〔農化 第 37 卷, 第 2 号, p. 116~117, 1963〕

赤外吸収スペクトルによる L-ロイシン, L-イソロイシン, L-バリンの迅速定量法*

加賀慎一郎, 林 泰 三 (第一製薬株式会社, 柳島工場)

昭和 37 年 9 月 4 日 受 理

緒 言

天然蛋白質の加水分解物を分離, 精製して各アミノ酸を単独に得る場合, 他のアミノ酸類に比して L-ロイシン, L-イソロイシン, L-バリンはその物理化学的性状が極めて類似しているために, 三者の完全分離は容易でなく, 互に夾雑していることが多い. この三者の混合物を分離する過程を追及する場合やアミノ酸の配合飼料または医薬品製剤を製造する際には, 三者の含量比を知ることは不可欠であって各含量を迅速に定量することは工業的にも価値大なることである. これら三者の化学的分別定量法としては, デンプン柱クロマトグラフ法⁽¹⁾, イオン交換樹脂法⁽²⁾, ニンヒドリン酸化後ヒドラゾンとなしアルミナカラムで分離する方法⁽³⁾, 難溶性の塩を生成する方法⁽⁴⁾等があるがいずれも操作が非常に煩雑で時間を要し迅速には分析できない.

一方赤外吸収スペクトルを利用した方法としては, Lacher 等は三塩化アンチモン溶液法で分析し⁽⁵⁾, また Darmon 等はアセチル化体を Nujol 法で測定してイソロイシンとロイシンの混合比を求めている⁽⁶⁾が, これらは実際操作上不便な点が多い.

著者等は L-ロイシン, L-イソロイシン, L-バリンの混合物を迅速に分別定量を行うために, 直接臭化カリ錠剤法にて赤外スペクトルを測定し, 以下の如く比較的満足すべき結果を得たので報告する.

実 験

1) 装置及び操作 赤外線分光器は日立赤外分光光度計 IPI 2 型を使用し, 試料はいずれも分析用標準試薬を用いた.

操作としては重量既知の無水臭化カリ及びアミノ酸試料を小型ポットミルに入れて完全に粉碎混和した後, 200 mg 正確に採取し, 日立成錠器を用いて 1 mmHg 真空中 7 ton の圧で 1 分間成錠したものを測定に供した.

2) 定量に使用する吸収帯の選定 L-ロイシン, L-イソロイシン, L-バリンの各々の単独の場合の赤外部における吸収スペクトルはすでに Koegel 等によって詳細に報告されている⁽⁷⁾が, 著者等も前記 KBr 法にて測定した結果, 4,000~1,500 cm⁻¹ の短波長部分では三者間に余り吸収帯の差はなく, また 1,500~1,300 cm⁻¹ の間でも分別定量に利用し得るような吸収帯は存在しないことを認めた. そして三者の吸収が互に重り合うことの最も少い吸収帯として, さらに長波長部分で次の key band を選定した.

L-ロイシン 845 cm⁻¹ L-イソロイシン 870 cm⁻¹ L-バリン 1,067 cm⁻¹

なお, 対照の光の強さ I_0 については, この三者混合物においては Base Line 法で行うと誤差が大きくなるので, これら近辺で最も透過度の大きい 720~730 cm⁻¹ で透過度最大の点を I_0 とした.

3) 検量線 L-ロイシン, L-イソロイシン, L-バリンを各々単独で 0.2~1.0 mg の各濃度の錠剤の赤外吸収スペクトルを測定し, 845 cm⁻¹, 870 cm⁻¹, 1,067 cm⁻¹ での透過率 T (720~730 cm⁻¹ における I_0 に対する比) を求め, $\log 1/T (=E)$ と濃度とを両軸とした座標にプロットしたところ第 1 図, 第 2 図, 第 3 図の如く直線性が成立することを認めた.

4) 定量式 混合物の吸収スペクトルに可成性が成立すると仮定するならば⁽⁸⁾, 各波長における混合物の吸光度 E は, その波長での 3 検量線を総和することにより以下の式を得る.

$$E_{845\text{cm}^{-1}} = 0.263 C_I + 0.025 C_{II} + 0.015 C_{III} - 0.005$$

$$E_{870\text{cm}^{-1}} = 0.010 C_I + 0.134 C_{II} + 0.004 C_{III}$$

* The Rapid Determination of L-Leucine, L-Isoleucine and L-Valine in a Mixture by Infrared Spectrometry.

By Shin-ichiro KAGA and Taizo HAYASHI (Yanagishima Factory, Dai-ichi Seiyaku Co., Ltd.)

第1図 検量線 (845 cm⁻¹)

A: L-ロイシン B: L-イソロイシン C: L-バリン

$$E_{1067\text{cm}^{-1}} = 0.018 C_I + 0.028 C_{II} + 0.254 C_{III} - 0.007$$

ただし C_I , C_{II} , C_{III} は各々 L-ロイシン, L-イソロイシン, L-バリンの 200 mg 錠剤中の mg 数である。この式を C_I , C_{II} , C_{III} について解くと次式を得るが, 赤外吸収スペクトルより得た各 E をこの式に代入することにより, 直ちに各含量を求め得るはずである。

$$C_I = 3.843 E_{845\text{cm}^{-1}} - 0.672 E_{870\text{cm}^{-1}} - 0.216 E_{1067\text{cm}^{-1}} + 0.018$$

$$C_{II} = -0.280 E_{845\text{cm}^{-1}} + 7.536 E_{870\text{cm}^{-1}} - 0.102 E_{1067\text{cm}^{-1}} - 0.002$$

$$C_{III} = -0.242 E_{845\text{cm}^{-1}} - 0.783 E_{870\text{cm}^{-1}} + 3.964 E_{1067\text{cm}^{-1}} - 0.027$$

第2図 検量線 (870 cm⁻¹)

A: L-ロイシン B: L-イソロイシン C: L-バリン

第3図 検量線 (1,067 cm⁻¹)

A: L-ロイシン B: L-イソロイシン C: L-バリン

5) 定量方法の適応性の検討 第1表の如き種々なる組成の混合物について, 以上の方法にて測定を行ったところ, 測定による定量値は採取量と大略一致することを認め, 実用的に応用し得ることを知った。

第1表 定量結果

No.	採取量* (mg)			定量値 (mg)			% (定量値/採取量 × 100)		
	L-ロイシン	L-イソロイシン	L-バリン	L-ロイシン	L-イソロイシン	L-バリン	L-ロイシン	L-イソロイシン	L-バリン
1	0.334	0.335	0.281	0.339	0.342	0.272	101.5	102.1	96.9
2	0.769	0.513	0.599	0.775	0.520	0.586	100.8	101.4	97.8
3	0.599	0.256	0.349	0.604	0.252	0.359	100.7	98.6	102.7
4	0.634	0.158	0.329	0.639	0.157	0.337	100.8	99.4	102.4
5	0.580	0.724	0.802	0.586	0.728	0.791	101.0	100.6	98.6
6	0.313	0.532	0.700	0.303	0.519	0.687	96.8	97.6	98.1
7	0.216	0.540	0.812	0.223	0.536	0.823	103.0	99.3	101.3
8	0.334	0.401	0.230	0.331	0.400	0.222	99.0	99.8	96.5
9	0.665	0.933	0.329	0.660	0.921	0.338	99.2	98.7	102.8
10	0.694	1.100	0.235	0.679	1.088	0.239	97.8	98.0	101.7

* 大略の混合比は (1:1:1), (4:3:3), (5:2:3), (6:1:3) の組み合わせによる。

本研究を発表する機会を与えられた第一製薬株式会社社長篠田淳三博士, 取締役開発部長石黒武雄博士, 終始御鞭撻をいただいた柳島工場長宮武一夫博士, 学術部高田正雄次長に深謝いたします。また赤外吸収スペクトルの測定に協力された中央研究所栗原文平氏に厚く感謝します。

以上の如く L-ロイシン, L-イソロイシン, L-バリンの分別定量に赤外吸収スペクトル (KBr 錠剤法) を利用すれば, 単純な操作で迅速に定量し得るので, 実用上極めて便利な方法である。

- (1) W. H. Stein, S. Moore : *J. Biol. Chem.*, **176**, 337 (1948).
- (2) S. Moore, W. H. Stein : *ibid.*, **211**, 893 (1954).
- (3) K. Löhr : *Biochem. Z.*, **320**, 115 (1950).
- (4) W. H. Stein, et al. : *J. Biol. Chem.*, **143**, 121 (1942).
- (5) J. R. Lacher, et al. : *J. Phys. Chem.*, **58**,

- 206 (1954).
- (6) S. E. Darmon, et al. : *Biochem. J.*, **42**, 508 (1948).
- (7) R. J. Koegel, et al. : *J. A. C. S.*, **77**, 5708 (1955).
- (8) 長瀬雄三, 馬場茂雄, 鈴木美智雄 : 薬誌, **79**, 705 (1959).