

分光光度法によるドリンク剤中のタウリンの定量

誌名	名城大学農学部学術報告
ISSN	09103376
著者名	青野,求 曾我,英樹
発行元	名城大学農学部
巻/号	37号
巻号補足	
掲載ページ	p. 109-117
発行年月	2001年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



分光光度法によるドリンク剤中のタウリンの定量

青 野 求・曾 我 英 樹

A Spectrophotometric Method for the Determination of Taurine
in Nutritional Supplement Drinks
Motomu AONO and Hideki SOGA

Summary

A rapid and simple method was developed for the quantitative determination of taurine in nutritional supplement drinks by ultra violet (UV) spectrophotometry of DNP derivative. The method involves derivatization of taurine by 2,4-dinitrofluorobenzene (2,4-DNFB). The DNP-taurine was extracted by chloroform, and measured. The absorption spectrum of the DNP-taurine showed the maximum absorption wavelength at 358 nm. The assay was linear in a taurine concentration range between 0.4 and 1.0 $\mu\text{mol} / \text{ml}$, with coefficient of variation of 3.3~10.6 % for the tested concentrations. Quantitation and detection limits of taurine, respectively, were 2.5 $\mu\text{mol} / \text{ml}$ and 0.08 $\mu\text{mol} / \text{ml}$. Compared with the ninhydrin method, this method was proven to be excellent with the recovery of 94.7 to 100.4%. From the recovery test, sugars and caffeine did not affected the experimental data.

Key Words : taurine, 2,4-dinitrofluorobenzene, determination, derivative, nutritional supplement drinks

緒 言

タウリンはその学名をアミノエタンスルホン酸またはアミノエチルスルホン酸 ($\text{H}_2\text{N} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{SO}_3\text{H}$)と呼ぶ。1827年にTiedemannとGmelinはウシの胆汁からアスパラギン類似物質を分離して胆汁アスパラギンと名付けたが、後の1838年にDemarcayはその結晶化に成功し、初めてタウリンと命名した。その後Redtenbacherは、タウリンが、哺乳動物の各組織や体液中、魚類の筋肉、軟体動物、甲殻類に多量に存在する含硫アミノ酸の一種であることを報告している^{1,2)}。

1886年にSchmeidebergは本品の麻酔薬として
環境分析化学研究室
受理：平成12年10月31日

の効果を認めているが、その催眠作用は微弱である。本品は体内に摂取されると、胆汁成分のコール酸、デオキシコール酸やリソコール酸などと結合して、タウロコール酸などとして存在する場合もある。これらのナトリウム塩は利胆・代謝促進などの薬効を有するといわれており³⁾、その代謝は、脂肪の乳化、消化酵素の活性化、消化と吸収を助け、脂溶性のみでなく、水溶性のビタミンの吸収を促す。それ以外にも、胆汁酸との包含神経組織に対する調節作用⁴⁾、膜の安定化作用⁵⁾、抗酸化作用⁶⁾など様々な重要な役割の働きをしていることが報告されている。

このアミノ酸の一種であるタウリンの定量方法は、アミノ酸を誘導体化して、定量分析を行うとい

うものである。

Sanger が、2, 4-ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) によりアミノ基をジニトロフェニル基で標識し、ペプチドおよびタンパク質の遊離アミノ基の検出に成功⁷⁾してからペプチドの N 末端アミノ酸の決定およびアミノ酸分析のために、アミノ基と反応して、紫外部あるいは可視部に吸収を有する誘導体を与える、種々の試薬が提唱された。

Sanger の報告以来、多くの人々により DNP 化の方法が研究され、その総説⁸⁻¹¹⁾も多い。

アミノ酸であるタウリンを弱塩基媒体中で、DNFB を用いて混合させることで、N-2, 4-ジニトロフェニル誘導体に定量変換させるのが DNP 化法の概略である。この方法の短所は、定量時間が少なくとも 24 時間を必要とすることにあった。その後 Wilbraham は比較的短時間で、正確に、精度の高い DNP 化を報告している²⁾。この方法は、DNFB によりタウリンを DNP-タウリン誘導体とし、DNP-タウリンが水に可溶で、無極性の有機溶剤に不溶であることに注目している。また、数回の抽出操作によって他のアミノ酸を除去し、水層中で完全に保有される DNP-タウリンを含む水溶液の吸光度を測定することによって、簡単に定量できる。この DNP 化を用いた定量方法を更に詳細に基本的事項すなわち、DNFB の濃度、 NaHCO_3 の濃度と添加量、pH、DNP-タウリン誘導体の抽出後の経時変化、加熱時間と温度、塩酸の濃度と添加量、クロロホルムの添加量、タウリン水溶液の安定性、共存物質による影響、上限と下限、検量線と繰り返し精度、信頼性等を検討することにより、より正確に繰り返し精度を上げることが可能となった。本法とニンヒドリン法との比較検討、市販医薬品ドリンク剤中のタウリン定量の適応性について報告する。

実験方法

1. 装置および器具

可視紫外分光光度計は島津製作所製の 160 A 型を使用した。振とう器はヤマト科学製の SA-31 型、pH メーターは東亜電波工業製の HM-30 S 型を使用した。

2. 試薬

定量に用いた代表的な試薬は特級タウリン $\text{NH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{SO}_3\text{H}$ 、特級エタノール (99.5%) $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 、特級 2, 4-ジニトロフルオロベンゼン C_6

$\text{H}_3(\text{NO}_2)_\text{F}$ 、特級クロロホルム CHCl_3 、1 級炭酸水素ナトリウム NaHCO_3 、特級カフェイン $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$ 、特級ニンヒドリン $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$ 、特級メチルセロソルブ $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、(和光純薬工業¹²⁾製)を用いた。

3. 試薬の調製

実験で用いた試薬は次のように調製した。

(1) タウリン溶液 (0.1 $\mu\text{mol}/\text{ml}$)

タウリンの 0.0031 g を精秤し、これを純水に溶解し、250 ml に定容した。この溶液はポリエチレン製容器に入れ、インキュベータ (3℃) で保存した。

(2) DNFB 溶液 (3%)

DNFB の 3 ml を 95% エタノール溶液 97 ml に溶かした。

(3) カフェイン原液 (100 $\mu\text{mol}/\text{ml}$)

カフェインの 1.9419 g を蒸留水に溶かし、100 ml に定容した。

(4) シアン化カリウム-メチルセロソルブ溶液

0.01 N-シアン化カリウム溶液の 5 ml にメチルセロソルブ溶液の 245 ml を加えて混合した。

(5) ニンヒドリン-メチルセロソルブ溶液

ニンヒドリンの 2.5 g をメチルセロソルブ溶液の 50 ml に溶解した。

4. 定量操作

試験管 (内径 2.5 cm、長さ 24.5 cm の褐色製) にタウリンの 0.5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ を含む 10 ml の試料溶液をとり、それに 4% 炭酸水素ナトリウム溶液の 2 ml と 3% DNFB エタノール溶液の 2 ml を加えた。それらを十分攪拌、混合したのち、試験管の口をサララップを用いて覆い、さらに、アルミホイルを用いて丁寧に密閉した。深いウォータバス中に試験管を入れ、90℃ (±1℃) で 40 分間加熱した。この際、ウォータバス中の熱湯は、試験管内の混合液の液面より常に上になるように注意した。加熱後、氷水で室温まで冷却した。混合液は、100 ml の分液漏斗に移し、試験管内の壁面に残留した混合液は、1~2 ml の蒸留水を用いて 3 回洗浄した。次に、6 N 塩酸の 1 ml を加えて酸性化し、軽く攪拌し、クロロホルムの 12 ml を加え、振とう器で 10 分間振とう後、水層とクロロホルム層を分離させるために、15 分間放置、下層のクロロホルム層を捨て、抽出されたタウリンの上層水を 25 ml のメスフラスコに移した。この時、直径約 2 cm のガラス製ロートの下部に小豆よりやや大きい綿を入れ、濾過した。水層がすべて

移された後、分液漏斗の壁面に付着した残留物を約 2 ml の蒸留水で洗浄した後濾過した。ロート内の綿を少量の蒸留水で洗浄した後、一定容にした。分光光度計を用いて 358 nm の吸収波長で測定した。また、試薬ブランクも併せて測定した。

5. ニンヒドリン法の操作

試験管 (2.5×24.5 cm) にタウリン溶液 (0.2~1.0 $\mu\text{mol}/\text{ml}$) 1 ml を、メスピベットを用いて取り、これに 2.5 N の NaOH 1 ml をホールビベットを用いて加えた。試験管の口をアルミホイルで覆い、オートクレーブ中で、120℃で 20 分間、加水分解を行った。

加水分解後、30%の CH_3COOH 1 ml を加えて中和し、更に 4 M の酢酸ナトリウム 0.5 ml を加え、pH を 5.0 に調整した。次に、ニンヒドリン溶液 1 ml を加え、よく攪拌した。再び試験管の口をアルミホイルで覆い、沸騰水中で 15 分間の反応を行った。反応終了後、流水で室温まで冷却した。その後、50% エタノールの 5 ml をホールビベットを用いて加え、よく攪拌した。この溶液を分光光度計を用いて、蒸留水を対照とし、570 nm で吸光度を測定した。

その際、この反応溶液は、経時的に吸光度が低下していき、測定条件が一定とならないため、50% エタノールの 5 ml を添加してから 30 分後に測定した。

結果および考察

1. DNP-タウリン誘導体化による定量条件の検討

1-1 吸収スペクトルの測定

0.1 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ のタウリン溶液の 5 ml をメスピベットを用いて試験管にとり、次に純水 5 ml を添加した。前述の定量操作に従って、DNP-タウリンを生成させ、その吸収スペクトル測定を行ったところ Fig. 1 のように 358 nm を最大吸収波長とするスペクトルが得られた。これは DNP-タウリンの最大吸収波長である。

1-2 DNFB の濃度の検討

DNFB のエタノール溶液 (6%) をエタノールで希釈し、その 2 ml ずつを使用した。DNFB の濃度が何%の時に最適となるかを試みたところ Fig. 2 のように 3.0% の時が最も吸光度が高かった。すなわち 1.0~3.0% 濃度では、高濃度になるにつれ、吸光度も高くなるが、3.0% を越えると徐々に減少し

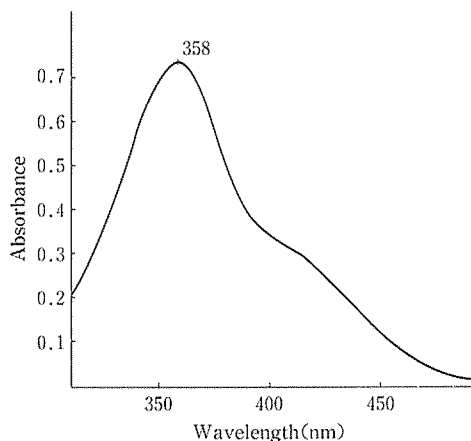


Fig. 1 Absorption spectrum of DNP-taurine.

Taurine solution: 0.5 $\mu\text{mol}/10$ ml,
NaHCO₃: 2 ml.

2,4-DNFB solution: 2 ml, Hydrochloric acid: 1 ml.

Heating time: 40 minutes, Heating temperature: 90℃

pH: 8.5

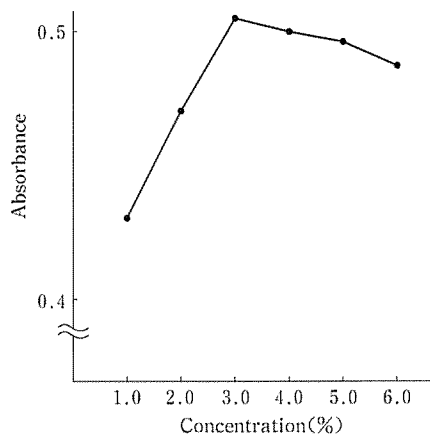


Fig. 2 Effect of the concentration of 2,4-DNFB solution on the absorbance of DNP derivative of taurine.

Taurine solution: 0.5 $\mu\text{mol}/10$ ml, NaHCO₃: 2 ml.

2,4-DNFB solution: 2 ml, Hydrochloric acid: 1 ml.

Heating time: 40 minutes, Heating temperature: 90℃.

pH: 8.5

た. 3.0%よりも低濃度では, DNP化する際のDNFBが不足するため, DNP-タウリンが完全に形成されず3.0%より高濃度では, DNFBが過剰となり, DNP-タウリンの発色阻害を招いたものと考えられる.

1-3 NaHCO_3 の濃度, 添加量, pHの変化

NaHCO_3 が1.0~4.0%濃度では, 高濃度になるにつれ吸光度も高くなるが, 4.0%を越えるとやや減少した. 4.0%より低濃度では, 溶液をアルカリ性にするのに, NaHCO_3 量が不足するためであり, 高濃度になると, 過剰量の NaHCO_3 がクロロホルムに移行して除去されず, 発色阻害をおこすと考えられる. 次に, その添加量については2.0 mlと4.5 mlの時の吸光度では, 他の添加量の吸光度より高くなった. 0.5~3.5%では NaHCO_3 の過剰量になるほど, DNP-タウリンの発色阻害となり, 4.0 mlを越えるナトリウム自身の発色量加わって, DNP-タウリンのみの発色には成らないと考えられる. タウリン水溶液のpHは, 弱酸性の6.7を示した. DNP化するためには, この溶液を弱アルカリ性にする必要があるため, 4%の NaHCO_3 を0.5 mlおきに増やしていくと, 0.5 mlで8.5のアルカリ性を示し, その後pHは, NaHCO_3 量が5.0 mlまでほぼ一定の8.5を示した. NaHCO_3 が一種の緩衝溶液の作用を有するということがわかった. 本実験では最終液量を25 mlに定容するため NaHCO_3 は4.0%溶液2.0 ml (pH 8.5) が最適である.

1-4 加熱温度と加熱時間

反応温度が発色に及ぼす影響を調べた結果をFig. 3に示した.

DNP-タウリンの吸光度は, 40~80℃までは徐々に増加したが, 80℃から90℃へと温度を上げると, 試薬ブランクもDNP-タウリンもともに吸光度が急激に増加した. しかし, DNP-タウリンの吸光度から, その温度での試薬ブランクの吸光度を引くと, 40℃~80℃までは, 吸光度は一定であったが, 90℃では, 吸光度値で約0.1程高くなった. これは, 80℃までは温度が低すぎるために, DNP-タウリンの形成が不十分であり, 90℃になるとDNP化が活発になったためであると考えられる. また, 加熱時間は10~20分間の加熱では, ほとんど吸光度が変わらず, 30分間, 40分間と時間を長くすると, 吸光度は急上昇し始め, 40~60分間加熱で, ほぼ一定の吸光度を示すようになった. これは時間を短くすると,

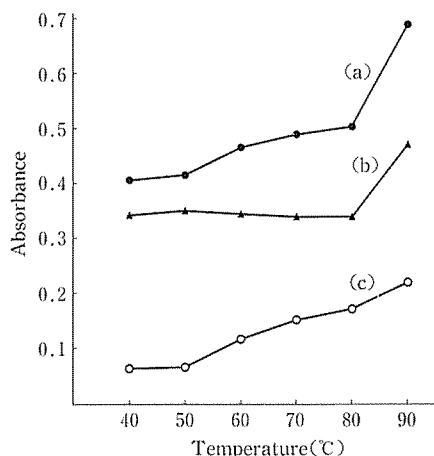


Fig. 3 Effect of heating temperature on the absorbance of DNP-aurine.

Taurine solution: 0.5 $\mu\text{mol}/10$ ml, NaHCO_3 solution: 2 ml.

2,4-DNFB solution: 2 ml, Hydrochloric acid: 1 ml.

Heating time: 40 minutes, pH: 8.5

(a) ●—●: DNP-aurine

(b) ▲—▲: (a) - (c) (value of taurine derivative)

(c) ○—○: Reagent blank

DNP-タウリンの形成が不完全となり, 発色量が減少すると考えられ, 40分以上がDNP化するために必要であることがわかった.

1-5 塩酸の濃度と添加量

塩酸の濃度の影響について, 2 N~10 Nまで調べたがDNP-タウリンの吸光度, 試薬ブランクの吸光度共に余り大きな差は認められなかった. 従って6 Nの塩酸を使用することにした. 次に添加量は0.5~2.0 mlでDNP-タウリンの吸光度, 試薬ブランクの吸光度に差はなかった. これは, 加熱後の反応溶液を酸性化する目的で塩酸を添加するので, 過剰に加える必要性はなく, 1 mlの添加で十分であった.

1-6 クロロホルム添加量と振とう時間の影響

室温まで冷却した混合液を, 分液漏斗に移したのち, それぞれの実験区へ, クロロホルムを2~20 mlまで添加し, 振とうした結果をFig. 4に示した. 2~10 mlへと添加量を増やしていくと吸光度が急激に減少していく, 10~14 mlの添加量では, 吸光度がほとんど一定である. 更に14~20 mlへと増やして

いくと、徐々に減少し続けた。これはDNP-タウリンの吸光度と試薬ブランクの吸光度の両方に共通している。また、クロロホルム添加後、6個の分液漏斗を各々5～30分間振とうを行ったところ、10分間の振とうが最も吸光度が高かった。振とう時間が10分以上になると、DNP-タウリン誘導体の破壊が起こり吸光度の減少が生ずると考えられる。

1-7 DNP-タウリン誘導体の抽出液の経時の変化 クロロホルム抽出後30分後から5時間までの吸

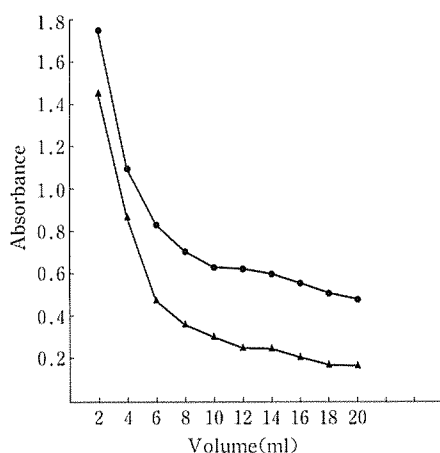


Fig. 4 Effect of additional volume of chloroform on the absorbance of DNP derivative of taurine.

Taurine solution: $0.5 \mu\text{mol}/10 \text{ ml}$, NaHCO_3 solution: 2 ml , $2,4\text{-DNFB}$ solution: 2 ml , Hydrochloric acid: 1 ml .
Heating time: 40 minutes, Heating temperature: 90°C .
pH: 8.5

●—●: DNP-taurine
▲—▲: Reagent blank

光度はほぼ一定であった。従って、抽出後のDNP-タウリン誘導体の安定性は、極めて高く測定上の問題は無いものと考えられる。

1-8 タウリン水溶性の安定性

タウリン水溶液を室温(20°C)とインキュベーター(3°C)中で保存することで、タウリン水溶液が何日間安定しているか検討した。室温で保存した場合2日間を過ぎると、徐々に吸光度が減少し、5日間経過すると吸光度のバラツキが現れてきた。インキュベータ中で保存した場合、2日間まではやや吸光度が高くなるが、3日目以降は安定し、9日目まではほぼ一定の吸光度を示した。従って、密閉したポリ容器に入れ、インキュベータ中に保存すれば7日間は安定している。

1-9 共存物質による影響

医薬品ドリンク剤中で比較的多量に含まれている糖(グルコース、フルクトース、サッカロース)、カフェインが、DNP化にどの程度影響を与えるか干渉率を求めたのがTable 1および2である。糖の場合、タウリン濃度が $0.1 \mu\text{mol}/\text{ml}$, $1.0 \mu\text{mol}/\text{ml}$ の両方に共通していることは、フルクトースのみ100倍量加えても、+10%以内の阻害しか与えず、グルコース、サッカロースは、同じ100倍量を加えると、+24%以上の阻害を示した。

一方、カフェインの場合、タウリン濃度に対して $1/20$ 量～100倍量のいずれの場合も、 $\pm 2\%$ 程度の妨害しか示さず、カフェインはほとんど干渉しないことが分かった。

1-10 タウリン定量における検量線

諸条件を検討した結果、最適条件を用いて、 $0.2 \sim 1.0 \mu\text{mol}/\text{ml}$ の範囲について検量線を作成した。その結果をFig. 5に示す。相関係数は+0.9999と非常に高い値を示した。更にDNP-タウリンの定

Table 1 Effect of saccharides on the measured value of taurine.

Taurine cons.	$0.01 \mu\text{mol}/\text{ml}$	$0.1 \mu\text{mol}/\text{ml}$	$1.0 \mu\text{mol}/\text{ml}$	$10 \mu\text{mol}/\text{ml}$	$100 \mu\text{mol}/\text{ml}$
	ABS(IC%)	ABS(IC%)	ABS(IC%)	ABS(IC%)	ABS(IC%)
Taurine	—	$0.320(\pm 0.0)$	—	—	—
Glucose	$0.291(-9.2)$	$0.340(+6.2)$	$0.316(-1.2)$	$0.392(+24.1)$	$0.917(+186.6)$
Fructose	$0.284(-11.2)$	$0.288(-10.0)$	$0.314(-1.9)$	$0.349(+9.1)$	$0.439(+37.2)$
Saccharose	$0.301(-5.9)$	$0.310(-3.1)$	$0.323(+0.9)$	$0.418(+30.6)$	$1.202(+275.6)$

ABS=absorbance IC=interference coefficient(%)

Table 2 Effect of caffeine on the measured value of taurine.

Taurine cons.	0.005 $\mu\text{mol/ml}$	0.01 $\mu\text{mol/ml}$	0.1 $\mu\text{mol/ml}$	1.0 $\mu\text{mol/ml}$	10 $\mu\text{mol/ml}$
	ABS(IC%)	ABS(IC%)	ABS(IC%)	ABS(IC%)	ABS(IC%)
Taurine	—	—	0.320(± 0.0)	—	—
Caffeine	0.317(-0.9)	0.322($+0.6$)	0.341(-1.9)	0.329($+2.9$)	0.325($+1.6$)

Taurine cons.	0.05 $\mu\text{mol/ml}$	0.1 $\mu\text{mol/ml}$	1.0 $\mu\text{mol/ml}$	10 $\mu\text{mol/ml}$	100 $\mu\text{mol/ml}$
	ABS(IC%)	ABS(IC%)	ABS(IC%)	ABS(IC%)	ABS(IC%)
Taurine	—	—	0.961(± 0.0)	—	—
Caffeine	0.952(-0.9)	0.970($+0.9$)	0.940(-2.2)	0.986($+2.6$)	0.959(-0.2)

ABS=absorbance IC=interference coefficient(%)

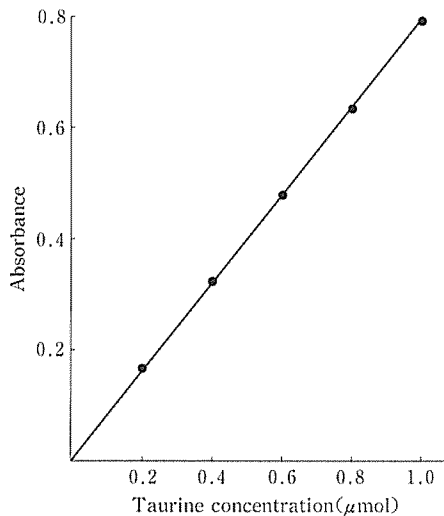


Fig. 5 Calibration curve of taurine.

NaHCO₃ solution: 2 ml, 2,
4-DNFB solution: 2 ml.
Hydrochloric acid: 1 ml, Heating
time: 40 minutes.
Heating temperature: 90°C, pH:
8.5

量における上限と下限を検討したところタウリン濃度が2.5 $\mu\text{mol/ml}$ 以上になると、急激な上昇曲線を描くようになるため、本法におけるタウリンの定量上限は2.5 $\mu\text{mol/ml}$ とした。また、0.01~0.08 $\mu\text{mol/ml}$ までは、吸光度が不安定であり、曲線を描いた。0.08~0.1 $\mu\text{mol/ml}$ になると、ほぼ直線性を示し Lambert-Beer の法則に適合した。0.08 $\mu\text{mol/ml}$ 以下では、吸光度が0.06 以下となり、試薬ブランクの影響をうけ易くなるため、タウリン定

量における下限を0.08 $\mu\text{mol/ml}$ とした。

1-11 繰り返し精度

DNP-タウリン誘導体化による繰り返し精度を検討した結果を Table. 3 に示した。このデータの吸光度は、試薬ブランクの吸光度を引いた値を示した。10 回の測定値中、各々の濃度の平均をその濃度の真の値と考え、0.2 $\mu\text{mol/ml}$ の場合、真値との差が、測定回数が増える程小さくなった。しかし、10 回の測定値の差はかなり大きいため、0.2 $\mu\text{mol/ml}$ での精密さは低くなる。変動係数も他の濃度に比べてかなり高く、バラツキが大きいことがわかる。従って、0.2 $\mu\text{mol/ml}$ の濃度では正確さ、精度の点で低くなり、信頼性を欠くことになる。これより高い濃度では、正確さは高くなり、精密さも徐々に高くなる傾向が見られた。これは、各濃度の変動係数が高濃度になる程低くなり、精度が上がってくる。この結果、測定回数を増すごとに検量線の相関係数が、低くても0.9991 となり、精密さが上昇していることが分かった。

2. 本法とニンヒドリン法の比較

本法の最も特徴的なことは、アミノ酸を誘導体化し、それらのほとんどが無極性の有機溶媒に可溶であるのに対し、タウリンの誘導体は不溶で、水に非常に溶けやすい。そのため、タウリンを DNP-誘導体とし、無極性の有機溶媒を用いて抽出操作を行うことで、水層中に完全に保有され、その水溶液の吸光度を測定することによって容易に定量できるということである。しかし抽出操作ということで、有機溶媒と水溶液の分離の際、注意を要し、極微量定量には誤差を生じやすい。ところが、ニンヒドリン法

Table 5 Recovery of taurine from nutritional supplement drinks

Sample	Theoretical value g/100 ml	Dilute×1000 g/100 ml	Recovery* %
A	1	1.0037	100±0.8
B	1	0.9924	99.2±0.3
C	1	0.9999	99.9±0.2
D	1	0.9474	94.7±0.3
E	2	2.0048	100.2±0.9

* Average of three trials.

A: Lipovitan D (TAISHO PHARMACEUTICAL CO.,LTD.)

B: S.CUP (SS PHARMACEUTICAL CO.,LTD.)

C: S.CUP C 1000 (SS PHARMACEUTICAL CO.,LTD.)

D: Regein (SANKYO CO.,LTD.)

E: Lipovitan D sugar (TAISHO PHARMACEUTICAL CO.,LTD.)

できることが確認された。すなわち、共存物質である糖、カフェインの影響を受けないということが認められたように、抽出により、これらの共存物質が有機溶媒に溶解し、水溶液中に残存することが防止できるためと考えられる。ドリンク剤自体も着色されており、これが吸光度への影響をおよぼすことも考えられたが、原液を希釈することにより、解消され定量には全く影響しなかった。このことにより、正確さおよび精密性が高く、作成した検量線も信頼性の高いものである。

ニンヒドリン法では①0.2~1.0 $\mu\text{mol/ml}$ の濃度範囲で測定値が不安定であり、②抽出操作でタウリン以外の物質を、容易に除去する操作がなく、吸光度に影響が現れる、③反応溶液が不安定で、経時的に吸光度が減少する。以上の観点から本法が正確で精密な信頼性の高い定量法といえる。

要 約

現在、主として行なわれているタウリンの定量方法にアミノ酸アナライザーや高速液体クロマトグラフィーを用いる方法^{13,14)}があるが、高価であること、共存物質の影響を除くためにクリーンアップが必要、分析時間が長すぎるなどの欠点がある。今回、簡易な定量法として分光光度計を用いてDNP-タウリン誘導体の定量条件の検討とドリンク剤中のタウリンの定量を行った。DNP-タウリンの吸収スペクトルを測定した結果、358 nm が最適であった。2~4 DNFB の濃度が3%までは吸光度が上昇し、それ以上になると減少したため、3%溶液を用いた。NaHCO₃は4%溶液で2 ml 添加した時 (pH 8.5)、

吸光度が高く、安定した。NaHCO₃は一種の緩衝作用を有するということがわかった。

DNP-タウリン誘導体の抽出後の経時変化は少なくとも、5時間安定している。

DNP-タウリン生成における加熱時間は40~60分で吸光度が一定になり、加熱温度は80℃以下よりも90℃に保つことにより吸光度が上昇し、安定した。塩酸の濃度は2 N~10 N であまり影響が認められない。従って試薬の調製が容易にできるように、6 N と定めた。塩酸の添加量は、加熱後の反応溶液を酸性化するのが目的であるので、6 N の塩酸1 ml で十分である。

クロロホルム添加量10~40 ml までは吸光度はほぼ安定し、10分間の振とうが最も吸光度が高かった。タウリンの水溶液は密閉したポリエチレン製の容器に入れ、インキュベーター (3℃) 中で保存した場合、7日間は安定していることから、1週間ごとに溶液の調製をするのが望ましい。

共存物質である糖、カフェインはタウリンの10倍量までは吸光度に影響しない。また、他のアミノ酸の干渉も抑制できる。

本法における定量の下限は0.08 $\mu\text{mol/ml}$ であり、それより低濃度では吸光度は不安定であった。また、上限は2.5 $\mu\text{mol/ml}$ で、それより高濃度では吸光度が上昇した。

検量線は、0.2~1.0 $\mu\text{mol/ml}$ の濃度範囲で Lambert-Beer の法則に適合し、相関係数は0.9999であった。医薬品ドリンク剤中のタウリンの定量は100.2±1.7%の回収率で定量できた。

分光光度法によるDNP-タウリンの定量は平均偏差、標準偏差、変動係数のいずれも、ニンヒドリ

は、試料溶液への試薬の添加と加熱操作を行うのみであり、反応溶液の分離操作を必要としないため、試薬の反応感度さえ高ければ、微量定量を行うことができる。しかし、 $0.2 \sim 1.0 \mu\text{mol/ml}$ の濃度範囲では Table 4 に示す通り、安定性は本法の方がよく、吸光度のバラツキも小さく信頼性が高い、反応溶液の安定性を考えると、本法の場合、室温におい

て少なくとも 5 時間は安定しており、これに対して、ニンヒドリン法では、経時的に吸光度が低下していった。

3. 市販医薬品ドリンク剤中のタウリンの定量

ドリンク剤中のタウリンの定量への適用性については Table 5 に示す通り、非常に良好な状態で定量

Table 3 Statistical analysis for accuracy and precision. (Spectrophotometric method)

Taurine cons.	$0.2 \mu\text{mol/ml}$	$0.4 \mu\text{mol/ml}$	$0.6 \mu\text{mol/ml}$	$0.8 \mu\text{mol/ml}$	$1.0 \mu\text{mol/ml}$	Correlation coefficient.
No. 1	0.248	0.316	0.478	0.597	0.756	0.9918
No. 2	0.193	0.379	0.466	0.604	0.753	0.9940
No. 3	0.134	0.253	0.449	0.601	0.821	0.9951
No. 4	0.132	0.290	0.425	0.653	0.786	0.9968
No. 5	0.185	0.345	0.480	0.650	0.790	0.9990
No. 6	0.140	0.341	0.503	0.667	0.807	0.9988
No. 7	0.162	0.329	0.505	0.675	0.832	0.9999
No. 8	0.160	0.344	0.513	0.667	0.813	0.9993
No. 9	0.180	0.326	0.472	0.621	0.807	0.9991
No.10	0.163	0.310	0.474	0.620	0.815	0.9992
AV	0.170	0.323	0.476	0.636	0.798	0.9999
A.D	0.0254	0.0248	0.0193	0.0269	0.0210	—
S.D	0.0346	0.0344	0.0267	0.0301	0.0266	—
C.V	20.404	10.633	5.599	4.743	3.331	—

AV : Average, A.D : Average deviation

S.D : Standard deviation, C.V : Coefficient of variation

Table 4 Statistical analysis for accuracy and precision. (Ninhydrin method)

Taurine cons.	$0.2 \mu\text{mol/ml}$	$0.4 \mu\text{mol/ml}$	$0.6 \mu\text{mol/ml}$	$0.8 \mu\text{mol/ml}$	$1.0 \mu\text{mol/ml}$	Correlation coefficient.
No. 1	0.118	0.231	0.293	0.431	0.564	0.9957
No. 2	0.050	0.228	0.345	0.491	0.679	0.9919
No. 3	0.113	0.221	0.341	0.471	0.657	0.9948
No. 4	0.102	0.267	0.319	0.584	0.688	0.9870
No. 5	0.139	0.290	0.448	0.576	0.758	0.9990
No. 6	0.111	0.267	0.423	0.624	0.779	0.9968
No. 7	0.137	0.254	0.482	0.590	0.815	0.9961
No. 8	0.096	0.264	0.458	0.593	0.735	0.9969
No. 9	0.170	0.300	0.477	0.547	0.712	0.9975
No.10	0.132	0.289	0.459	0.571	0.733	0.9975
AV	0.117	0.261	0.404	0.548	0.712	0.9990
A.D	0.0219	0.0221	0.0640	0.0502	0.0520	—
S.D	0.0307	0.0276	0.0720	0.0624	0.0705	—
C.V	26.169	10.578	17.798	11.391	9.907	—

AV : Average, A.D : Average deviation

S.D : Standard deviation, C.V : Coefficient of variation

ン法と比べて非常に安定している。従って、抽出操作も比較的容易であるため、再現性を得ることができ、優れた定量方法であるといえる。

文 献

- 1) Awapara, J., (1976) "Taurine," ed. by R. Huxtable and A. Barbeau, Raven Press Books Ltd., N.Y., 2.
- 2) Jacobsen, J. G., L. H. Smith (1968) *Physica. Rev.*, **48**, 425.
- 3) 日本公定書協会, (1966) 「第七改正日本薬局方 第2部解説書」, 広川書店, 28.
- 4) Kuriyama, K. (1980) *Fed. Proc.*, **39**, 2680.
- 5) Pasantes Morales, H., C. E. Wright, G. E. Gaull (1984) *J. Nutr.*, **114**, 2256.
- 6) Aruoma, O. I. B. Halliwell, B. Hory, J. Butles (1988) *Biochem. J.*, **256**, 251.
- 7) Sanger F., (1945) *Biochem. J.*, **39**, 507.
- 8) Fraenkel-Conrat, H., J. I. Harris, A. L. Levy (1955) "Methods of Biochemical Analysis". ed. by D. Glick, Interscience, New York, Vol. II, 359.
- 9) 大野 光, 関 得一郎, (1956) "蛋白質化学 4" 共立出版, 209.
- 10) Biserte, G., J. W. Holleman, J. Holleman -Dehove, P. Sautiete (1960) *Chromatogr. Rev.*, **2**, 59.
- 11) Rosmus, J., Z. Deyl (1972) *Chromatogr.*, **70**, 221.
- 12) Wilbraham, A. C., et. al (1971) *Talanta*, **18**, 977.
- 13) 廣田雅洋, 伊藤蒼志男, 外海泰秀 (1981) 日本農芸化学会誌, **55**, 495~497.
- 14) 岡崎庸樹, 片岡洋行, 藤本あゆみ, 河野恭子, 蒔田政見, (1989) 分析化学, **38**, 401.