



Title	タンパク質構成アミノ酸のガスクロマトグラフィー
Author(s)	吉田, 雅彦; YOSHIDA, Norihiko; 米田, 勤 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 28(3), 165-173
Issue Date	1977-08
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/23616">https://hdl.handle.net/2115/23616</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	28(3)_P165-173.pdf



タンパク質構成アミノ酸のガスクロマトグラフィー

吉田 雅彦\*・米田 勤\*・石原 義雄\*

Gas-Liquid Chromatography of N-Trifluoroacetyl  
n-Butyl Esters of Protein Amino Acids

Norihiko YOSHIDA\*, Tsutomu YONEDA\* and  
Yoshio ISHIHARA\*

Abstract

In the previous paper, we reported a gas-liquid chromatographic analysis of N-trifluoroacetyl n-butyl esters of protein amino acids, however histidine and cystine were not detected and arginine was not sufficient quantitatively on single column of EGSS-X·DEGS. For resolution of these problems the second column of OV-17 was employed and a good result was obtained. Quantitative responses were obtained from 0.1  $\mu$ mole of all protein amino acids except histidine using double column system (EGSS-X·DEGS and OV-17). Only histidine was necessary 0.4  $\mu$ moles for quantitative analysis. Usually 0.4  $\mu$ moles of histidine was added to sample as carrier prior to derivatization. On estimating the chromatogram, better results were obtained from peak length than peak area and made sure by the standard deviation of relative response to that of internal standard. By this procedure all protein amino acids could be easily converted to N-trifluoroacetyl n-butyl esters within 1 hour and only 0.2 mg of protein was required for quantitative analysis. We attempted to analyze amino acid of five different proteins respectively by the described method and results were compared to that of amino acid auto-analyzer (with ion-exchange resin) already reported by other authors.

諸 言

タンパク質構成アミノ酸の分析は、生化学の分野ばかりでなく、生理学・栄養学においても重要であり、その分析手段について種々検討されてきた。近年イオン交換樹脂を用いた自動分析計の改良によりその分析は比較的簡便になったが、測定時間・費用・必要検体量などに若干問題を残している。一方、微量成分の分析に大きな役割を果たしてきたガスクロマトグラフィー (GLC) を用いてアミノ酸分析は、1956年 Hunter ら<sup>1)</sup> が試みて以来数多くの報告がある。しかしアミノ酸はそのまま GLC で分析することはほとんど不可能であり、ニンヒドリンによる酸化<sup>1)2)</sup>・脱炭酸・エステル化<sup>3)4)</sup>・アシル化などによって揮発性物質への変換が行われ<sup>5)6)</sup>、アミノ酸の N-acetyl n-butyl ester<sup>7)</sup>・N-acetyl amyl ester<sup>8)</sup>・N-trifluoroacetyl n-amyl ester<sup>9)</sup>・N-trifluoroacetyl n-methyl ester<sup>10)-11)</sup>・N-trimethylsilyl trimethyl ester<sup>12)</sup>・N-acetyl ethyl ester<sup>13)</sup> など報告されているが、定量的な誘導体化やピークのレス

\* 北海道大学水産学部水産高分子化学講座  
(Laboratory of Polymer Chemistry of Marine Products, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate)

ボンズ・分離などに問題を残していた。1962年 Zomzelyら<sup>17)</sup>が報告し、その後 Gehrke と彼の共同研究者<sup>18)-32)</sup>によって研究されているアミノ酸の N-trifluoroacetyl n-butyl ester (TAB) 誘導体は、分離と定量に非常に優れた誘導体であり、その実際の応用例など<sup>33)-35)</sup>も他の誘導体に比べて多いが、エステル化・アシル化の誘導体合成のむづかしさから、報告どおりの十分なアミノ酸ピークを得ることは困難であった。

当研究室においても、1968年以來 TAB 誘導体を EGSS-X・DEGS カラムで分析し<sup>36)</sup>、タンパク質構成アミノ酸中、ヒスチジン・シスチン・アルギニンに問題を残したが、サケ血清の遊離アミノ酸の定量などに応用した<sup>37)38)</sup>。その後、OV-17 カラムを用いることによってシスチン・アルギニンの分離定量が可能となり、また Roach and Gehrke<sup>21)</sup>によりエステル化の時間短縮が行われた。アミノ酸の試料は当初 1  $\mu\text{mole}$  で分析を行っていたが、その後ヒスチジンを除くすべてのアミノ酸は、0.1  $\mu\text{mole}$  で分析可能とする技術を確認するに至った。ヒスチジンのみは最小限 0.3  $\mu\text{mole}$  を要するが、あらかじめ試料に添加することにより分析が可能となった。一方、クロマトグラムからの定量は、ピークの面積よりも高さを基準とする方が、より定量値の精度が高く再現性も良いことを確めた。これらの方法により、5種類のタンパク質のアミノ酸分析を行い、既報のアミノ酸自動分析計を用いた分析値との比較を試みたので、併せて報告する。

## 実験方法

### 試料・試薬・使用機器

標準アミノ酸は味の素 K, K. と和光純薬工業 K, K. 製、インシュリンは Sigma Chemical Co. 製、血清アルブミン・ $\alpha$ -キモトリプシン・オバルブミンは Boehringer Mannheim 製、カゼインおよび沸点塩酸 (5.7N) は和光純薬工業 K, K. 製、n-ブタノール・ジクロロメタン・無水トリフルオロ酢酸 (TFAA) は半井化学薬品 K, K. 製のものをそれぞれ使用した。

無水塩酸ブタノールは特級 n-ブタノールに金属マグネシウムを投入して一昼夜放置後、総ガラス製蒸留装置に乾燥管を付けて蒸留し、これに 99.9% 塩化水素ガスを吹き込み、その濃度を  $3 \pm 0.1$  規定に調製しアルカリ滴定で確認した。無水ジクロロメタンも n-ブタノールと同様に蒸留し、これらの試薬はデシケーター中に貯蔵した。

ガスクロマトグラフは島津製作所製 GC-4A PTF 型および自動平衡記録計 250 AO11 型を用いた。カラム用充てん剤は日本クロマト工業 K, K. 製の EGSS-X・DEGS (0.25% ethylene glycol succinate・0.75% diethylene glycol succinate poly ester, chromosorb W 60-80 mesh) と OV-17 (1.5% silicon OV-17, chromosorb W 80-100 mesh) を用いた。充てん剤はそれぞれ  $1\text{m} \times 4\text{mm}$  ID と  $1.5\text{m} \times 4\text{mm}$  ID のガラスカラムに振動させながら隙のないように充てんし、60-210°C まで 2°C/min で昇温させた後、210°C でクロマトグラムのベースラインが安定するまでエイジングした。

### アミノ酸誘導体調製法

i) n-ブチルエステル化 アミノ酸 (標準溶液は各 0.1  $\mu\text{mole}$  濃度) を重クロム酸混液で洗浄した試験管 (10×110mm) に取り、水分を 40°C で減圧除去した。これに無水塩酸ブタノール 300  $\mu\text{l}$  を加えて約 60 秒間超音波処理で試料を完全に溶解させた後、100°C のグリセリンバス中で 15 分間ブチル化を行い、終了後塩酸ブタノールを 40°C で減圧除去した。

ii) トリフルオロアセチル化 上記のアミノ酸の n-ブチルエステルに無水ジクロロメタン 30  $\mu\text{l}$  と TFAA 10  $\mu\text{l}$  を加えて封管後 15 秒間超音波処理で溶解し、150°C で 10 分間反応させた。得られたアミノ酸の TAB 誘導体を室温まで冷却後、その 3-5  $\mu\text{l}$  を供試した。以上の概略は図 1 に示した。

Protein hydrolysate  
 add 0.4 ml of 1 mM His (in 0.1N HCl)  
 evaporate  
 add 300  $\mu$ l of 3N HCl n-BuOH  
 esterize for 15 min at 100°C  
 evaporate  
 Butyl ester of amino acid  
 add 30  $\mu$ l of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and 10  $\mu$ l of TFAA  
 acylate for 10 min at 150°C  
 N-trifluoroacetyl n-butyl ester of amino acid

Fig. 1. Procedure of amino acid derivatization.

### タンパク質の加水分解と精製

試料タンパク質に内部標準溶液 (IS, 1.0  $\mu$ mole ノルロイシン/1.0 ml 定沸点塩酸) 0.1 ml と定沸点塩酸 0.5 ml を加えて常法どおり, 110°C, 24・72 時間加水分解を行い塩酸を 40°C で減圧除去した。この加水分解物中に糖などの物質が含まれる場合には, イオン交換樹脂 (DOWEX 50 X-8) にアミノ酸を吸着させ, 蒸留水で洗浄, 1N アンモニア水で溶出した後, アンモニア水を 40°C で減圧除去してアミノ酸の精製を行った。

### ガスクロマトグラフィー

GLC は表 1 に示した条件で行った。

Table 1. Conditions for gas-liquid chromatography.

	EGSS-X·DEGS	OV-17
Column temperature:		
Initial (°C)	60	80
Final (°C)	210	210
Temperature programming rate (°C/min)	4	6
Detector oven temperature (°C)	245	245
Injection port temperature (°C)	240	240
Sensitivity (M $\Omega$ )	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>
Range (V)	0.4	0.4
Gas flow rate		
Hydrogen (Kg/cm <sup>2</sup> )	0.6	0.6
Air (Kg/cm <sup>2</sup> )	0.9	0.9
Carrier gas: N <sub>2</sub> (ml/min)	40	60
Chart speed (mm/min)	5	5
Sample volume ( $\mu$ l)	1-10	1-10

### 定量処理

クロマトグラムからの各アミノ酸 TAB 誘導体のピークの同定は IS との保持時間の比で行い, 定量は IS とのピークの高さの比 R. R. (Relative Response) で行った。

### 実験結果および考察

標準アミノ酸の TAB 誘導体を EGSS-X·DEGS, OV-17 で分析した時のクロマトグラムをそれぞれ図 2・3 に示した。EGSS-X·DEGS における各アミノ酸誘導体は分離が良く, 多くは明瞭な単独のピークを与える。しかしプロリンとスレオニンが重なり, またアルギニン・ヒスチジン・シスチン

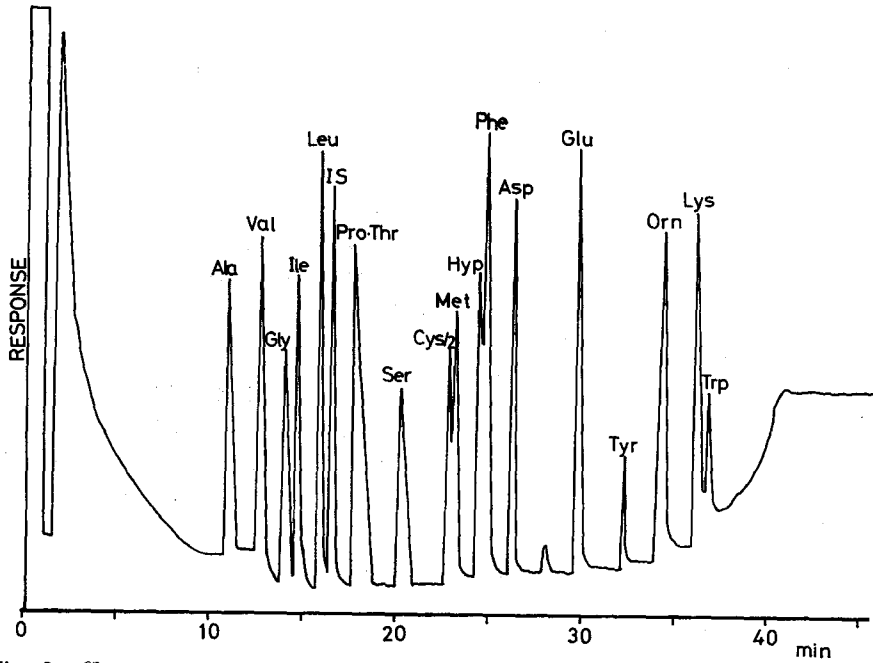


Fig. 2. Chromatogram of N-trifluoroacetyl n-butyl esters of amino acid on EGSS-X-DEGS.

IS: norleucine, Cys/2: cysteine, Hyp: hydroxyproline, Orn: ornithine, Cys: cystine.

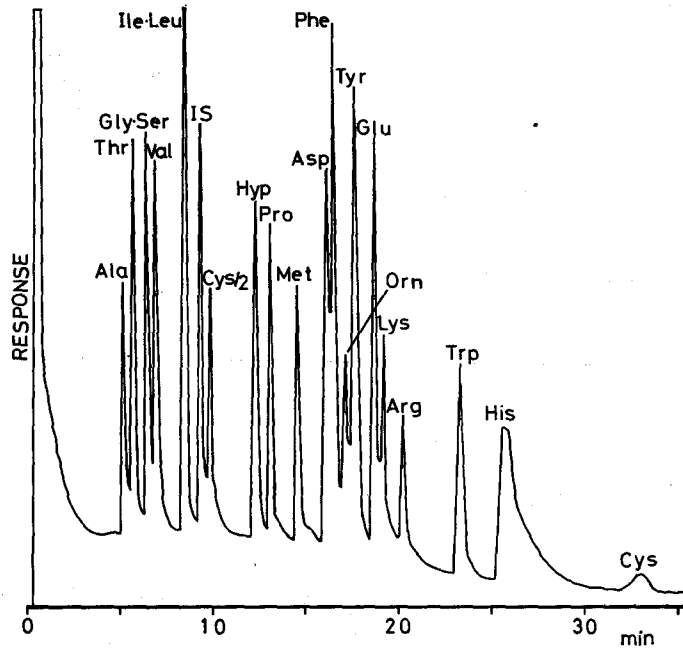


Fig. 3. Chromatogram of N-trifluoroacetyl n-butyl esters of amino acid on OV-17.

はピークを示さない。他方、OV-17においても各誘導体は分離が良く、EGSS-X·DEGS では分析できなかったスレオニン・プロリン・アルギニン・ヒスチジン・シスチンの分析が可能であり、この2種類の充てん剤を用いれば、タンパク質構成アミノ酸 20 種類の分析が可能と認められた。OV-17 においてヒスチジンとシスチンのピークは他のピークに比べると多少テーリングするが分析には何ら問題はない。オルニチンはノルロイシンが IS として使用できない時、第二の IS として用いることができる。

Table 2. Retention time of the *N*-trifluoroacetyl *n*-butyl esters of amino acids.

EGSS-X·DEGS		OV-17	
Amino acid	Retention time (min)	Amino acid	Retention time (min)
Ala	11.02	Ala	5.24
Val	12.92	Thr	5.86
Gly	13.88	Gly	6.42
Ile	14.86	Ser	6.58
Leu	16.20	Val	7.02
IS	16.80	Leu	8.56
Pro	18.02	Ile	8.64
Thr	18.02	Is	9.50
Ser	20.24	Cys/2	9.80
Cys/2	22.81	Hyp	12.42
Met	23.18	Pro	13.12
Hyp	24.16	Met	14.62
Phe	25.00	Asp	16.18
Asp	26.36	Phe	16.52
Glu	29.68	Orn	17.02
Tyr	32.00	Tyr	17.62
Orn	33.36	Glu	18.60
Lys	35.28	Lys	19.06
Trp	36.04	Arg	20.08
		Trp	23.08
		His	25.06
		Cys	31.82

前報<sup>36)</sup>では定量操作はピークの面積値を求めて行ったが、今回は定量操作の検討を行い、ピークの高さを測定して分析する場合との比較を試みた。表3に内部標準 IS に対するアミノ酸の R, R. の比較を示した。R, R. の平均値は各アミノ酸 0.1  $\mu$ mole の TAB 誘導体を 9-10 回個別に調製し、それぞれのクロマトグラムの測定値の平均であり、平均値の標準偏差 (S. D.) は R, R. の定量値の精度をみるために求めた。その結果、ピークの高さを測定するよりも、面積値を測定するよりも、高さを測定した場合に小さな標準偏差、すなわち高い精度が得られることがわかる。また図 2-3 のクロマトグラムに見られるシステインとメチオニン・ヒドロキシプロリンとフェニールアラニン、アスパラギン酸とフェニールアラニン・グルタミン酸とリジンなどのように、ピークが接近している場合には、特にその高さを測定するほうが定量処理を行うにも簡便であり、実用性に富んでいると考えられる。この場合、タンパク質構成アミノ酸のうちヒスチジンを欠いているが、ヒスチジンは他のアミノ酸と同濃度では OV-17 を用いてもピークを与えないが、0.3  $\mu$ mole 以上の濃度になるとピークが現われることを認めたので、ヒスチジンの濃度とその IS (0.1  $\mu$ mole) に対する R, R. を測定した。結果を図 4 に示した。検量線は直線を示し、他のアミノ酸と同程度の R, R. を示すヒスチジン濃度は、0.4  $\mu$ mole 程度であることがわか

Table 3. Comparison of the peak length with the peak area at quantitative analysis of amino acids.

Amino acid	R.R. from Peak Length		R.R. from Peak Area	
	Average	S.D.	Average	S.D.
Ala	0.69	0.025	0.67	0.032
Val	0.79	0.043	0.72	0.042
Gly	0.56	0.017	0.54	0.029
Ile	0.65	0.020	0.60	0.049
Leu	1.25	0.030	0.97	0.041
Ser	0.55	0.014	0.48	0.034
Cys/2	0.48	0.015	0.50	0.032
Met	0.84	0.021	0.81	0.035
Hyp	0.83	0.020	0.82	0.053
Phe	1.19	0.022	1.14	0.062
Asp	0.84	0.025	0.89	0.037
Glu	0.86	0.041	0.78	0.069
Orn	0.95	0.018	0.94	0.026
Lys	0.76	0.014	0.79	0.016
Thr*	0.75	0.023	0.73	0.036
Pro*	0.82	0.012	0.83	0.029
Tyr*	1.21	0.022	1.28	0.052
Arg*	0.44	0.062	0.55	0.055
Trp*	0.73	0.036	0.82	0.054
Cys*	0.17	0.017	0.55	0.055

\* OV-17 column. Average; of 9 or 10 times experiments.

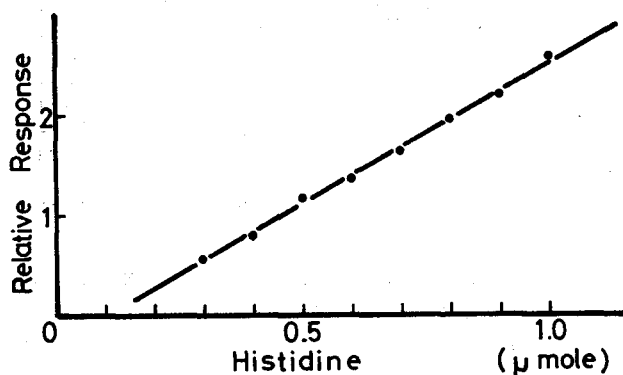


Fig. 4. Calibration curve of histidine.

る。従ってヒスチジンの定量のためには、誘導体調製の直前にあらかじめ一定濃度 (0.4 μmole) のヒスチジンを試料検体に加える方法 (Carrier Method) を用いて、OV-17 でヒスチジンの R.R. を測定した。その値から検量線を用いてヒスチジン濃度を求め、加えておいたヒスチジン量 (0.4 μmole) を差し引いた値をその試料のヒスチジン濃度として算出した。ヒスチジンの定量のために Li イオンを添加してアセチル化し誘導体調製を行う方法を試みたが十分な分析値が得られなかった。また Carrier Method を用いて分析した時、EGSS-X·DEGS においてもヒスチジンと考えられる巾の広い小さなピークのレスポンスを認めたが、定量分析できるほどのものではなかった。

以上の操作を行い、EGSS-X·DEGS と OV-17 の 2 本のカラムを用いることにより、タンパク質構成アミノ酸 20 種類の GLC による分析が可能となった。この方法は前報<sup>36)</sup>に比べて、誘導体は 40 分以内に調製でき、分析時間も短縮されている。またヒスチジンを除けば、他のアミノ酸は 0.1  $\mu$ mole、タンパク質試料では 0.2 mg で分析可能である。

標準アミノ酸で検討されたこの方法を実用的なものとするために、5 種類のタンパク質について、そのアミノ酸分析を行い、既に報告されているイオン交換樹脂を用いた自動分析計の値と比較した。5 種類のタンパク質試料中、加水分解後カゼインについてのみアミノ酸の精製を行った。GLC 分析による各タンパク質のクロマトグラムは、標準アミノ酸のクロマトグラムと同様に分離が良く明瞭なピークを与え、分析に何ら問題はなかった。表 4 に 5 種類のタンパク質；カゼイン・インシュリン・ $\alpha$ -キモトリプシン・オバルブミン・血清アルブミンの分析結果を示した。分析値はすべて各タンパク質の全アミノ酸基数を 100 とした時の各アミノ酸の残基数として示した。イソロイシンとバリンは 72 時間加水分解の値、セリン・スレオニン・チロシンは 24・72 時間加水分解の値から 0 時間に外挿した値を、その他のアミノ酸は 24 時間加水分解の値を用いた。

Table 4. Amino acid compositions of known proteins.

Amino acid	Casein		Insulin		$\alpha$ -Cymotrypsin		Ovalbumin		Serum Albumin	
	GLC	Literature <sup>39)</sup>	GLC	Literature <sup>40)</sup>	GLC	Literature <sup>41)</sup>	GLC	Literature <sup>42)</sup>	GLC	Literature <sup>43)</sup>
Gly	3.4	3.4	8.3	8.3	9.6	9.4	7.2	5.1	3.2	2.8
Ala	4.5	4.9	6.1	6.3	10.1	9.0	10.2	9.5	9.0	8.2
Val	7.4	6.0	9.0	10.4	9.4	9.4	8.3	7.6	6.2	5.8
Leu	10.3	7.6	10.0	12.5	7.9	7.8	8.6	8.8	10.3	10.9
Ile	6.4	6.1	3.1	2.1	6.0	4.1	6.4	6.7	1.8	2.4
Pro	10.1	9.0	2.1	2.1	3.6	3.7	3.3	3.9	4.4	4.8
Phe	4.0	3.5	7.3	6.3	3.4	2.5	6.0	5.8	5.9	4.6
Tyr	3.2	5.0	6.9	8.3	1.6	1.6	2.4	2.6	3.0	3.4
Ser	8.7	7.6	5.8	6.3	7.0	11.9	8.9	4.3	5.0	4.7
Thr	4.1	4.4	2.1	2.1	7.3	9.4	4.1	4.3	5.5	5.7
Met	0.6	2.2			0.9	0.8	2.4	4.4	0.3	0.6
Arg	2.1	2.8	1.0	2.1	2.4	1.6	3.6	4.1	4.1	4.0
His	2.9	2.4	3.1	4.2	0.9	0.8	1.1	1.9	2.0	3.0
Lys	7.0	8.0	2.7	2.1	6.4	5.7	5.4	5.4	10.4	10.7
Asp	8.4	7.6	6.6	6.3	8.6	9.4	8.9	8.8	8.8	9.5
Glu	16.2	17.9	12.2	14.6	6.5	6.1	12.3	14.1	12.5	13.1
Cys/2			6.6	6.3	2.0	4.1	2.8	2.0	6.1	6.3

(Amino acid Residues/100 Residues)

カゼインではロイシンの値に差が見られ、バリン・チロシン・メチオニン・グルタミン酸にも多少の差が見られる。これは両試料の差異によるものと判断される。インシュリンではロイソとグルタミン酸の値に差が認められる。インシュリンのように残基数の少ないタンパク質は、差が拡大されるのでその点を考慮に入れば、さほど大きな差とは考えられない。 $\alpha$ -キモトリプシンではセリン・スレオニン・システニンに、オバルブミンではグリシン・セリン・グルタミン酸に多少の差が見られる。しかし血清アルブミンではほとんど差は見られない。5 種類のタンパク質のアミノ酸については、GLC による分析ではチロシン・スレオン・メチオニン・グルタミン酸は低い値を、フェニールアラニンは高い値を示す傾向が認められた。チロシン・スレオニンは加水分解の条件の差によるとも考えられ、これらの問題を解決するには同一のタンパク質加水分解試料を自動分析計と GLC で分析し比較

する必要があると考える。この方法でシスチン・アルギニンはもちろんヒスチジンの分析も十分行えることが確認された。この方法を用いることによって、簡便にかつ迅速にアミノ酸の分析ができ、多種類試料の一連の分析などに応用が期待される。

文 献

- 1) Hunter, I.R., Dimmick, K.P. and Corse, J.W. (1956). Determination of amino acids by ninhydrin oxidation. *Chem. and Ind. (London)*, 294-295.
- 2) Zlatkis, A., Oro, J.F. and Kimball, A.P. (1960). Direct amino acid analysis by gas chromatography. *Anal. Chem.* **32**, 162-164.
- 3) Saroff, H.A., Karmen, A. and Healy, J.A. (1962). Gas chromatography of the amino acid esters in ammonia. *J. Chromatogr.* **9**, 122-123.
- 4) Nicholls, C.H., Makisumi, S. and Saroff, H.A. (1963). Gas chromatography of the methyl esters of the amino acids as the free base and by dissociation of their acid salts. *Ibid.* **11**, 327-330.
- 5) Blau, K. (1968). Analysis of amino acids by gas chromatography. p. 1-52. In Szymanski, H.A. (ed.), *Biomedical applications of gas chromatography*. 2. 198.p Plenum Press, New York.
- 6) Husek, P. and Macek, K. (1975). Gas chromatography of amino acids. *J. Chromatogr.* **113**, 139-230.
- 7) Youngs, C.G. (1959). Analysis of mixtures of amino acids by gas phase chromatography. *Anal. Chem.* **31**, 1019-1021.
- 8) Johnson, D.E., Scott, S.J. and Meister, A. (1961). Gas-liquid chromatography of amino acid derivatives. *Ibid.* **33**, 669-673.
- 9) Blau, K. and Darbre, A. (1963). Preparation of volatile derivatives of amino acids for gas chromatography. *Biochem. J.* **88**, 8p.
- 10) Saroff, H.A. and Karmen, A. (1960). Gas chromatography of the N-trifluoroacetyl methyl esters of the amino acids. *Anal. Biochem.* **1**, 344-350.
- 11) Weygand, F., Kolb, B., Prox, A., Tilak, M.A. and Tomida, I. (1960). N-trifluoroacetylaminosäuren, XIX; Gaschromatographische trennung von N-TFA-dipeptidmethylestern. *Z. Physiol. Chem.* **322**, 38.
- 12) Ikekawa, N. (1963). Gas chromatography of amino acids; I. Analysis of the mixture of methyl-N-trifluoroacetyl derivatives. *J. Biochem.* **54**, 279-282.
- 13) Cruickshank, P.A. and Sheehan, J.C. (1964). Gas chromatographic analysis of amino acids as N-trifluoroacetyl amino acid methyl esters. *Anal. Chem.* **36**, 1191-1197.
- 14) Darbre, A. and Islam, A. (1968). Gas-liquid chromatography of trifluoroacetylated amino acid methyl esters. *Biochem. J.* **106**, 923-925.
- 15) Gehrke, C.W., Nakamoto, H. and Zumwalt, R.W. (1969). Gas liquid chromatography of protein amino acid trimethylsilyl derivatives. *J. Chromatogr.* **45**, 24-51.
- 16) 呉地伝夫 (1970). 衛生化学領域におけるガスクロマトグラフィーの応用; アミノ酸 N-アセチルエチルエステル類の分離定量. 東京薬大研究年報 **20**, 629-634.
- 17) Zomzely, C., Marco, G. and Emery, E. (1962). Gas chromatography of the n-butyl N-trifluoroacetyl derivatives of amino acids. *Anal. Chem.* **34**, 1414-1417.
- 18) Lamkin, W.M. and Gehrke, C.W. (1965). Quantitative gas chromatography of amino acids; Preparation of n-butyl N-trifluoroacetyl esters. *Ibid.* **37**, 383-389.
- 19) Gehrke, C.W. and Shahrokhi, F. (1966). Chromatographic separation of n-butyl N-trifluoroacetyl esters of amino acids. *Anal. Biochem.* **15**, 97-108.
- 20) Gehrke, C.W. and Stalling, D.L. (1967). Quantitative analysis of the twenty natural protein amino acids by gas-liquid chromatography. *Separation Sci.* **2**, 101-138.
- 21) Gehrke, C.W., Zumwalt, R.W. and Wall, L.L. (1968). Gas liquid chromatography

- of protein amino acids separation factors. *J. Chromatogr.* **37**, 398-413.
- 22) Roach, D. and Gehrke, C.W. (1969). The gas-liquid chromatography of amino acids. *Ibid.* **43**, 303-310.
  - 23) Roach, D., Gehrke, C.W. and Zumwalt, R.W. (1969). Quantitative gas-liquid chromatography of histidine. *Ibid.* **43**, 311-321.
  - 24) Roach, D. and Gehrke, C.W. (1969). Direct esterification of the protein amino acids gas-liquid chromatography of N-TFA n-butyl esters. *Ibid.* **44**, 269-279.
  - 25) Zumwalt, R.W., Roach, D. and Gehrke, C.W. (1970). Gas-liquid chromatography of amino acids in biological substances. *Ibid.* **53**, 171-193.
  - 26) Gehrke, C.W. and Leimer, K. (1970). The effect of salts on the derivatization and chromatography of amino acids. *Ibid.* **53**, 195-200.
  - 27) Zumwalt, R.W., Kuo, K. and Gehrke, C.W. (1971). Applications of a gas-liquid chromatographic method for amino acid analysis. *Ibid.* **55**, 267-280.
  - 28) Zumwalt, R.W., Kuo, K. and Gehrke, C.W. (1971). A nanogram and picogram method for amino acid analysis by gas-liquid chromatography. *Ibid.* **57**, 193-208.
  - 29) Gehrke, C.W., Kuo, K. and Zumwalt, R.W. (1971). The complete gas-liquid chromatographic separation of the twenty protein amino acids. *Ibid.* **57**, 209-217.
  - 30) Gehrke, C.W., Zumwalt, R.W., Stalling, D.L., Roach, D., Aue, W.A., Ponnampurana, C. and Kvenvolden, K.A. (1971). A search for amino acids in Apollo 11 and 12 Lunar Fines. *Ibid.* **59**, 305-319.
  - 31) Gehrke, C.W. and Takeda, H. (1973). Gas-liquid chromatographic studies of the twenty protein amino acids; A single-column separation. *Ibid.* **76**, 63-75.
  - 32) Gehrke, C.W. and Takeda, H. (1973). Gas-liquid chromatographic analysis of tryptophan in proteins. *Ibid.* **76**, 77-89.
  - 33) Cancalon, P. and Klingman, J.D. (1974). An improved procedure for preparing the n-butyl-trifluoroacetyl amino acid derivatives and its application in the study of radioactive amino acids from biological sources. *J. Chromatogr. Sci.* **12**, 349-355.
  - 34) Appelqvist, L.A. and Nair, B.M. (1976). An improved technique for the gas-liquid chromatographic separation of the N-trifluoroacetyl n-butyl derivatives of amino acids. *J. Chromatogr.* **124**, 239-245.
  - 35) Amico, V., Oriente, G. and Tringali, C. (1977). Quantitative analysis of protein and non-protein amino acids by gas-liquid chromatography. *Ibid.* **131**, 233-238.
  - 36) 国崎直道・米田 勤・石原義雄 (1969). 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. 北大水産集報 **3**, 193-201.
  - 37) 米田 勤・石原義雄 (1975). シロサケ (*Oncorhynchus keta*) 血清遊離アミノ酸の溯上前後における量的変動. 同誌 **26**, 192-200.
  - 38) 米田 勤 (1977). シロサケ (*Oncorhynchus keta*) 卵発生に伴うアミノ酸変動. 同誌 **28**, 29-39.
  - 39) Light, A. and Smith, E.L. (1963). Amino acid analysis of peptides and proteins. p. 1-51. In Neurath, H. (ed.), *The proteins I*. 2nd Ed. 665p. Academic Press, New York and London.
  - 40) Nolan, C., Margoliash, E., Peterson, J.D. and Steiner, D.F. (1971). The structure of bovine proinsulin. *J. Biol. Chem.* **246**, 2780-2795.
  - 41) Hartley, B.S. (1964). Amino-acid sequence of bovine chymotrypsinogen-A. *Nature* (London). **201**, 1284-1287.
  - 42) Zanetta, J.P. and Vincendon, G. (1973). Gas-liquid chromatography of the N(O)-heptafluorobutyrate of the isoamyl esters of amino acids. *J. Chromatogr.* **76**, 91-99.
  - 43) Weber, G. and Young, L.B. (1964). Fragmentation of bovine serum albumin by pepsin; II Isolation, amino acid composition, and physical properties of the fragments. *J. Biol. Chem.* **239**, 1424-1431.