDA,

Tsutomu MASUJIMA, and Gen TAMAI (Institute of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima University School of Medicine, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima)

The oxidative voltammetry of methionine (Met) and related compounds at a glassy carbon electrode was studied, and was applied to the microanalysis by using a thin-layer flow cell (TLV). Met showed an irreversible and obscured oxidation peak at about 1.2 V *vs.* Ag/AgCl (0.1 mol l⁻¹ KCl). A more distinct Met peak was observed by the differential pulse polarography (DPP), and the DPP peak was shifted toward less positive potentials with increasing pH by 30 mV/pH over the range pH 6~8. A curvilinear calibration plot was obtained in the concentration range from 0.1 mmol l⁻¹ to 1.7 mmol l⁻¹ of Met. The main product of Met by a controlled potential electrolysis at 1.2 V was confirmed to be Met sulfoxide by TLC and HPLC. The detection limit of Met by TLV was 100 pmol with a linear calibration plot in the range from 100 pmol to 5 nmol, and the c.v. value was 4.7 % (within-run) at 400 pmol. Eledoisin related peptide (ERP) and chemotactic peptide (CP), those containing Met in their amino acid sequence, were not electrochemically oxidized at pH over 4, but at lower pH they showed peak current. For the determination of ERP and CP by using TLV at a controlled potential of 1.2 V *vs.* Ag/AgCl in 0.01 mol l⁻¹ phosphate buffer (pH 3.0) the linear calibration plot was yielded for ERP of (100~800) pmol and for CP of (100~600) pmol. At higher concentrations the plot tended to deviate from the straight line probably due to the adsorption on the electrode surface.

(Received Jan. 6, 1982)

Keyword phrases

electrochemical determination of methionine and related compounds by thin-layer flow cell voltammetry; differential pulse voltammetry.