HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ガスクロマトグラフィーによるアミノ酸定量分析について
Author(s)	国崎, 直道; 米田, 勤; 石原, 義雄
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 20(3), 193-201
Issue Date	1969-11
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23393
Type	bulletin (article)
File Information	20(3)_P193-201.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ガスクロマトグラフィーによるアミノ酸定量分析について

国崎直道*・米田　勤*・石原義雄*

Quantitative Analysis of Amino Acids by Gas-Liquid Chromatography and Its Application

Naomichi KUNISAKI, Tsutomu YONEDA and Yoshio ISHIHARA

Abstract

The method of gas-liquid chromatography was developed recently by Gehrke and his coworkers on the quantitative analysis of amino acids with a preparation of N-trifluoroacetyl amino acid n-butyl esters. We attempted to analyze amino acids using their method with some modifications, concerning reproducibility and its actual application to biological products.

As to amino acids found in proteins except histidine and cystine the reproducibility was very good, but tryptophan and arginine were not quantitative. Moreover, the accuracy of this method was estimated by comparison with amino acid auto-analysis using casein hydrolysate. For biological products, free amino acids in salmon eggs were analyzed before and after fertilization.

緒　　言

近年ガスクロマトグラフィーによる分析技術は著しく進歩し種々の微量成分の検出・定量に利用されてるところであるが，アミノ酸定量分析にも応用されるようになった。アミノ酸の定量分析には，微生物法とかロ紙・薄層・イオン交換のクロマトグラフィーなどがあるが，いずれも限られた微量の生体試料について行なうには適当な方法とはいい難い。イオン交換樹脂を用いたアミノ酸自動分析計による方法は優れたものであるが，なお相当量の検体を要し分析時間・費用の点でも問題なしとし得ない。そこでガスクロマトグラフィーによる分析法が考えられるに至った。この方法が確立されると微量の試料（アミノ酸量 10^{-9} mole 又は之以下でも可能）を極めて迅速に多数分析でき，しかも経済的でその応用面も巾広くなり，水産動植物の比較生化学的研究のためのアミノ酸微量定量法として極めて有効な分析手段と考える。

アミノ酸をガスクロマトグラフィーで定量分析を行なうためには，まず揮発性の誘導体に(常に定量的に)変えることが必要で，これまでに N-アセチルアミルエステル，DNP-メチルエステル，フェニルチオヒダントイン誘導体などが研究されて来たが，分離性・定量性共にトリフルオルアセチル(TFA)ブチルエステル誘導体が最も適しており，カラム充塡剤の改良とあいまちガスクロマトグラフィーによるアミノ酸定量分析もほぼ完成されるに至った[1-7]。種々の生体試料についてもアミノ酸自動分析計による定量値と比較しガスクロマトグラフィーの分析精度の高いことが認められている[8]。特に Gehrke ら[9-13] は蛋白構成アミノ酸 20 種について詳細な報告を行なっている。

ここに通常の蛋白構成アミノ酸 20 種の分離定量を目標に，TFA-エステル法によるガスクロマトグ

* 北海道大学水産学部水産高分子化学講座
(*Laboratory of High Polymer Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkido University*)

ラフィーを生体試料分析に応用するための基礎的研究を行ない，さらにサケ卵の遊離アミノ酸定量を試みたので報告する。

実 験 方 法

試料および試薬

標準アミノ酸は和光純薬工業 K.K. と味の素 K.K. 製，カゼインは Merck 製，試薬のメタノール・ブタノール・メチレンクロライド・クロロホルムおよび無水トリフルオル酢酸 (TFAA) は和光純薬工業 K.K. 製のものをそれぞれ使用した。

試薬の調製

無水塩酸メタノール： 特級メタノール 500 ml に金属マグネシウム約 2g を投入して 1 昼夜放置，含有する水を $Mg(OH)_2$ として除去後ガラス製蒸溜装置で再溜して精製，得られた無水メタノールに乾燥塩化水素を導入（この濃度はアルカリ滴定で 1.25±0.10 規定に調整）して調製した。

無水塩酸ブタノール・無水メチレンクロライド： 上記と同様に金属マグネシウム処理して調製。またエステル化・アセチル化などの定量的反応遂行のためすべて完全に乾燥した器具類を使用することに留意した。

使用機器および測定条件

島津製ガスクロマトグラフ GC-4A PTF を用い，充塡剤は最も分離能が優れていると考えられる EGSS-X (Ethylene glycol succinate methyl silicone polymer) 0.25%，DEGS (Diethylene glycol succinate) 0.75% を Chromosorb W にコーティングしたものを用い内径 4 mm 長さ 1.0 m のガラスカラムによって分析を行なった。その他測定条件は Table 1 に示す。

Table 1. Instrumental and chromatographic conditions

Instrumental conditions:	
Shimazu gas chromatograph GC-4A PTF	
Column temperature	(60°–210°C)
Program rate	4°C/min.
Detector temperature	230°C
Injection temperature	245°C
Sensitivity, (range)	10^2, (0.4)
Carrier flow rate, N_2	40 ml/min.
Air	0.6 Kg/cm²
Hydrogen	0.5 Kg/cm²
Chart speed	5 mm/min.
Column system:	
EGSS-X 0.25%, DEGS 0.75%	
Chromosorb W (60–80 mesh)	
One meter × 4 mm i.d. glass column	

実験結果および考察

1. 標準アミノ酸のガスクロマトグラフィー

a) アミノ酸のエステル化： 標準アミノ酸 20 種各 5 mg を精秤し 50 ml ナス型フラスコに取り，無水塩酸メタノール 20 ml を加え密栓して室温 30 分間時々振盪してエステル化を行ない，過剰のメタノール，塩酸および生成した水を 60°±5°C で減圧溜去後無水塩酸ブタノール 20 ml を加え乾燥管

を付して 100°±5°C で 150 分間容器を回転攪拌して エステル交換を行なった。次に過剰の無水塩酸ブタノールを 60°±5°C で完全に減圧溜去しアミノ酸の n-ブチルエステル塩酸塩を得た。

b) トリフルオルアセチル化： 上記アミノ酸の n-ブチルエステル塩酸塩に無水メチレンクロライド 10 ml と TFAA 0.1 ml を加えて溶解，この溶液 50 μl をマイクロシリンジでアンプル（内径 7mm 程度の肉厚ガラス管の両端を細く引いたもの）に取り，さらに TFAA 50 μl を加え封管，これを 150°±5°C で 10 分間反応させアセチル化を行ない，冷却後開管し過剰のメチレンクロライド・TFAA を室温下減圧除去した。ここに得られた N-トリフルオルアセチル n-ブチルエステル誘導体を 0.5 ml クロロホルムに溶解してその 3 μl を供試，得られたクロマトグラムを Fig. 1 に示す。

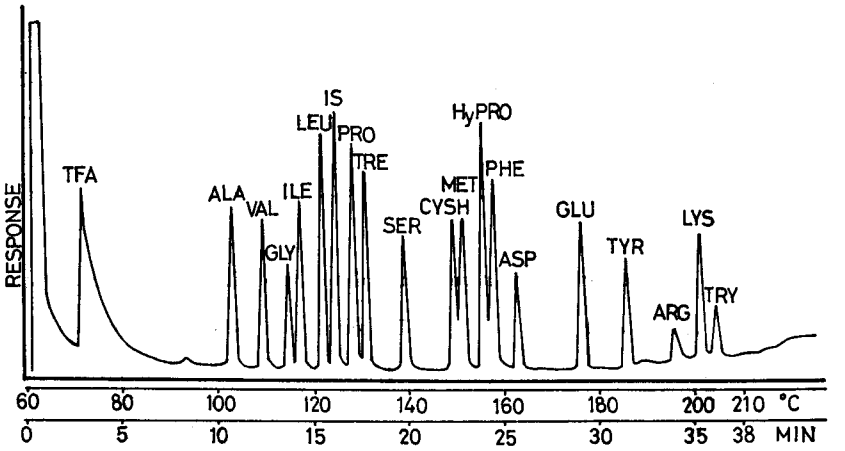


Fig. 1. Chromatogram of n-butyl N-trifluoroacetyl amino acid esters.
IS (Internal Standard): Norleucine
Chromatographic conditions are the same as shown in Table 1

c) 定量処理： 内部標準物質 (IS) は種々検討して DL-ノルロイシンを選び，クロマトグラムのピーク面積はガスクロマトグラフに内装するインテグレーターによってカウント数として表わされるが，各アミノ酸のピーク面積は固有の値を取るので，そのカウント数を重量に換算するための係数 (Factor) も亦各アミノ酸固有の値を与えるが Table 2 は 7 回繰返し測定した値の平均とその標準偏差を示したものである。

ガスクロマトグラフィーのためのアミノ酸誘導体には前記の如く種々のものが報告[1-6, 11] されているが，これらは蛋白構成アミノ酸 20 種に必ずしもすべて適応できない。たとえば N-トリフルオルアセチル n-メチルエステルでは蒸気圧が高くなり過ぎて一部損失するという欠点があり，ピーク相互の分離は可能でも定量的ではない。ただし定性的には比較的簡便な方法であり利用価値も高いと思われる。これに対して Gehrke ら[10-13] の N-トリフルオル n-ブチルエステル誘導体は各段階の反応が定量的に行なわれるため再現性が非常に高い。

誘導体の合成段階で無水塩酸メタノールおよび無水塩酸ブタノールの塩酸濃度を 1.25±0.10 規定とする前は，触媒としての塩酸濃度をほぼ飽和状態として使用したが，再現性の点で前者の方が遙かに優れていることが判明した。

カラムについては当初 2 m のステンレス製を使用して分析を試みたが，揮発性の低い塩基性アミノ酸の分離が不良であった。またシスティンとメチオニンのような保持時間の近接したものも分離不充分で，しかも 1 種類のアミノ酸誘導体から数個の小さなピークが認められた。この点ガラスカラム

を用いるオンカラムシステムでは注入部の高温による分解が避けられ，単一のピークが個々のアミノ酸について得られるに至った。

同定には個々のアミノ酸の誘導体を合成しその保持時間から判定したが，トリプトファンの場合室温下のアセチル化では2個のピークに分れた。これはインドール核のアミノ基が完全にアセチル化されずにジアシル誘導体とモノアシル誘導体の2つになるなるためと考えられる。しかし上記のように高温でアセチル化を行なった場合には単一のピークが得られ，他のアミノ酸との分離も完全でその上時間の一層の短縮も可能となるに至った。

塩基性アミノ酸ヒスチジンおよびジスルフィド結合をもつシスチンは分離できなかった。またアルギニンも他のアミノ酸のピークに比べかなり小さいことが指摘される。標準偏差はアルギニンを除いて0に近く定量分析を行なうのに充分再現性があることを示している。トリプトファン・メチオニン・セリン次いでシスティンの偏差がやや大きいが数回の平均を取る時は妥当な数値を与える。

これらからガスクロマトグラフィーで一部を除いてアミノ酸の分離定量がほぼ完全に行なえるものと考えられる。今回の実験で分離できなかった前記のヒスチジン・シスチンさらに定量性に問題を残したアルギニンの3種アミノ酸については検討の余地を残した。しかし Gehrke の最近の報告[14]で示された OV-17 (Phenylmethylsiloxane) を充塡剤に使用すればこれらも分離定量が可能と思われ検討中である。

Table 2. The factor and relative standard deviation for each amino acid

Amino acid	Factor	Standard deviation
Alanine	1.024	0.062
Valine	1.125	0.071
Glycine	1.074	0.067
Isoleucine	1.014	0.069
Leucine	1.059	0.052
Proline	1.103	0.055
Threonine	1.146	0.056
Serine	1.188	0.136
Cysteine	1.405	0.109
Methionine	1.463	0.144
Hydroxyproline	1.165	0.080
Phenylalanine	0.929	0.064
Aspartic acid	1.007	0.080
Glutamic acid	0.977	0.059
Tyrosine	1.998	0.076
Arginine	13.344	2.283
Lysine	1.222	0.058
Tryptophan	2.550	0.252

2. ガスクロマトグラフィーによるカゼインのアミノ酸分析

本分析法の精度を見るために，カゼインについてアミノ酸オートアナライザーによる分析値との対比を試みた。カゼインを精秤し IS として DL-ノルロイシンの 40 mg % 水溶液 1 ml と 12 N-HCl 1.0 ml を加えて溶解後減圧封管の下で常法通り加水分解を行ない Dowex 50W-X8 (H^+型，100～200 mesh，1.1×6 cm) にアミノ酸を吸着，50 ml の水で洗滌後 2N-NH_4OH 100 ml で溶出，これを 50°±5°C でロータリーエバポレーターで減圧下濃縮乾固後さらに少量の水を加えて減圧濃縮を繰返

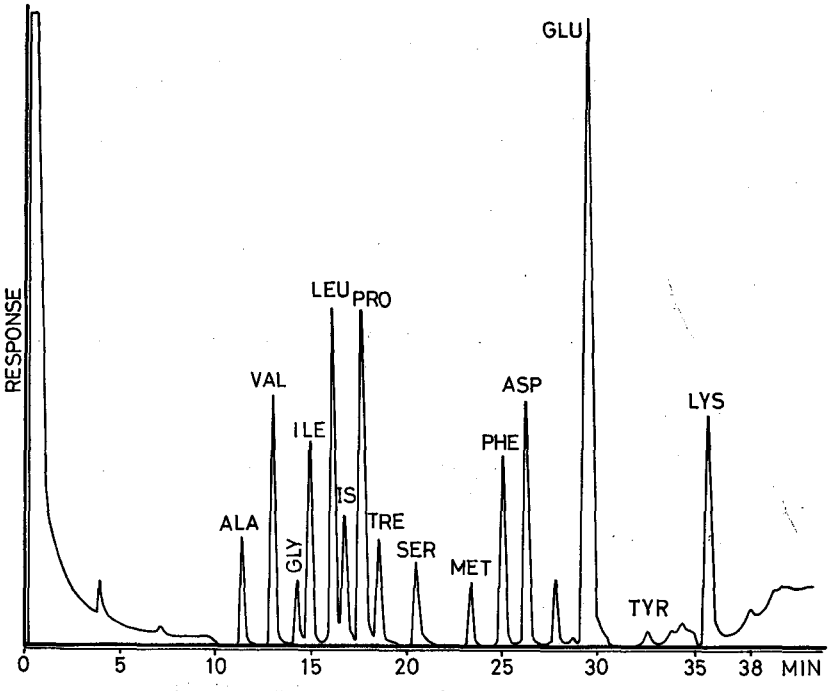


Fig. 2. Chromatogram of casein hydrolysate

Table 3. Amino acid analysis of casein

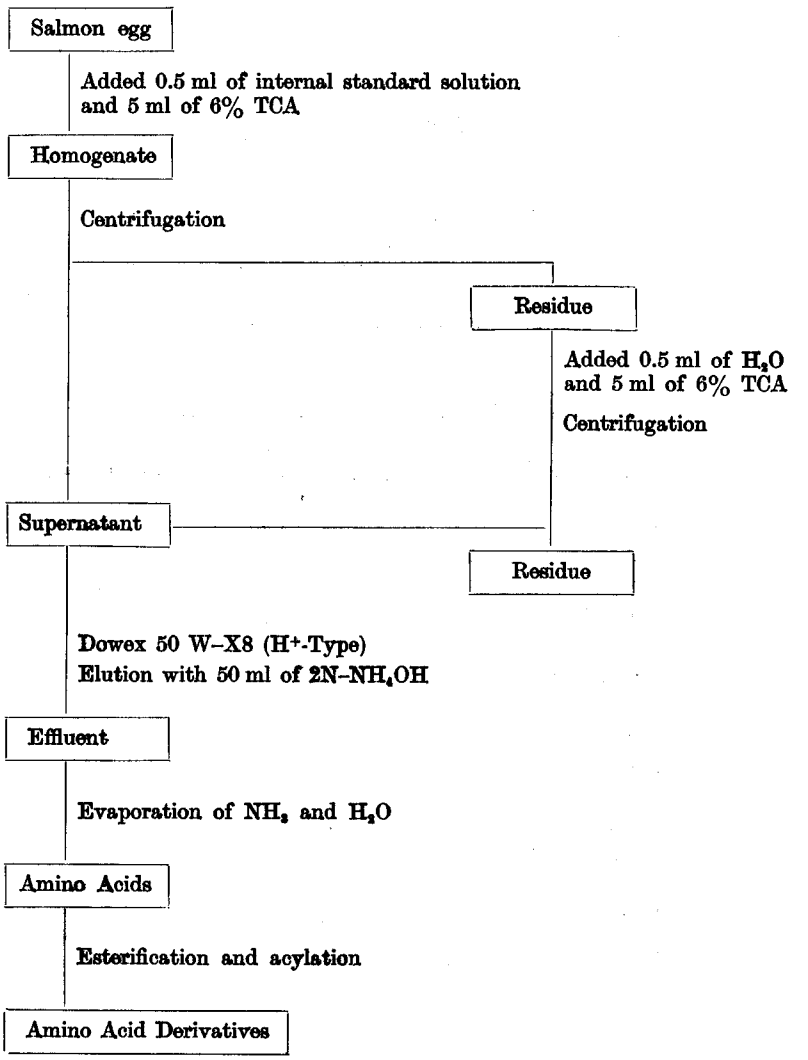
Amino acid	Gas-liquid chromatography	Ion exchange
Alanine	2.79 (%)	3.15 (%)
Valine	7.51	7.40
Glycine	1.81	1.81
Isoleucine	5.70	5.20
Leucine	10.26	9.42
Proline	12.09	10.64
Threonine	3.55	3.75
Serine	6.92	6.76
Methionine	2.42	2.47
Phenylalanine	5.07	5.13
Aspartic acid	7.66	7.45
Glutamic acid	23.55	22.26
Lysine	9.36	8.42
Tyrosine	1.26	6.35
Total	99.95	100.21

してアンモニアを完全に溜去し，得られたアミノ酸は上記の方法により処理して誘導体とした。

これを 0.5 ml クロロホルムに溶解しその一定量を供試して得られたクロマトグラムを Fig. 2 に示す。アミノ酸重量は Table 2 の Factor を用いて計算し，これをアミノ酸オートアナライザーで測定した値と比較して Table 3 に示した。

カゼイン構成アミノ酸ではチロシンを除いて他はアミノ酸自動分析値と良く一致している。このように一部のアミノ酸を除いて，ガスクロマトグラフィーによる天然物のアミノ酸定量分析も可能で，その費用も比較的少なく多数の試料を微量で迅速に処理できる長所は種々の生化学的応用に充分活用できるものと判断される。前記の OV-17 カラム使用でアルギニン・ヒスチジン・シスチンならびにこのチロシンの分離定量が完成されるとさらに完璧なものとなろう。

Scheme 1. Extraction of amino acids from salmon eggs and preparation of their derivatives



3. サケ卵の遊離アミノ酸分析

ガスクロマトグラフィーによるアミノ酸の微量定量分析は特に生体内遊離アミノ酸の消長を追跡する手段として極めて有効と考える。発生の生化学的研究は水産増殖の面でも重要であるが，硬骨魚のこの方面の研究は他の背椎動物に比べて少なく今後発展させなければならぬ分野であろう。ここにサケ卵について発生に伴なう遊離アミノ酸含量の変化の分析を試みた。

1968年10月北海道上磯町茂辺地川で捕獲したサケ (*Onchorhynchus keta*) の成熟未受精卵，受精後20日・25～30日・40～50日後のものについてそれぞれ Scheme 1 に従って処理して得られた遊離アミノ酸クロマトグラムを Fig. 3～6 に示す。全般的に見てグルタミン酸・アスパラギン酸が圧倒的に多く，次いでセリン・ロイシン・バリンが比較的高含量を示す。グルタミン酸・アスパラギン酸の多量存在は渡辺[15] らも指摘している。未同定物質 U_1・U_2・U_3 が存在し特に U_1 は大量で発生の後期

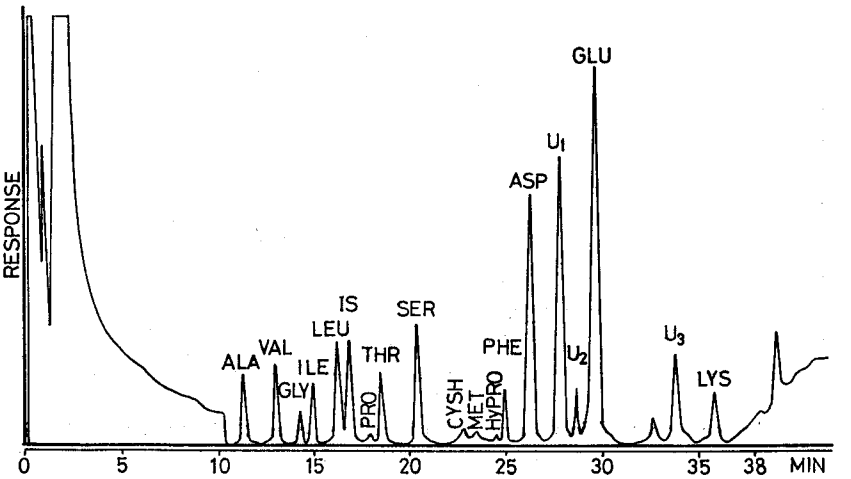


Fig. 3. Chromatogram of free amino acids in salmon eggs before fertilization

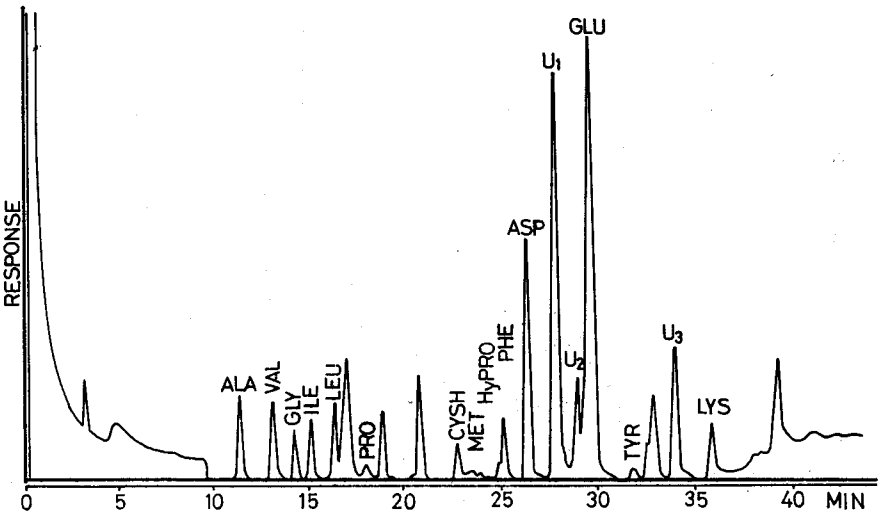


Fig. 4. Chromatogram of free amino acids in salmon eggs 20 days after fertilization

でも増量を示し最大の含量を示すに至る。渡辺らのペプタイド X_1-X_6 と関連がありそうである。受精後20日（発眼期頃）には大量存在のグルタミン酸の増アスパラギン酸の減 U_1 の著増があり，他にセリン・ロイシンの減，グリシン・U_2・U_3 の増が認められる。受精後25～30日ではアスパラギン酸・グルタミン酸共に減少，U_1 は増大を続けるが U_2・U_3 はそのままである。一方，フェニルアラニンの急増とスレオニン・アラニンの減少が見受けられる。受精後40～50日になると引続きグルタミン

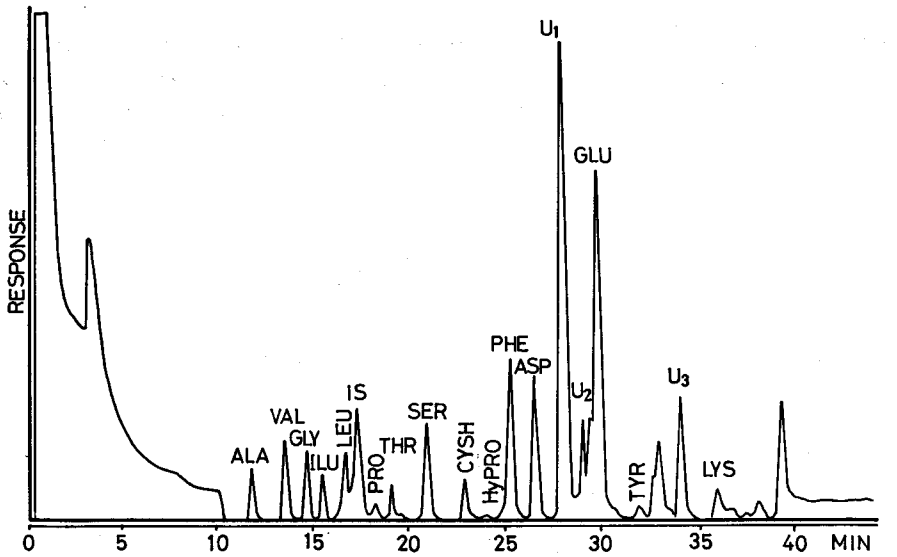


Fig. 5. Chromatogram of free amino acids in salmon eggs 25–30 days after fertilization

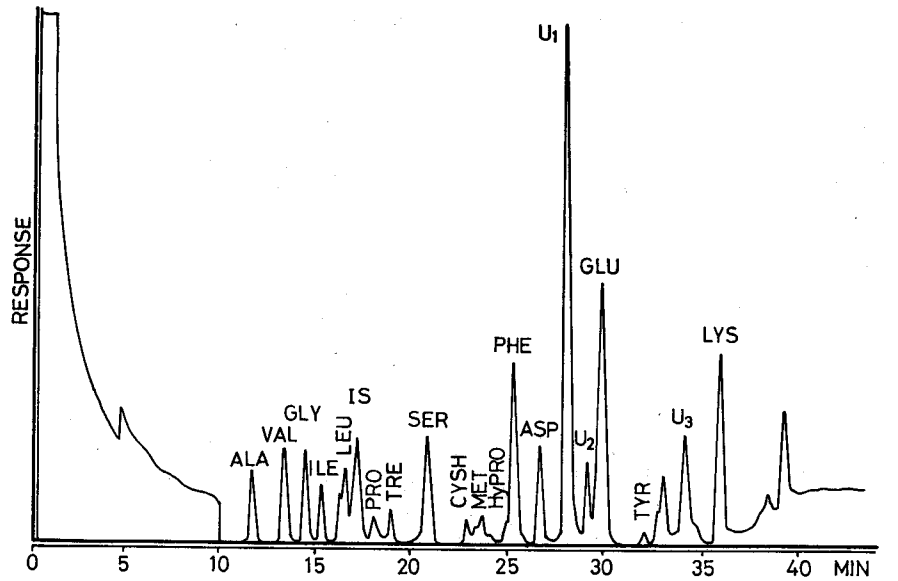


Fig. 6. Chromatogram of free amino acids in salmon eggs 40–50 days after fertilization

酸・アスパラギン酸が減少するが U_1 は更に増大を続ける。またグリシン・バリン・アラニンも増大しているがこの期でのリジンの急増が注目される。

各組織の遊離アミノ酸量は蛋白質の合成・分解，核酸塩基その他生理活性物質（アドレナリン・チロキシン・セロトニンなど）の生成およびエネルギー代謝等に広範囲にわたり密接な関係にあるが，血漿中遊離アミノ酸と共に含有量がほぼ一定に保持されその恒常性が維持されているが，種々の生理的条件下ではそのパターンに変動を与えるのでいろいろの解析手段となり得る。最近これを病理学的・栄養学的に応用されてるところであるが，生命現象の発現・活動という激しい生理現象が短時日の間に進行していく魚卵発生段階では当然かなり大きな遊離アミノ酸パターンの変動が推定される。ガスクロマトグラフィーにより比較的容易に多数の分析値を集積しこれを総合的に検討することによって短時日に研究を展開することが可能と考えられる。今後組織化学・酵素化学的手技も併用して魚卵発生におけるその生化学的意義を解明，さらに病変などによる変動も究明し水産蛋白資料増殖のための基礎的資料としたいと願っている次第である。

要　　約

(1) 0.25 % EGSS-X, 0.75 % DEGS, Chromosorb W (60-80 mesh) を充塡剤とし 4 mm×1.0 m のガラスカラムを用いて，N-トリフルオルアセチル n-ブチルエステル法によるガスクロマトグラフィーで 20 種標準アミノ酸の定量分析を検討し，ヒスチジン・シスチン・アルギニンを除いて他は測定可能と認められた。

(2) カゼインのアミノ酸分析についてガスクロマトグラフィーとオートアナライザーによる数値を比較しチロシン以外は良く一致することを確認した。

(3) サケ卵の種々発生段階における遊離アミノ酸をガスクロマトグラフィーで測定しそのパターンにかなりの変動のあることを示した。全般的にグルタミン酸・アスパラギン酸が極めて多量次いでセリン・ロイシン・バリンが比較的多く存在し他に未同定物質 U_1（特に多量存在し発生後期では最も大きなピークとなる）・U_2・U_3 あり，後期にはグルタミン酸・アスパラギン酸の大巾の減少とフェニルアラニン・リジンの急増が認められる。

おわりに，試料を提供された北海道上磯郡茂辺地漁業協同組合並びに発生段階の観察をお願いした当水産学部小野里坦氏に厚く謝意を表す。

文　　献

1) Zlatkis, A., Oro, J.F. & Kimball, A.P. (1960). *Anal. Chem.* **32**. 162.
2) Johnson, D.E., Scott, S.J. & Meister, A. (1961). *Ibid.* **33**, 669.
3) Zomzely, C., Marco, G. & Emery, E. (1962). *Ibid.* **34**, 11.
4) Cruickshank, P.A. & Sheehan, J.C. (1964). *Ibid.* **36**, 7.
5) Makisumi, S. & Saroff, H.A. (1965), *J. of G.C.* **3**, 21.
6) Darbre, A. & Islam, A. (1968). *Biochem. J.* **106**, 923.
7) 舟坂　渡・池川信夫 (1968).　最新ガスクロマトグラフィー　応用篇 668 p. 東京；広川書店.
8) 富田一郎 (1967).　蛋白質・核酸・酵素 **12**, 1069.
9) Gehrke, C.W., Lamkin, W.M., Stalling, D.L. & Shahrokhi, F. (1965). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **19**, 328.
10) Stalling, D.L. & Gehrke, C.W. (1966). *Ibid.* **22**, 3.
11) Gehrke, C.W. & Shahrokhi, F. (1966). *Anal. Chem.* **15**, 97.
12) Stalling, D.L., Gille, G. & Gehrke, C.W. (1967). *Ibid.* **18**, 118.
13) Lamkin, W.M. & Gehrke, C.W. (1968). *Ibid.* **37**, 383.
14) Gehrke, C.W., Zumwalt, R.W. & Wall, L.L. (1969). *in press.*　(私信)
15) 渡辺俊夫・西田秀夫 (1967).　生化 **39**, 10.