アミノ酸液中のレブリン酸の 直接吸光光度定量法

持田 晃一*・大崎 孝雄*
池原 和人**・丸山 博裕**

Direct Spectrophotometric Determination of
Levulinic Acid in Aminosan-eki
(Soybean-hydrolyzate)

KOOICHI MOCHIDA, TAKAO OSAKI,
KAZUTO IKEYARA, and HIROYASU MARUYAMA

Shilling-Hunter's method based on the measurement of absorbance at 242 m μ on the reaction product of levulinic acid with hydrazine monohydrochloride was applied to rapid determination of levulinic acid content in Aminosan-eki. The effect of other components in Aminosan-eki on the result was negligible and the accuracy of the method was satisfactory.

(Received February 8, 1968)

レブリン酸はヘキソース、ヘキソサンに無機酸を作用させると生成する。アミノ酸液は脱脂大豆、小麦グルテン、コーングルテンなどを塩酸で加水分解して製造されるため、これら原料中に含まれる糖質からレブリン酸が生ずる¹⁾²⁾。したがってアミノ酸液では醸造醤油に比し、レブリン酸の含有量が非常に多い^{3)~6)}。アミノ酸液中のレブリン酸の定量法にはペーパークロマトグラフィー法⁷⁾、カルボニル化合物としての定量法⁸⁾、カラムクロマトグラフィー法^{2)~4)8)9)}、バニリン-硫酸法による比色法¹⁰⁾などがあるが、いずれの方法も長時間のエーテル抽出による前処理が必要で、その後展開、あるいは反応などを行なうため、実用上アミノ酸液の製造管理に導入するのは困難であった。そこでわれわれは分析の迅速化、および簡易化を目的として、SHILLINGらの吸光光度法¹¹⁾をアミノ酸液中のレブリン酸定量に適用するため、その可能性について検討を加え、満足すべき結果を得たので報告する。

1. 実験方法

(1) 供試アミノ酸液

いずれも市販のアミノ酸液を用いた。それらの一般成分、および性質の異なるもの7種類をえらび、その分析値を第1表に示した。

Table 1. Analysis of general components in several samples of Aminosan-eki

Sample	Be' (15°C)	T.N. (g/dl)	NaCl (g/dl)	Glutamic acid (g/dl)	pH	Extract (g/dl)	Fe ⁺⁺ (mg/dl)
A	24.85	2.41	18.47	3.19	5.00	23.06	3.18
B	26.15	2.43	18.24	2.55	4.91	25.86	1.33
C	24.25	2.21	18.60	2.75	5.02	20.56	1.03
D	23.10	2.02	17.97	2.64	5.00	18.43	1.13
E	24.90	2.41	18.58	4.11	5.00	22.97	0.51
F	24.00	2.21	18.52	4.02	5.03	20.38	0.43
G	22.70	2.07	18.55	3.82	5.00	17.06	0.41

(2) 定量方法

市販アミノ酸液の一定量(レブリン酸として10~200 mg)をとり、直接SHILLINGらの方法¹¹⁾にしたがって定量した。すなわち、供試アミノ酸液の一定量を試験管にとり、50%ヒドラジンモノ塩酸塩溶液1 mlを加え、水を加えて10 mlとなし、沸騰浴中で30分間反応後、少なくとも1 l(塩酸でpH 1~2に調節)以上に希釈した。なお、対照はヒドラジンのみを加えることなく、他は全く同様に操作して作った。この希釈液の242 m μ における吸光度を測定し、その値に0.00156を乗じ希釈液100 ml中のレブリン酸量を求めた。

(3) 装置

紫外外部吸収スペクトルは島津製自記分光光度計SV-50 A形を使用した。

2. アミノ酸液中の共存物質による影響

アミノ酸液中のカルボニル化合物はレブリン酸以外に他のケト酸、アルデヒド類を含有している。その他のおもな成分は食塩、アミノ酸、有機酸、糖などであり、これらが本定量法に影響を与えるかどうかを検討した。すなわちこれらの化合物を本定量法と同条件で反応せしめ、測定波長である242 m μ 付近の紫外外部吸収スペクトルを調べた。各化合物の反応液中の量はアミノ酸液、醤油中の含有量を基礎とした。アミノ酸液では試料は約2 ml程度あるいはそれ以下で十分であるが、レブリン酸含有量がとくに少ない場合はさらに多量の試料で反応しなければならぬため、通常のアミノ酸液の10 mlに相当する量として、ビルビン酸4.0 mg、 α -ケトグルタル酸1.2 mg、アルデヒド類(0.02~0.5 mg、ただしイソパレリルアルデヒドは飽和量)、有機酸類(10~50 mg)、糖類(10~50 mg、ただしブドウ糖は100 mg)、アミノ

* 生産開発科学研究所(京都市左京区下鴨森本町15)
Research Institute for Production Development, Sakyo-ku, Kyoto.

** 播州調味料株式会社(姫路市野里948)
Bansyu Chomiryo Co., Ltd. Himeji, Hyogo.

Fig. 1 Ultraviolet spectra of substances formed with hydrazine monohydrochloride from levulinic acid, pyruvic acid, and α -ketoglutaric acid.

Levulinic acid: 12.0 mg/10 ml of reaction mixture
 Pyruvic acid: 4.0 mg/10 ml of reaction mixture
 α -ketoglutaric acid: 1.2 mg/10 ml of reaction mixture

酸類 (40~100 mg, ただし グルタミン酸は 460 mg) を本定量法と同条件で反応せしめ, 紫外部吸収スペクトル (220~275 m μ) を測定した。その結果第 1 図に示すようにピルビン酸, α -ケトグルタル酸は紫外部に吸収を示したが, 他はすべて影響を与えないことがわかった。

3. 回収試験

供試試料アミノ酸液のレブリン酸含有量を考慮して A, B, および E を選び, レブリン酸の回収率を求めた。その結果は第 2 表に示すように 99.7~102.9% となり, ほぼ完全に回収できることがわかった。

4. 安定性

供試試料アミノ酸液にヒドラジンモノ塩酸塩を加え, 沸騰浴中で 30 分間反応後, 直ちに一定量に希釈し室温

Table 2. Recoveries of levulinic acid added to the samples

Sample	Levulinic acid added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)
A	—	26.07	—
	23.87	49.89	99.8
	47.74	74.29	101.0
	71.61	99.76	102.9
B	—	35.59	—
	9.781	45.34	99.7
	19.56	55.37	101.1
	29.34	64.90	99.9
E	—	11.28	—
	23.87	35.68	102.2
	47.74	59.59	101.2
	71.61	84.04	101.6

Table 3. Levulinic acid contents in Aminosan-eki

Sample	Levulinic acid (g/dl)	Levulinic acid* (g/dl)	Standard deviation (g/dl)
A	2.607	1.082	0.013
B	3.559	1.465	0.020
C	2.295	1.039	0.022
D	1.995	0.988	0.017
E	1.128	0.468	0.021
F	0.982	0.444	0.006
G	0.971	0.469	0.006

* Calculated by converting the total nitrogen in sample to 1.0%.

で暗所に放置して, 希釈液の吸光度の安定性について調べた。結果はきわめて安定で, 吸光度の変化は 5 時間および 10 時間放置後 1.4%, 24 時間放置後 7.6% の減少にとどまった。

5. アミノ酸液中のレブリン酸の定量

第 1 表に示す供試アミノ酸液を本法で定量した結果を第 3 表に示す。各供試試料について採取量, 希釈率を変化させて行なったが, 標準偏差は, 0.006~0.022 g/100 ml であり, ばらつきは少なかった。市販のアミノ酸液中のレブリン酸量は 0.971~3.559 g/100 ml で, T.N. = 1.0% に換算した場合は 0.444~1.465 g/100 ml であった。

6. 考 察

本法はレブリン酸とヒドラジンモノ塩酸塩との反応で, 4,5-dihydro-6-methyl-3(2H)pyridazinone が生成し¹¹⁾, これは 242 m μ に極大吸収をもつことを利用したものである。アミノ酸液中の他のカルボニル化合物からも紫外部に吸収をもつヒドラゾンを生成することは十分考えられる。しかし, アミノ酸液中の他のおもなカルボニル化合物^{12)~15)}, および多量含有するものとして有機酸³⁾⁴⁾⁶⁾, アミノ酸¹⁶⁾¹⁷⁾, 糖¹⁸⁾¹⁹⁾, 食塩の含有量を取り反応させたが, ピルビン酸, α -ケトグルタル酸のみ紫外部に吸収を示した。しかし, アミノ酸液中のピルビン酸含有量³⁾⁴⁾⁶⁾は 10.4~32.2 mg/100 ml であり, 一般の醤油の場合を考慮に入れても 40 mg/100 ml 以下である。また, α -ケトグルタル酸含有量³⁾⁴⁾⁶⁾はアミノ酸液の場合, 1.2~7.7 mg/100 ml であり, 一般の醤油の場合とほぼ同じである。アミノ酸液中のレブリン酸が 1000 mg/100 ml の場合, 本法では 2 ml の試料をとれば十分であり, ピルビン酸は上記の数値から反応液中には 0.2~0.6 mg となり第 1 図に示す吸光度からほぼ影響はないと考えられる。また, α -ケトグルタル酸では 0.02~0.15 mg となり同様に影響はないと考えられる。

回収試験の結果, ほぼ完全に回収されることを知っ

た。また、反応生成物の吸光度も安定であって製造管理上利用しやすく、これらの点において、他の定量法に比しすぐれている。

本法の特徴は試料を直接定量できるため、分析時間が短縮され操作の簡単な点にある。他の定量法が、エーテル抽出にバニリン-硫酸法では6時間以上を、シリカゲルによるカラムクロマト法では70~96時間を必要とするのに比し、本法では、反応時間は30分間で、反応後の希釈、測定に要する時間を含め1時間以内に迅速に定量できる。

7. 要 約

アミノ酸液中のレブリン酸を迅速に定量することを目的として吸光光度法について検討した。その結果、本法は試料をエーテル抽出せず、直接レブリン酸とヒドラジンモノ塩酸塩を反応させ、242 m μ の吸光度を測定して定量するものであり、市販アミノ酸液7種を用いて定量を行ない、本法による場合の共存物質の影響、回収率を調べ満足すべき結果を得た。本法により市販アミノ酸液7種のレブリン酸含有量を測定した結果0.971~3.559 g/100 mlであり、T.N.=1%に換算すれば、0.444~1.465 g/100 mlであった。

終りにのぞみ、本研究に際し終始、激励と御指導を賜った生産開発科学研究所科学技術部長木村隆一博士に対し深甚の謝意を表する次第である。

(本報告の要旨は昭和42年11月11日、日本醤油技術会第31回研究発表大会において発表した。)

文 献

- 1) 堀 信一・加藤二郎・日野哲雄・溝口直正: 農化, **31**, 17 (1957).
- 2) 堀 信一・加藤二郎・若松八郎・林 弘一: 農化, **31**, 22 (1957).
- 3) 上田隆蔵・永井史郎・森口繁弘: 醗酵工学, **37**, 99 (1959).
- 4) 上野喬宏: 農化, **35**, 458 (1961).
- 5) 奥野 章・横塚 保: 農化, **37**, 585 (1963).
- 6) 森口繁弘・石上有造: 醸協, **62**, 995 (1967).
- 7) 市川邦介: 醗酵工学, **33**, 288 (1955).
- 8) 上田隆蔵・永井史郎・森口繁弘: 醗酵工学, **37**, 94 (1959).
- 9) 奥原 章・横塚 保: 農化, **35**, 447 (1961).
- 10) 野村囃夫・上原潤二郎・飯倉善一郎・横塚 保: 農化, **40**, 331 (1966).
- 11) SHILLING, W.L. and HUNTER, B.T.: *Anal. Chem.*, **37**, 1420 (1965).
- 12) 日野哲雄・君塚明光・伊藤克巳・小笠原武・竹西忠男: 農化, **36**, 85 (1962).
- 13) 日野哲雄・君塚明光・伊藤克巳・小笠原武・竹西忠男: 農化, **36**, 120 (1962).
- 14) 日野哲雄・君塚明光・伊藤克巳・小笠原武・竹西忠男: 農化, **36**, 314 (1962).
- 15) 浅尾保夫・横塚 保: 醸協, **62**, 1106 (1967).
- 16) 石上有造・石川 浩・藤原耕三・上田隆蔵: 醗酵工学, **43**, 121 (1965).
- 17) 福島男児・横塚 保: 醸協, **62**, 724 (1967).
- 18) 上野喬宏: 農化, **34**, 1039 (1960).
- 19) 福島男児・横塚 保: 醸協, **62**, 861 (1967).

(1968年2月8日受理)