

報 文

銅(II) イオンとの反応を検出に利用するアミノ酸の
イオンクロマトグラフィー池田 早苗^{®*}, 有満 亮作*, 本仲 純子*Ion chromatography of amino acids using the reaction
with copper(II) ion as indicator

Sanae IKEDA, Ryousaku ARIMITSU and Junko MOTONAKA*

*Department of Chemical Science and Technology, Faculty of Engineering,
The University of Tokushima, 2-1, Minami-Josanjima, Tokushima-shi, Tokushima 770

(Received 26 June 1995, Accepted 17 October 1995)

A novel ion chromatography for the determination of amino acids was developed. The eluted amino acids were monitored by conductometric-UV detection using copper(II) acetate reagent. Amino acids were separated on a reverse-phase column, ODS-80Ts (5 μm , 150 mm \times 4.6 mm i.d.) with water as the eluent. It was not necessary to adjust the pH of the post-column solution when copper(II) acetate was used. Five amino acids (valine, methionine, leucine, tyrosine, phenylalanine) in soy sauce were simultaneously determined.

Keywords : ion chromatography of amino acids; conductometric detection of amino acids using copper(II) ion.

1 緒 言

アミノ酸は様々な食品中に含まれており、それらのうま味はアミノ酸の種類と量に微妙に影響されると言われている¹⁾。現在、食品中に含まれる全アミノ酸は国税庁所定分析法であるホルモール滴定法²⁾によって定量されている。一般に、アミノ酸はこう配分離法によりイオン交換樹脂カラム又は逆相系カラムで分離され、発色試薬であるニンヒドリン³⁾や蛍光試薬であるフタルアルデヒド⁴⁾、フルオレスカミン⁵⁾と反応させることにより検出される。このような原理を用いた種々のアミノ酸分析装置が市販されているが、高価であるため安価な簡易定量法の開発が望まれている。又、食品中のアミノ酸分析の

ような、それほど検出感度を上げる必要がない場合には、これら既存の方法は必ずしも最適な分析方法であるとは言い難い。

アミノ酸のなかで自然界に存在している α -アミノ酸は H^+ を放って陰イオンとなる。このイオンは二座配位子として様々な金属イオンに配位して多彩な錯体種をつくる。このうち、二価の金属イオンである銅(II)イオンと α -アミノ酸の 1:2 錯体は平面 4 配位構造を持つ中性分子であり電荷はゼロである。そしてビスグリシン銅の水溶液の電導度が通常の銅塩に比して異常に低いことが報告されている⁶⁾。又、銅(II)イオンとのキレート生成反応を電導度検出イオンクロマトグラフィーのバックグラウンドの除去に利用した例がある⁷⁾。Loscombeらは、アミノ酸を高速液体クロマトグラフィー

* 徳島大学工学部: 770 徳島県徳島市南常三島 2-1

(HPLC) で分離した後、銅(II) と反応させ、遊離の銅イオン活量の減少を銅(II) イオン選択性電極で測定して定量する方法を報告している⁸⁾。

本研究ではこのアミノ酸-銅(II) 錯体生成による電導度の減少と紫外吸収の増加を利用して、イオンクロマトグラフィー(IC) によるアミノ酸の分析法を検討した。

2 実 験

2.1 装 置

IC の概略図を Fig. 1 に示す。東ソー製ノンサプレッサー型イオンクロマトグラフ IC-8010 型(カラム恒温槽・電導度検出器内蔵型) に同社製逆相系分離カラム TSK-gel ODS-80Ts を装てんして使用した。検出器には IC-8010 内蔵の電導度検出器及び紫外検出器 UV-8011 を用いた。ポンプは同社製コンピュータコントロールマルチポンプ CCMP を用い、全システムのコントロール及びデータ処理には同社製スーパーシステムコントローラー SC-8010 を用いた。

2.2 試 薬

L-アミノ酸標準溶液は、和光純薬製特級試薬を蒸留水に溶解して 100 mg dm^{-3} に調製した。これを冷蔵庫中で保存し、用時、蒸留水で希釈して使用した。L-アミノ酸分析用移動相は、蒸留水をアスピレーターで減圧脱気したものを使用した。L-アミノ酸反応用銅(II) 溶液は、和光純薬製特級試薬の酢酸銅(II) 一水和物を 0.14 g 採り、蒸留水 1 dm^{-3} に溶解して、アスピレーターで減圧脱気したものを使用した。

2.3 実験方法

試料溶液を過塩素酸で除タンパクした後、蒸留水にて適当な濃度に希釈したものを分析試料とした。前処理カラム(東ソー, Toyopak ODS-S) を通してインジェクションバルブより $100 \mu\text{l}$ を注入し、カラムにて分離した。分離した後、反応系にて銅(II) イオンと反応させて電導度検出器及び紫外検出器により検出した。電導度検出器及び紫外検出器で得られた変化をデータ処理機(システムコントローラー SC-8010) に取り込み、クロマトグラムを記録してピーク高さを測定し、絶対検量線法により定量を行った。

3 結果と考察

3.1 アミノ酸分析用銅(II) 溶液

L-アミノ酸と反応させる銅(II) 溶液に関して、銅塩の種類、濃度及び pH について検討した。

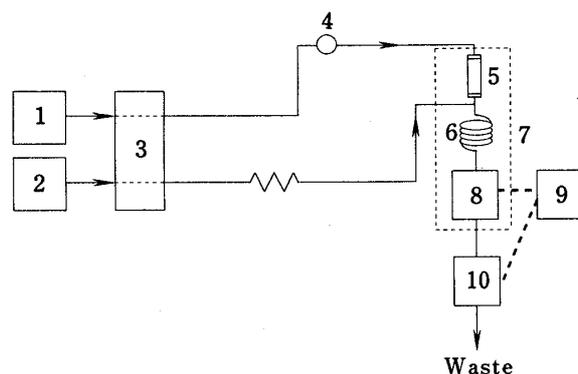


Fig. 1 Schematic diagram of ion chromatography
1: eluent; 2: Cu^{2+} solution; 3: pump; 4: sample injector; 5: analytical column; 6: reaction coil; 7: oven; 8: conductometric detector; 9: integrater; 10: UV detector

銅塩として酢酸銅(II) 一水和物、硝酸銅(II) 三水和物、そして硫酸銅(II) 五水和物の3種類について、それぞれ $7 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ の水溶液に調製し、Fig. 1 に示される IC に適用してその有効性について調べた。サンプルとして4種類のアミノ酸(バリン, メチオニン, ロイシン, フェニルアラニン)の混合溶液を用いてそのクロマトグラムを調べたところ、酢酸銅水溶液(pH 6)の場合、電導度検出によるものは原理どおり負の方向にピークが確認された。一方硝酸銅水溶液(pH 6)及び硫酸銅水溶液(pH 6)の場合、共に正の方向にピークが生じた。又、紫外検出器(検出波長 225 nm)によるクロマトグラムは酢酸銅水溶液を用いた場合、他の2種類のものと比較してかなり高いピークが観察された(Fig. 2)。これは酢酸銅水溶液ではアミノ酸と銅(II) イオンの2:1錯体が形成され、硝酸銅及び硫酸銅水溶液では1:1錯体が形成されているものと考えられる。なぜなら1:1錯体と比較して2:1錯体は電荷がなく、銅に対する配位数が多いために 220 nm 付近の吸収が増加するからである。酢酸銅水溶液を反応液として用いることにより安定な2:1錯体を穏和な反応条件で形成でき、かつ紫外検出器によるピークも感度が良好であることから、本法ではアミノ酸反応用銅塩として酢酸銅(II)を使用することにした。

分離液流量が $0.4 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ 、反応液流量が $0.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ の操作条件のもとで酢酸銅(II) 溶液の濃度を $10^{-4} \sim 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ まで変化させたところ、 $7 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ で感度が最も高くなった(Fig. 3)。又、酢酸銅(II) 溶液の pH を酢酸及び水酸化ナトリウムで調整して反応液 pH の影響について調べた。酢酸銅水溶液

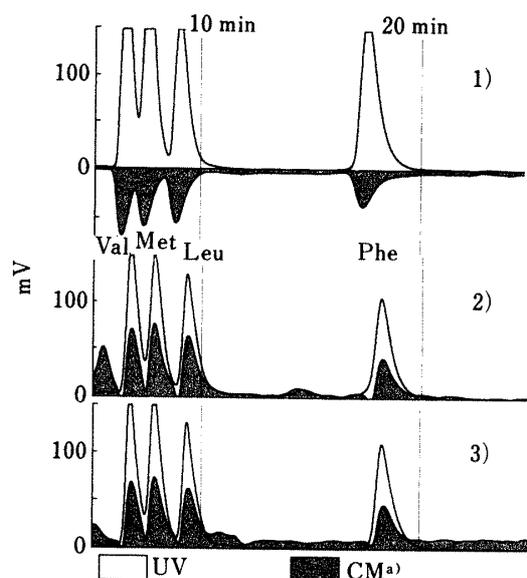


Fig. 2 Effect of ion-pair species of copper(II)

Column: TSK-gel ODS-80Ts; Detector: conductometric-UV; Flow rate: $0.4 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ (eluent), $0.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ (Cu^{2+} solution); Column temperature: 35°C ; (1): $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; (2): $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$; (3): CuSO_4 ; a) conductometric detection

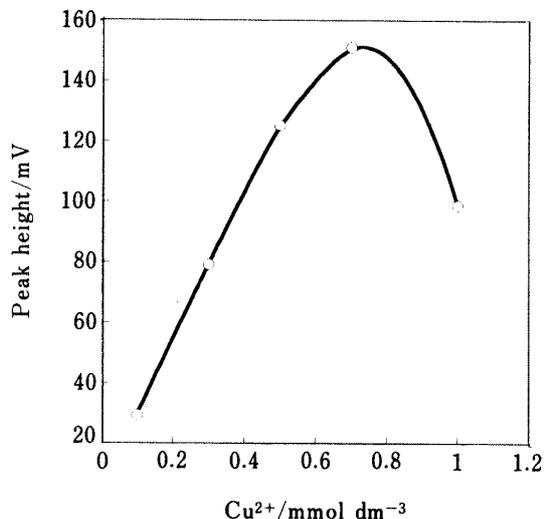


Fig. 3 Effect of concentration of copper(II) ion

Copper(II) solution: $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ was dissolved in water. Column: TSK-gel ODS-80Ts; Detector: conductometric; Flow rate: $0.4 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ (eluent), $0.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ (Cu^{2+} solution); Column temperature: 35°C

そのものの pH は 6 であり, それより高くなっても低くなっても感度が下がった. よって反応液の pH 調整は行わないことにした.

3.2 操作条件

本法では検出器に電導度検出器を使用するために, 高濃度の塩の水溶液を溶離液に使用するイオン交換樹脂カラムでのアミノ酸の分離は不適切である. Loscombe⁸⁾は, 移動相に水を用いて逆相系カラムでアミノ酸を分離している. 移動相に有機溶媒を添加した場合のピークに及ぼす影響を検討した. アセトニトリル, メタノール (それぞれ 10% 水溶液), 水の順にアミノ酸の保持時間が長くなり, 分離がよくなる傾向が見られた. そこで本法では水を移動相に用い, 流量は $0.4 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ とした.

カラム温度を $35\sim 50^\circ\text{C}$ まで変化させたところ, 高温になるにつれてデータの再現性が乏しくなった. 又, 室温と近い温度では恒温槽の温度制御が不正確になるために, 室温 (25°C) より 10°C 高い温度 (35°C) に設定して実験を行った.

銅(II) イオンとアミノ酸の反応を行う反応コイルの長さを $0.5\sim 4.0 \text{ m}$ まで変化させたところ, 長くなるにつれてベースラインが安定し再現性がよくなった. そこで内径 0.4 mm で長さ 4.0 m のテフロンチューブコイルを用いた.

3.3 アミノ酸の分離

3.2 で得られた実験条件のもとで L-アミノ酸を分析したところ, アスパラギン酸, グルタミン酸, ヒスチジンはピークがブロードになり, アルギニン, リジンは感度が悪かった. しかし, それ以外のアミノ酸は良好なクロマトグラムが得られた. 保持時間の一覧を Table 1 に示す. これから分かるようにグリシン, アラニン, アスパラギン, グルタミン, セリン, システイン, トレオニンが同時溶出することが分かった. 今回はバリン, メチオニン, ロイシン, チロジン, フェニルアラニンについて, 同時定量を行った. なおこれらのアミノ酸標準溶液のクロマトグラムを Fig. 4 に示す.

3.4 実際試料の分析

絶対検量線法を用いて実際試料 (しょうゆ) 中のアミノ酸の分析を行った.

分析の対象となるアミノ酸の検量線を $10\sim 100 \text{ mg dm}^{-3}$ の濃度範囲で作成した. いずれのアミノ酸についても, 又電導度, 紫外のいずれの検出器についても良好な直線関係が得られた (相関係数 0.999 以上).

市販のしょうゆは蒸留水で 5 倍に希釈した. このときに得られたクロマトグラムを Fig. 5 に示す. 電導度検出器で得られたものは妨害ピークにのみこまれて一部

Table 1 Retention time of amino acids

Amino acid	Retention time/ min	Amino acid	Retention time/ min
Asp	5.5	Val	6.8
Ser	5.6	Met	7.9
Cys	5.6	Ile	8.8
Gly	5.7	Leu	9.4
Ala	5.7	Tyr	10.6
Arg	5.7	His	13.4
Glu	5.8	Phe	18.3
Thr	5.8	Trp	37.4
Pro	6.4	Lys	—

Amounts of amino acids: 0.1 μmol each; Detector: UV (220 nm)

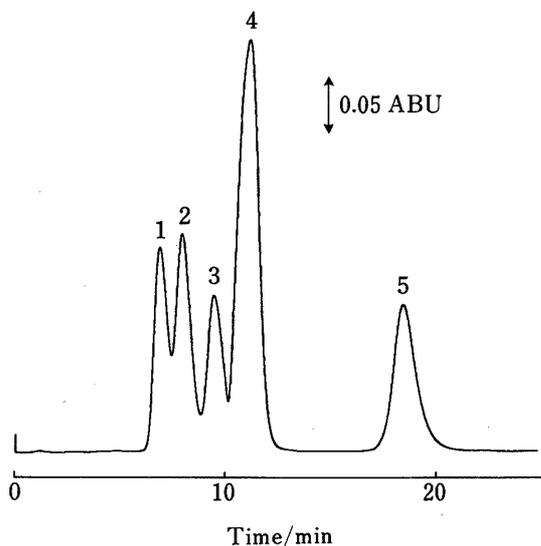


Fig. 4 Chromatogram of standard amino acids

Column: TSK-gel ODS-80Ts; Detector: UV; Flow rate: 0.4 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ (eluent), 0.5 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ (Cu^{2+} solution); Column temperature: 35°C; 1: Val; 2: Met; 3: Leu; 4: Tyr; 5: Phe

しか定量できなかったが、紫外検出器で得られたものは定量可能な5種類のアミノ酸を確認することができた。実際試料の分析を分析時間25分で5回連続操作を行ったが、ベースラインの変動は見みられず、データの相対標準偏差も良好なものであった。この分析結果をTable 2に示す。

本法はアミノ酸分析用試薬として酢酸銅(II)溶液を用いることにより、アミノ酸の検出を可能にしたもので既存の方法に比べて反応条件が穏和でかつ簡単であるために、特定のアミノ酸の簡易定量法として利用価値が高

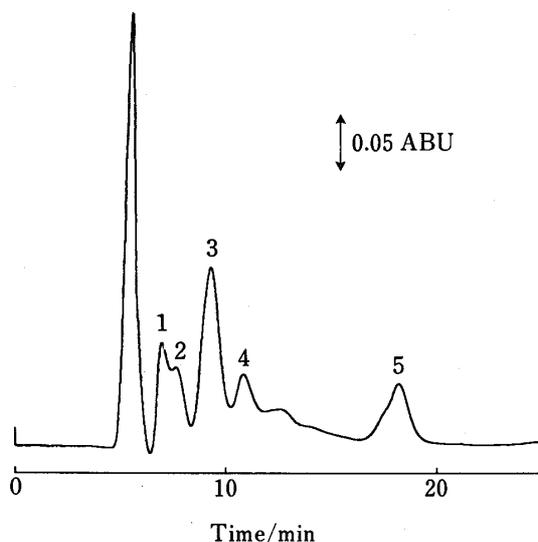


Fig. 5 Chromatogram of free amino acids in soy sauce

Column: TSK-gel ODS-80Ts; Detector: UV; Flow rate: 0.4 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ (eluent), 0.5 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ (Cu^{2+} solution); Column temperature: 35°C; 1: Val; 2: Met; 3: Leu; 4: Tyr; 5: Phe

Table 2 Determination of free amino acids in soy sauce

Amino acid	Concentration/ mg dm^{-3}	RSD, %
Val	128	1.9
Met	91	4.1
Leu	283	2.4
Tyr	50	7.9
Phe	85 (99 [†])	4.2 (3.0)

[†] Conductometric detection. Each analysis was repeated five times. Detector: UV(220 nm)

いものと考えられる。

文 献

- 1) 泉 美治: “ものを知るための化学”, p. 81 (1990), (講談社).
- 2) 注解編集委員会編: “第3回改正国税庁所定分析法注解”, (1981), (日本醸造協会).
- 3) P. B. Hamilton: *Anal. Chem.*, **35**, 2055 (1963).
- 4) M. Roth: *Anal. Chem.*, **43**, 880 (1971).
- 5) S. Udenfriend, S. Stein, P. Böhlen, W. Dairman, W. Leingruber, M. Weigle: *Science* (Washington, D.C.), **178**, 871 (1982).
- 6) 上野景平: “入門キレート化学”, p. 62 (1969),

(南江堂)
7) H. Sato, A. Miyanaga: *Anal. Chem.*, **61**, 122
(1989)

8) C. R. Loscombe, G. B. Cox: *J. Chromatogr.*, **166**,
403 (1978).

要 旨

ノンサプレッサー型イオンクロマトグラフを用いた新規なアミノ酸の分析法を開発した。本法では酢酸銅(II)水溶液を用いるポストカラム法によりアミノ酸を電導度/紫外検出した。アミノ酸は、ODS-80 Ts (5 μm) カラム (150 mm \times 4.6 mm i.d.) によって水で逆相分離された。銅(II)イオンとして 0.7 mmol dm⁻³ の酢酸銅(II)水溶液を用いると pH 調整を必要とせず、又ポストカラム反応条件も穏和なものであった。本法により 5 種類のアミノ酸 (バリン, メチオニン, ロイシン, チロジン, フェニルアラニン) が分離された。上記 5 種類のアミノ酸の検量線は 10~100 mg dm⁻³ の範囲で優れた直線関係を示した。市販のしょうゆ中の遊離アミノ酸の分析に本法を適用したところ、良好な結果が得られた。