

pH-ガラス電極と酸-塩基緩衝液の流れを用いる清酒中の有機酸および
アミノ酸のフローインジェクション分析

今任稔彦、哇森智恵、浅野泰一、石橋信彦^{*}

九州大学 工学部 工業分析化学教室

〒812 福岡市東区箱崎6-10-1

*電気化学計器開発部

〒180武蔵野市吉祥寺北町4-13-14

Flow injection analysis of organic acids and amino acids in Sake
(Japanese rice wine) by using pH-sensitive glass electrode and acid-base
buffer solution.

Toshihiko Imato, Chie Azemori, Yasukazu Asano* and Nobuhiko Ishibashi

Faculty of Engineering, Kyushu University, Hakaozaki, Higashi-ku,
Fukuoka, 812

* Denki Kagaku Keiki Co., Ltd.,

Musashinoshi, Kichijyou, Kitamachi, 180

Flow injection analysis of organic acids and amino acids in Sake
(Japanese rice wine) was developed by using a pH-sensitive glass elec-
trode and acid-base buffer solutions. For analysis of organic acids,
a sample solution was injected into a water stream and was merged with a
neutral phosphate buffer solution ($\text{H}_2\text{PO}_4^- - \text{HPO}_4^{2-}$). The acid-base re-
action between the organic acid and HPO_4^{2-} results in the change of the
composition of the buffer solution. The analysis was based on the de-
tection of pH change accompanied by the composition change of the buffer
solution by the flow-through type pH-glass electrode located downstream.

For analysis of amino acids, the reaction of the Formol Titration was
used. The sample injected into the water stream was merged with the
solution of formaldehyde. The amino acid sample was converted as a

stronger acid. The stream of the formaldehyde solution was merged with alkaline phosphate buffer solution. The change of the composition of the buffer solution was also detected by the pH-glass electrode. The correlation between the developed FIA method and the conventional neutralization titration method was good.

1. 緒言

清酒中にはエチルアルコールや糖のほか、コハク酸や乳酸などの有機酸やグリシンをはじめとする各種アミノ酸が含まれている。これらは、清酒中の品質を定める重要な成分であるが、その成分分析は国税庁が定めた所定分析法（滴定分析法）で行われている¹⁾。滴定分析法は自動滴定装置の開発により分析速度もやや速くなったがまだ十分でなく、清酒のような多検体試料にはより迅速な分析法が望まれている。

著者らは滴定分析法の迅速化を目的として、緩衝液の流れを利用する連続流れ滴定法を考案し、報告している²⁻⁷⁾。例えば、pH 緩衝液を用いるアミノ酸及び濃厚な酸や塩基の分析^{2,3)}、金属イオン濃度緩衝液を用いるアルカリ土類金属イオンや重金属イオンの分析^{4,5)}及び酸化還元電位緩衝液を用いる臭素酸イオンや還元糖の分析^{6,7)}などである。

本報は、すでに提案した酸-塩基緩衝液の流れとpH-ガラス電極を用いる酸、塩基の分析法を清酒中の遊離の有機酸及びアミノ酸の迅速定量法に適用したものである。すなわち有機酸の定量には中性リン酸緩衝液の流れを、アミノ酸の定量には中性ホルマリンを含むアルカリ性リン酸緩衝液を用い、試料と各々の緩衝液との反応による緩衝液の組成変化に基づく pH の変化をガラス電極で検出、定量するものである。本法による清酒中の遊離有機酸及びアミノ酸の分析結果を国税庁の所定分析法による滴定分析の結果と比較検討したところよい一致を認めたので報告する。

2. 実験

2.1 試薬

中性リン酸緩衝液：リン酸ナトリウム（2水塩）15.60 g とリン酸二ナトリウム（12水塩）35.80 g を脱イオン水に溶解し全量を 1 l とした。（0.10 M NaH_2PO_4 - 0.10 M Na_2HPO_4 ）適宜脱イオン水で希釈して用いた。

アルカリ性リン酸緩衝液：リン酸三ナトリウム（12水塩）38.01 g とリン酸二

ナトリウム (12 水塩) 35.80 g を脱イオン水に溶解し全量を 1 l とした。

(0.10 M Na₂HPO₄ - 0.10 M Na₃HPO₄) 適宜脱イオン水で希釈して用いた。

中性ホルマリン溶液：市販ホルマリン溶液に水酸化ナトリウム溶液を加えて中性としたのち適宜希釈して用いた。

水酸化ナトリウム水溶液：水酸化ナトリウム飽和溶液を作り数日放置したのち、これを 5 ml とり脱イオン水に溶解し 1 l とした。常法により標定したのち試料の有機酸やアミノ酸の標定に用いた。

有機酸、アミノ酸の水溶液は市販特級試薬を脱イオン水に溶解して用いた。

清酒試料は市販品を用いた。

2.2 装置

送液用ポンプ及び試料注入装置には電気化学計器 (DKK) 社製 F I A 装置 FICS 10 を用いた。ガラス電極検出器にはダイフロン製フローセルにガラス電極及び参照電極を装着し用いた。ガラス電極と参照電極間の電位測定には DKK 社製イオンメータ IOC-10 を用いた。記録計には渡辺測器社製 SR652 を用いた。

2.3 操作

有機酸の定量：図 1 のような二流路 F I A 系の一方に中性リン酸緩衝液 (NaH₂PO₄ - Na₂HPO₄) を、他方に脱イオン水を流す。試料の有機酸 (HB) を水の流れに注入すると、P 点で中性リン酸緩衝液と合流し

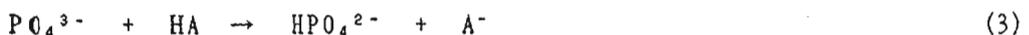


の反応が起こり緩衝液の組成が変化し、pH が変化する。これを下流に設置した pH ガラス電極で検出し、電位差計で電位変化を測定しこれをピーク状信号として記録計に記録する。

アミノ酸の定量：図 2 のような三流路 F I A 系の各流路に中性ホルマリン溶液、アルカリ性リン酸緩衝液 (Na₂HPO₄ - Na₃PO₄) 及び脱イオン水を流す。試料のアミノ酸を水の流れに注入する。試料は先ず中性ホルマリンと合流し、例えば試料がグリシンの場合つぎの様な反応が起こり、グリシンはより強い酸となる。



生成した酸 (HA) はさらにアルカリ性リン酸緩衝液と合流し



の反応が起こり緩衝液の組成が変化する。これ以後の操作は有機酸の定量と同様である。

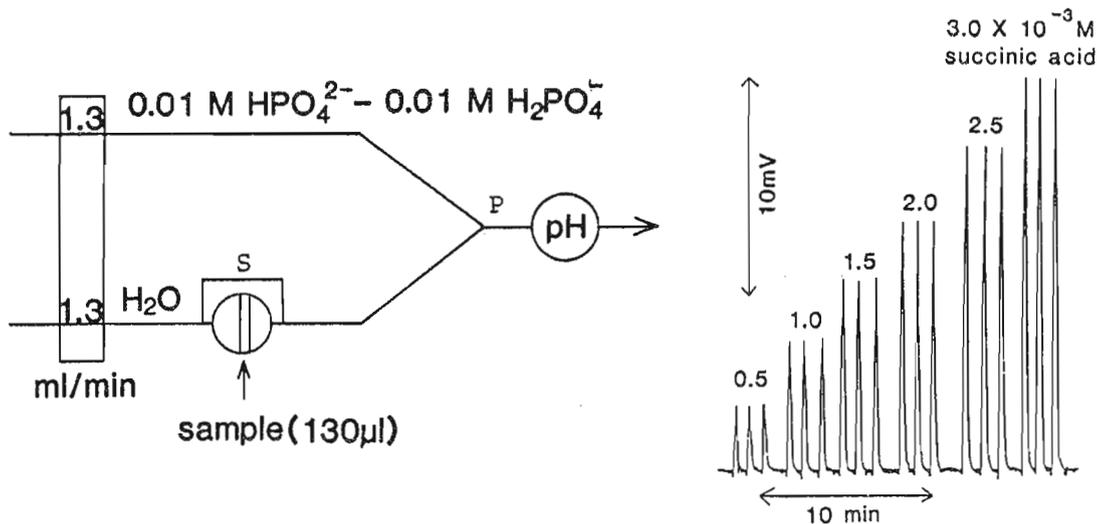


Fig. 1 Flow diagram for determination of organic acids and FIA peaks for succinic acid.

Coil length and diameter: S-P 40 cm, 0.5 mm i. d.,
P-D 50 cm, 0.5 mm i. d.

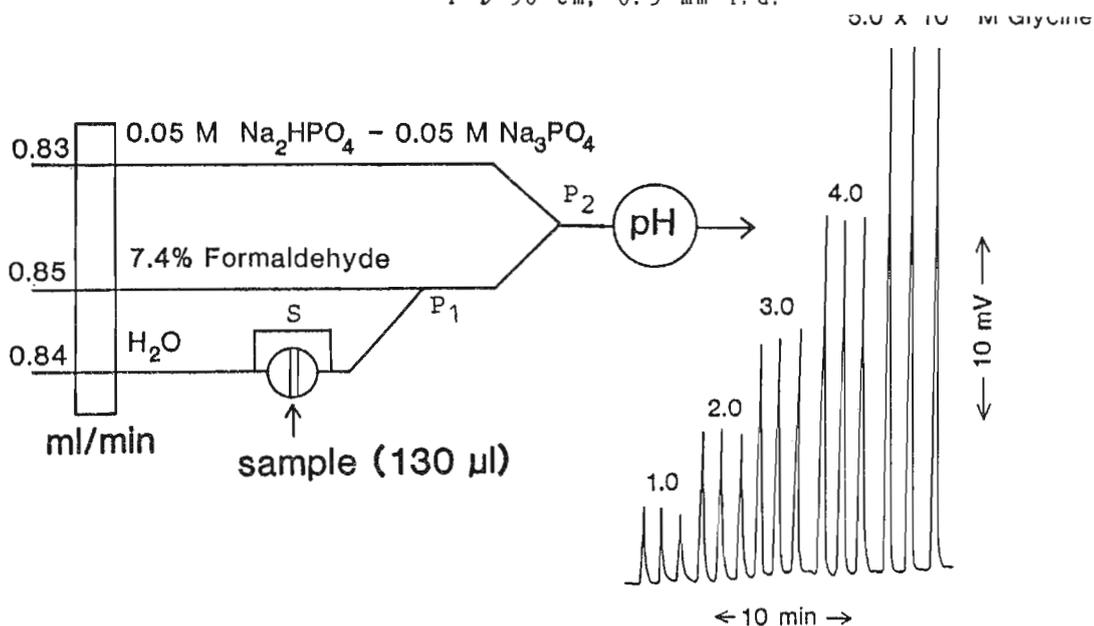


Fig. 2

Flow diagram for determination of amino acids and FIA peaks for glycine

Coil length and diameter: S-P₁ 38 cm, 0.5 mm i. d., P₁-P₂ 90 cm, 0.5 mm i. d., P₂-D 70 cm, 0.5 mm i. d.

3. 結果と考察

3.1 有機酸の定量

前報²⁾で述べたように、本法の分析感度は緩衝液の組成やその濃度並びに試料の酸や塩基の酸解離定数と緩衝液に用いた酸の酸解離定数との相対的大きさで定まる。本報のように有機酸やアミノ酸のような弱酸の定量を目的とする場合、特に用いる緩衝液中の酸の酸解離定数の選択は重要な因子である。試料の酸の酸解離定数を $K_{a,HB}$ 、緩衝液中の酸のそれを $K_{a,HA}$ とすると、前報の計算結果から二つの酸解離定数の比 $K_{a,HB}/K_{a,HA}$ が 10^3 以上の場合は試料の酸解離定数によらずほぼ同程度の感度を示す。清酒中に含まれる主な有機酸およびアミノ酸とそれらの酸解離定数を表1に示す。

表1 清酒中に含まれる主な有機酸とアミノ酸

有機酸	含量 ^{a)} (mg/100 ml)	pK _a ^{b)}	アミノ酸	含量 ^{a)} (g/l)	pK _a ^{b)}
酢酸	5.7-12.0-31.2	4.75	グルタミン酸	0.26-0.66	4.28, 9.67
コハク酸	12.0-92.0	4.21, 5.64	バリン	0.13-0.54	9.72
乳酸	23.4-34.1-157	3.86	ロイシン	0.21-0.53	9.74
グルコン酸	25-45		アルギニン	0.39-0.48	9.13
クエン酸	0-13.2	3.12, 4.76, 6.40	グリシン	0.14-0.36	9.78

a) 文献1 b) 化学便覧 改訂2版 日本化学会編 p995 (1975)

緒言で述べたように本報では清酒中の遊離の全有機酸およびアミノ酸の分析を目的としているので、できるだけそれらを同感度で分析することが望ましい。清酒中の有機酸の pK_a は表1に示すように 3 - 5 程度であるので H₂PO₄⁻ と HPO₄²⁻ からなる中性リン酸緩衝液が適していると考えられた。図1(b)は緩衝液として中性リン酸を用い、コハク酸を試料として注入しときの検量線ピークである。図2は酢酸、乳酸及びコハク酸の検量線である。酢酸と乳酸の検量線はほぼ一致している。また、コハク酸の検出感度(検量線の傾き)は酢酸及び乳酸のその約二倍である。これはコハク酸が二塩基酸であることに対応している。従って、有機酸量としては三者とも同程度の感度を示す。

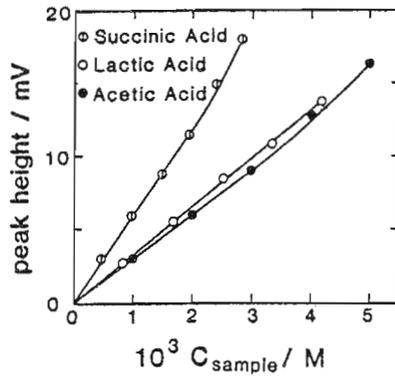


Fig. 3 Calibration curves for organic acids.

The flow conditions are shown in Fig. 1.

3.2 清酒中の有機酸の定量

清酒中の遊離の全有機酸の国税庁の所定分析法では、ブロムチモールブルーとニュートラルレッドを混合指示薬として水酸化ナトリウムに中和滴定によっている。この所定分析法で測定した清酒中の遊離の全有機酸量と本法の FIA 法により測定したそれとの相関関係を図 3 に示す。FIA 法では図 3 のコハク酸の検量線を用いた。試料としては市販の清酒 6 種類とそれら清酒の一つにコハク酸を一定量加えたもの及び清酒を脱イオン水で希釈したものを用いた。図 4 に示すように本法は公定分析法と良い相関関係があることがわかる。

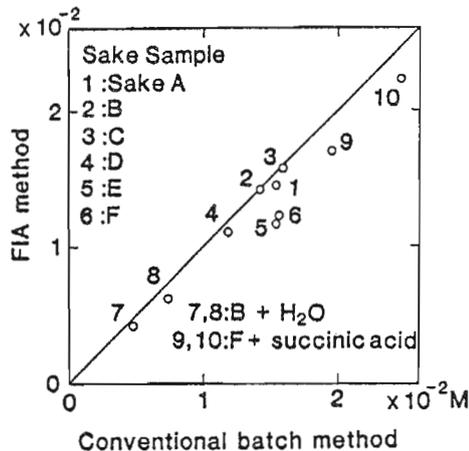


Fig. 4 Correlation between the conventional titration method and FIA method for determination of organic acid in Sake (Japanese rice wine).

The flow conditions of FIA method are the same as shown in Fig. 1.

3.3 アミノ酸の定量

アミノ酸は酸あるいは塩基としての性質をもつ両性イオンであるがその強さは弱いので、アミノ酸を滴定分析する場合、ホルムアルデヒドと反応させ塩基性を消失させ、より強い酸として、中和滴定により定量される。いわゆる Serensen のホルモール滴定として知られている^{a)}。表 2 に主なアミノ酸の水中及びホルマリン中での酸解離定数を示す。

表 2 アミノ酸の水中及びホルマリン中での酸解離定数

アミノ酸	酸解離定数 (pK _a)	
	水中 ^{a)}	ホルマリン中
グリシン	9.73	5.92 ^{a)} (9%) 5.70 ^{b)} (9%)
L-バリン	9.72	7.47 ^{a)} (9%) 7.25 ^{b)} (9%)
β-アラニン	9.87	6.96 ^{a)} (9%) 6.86 ^{b)} (9%) 6.4 ^{c)} (16%)
L-グルタミン酸	4.28	4.2 ^{c)} (16%) 6.83 ^{d)} (10%) 6.91 ^{e)} (9%)
	9.67	6.8 ^{e)} (16%)

a) M. S. Dunn and A. Loshakoff, J. Biol. Chem., 113, 359, 691 (1936).

b) M. Levy and D. E. Silberman, J. Biol. Chem., 118, 723 (1937).

c) L. J. Harris, Proc. Roy. Soc. London, Series B, 95, 440 (1923-24).

d) M. Levy, J. Biol. Chem., 99, 767 (1932-33).

e) 化学便覧 改訂 2 版 日本化学会編 p996-997 (1975)

括弧内の数字はホルマリン濃度

水中では pK_a が 9 - 10 程度であるが 10 % 程度のホルマリン中では研究者によってやや報告値は異なるが pK_a は 6 - 7 程度となる。従って、本法によって異なる種類のアミノ酸を同程度の感度で測定するためには pK_a で 3 以上大きな pK_a を持つアルカリ性リン酸緩衝液が適していると考えられる。以上の考察により、図 2(a) のようなフロー系を構成した。図 2(b) はグリシンの検量線ピークを示す。また、図 5 にはグリシン、アラニンおよび L-グルタミン酸の検量線を示す。グリシン及びアラニンの検量線は同一であり、グルタミン酸の検量線の傾きは前者の約二倍である。これは、グルタミン酸がホルムアルデヒドと反応し生成した酸が二塩基酸であることに対応している。よって、アミノ酸量としては三者とも同程度の感度を示す。

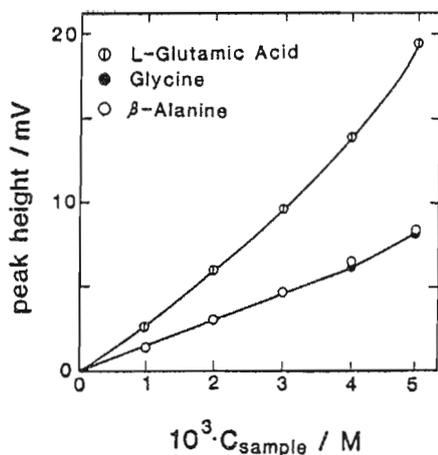


Fig. 5 Calibration curves for amino acids.

Flow condition: Buffer solution, 0.010M Na_2HPO_4 - 0.010 M Na_3PO_4 (0.50 ml/min), neutral formaldehyde solution, 0.7 % (0.50 ml/min), water, 0.60 ml/min. The flow conditions are the same as shown in Fig. 2.

3.4 清酒中の全アミノ酸の定量

清酒中には約20種類のアミノ酸があるが、これらの全アミノ酸の公定分析法では、清酒中の遊離の有機酸を中和したのち、先に述べたホルモール滴定法により定量する。ただし、アルギニンやリジンなどは滴定にかかってこない。バリンの検量線を用いて清酒中の全アミノ酸を本法により定量した。本法と公定分析法にしたがって分析した結果との相関関係を図に示す。試料としては三種の清酒と共にそれらにバリンを添加したもの及び清酒を脱イオン水で希釈したものを用いた。図6に示すように本法は公定分析法と良い相関関係があることが分かる。

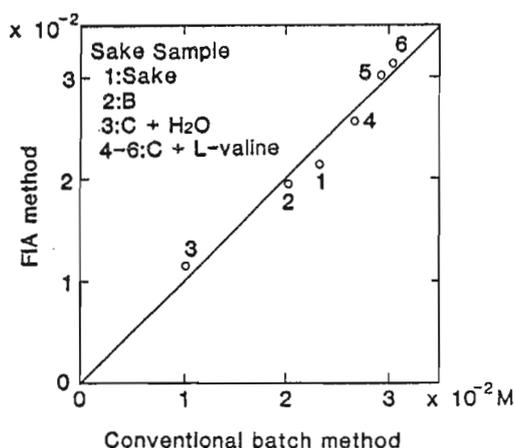


Fig. 6 Correlation between the conventional titration method and FIA method for determination of amino acids in Sake (Japanese rice wine). Flow condition of FIA is the same as indicated in Fig. 5.

結言

清酒中の全遊離有機酸及び全アミノ酸の迅速定量を目的として、pH 緩衝液の流れとガラス電極を用いて公定分析法にしたがった有機酸及びアミノ酸のフローインジェクション分析法を開発した。本法は公定分析である滴定法とよい一致を示した。また本法では試料の流れをそのまま緩衝液と合流させれば連続モニタリングも可能である。ここでは、酸の全量測定を目的として緩衝液を選択したが、本法の感度が緩衝液と試料の酸解離定数の差によることを利用すれば弱酸中の強酸など混合酸の選択的定量も可能であると考えられる。

文献

- 1) 村上英也監修、国税庁所定分析法注解、p 17
- 2) N. Ishibashi, T. Imato, C. Azemori and Y. Asano, Ion-Selective Electrodes 4, Akademic Kiado, Budapest p479 (1985).
- 3) T. Imato and N. Ishibashi, Anal. Sci., 1, 481 (1985).
- 4) N. Ishibashi, T. Imato, Fresenius' Z. Anal. Chem., 323, 244 (1986).
- 5) N. Ishibashi, T. Imato and K. Tsukiji, Anal. Chim. Acta, in press.
- 6) H. Ohura, T. Imato, S. Yamasaki and N. Ishibashi, Bunseki Kagaku, 35, 349 (1986).
- 7) H. Ohura, T. Imato, S. Yamasaki and N. Ishibashi, Bunseki Kagaku, 35, 807 (1986).
- 8) S. P. L. Sorensen, Biochem. Z., 7, 45 (1908).

(1986年11月15日受理)