ノ ー ト

原子吸光分析法による α -アミノ酸の
間接定量南 幸男^{①*}, 三井利幸^{**}, 藤村義和^{***}

(1982 年 8 月 11 日受理)

1 緒 言

アミノ酸の定量法としては、既に吸光光度法¹⁾ ガスクロマトグラフィー²⁾ によるもの、更に喜谷らの間接原子吸光分析法³⁾ によるものなど数多く報告されている。

本報告は、 α -アミノ酸を四ホウ酸ナトリウム及び塩化ナトリウム共存下で水に不溶のリン酸銅と反応させ水に可溶の α -アミノ酸の銅錯体⁴⁾ とし、未反応の銅を汙別除去し、汙液中の銅量を原子吸光分析法で測定することにより α -アミノ酸の間接定量法を検討したものである。この方法は α -アミノ酸銅錯体にオキサリヒドロラジド、アセトアルデヒド、アンモニア水を暗室中で加え 30 分間放置後 540 nm で吸光度を測定する方法⁴⁾ と比較して簡単であるだけでなく定量限界も約 2 倍向上する。更にこの定量法における各種条件及び共存物質の影響についても検討した。

2 試薬及び装置

2.1 試 薬

リン酸銅試薬：文献⁴⁾ の報告に準じて調製した。すなわち 70.75 mg/ml のリン酸ナトリウム 12 水和物水溶液 40 ml に 27.79 mg/ml の塩化銅(II) 水溶液 20 ml をかくはんしながら加え 3000 rpm で遠沈分離し、上澄液を捨て、これに 19.04 mg/ml の四ホウ酸ナトリウム 10 水和物水溶液 60 ml を加えかくはんし、同様に 3000 rpm で遠沈分離し上澄液を捨てる。この四ホウ酸ナトリウム添加操作を 2 回繰り返した後、3.01 g の塩化ナトリウムを加え更に 19.04 mg/ml の四ホウ酸ナトリウム 10 水和物水溶液で全量を 100 ml とした。なお実験に際しては、これを 10 倍希釈して使用した。

* 大阪府警察本部科学捜査研究所：大阪府大阪市東区大手前之町 9

** 愛知県犯罪科学研究所：愛知県名古屋市中区三の丸 2-1-1

*** 中部工業大学工業化学科：愛知県春日井市松本町 1200

α -アミノ酸としては、アラニン、アルギニン塩酸塩、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン塩酸塩、ホモセリン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、オルニチン、フェニルアラニン、プロリン、トレオニン、トリプトファン、バリン、シトルリンの 20 種類を試料として使用した。

2.2 装 置

原子吸光分光光度計：日立製 207 型原子吸光分光光度計を使用した。光源は日立製 HLA-3 型の銅中空陰極ランプ、バーナーは水冷予混合式バーナー（アセチレン-空気）を使用した。

3 定量操作

α -アミノ酸 (25~500) $\mu\text{g/ml}$ を含有する水溶液 1 ml に、2.1 で作製したリン酸銅試薬 1 ml を加え、蒸留水で全量を 10 ml としよく振り混ぜた後約 2 分間静置する。次いで東洋汙紙 No. 5C を用いて未反応の銅を汙別除去し、汙液中の銅量を原子吸光分析法で測定する。

原子吸光分析法の測定条件は、空気流量 12 l/min, アセチレン流量 2.5 l/min, 測定波長 324.7 nm, ランプ電流値 10 mA で行った。

4 実験結果及び考察

リン酸銅試薬調製の最適条件及び定量操作における各種の操作の最適条件についてグリシンを用いて検討した。

4.1 リン酸銅試薬調製における四ホウ酸ナトリウム添加量の検討

リン酸銅試薬調製においてリン酸ナトリウムと塩化銅(II) で合成したコロイド状のリン酸銅と共存させる四ホウ酸ナトリウム 10 水和物の最適量を銅イオン 0.167 mg, 塩化ナトリウム 6.226 mg, グリシン 70 μg を用いて 3 に準じた操作を行い検討した。Fig. 1 に示したように四ホウ酸ナトリウム 10 水和物の添加量が 0.130 mg 以上で一定の最大吸光度を示した。本実験においては、完全を期すためすべて 1.904 mg 添加した。

4.2 リン酸銅試薬調製における塩化ナトリウム添加量の検討

塩化ナトリウムは添加しなくても検量線は直線性を示し α -アミノ酸の定量は可能であるが、塩化ナトリウムを添加しないと他物質が共存した場合 α -アミノ酸の銅錯体生成に影響を与えるため本実験ではすべて塩化ナトリウムを添加しリン酸銅試薬を調製した。そこで最適塩化ナトリウム添加量を銅イオン 0.167 mg, 四ホウ酸ナ

Fig. 1 Effect of $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ concentration in 1 ml of $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ reagent

Cu^{2+} : 0.167 mg; NaCl : 6.226 mg; L-Glycine : 70 μg

トリウム 10 水和物 2.017 mg, グリシン 46.5 μg を用いて 3 に準じた操作を行い検討したところ Fig. 2 に示したようにリン酸銅試薬調製において塩化ナトリウム添加量は 3.091 mg 以上添加すれば一定の吸光度が得られることが明らかとなった。

Fig. 2 Effect of NaCl concentration in 1 ml of $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ reagent

Cu^{2+} : 0.167 mg; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$: 2.017 mg; L-Glycine : 46.5 μg

4.3 リン酸銅試薬調製における銅イオン添加量の検討

四ホウ酸ナトリウム 10 水和物 2.017 mg, 塩化ナトリウム 6.226 mg, グリシン 46.5 μg を用いてリン酸銅試薬調製における最適添加銅イオン量を検討したところ Fig. 3 に示したように吸光度は常に増加し一定値を示さなかった。しかし銅イオン量, 四ホウ酸ナトリウム 10

Fig. 3 Effect of Cu^{2+} concentration in 1 ml of $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ reagent

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$: 2.017 mg; NaCl : 6.226 mg; L-Glycine : 46.5 μg

水和物, 塩化ナトリウムの割合を一定にしたリン酸銅試薬を用いれば検量線はよい直線性を示した。本実験では検量線が原点を通る 2.1 の方法によって調製したリン酸銅試薬を用いることとした。

4.4 銅イオン (リン酸銅試薬) 添加量の検討

グリシン 46.5 μg を用いて最適銅イオン (リン酸銅試薬) 添加量を検討したところ Fig. 4 に示したように銅/グリシンがモル比で 2~23 の範囲で一定の最大吸光度を示した。又銅イオンの添加量がモル比で 23 を越えると吸光度が減少したが、これはコロイド状態にあるリン酸銅の沈殿に錯体が吸着されるためと考えられる。しかしモル比 23 を越えた範囲でも銅イオン (リン酸銅試薬)

Fig. 4 Effect of Cu^{2+} concentration in $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ reagent

L-Glycine : 46.5 μg

の添加量を一定にすればその検量線は直線性を示し、感度はやや減少するが定量は可能であった。

4.5 振とう時間の検討

固体と液体が接触し錯体を生成するために時間を必要とすることも考えられたのでグリシン 42 μg を用いて試薬添加後の振とう時間が吸光度に与える影響を検討したところ添加直後から 10 分まで全く吸光度に変化は認められなかった。本実験では完全を期すためすべて 2 分間振り混ぜることとした。

4.6 共存物質の影響

化学工業事故の際の原料あるいは製品、更に尿中の α -アミノ酸の定量分析を行う場合に共存の考えられる物質についてグリシン 56 μg を用いて 3 項に準じた操作を行い検討した。その結果 Table 1 に示したように金属イオンについては Fe^{3+} がグリシンに対してモル比で 3.5 倍の共存で若干負の影響を示し、この影響の除去は本操作では不可能であった。又アセトアルデヒド、エチルアミン、酢酸ナトリウム、グルコース、尿素、硝酸アンモニウム、リン酸ナトリウムはそれぞれモル比で 6.6~25.5 倍共存していても影響はなかった。

Table 1 Effect of diverse metal ions and compounds on the determination of L-glycine

Compounds	Compounds/L-glycine (mol/mol)	Recovery (%)
K^+	15.6	100.0
Ca^{2+}	10.0	102.7
Mg^{2+}	12.6	100.0
Fe^{3+}	3.5	84.8
Acetaldehyde	1.8	100.0
Ethylamine	12.0	98.6
Sodium acetate	18.5	98.8
Glucose	12.4	101.8
Urea	25.5	103.6
Ammonium nitrate	22.8	103.5
Sodium phosphate	10.1	102.7

L-Glycine : 56 μg

4.7 測定結果

以上各々の検討により 3 の操作に従って α -アミノ酸 20 種類の定量を行った結果を Table 2 に示した。

本法の繰り返し精度をグリシン 56.0 μg を用いて検討したところ標準偏差 0.6 μg 、変動係数 1.1 % であった。この結果から本方法は α -アミノ酸の定量に十分利用できるものと考えられる。

Table 2 Recovery and determination range of α -amino acids by proposed method

Compounds	Measurement range (μg)	Recovery (%)
L-Alanine	25~150	98.6~100.9
L-Arginine HCl	100~500	99.9~100.7
L-Asparatic acid	25~150	99.7~100.2
L-Citrulline	25~250	99.6~100.7
L-Cysteine	55~300	99.3~101.0
L-Glutamine	25~250	98.6~101.3
L-Glutamic acid	25~150	99.1~100.2
L-Glycine	25~150	98.2~100.7
L-Histidine HCl	50~300	98.0~100.6
L-Homoserine	25~200	99.6~100.3
L-Isoleucine	25~150	97.9~102.3
L-Leucine	25~150	96.9~102.3
L-Lysine HCl	50~500	96.5~99.8
L-Methionine	25~200	95.1~101.2
L-Ornithine HCl	80~500	98.3~100.5
L-Phenylalanine	25~150	96.2~100.2
L-Proline	30~150	97.8~100.0
L-Threonine	25~150	97.0~100.2
L-Tryptophan	25~300	96.6~102.3
L-Valine	25~150	98.4~100.0

5 結 語

α -アミノ酸を水に可溶な銅錯体とし、錯体中の銅を原子吸光分析法により測定し間接的に α -アミノ酸を定量する方法を確立した。本法は精度よく定量でき、他の定量法と比較して操作が極めて簡単であり、定量時間も短く、多量の試料の分析には適した方法と考えられる。

(1982 年 4 月, 日本化学会第 45 春季年会において一部発表)

文 献

- 1) 扇谷正三郎, 丸山幸三, 喜谷喜徳, 滝谷昭司: “薬品分析化学”, 坂口武一編, p. 458 (1974), (南江堂).
- 2) 百瀬 勉: “有機定性分析”, p. 231 (1978), (廣川書店).
- 3) 喜谷喜徳, 宇野静夫, 稲垣健治: 分化, **25**, 514 (1976).
- 4) M. Pesez, J. Bartos: “Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Organic Compounds and Drugs”, p. 305~307 (1974), (Marcel Dekker, Inc., New York).

☆

Indirect determination of α -amino acids by atomic absorption spectrophotometry. Yukio MINAMI,* Toshiyuki MITSUI,** and Yoshikazu FUJIMURA*** (*Scientific Investigation Research Laboratory, Osaka Prefectural Police, Otemae-no-cho, Higashi-ku, Osaka-shi, Osaka; **Criminal Science Laboratory, Aichi Prefecture, 2-1-1, Sannomaru, Naka-ku, Nagoya-shi, Aichi; ***Department of Industrial Chemistry, Chubu Institute of Technology, 1200, Matsumoto-cho, Kasugai-shi, Aichi)

α -Amino acids were indirectly determined with good precision by atomic absorption spectrophotometry (A.A.S.). Reagent: To 40 ml of 70.75 mg of $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ /ml solution is added 20 ml of 27.79 mg of $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /ml solution with stirring and then centrifuged at 3000 rpm. The supernatant is flowed out by decantation. To the precipitate 60 ml of 19.04 mg of $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ /ml solution is added and centrifuged at 3000 rpm. And the supernatant is flowed out by decantation. This procedure is repeated twice. To the precipitate 3.01 g of NaCl is added and diluted to 100 ml with 19.04 mg of $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ /ml solution. Procedure: The aqueous sample solution, containing (25~500) μg of α -amino acids, is mixed with 1 ml of reagent (diluted to ten times), and then brought to 10 ml with water. The mixture is shaken for 30 s and standed for 2 min. After filtration, the copper content in the filtrate is measured by A.A.S. No detectable interference for determination of α -amino acids with any of the other compounds such as acetaldehyde, ethylamine, sodium acetate, glucose, urea, ammonium nitrate, and sodium phosphate, however, Fe^{3+} interfered with the determination of α -amino acids.

(Received Aug. 11, 1982)

Keyword phrases

α -amino acid; indirect determination of α -amino acid;
water soluble copper complex of α -amino acid;
atomic absorption spectrophotometry.

ナトリウムメトキシドとヨウ化カリウムによる 5H-ベンゾ[b]カルバゾールの蛍光光度定量法

古澤 源久®, 橘 正樹*

埴原 洋子**, 相川 弘美***

(1982 年 9 月 25 日受理)

1 緒 言

著者の一人である橘らは、カルバゾールの蛍光を選択

的に測定する方法を先に提案した¹⁾。これはジメチルスルホキシド (以下 DMSO と略記) を溶媒として使用し、ナトリウムメトキシド、ヨウ化カリウム及びメタノールを添加して測定する方法である。ヨウ化物イオンのために多くの多環芳香族化合物の蛍光が消光されるが、ナトリウムメトキシドを共存させれば、カルバゾールの蛍光は消光されない。更に、ナトリウムメトキシドの添加により、カルバゾールの励起並びに蛍光極大波長が長波長側に移動するので、これらの両方の効果により、共存物質の影響を著しく小さくすることができる。

著者らは、この方法のベンゾカルバゾール類への適用について検討した。5H-ベンゾ[b], 11H-ベンゾ[a], 7H-ベンゾ[c]カルバゾールの3種類について検討した結果、5H-ベンゾ[b]カルバゾールの場合には、相互の影響が最も小さくしかも安定した蛍光を示し、良好な定量法として使用しうることが判明した。カルバゾール中に含まれている 5H-ベンゾ[b]カルバゾールは、共存物質の影響のために通常法では定量が困難であるが、本定量法を応用すれば 0.01 % まで定量可能であることが認められた。

2 実験及び結果

2.1 装置及び試薬

分光蛍光光度計：日立製 650-40 型を使用した。記録計は 056 型を、光源は 150 W キセノンランプを使用した。10 mm × 10 mm × 45 mm のセルを使用した。励起及び蛍光側のスリットは、波長幅でそれぞれ 5 nm にセットした。

DMSO：市販特級品をモレキュラーシーブで乾燥したものを使用した。

ナトリウムメトキシドの DMSO 溶液：容量で 20 % のメタノールを含む DMSO に、ナトリウムメトキシド (市販品) を 10 mg/ml の濃度に溶解したものを使用した。

5H-ベンゾ[b]カルバゾール：2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムと亜硫酸水素ナトリウムとの混合水溶液に、塩酸とフェニルヒドラジンを加えて煮沸した。冷却後、濃硫酸を加えて加熱した。次に、アルカリを加えてベンゾカルバゾールスルホン酸塩を生成させ、塩酸で脱スルホン化を行って合成した²⁾。水酸化ナトリウム水溶液を加えて煮沸した後放冷し、析出した結晶を分離した。この結晶をエタノール中に移し、塩酸を加えて煮沸した後ろ過した。キシレンから再結晶を行い、更に帯域溶融法により精製した。m. p. 337 °C.

11H-ベンゾ[a]カルバゾール：2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウムの代わりに 1-ナフトールを使用し、5H-ベンゾ[b]カルバゾールの場合と同様な方法により合成した²⁾。ベンゼンから再結晶を行い、更にリグロインを溶媒として、活性炭処理と再結晶を繰り返して精製した。m. p. 229 °C.

* 山梨大学工学部工学基礎教室：山梨県甲府市武田 4-3-11

** 現在 (株)日立製作所武蔵工場甲府分工場：山梨県中巨摩郡竜王町西八幡

*** 現在 (株)環境技術研究所：東京都足立区江北 2-11-17