

## ノ ー ト

イオンクロマトグラフィーによる植物体中の  
4-メチレングルタミンの迅速分析林 浩昭\*・大山卓爾\*\*・計良高子\*\*  
五十嵐太郎\*\*・茅野充男\*キーワード イオンクロマトグラフィー, 4-メチレン  
グルタミン

## 1. はじめに

4-メチレングルタミンは、チューリップや落花生に多量に含まれていることが報告されており<sup>1-4)</sup>、これらの植物においては、窒素栄養上きわめて重要な化合物であると考えられている。OHYAMA ら<sup>1,2)</sup>は、アミノ酸アナライザー（日立 935 型）を用いて、4-メチレングルタミンの定量を行ったが、一般に、アミノ酸アナライザーでは、4-メチレングルタミンのピークはグルタミンのピークと重なり、分離困難な場合が多い。筆者らは、生体アミノ酸分析用カラム（Jasco AApack Li<sup>+</sup> 型）を用いて分離条件を検討したが、両者の保持時間は全く一致し分離できなかった。4-メチレングルタミンとグルタミンが分離困難なため、WINTER ら<sup>4)</sup>は、試料を加水分解することにより生成する 4-メチレングルタミン酸とグルタミン酸の増加量を求めて、落花生体内の 4-メチレングルタミンとグルタミンの分別定量を行っている。

ところで、イオンクロマトグラフィーは、SMALL ら<sup>5)</sup>により自動化されて以来、無機のアニオン・カチオンの分析にとどまらず、有機酸、アミンなど多種類のイオンの分析に応用されてきている<sup>6)</sup>。さらに、1価カチオン成分の分析に際しては、無機のカチオン以外にもアミノ酸が短時間のうちに溶出してくることが示されている<sup>7)</sup>。

そこで、より簡便な方法で 4-メチレングルタミンを定量する目的で、筆者らは、カチオン分析カラムを装着したイオンクロマトグラフィーによる分析法を検討した。

## 2. 分析条件

日本分光 BIP-1 型ポンプ、Wescan カチオンカラム、Wescan 213 A 型導電率検出器、フローセル付分光光度計日立 100-20 型をこの順に直列に接続してイオンクロマトグラフィーとして用いた。塩酸溶液 (pH 3.5) を溶離液として用い、0.2 ml/分 の流速で流した。分析は、すべて室温で行った。

なお、4-メチレングルタミンの standard は、大山<sup>2)</sup>が、チューリップ新鮮葉より単離精製した純品を用いて作製した。

## 3. 実験結果および考察

第 1 図に、4-メチレングルタミンとグルタミンの紫外外部吸収曲線を示した。4-メチレングルタミンはメチレン基の二重結合に起因する強い紫外外部吸収を示した。各種アミノ酸、アミドの紫外外部吸収曲線を調べたところ、グルタミンとアスパラギンがほぼ同程度で、他のアミノ酸の紫外外部吸収はグルタミンより低かった。そこで、4-メチレングルタミンとグルタミンの吸光度比が高く、かつ、4-メチレングルタミンが感度よく測定可能な 220nm を測定波長とした。

第 2 図(a)にイオンクロマトグラフィーで分離した 4-メチレングルタミンの電気伝導率と紫外外部吸収のチャートを示した。本測定例では、導電率検出器と紫外外部吸収検出器をカチオンカラムに直列に接続したため、導電率のピークが紫外外部吸収のピークより早く出ている。4-メチレングルタミンとグルタミンをほぼ等量含む試料の測定例を第 2 図(b)に示す。導電率による測定ではピークの分離が不十分であったが、紫外外部吸収による測定では、グルタミンによる紫外外部吸収はほとんど無視でき、ほぼ単一の 4-メチレングルタミンのピークが得られることがわかった。

第 3 図に、4-メチレングルタミン注入量と導電率・紫外外部吸収との関係を示した。どちらの測定結果も注入量との間に直線関係（相関係数  $>0.999$ ）があり、定量可能であると判断できた。本装置での定量限界は、紫外外部吸収法では約 0.1  $\mu\text{g}$ 、導電率法では約 0.3  $\mu\text{g}$  程度であり、 $\mu\text{g}$  オーダーの 4-メチレングルタミンを含む試料で十分測定可能であった。

第 4 図に、アスパラギン酸、グルタミン酸、4-メチレングルタミン酸、グルタミン、4-メチレングルタミンの混合液の導電率測定によるチャートを示した。ここで、アスパラギン酸、グルタミン酸、4-メチレングルタミン酸は導電率正の、グルタミン、4-メチレングルタミンは負のピークを示した。アスパラギンは、グルタミン酸のすぐあとに導電率負のピークを示し、グリシン、アラニ

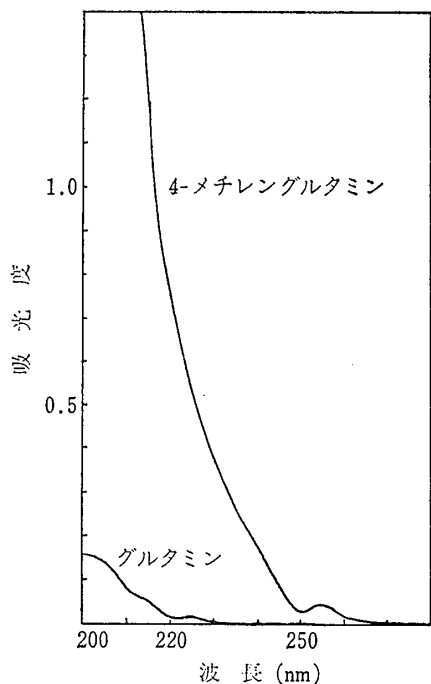
Hiroaki HAYASHI, Takuji OHYAMA, Takako KERA, Taro IKARASHI and Mitsuo CHINO

\* 東京大学農学部 (113 文京区弥生 1-1-1)

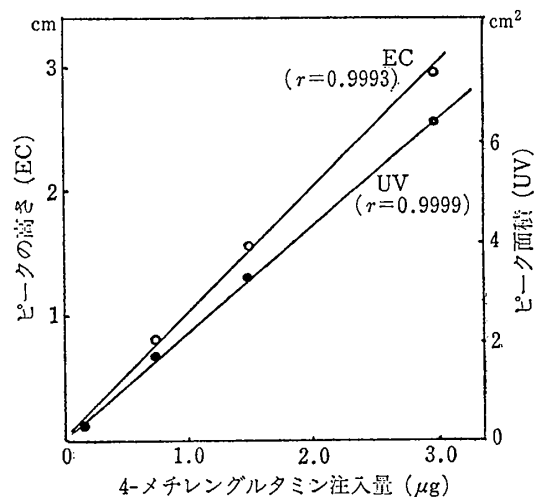
\*\* 新潟大学農学部 (950-21 新潟市五十嵐 2 の町 8050)

昭和 61 年 12 月 8 日受理

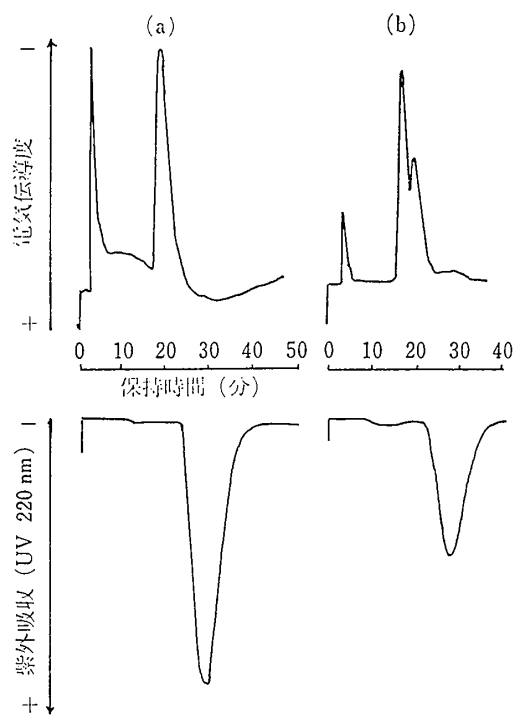
日本土壤肥料学雑誌 第 58 巻 第 5 号 p. 606~608 (1987)



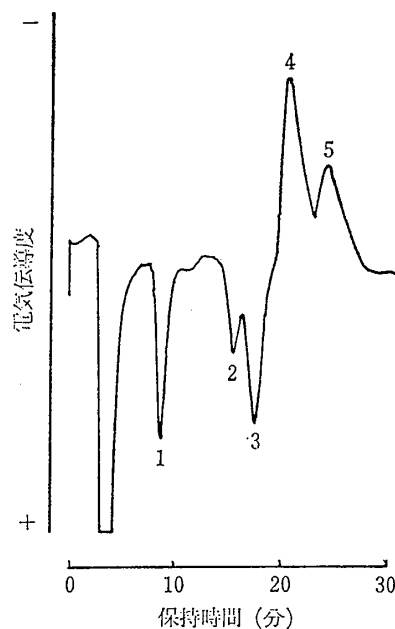
第1図 4-メチレングルタミンとグルタミンの紫外外部吸光度曲線  
試料濃度 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を日立分光光度計100-20型で測定した。



第3図 4-メチレングルタミン注入量とピーク面積(紫外吸収, UV)とピーク高さ(導電率, EC)



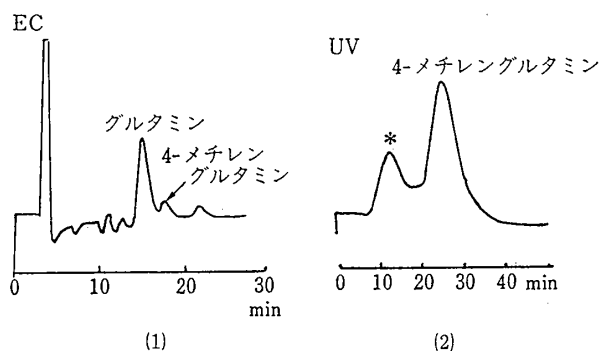
第2図 4-メチレングルタミンとグルタミンの電気伝導率および紫外外部吸収による検出  
カラム, 導電率検出器, 紫外吸収測定器を直列に接続し, 同一試料につき, 電気伝導率と紫外吸収 (220 nm) を測定した。  
(a) 4-メチレングルタミン, (b) 4-メチレングルタミンとグルタミンの混合液。



第4図 各種アミノ酸, アミドの分析例  
1, アスパラギン酸; 2, グルタミン酸;  
3, 4-メチレングルタミン酸; 4, グルタミン;  
5, 4-メチレングルタミン。  
ピーク1~3は各 1  $\mu\text{g}$ , 4, 5は各 10  $\mu\text{g}$  の試料を注入した。

ンは, 4-メチレングルタミンよりあとにピークが出現した。

第5図に, 冬(1月17日)に採取したチューリップの根の抽出液の分析例を示した。この時期には, チューリップは根に多量の窒素をグルタミンとして蓄えている。導電率測定の結果(第5図(1)), グルタミンが最も大きなピークを示した。同時に4-メチレングルタミンのピークも確認できた。一方, 紫外吸収測定によるピークの



第5図 冬に採取したチューリップ根内の4-メチレングルタミンの分析

\* カラム非吸着画分に UV 吸収を示す物質が含まれている。定量の結果、グルタミン22.3  $\mu\text{g}$ 、4-メチレングルタミン5.9  $\mu\text{g}$ であった。

保持時間は、4-メチレングルタミンと一致した。このように、グルタミンを多量に含む試料であっても、紫外吸収測定では、グルタミンと4-メチレングルタミンの分別定量が可能であった。

開花時(4月29日)に採取したチューリップの葉および茎の4-メチレングルタミンを、イオンクロマトグラフィー法とアミノ酸アナライザー(日立935型)で分析した。葉においては、それぞれ、1.3 mg/乾物重 g、1.3 mg/乾物重 g、茎においては、4.2 mg/乾物重 g、4.9 mg/乾物重 gであり、両測定結果はよく一致した。

以上の結果から、イオンクロマトグラフィー(カチオ

ンカラム)で、紫外吸収の低い塩酸溶液を溶離液として用いることにより、植物体中の4-メチレングルタミンの定量が可能であることがわかった。

## 文 献

- 1) OHYAMA, T., IKARASHI, T. and BAFA, A.: Nitrogen Accumulation in the Roots of Tulip Plants (*Tulipa gesneriana*). *Soil Sci. Plant Nutr.*, **31**, 581~588 (1985)
- 2) 大山卓爾: 4-メチレングルタミンのチューリップ新鮮葉からの単離, 土肥誌, **57**, 300~303 (1986)
- 3) DONE, J. and FOWDEN, L.: A New Amino Acid Amide in the Groundnut (*Arachis hypogaea*). Evidence of the Occurrence of  $\gamma$ -Methyleneglutamine and  $\gamma$ -Methyleneglutamic Acid. *Biochem. J.*, **51**, 451~458 (1952)
- 4) WINTER, H. C., POWELL, G. K. and DEKKER, E. E.: 4-Methyleneglutamine in Peanut Plants. Dynamics of Formation, Levels, and Turnover in Relation to Other Free Amino Acids. *Plant Physiol.*, **68**, 588~593 (1981)
- 5) SMALL, H., STEVENS, T. S. and BAUMAN, W. C.: Novel Ion Exchange Chromatographic Method Using Conductimetric Detection. *Ann. Chem.*, **47**, 1801~1809 (1975)
- 6) FRITZ, J. S., GJERDE, D. T. and POHLANDT, C. 著, 斎藤紘一訳: イオンクロマトグラフィー, 産業図書, 東京 (1985)
- 7) HAYASHI, H. and CHINO, M.: Collection of Pure Phloem Sap from Wheat and Its Chemical Composition. *Plant Cell Physiol.*, **27**, 1387~1393 (1986)