



Title	アミノ酸のガスクロマトグラフ分析法に関する研究 : N-iso Butyloxycarbonyl Methyl Ester誘導体
Author(s)	山本, 重雄
Citation	大阪大学, 1976, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31676
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	山 ^{やま} 本 ^{もと} 重 ^{しげ} 雄 ^お
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	第 3 7 6 9 号
学位授与の日付	昭 和 51 年 12 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	アミノ酸のガスクロマトグラフ分析法に関する研究 —N-iso Butyloxycarbonyl Methyl Ester 誘導体—
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 田村 恭光 (副査) 教 授 上原喜八郎 教 授 枡井雅一郎 教 授 佐々木喜男

論 文 内 容 の 要 旨

緒 論

ガスクロマトグラフ法 (GLC) は機器が廉価で、しかもその適用範囲が広く、さらに操作が簡便であるなど分析法としての優れた特徴を備えており、それ故これを用いてアミノ酸を分析しようとする試みが多くの研究者によってなされている。

所で、アミノ酸はほとんど揮発性がなく、そのまま GLC を行なうことは不可能であり、予め適当な揮発性と熱安定性を有する化合物に誘導する必要がある。誘導体化のためには、その反応は緩和な条件下で簡便かつ迅速に、副反応がなく定量的に進行しなければならない、さらに種々のアミノ酸を同一条件下で一挙に誘導体化できなければならない。また、生成した誘導体は水分(湿気)、熱などに安定でその取扱いおよび GLC 操作の容易なものでなければならない。

既に Fales¹⁾、Weinstein²⁾、Blau³⁾ および Coulter ら⁴⁾ の総説に見られるごとく多数の誘導体が検討されているが、全蛋白アミノ酸の分析という観点から比較的良好と考えられる誘導体は次の 4 種である。

- 1) N-trifluoroacetyl ester⁵⁾
- 2) N-heptafluorobutyryl ester⁶⁾
- 3) N-acetyl ester⁷⁾
- 4) trimethylsilyl⁸⁾

しかし、これらには次のような共通する短所がある。

- 1) 誘導体化には無水条件下高温での封管反応が必要であり、操作が煩雑で簡便性に欠ける。

2) 誘導体自身が水分(湿気)に不安定であり、その調製さらにGLCに際しても特別の配慮が必要である。

3) 実際の試料は水溶液として供されるが、誘導体化に際しその都度水分を完全に除去しなければならず、そのために相当面倒で時間のかかる操作を要する。

アミノ酸のアミノ基を保護するためにN-carbobenzoxy化⁹⁾あるいはN-t-butyloxycarbonyl化¹⁰⁾する反応がペプチド合成の分野において用いられている。この反応は一般に氷冷下、アルカリと試薬(benzylあるいはt-butyl chloroformate)とを交互に加え、Schotten-Baumann条件下で行なわれている。この方法を直ちに分析のための誘導体化法として利用するには、簡便性において難点がある。しかし、先に述べた各方法の短所が専ら有機溶媒中、しかも無水条件下で誘導体の調製を行なわなければならない所に帰因することを考え合せ、何らかの改良を加えればGLC分析のための誘導体化法として有用であろうと考えられた。

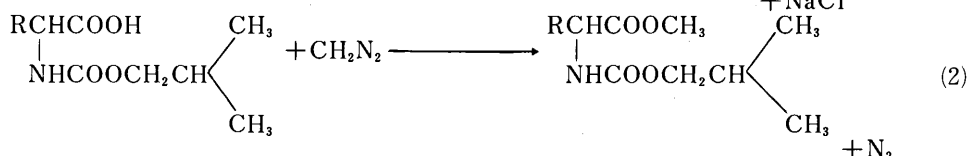
そこで、著者はbenzylあるいはt-butyl chloroformateのような不安定な試薬でないalkyl chloroformate(ethyl, isobutyl, n-butyl, n-amyl, n-hexyl, n-octyl)を用い、これらのN-誘導体化剤としての適否、反応条件等について検討した。その結果、炭酸ナトリウム水溶液中isobutyl chloroformate(iso BCF)でN-isobutyloxycarbonyl(N-iso BOC)化し、これを抽出分離後Schlenkら¹¹⁾の方法に従ってメチルエステル化すればGLCの可能な誘導体が見いだされることを見出した。ここに得られるN-iso BOC methyl ester誘導体は調製の簡便性および揮発性、さらに水分(湿気)および熱に対する安定性等のGLC上の諸条件から考えて良好であることが判明した¹²⁾。蛋白アミノ酸のうちarginineのみがこの方法でピークを示さなかったが、arginaseでornithineに変換することによって分析することができた。さらに、本誘導体のGC-MS、分離カラム、検量線、添加回収率などについて詳細に検討した¹³⁾。また、本法を血清および蛋白質、ペプチド加水分解物のアミノ酸分析に応用し、その定量値は並行して行なったアミノ酸自動分析計の結果と良好な一致を示すことを明らかにした^{14,15)}。さらに、各種生物学的に重要な非蛋白アミノ酸も本誘導体として分析できることを明らかにした¹⁶⁾。

本 論

第1章 蛋白アミノ酸N-iso BOC Methyl Ester誘導体の調製

N-誘導体化剤の選択(各種alkyl chloroformateについて)、N-誘導体化の反応条件等について詳細に検討し、次のような誘導体調製法を確立した。

検液1ml(各アミノ酸10-100 μ gを含む)を取り、これに内部標準物質溶液0.5ml(norleucine 50 μ gを含む、しかし実際の試料において前操作中に既に内部標準物質が添加されている場合には蒸留水0.5ml、あるいは検液1.5mlを取る)、10% Na₂CO₃ 0.5mlおよびiso BCF 0.1mlを加える。栓をして室温(10-30℃)で10分間振とう機で激しく振りまぜる(1)。次に、アルカリ性のままでエーテル抽出して過剰のiso BCFを除去し、10%リン酸でpHを1-2に調節し(TB試験紙)、食塩飽和下この酸性水層をエーテル(3ml $\times$ 3)で抽出する。全エーテル抽出液にメタノール1mlを加え、これにジアゾメタン(N-methyl-N-nitroso-p-toluenesulfonamideより調製)を通じ、黄色を呈したら栓をして5分間放置する(2)。エーテル・メタノールを50℃の水浴中で除去し、残渣を酢酸エチル



(0.1—0.2ml) に溶かし少量の無水硫酸ナトリウムで乾燥後 GLC に付す。操作に要する時間は約20分である。Arginineはこの方法ではピークを示さなかったので, arginaseで ornithine に変換後分析した。Arginase処理は次のようにして行なった。すなわち, 検液1mlを取り, 5% Na₂CO₃ でpH 9.4—9.6に調節し (TB試験紙), これに arginase (from borine liver, 42-60 units/mg) 5mgに0.1 M酢酸アンモニウム 4.5mlおよび0.5 M硫酸マンガン 0.5mlを加えて溶かし, 37°で4時間活性化した溶液0.1mlを加える。37°で20分間 incubationを行ない, 以下前述の方法に従って操作する。

本誘導体化法における7種の代表アミノ酸の収率はほぼ定量的 (>92%) であった。また, arginineのornithineへの変換率は他の19種の蛋白アミノ酸が各々 arginineと同量共存していても10—150 μgの範囲で96%以上で, その検量線も直線性を示した。

第2章 GLCによる蛋白アミノ酸 N-iso BOC Methyl Ester 誘導体の分離および定量性について

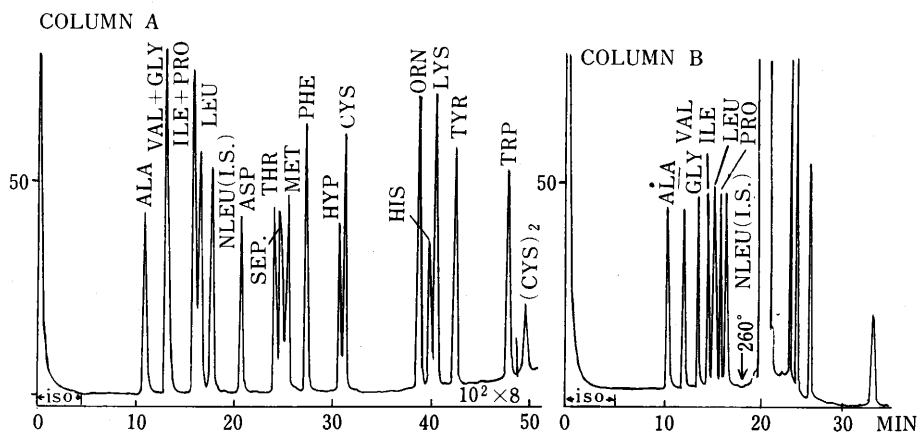


Fig. 1. Separation of the N-isoBOC methyl esters of the 20 protein amino acids with a dual-column system.

Each peak represents ca. 2 μg of amino acid. GLC conditions; nitrogen flow rate, 40 ml/min; Column A- 0.65% Poly-A-101A on 100-120 mesh silanized Gas Chrom P, 1m×3mm i.d. glass tube; isothermal at 80° for 5 min, then programmed at the rate of 4°/min to a final temperature of 270°; Column B- 0.70% FFAP-Poly-A-101A(1:1, w/w) on 100-120 mesh silanized Gas Chrom P, 2m×3mm i.d. glass tube; isothermal at 100° for 5 min, then programmed at the rate of 4°/min; soon after elution of norleucine (I. S.), the column temperature was raised quickly to 260° by manual operation and held for 15 min.

蛋白アミノ酸の本誘導体を各々完全に分離すべく種々のカラムについて検討を加えた結果、0.65% Poly-A-101A (1 m) と0.70% FFAP-Poly-A-101A (1 : 1, w/w) (2 m) の2本のカラムを用いれば全てに良好な分離が得られることが判明した (Fig. 1)。Norleucineはいずれのカラムにおいても他のピークと完全に分離し、内部標準物質として適当であった。

そこで、誘導体化、GLCを行なった場合の全操作における定量性を検討するため、先のカラムを用い各アミノ酸の検量線、RWR (アミノ酸のピーク高/norleucineのピーク高) の再現性を求めた。各アミノ酸10—100 μ g/vessel の範囲での検量線は良好な直線性を示し、またRWRの再現性も良好であった。次に、蛋白アミノ酸を各種の割合で含有する合成混合溶液を作成し、各アミノ酸の回収率を求めたが、94.3—106.1%と良好な結果を示した。よって誘導体化、GLCという二段階操作であるが、その間の定量性は確保されていることが判明した。

第3章 生物試料のアミノ酸分析への応用

Albumin, α -chymotrypsin, casein, insulin を常法に従って加水分解し、本法によって定量した。また、同一試料をアミノ酸自動分析計でも定量し、本法の結果と比較した。

いずれの試料においてもクロマトグラム上に妨害ピークは認められず、またその定量値は各アミノ酸ともアミノ酸自動分析計のそれと良好な一致を示した (Table I, II)。ただ、serineはglutamic acidが極端に多い試料では若干高値を示した。クロマトグラムの一例を Fig. 2に示す。

Table I. Amino Acid Analyses of Protein Hydrolysates

Amino acid	Bovine albumin		α -Chymotrypsin		Casein	
	GLC ^{a)}	Amino acid analyzer ^{b)}	GLC ^{a)}	Amino acid analyzer ^{b)}	GLC ^{a)}	Amino acid analyzer ^{b)}
Ala	5.78	5.44	7.02	6.97	2.81	2.70
Val	6.04	5.70	9.42	9.43	6.31	6.50
Gly	1.66	1.69	6.32	6.50	1.70	1.74
Ile	2.56	2.31	4.52	4.50	5.04	4.81
Leu	10.84	10.87	8.52	8.96	8.10	8.61
Pro	4.74	4.77	3.88	3.18	10.32	11.74
Asp	9.06	9.77	8.93	10.34	6.49	6.28
Thr	5.01	4.80	8.10	8.37	3.76	3.44
Glu	15.54	16.60	7.31	7.82	19.94	21.41
Ser	4.73	3.42	8.94	8.68	6.70	5.80
Met	0.84	0.71	0.75	0.81	2.92	2.55
Phe	6.18	6.01	3.49	3.52	5.00	4.61
His	3.22	3.62	1.03	1.13	2.74	2.61
Lys	12.01	11.99	6.47	6.44	7.14	7.20
Tyr	4.29	4.66	2.16	2.40	5.97	6.20
(Cys) ₂	4.17	4.73	3.26	3.23	0.23	0.22
Arg	5.68 ^{c)}	5.39	1.82 ^{c)}	1.74	3.98 ^{c)}	3.34
Total	102.35	102.48	91.91	94.02	99.15	99.76

Samples were hydrolyzed for 24hr at 115° in a closed tube with 6N HCl under N₂. All values given in w/w, %.

a) Each value represents an average of two determinations.

b) Hitachi, KLA-5 Amino Acid Analyzer

c) Arginine was converted into ornithine with arginase and analyzed as the derivative of ornithine.

Table II. Molar Ratios (MR) Obtained in the Amino Acid Analyses of an Insulin Hydrolysate

Amino acid	GLC ^{a)} MR	Amino acid analyzer ^{b)} MR	Theory MR
Ala	2.90	3.04	3
Val	4.18	4.23	5
Gly	3.98	4.26	4
Ile	0.47	0.45	1
Leu	6.16	6.21	6
Pro	1.00	1.02	1
Asp	3.26	3.09	3
Thr	1.00	0.98	1
Glu	6.48	7.19	7
Ser	3.16	2.81	3
Met	—	—	—
Phe	2.94	2.94	3
His	1.91	2.04	2
Lys	1.17	1.00	1
Tyr	3.92	4.06	4
(Cys) ₂	2.65	2.23	3
Arg	0.97 ^{c)}	1.02	1

Sample was hydrolyzed for 20hr at 106° in a closed tube with 6NHCl containing 2% (v/v) phenol under N₂.

a) Each value represents an average of two determinations.

b) Hitachi, KLA-5 Amino Acid Analyzer.

c) Arginine was converted into ornithine with arginase and analyzed as the derivative of ornithine.

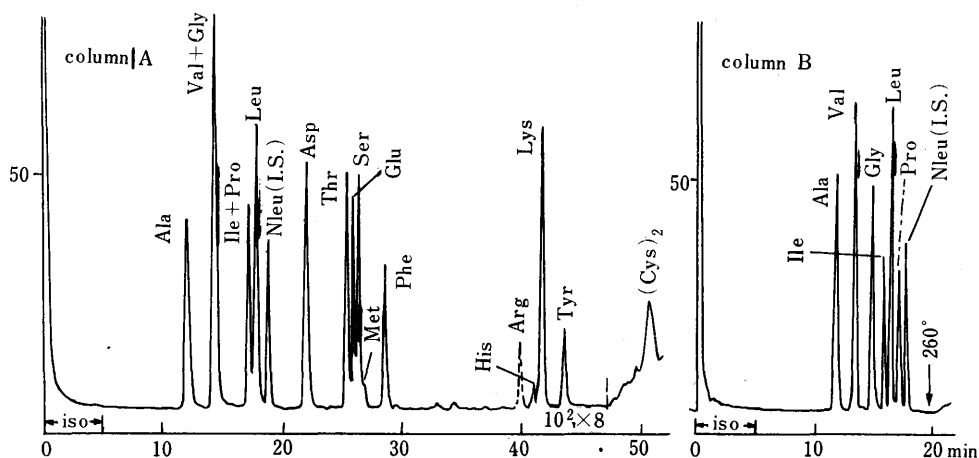


Fig. 2. Chromatogram of the N-isobutyryl amino acid methyl esters obtained from an α -chymotrypsin (40 μ g) hydrolysate.

GLC conditions: see Fig. 1; attenuation, $10^2 \times 64$.

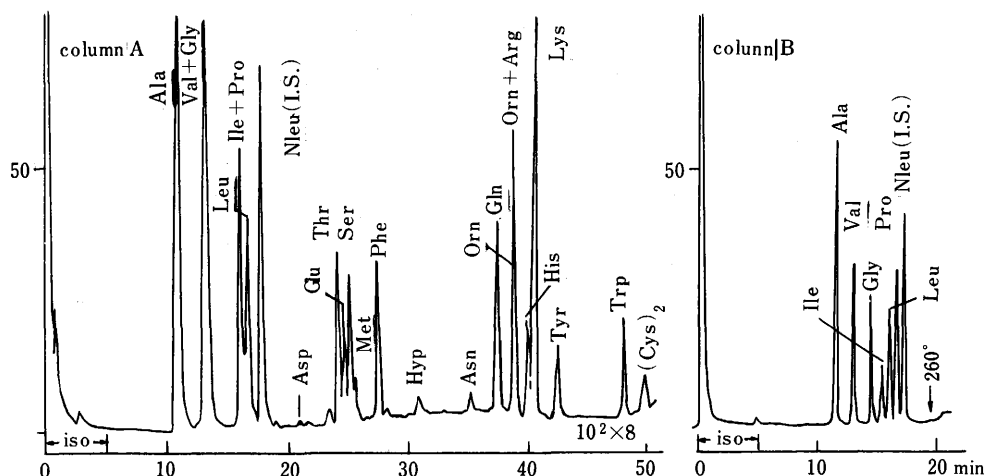


Fig. 3. Chromatogram of the N-isoBOC amino acid methyl esters obtained from a human serum(80 μ l).

GLC conditons: see Fig. 1; attenuation, $10^2 \times 32$ (column A) and $10^2 \times 64$ (column B).

Table III. Amino Acids Analyses of Sera.

Amino acid	Human serum (mg/dl)		Bovine serum (mg/dl)	
	GLC ^{a)}	Amino acid analyzer ^{b)}	GLC ^{a)}	Amino acid analyzer ^{b)}
Ala	3.90	3.87	2.73	2.66
Val	2.19	2.10	2.97	2.80
Gly	1.62	1.63	3.10	2.95
Ile	0.71	0.77	0.97	0.99
Leu	1.28	1.36	1.99	1.97
Pro	2.03	1.98	0.17	trace
Asp	0.06	0.04	0.11	0.13
Asn	0.81	0.83	0.34	trace
Thr	1.36	1.49	0.67	0.65
Glu	0.94	1.05	1.51	1.68
Gln	6.29	5.12	0.34	0.16
Ser	1.37	1.39	0.20	0.20
Met	0.35	0.30	0.12	0.06
Phe	0.88	0.89	0.95	0.96
Hyp	0.16	trace	0.13	trace
Orn	0.70	0.72	3.17	2.98
His	1.13	1.10	1.27	1.11
Lys	2.49	2.44	1.52	1.52
Tyr	0.85	0.94	0.56	0.63
Trp	0.68	0.66	0.69	0.62
(Cys) ₂	0.64	0.82	trace	trace
Arg	1.03 ^{c)}	1.39	1.40 ^{c)}	1.32
Total	31.47	30.89	24.91	23.39

a) Each value represents an average of two determinations.

b) Hitachi, KLA-5 Amino Acid Analyzer.

c) Arginine was converted into ornithine with arginase and analyzed as the derivative of ornithine. Calculation is given in the text.

本法によれば蛋白質あるいはポリペプチドとして1 mgあればアミノ酸自動分析計に劣らぬ正確さで定量可能であった。分析時間は誘導体化, G L Cを行なって約2.5時間であった。

さらに, 人および牛血清中アミノ酸を本法によって分析した。除蛋白はピクリン酸を用いて行ない, 陽イオン交換樹脂でclean-upした。本法の定量値はアミノ酸自動分析計のそれと良好な一致を示し (Table III), また従来のG L C法では困難であった asparagine, glutamine も定量することができた。本法によれば3 mlの血清で十分定量可能であった。クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示す。

第4章 蛋白アミノ酸N-isoBOC Methyl Ester 誘導体のGC-MSとその構造

本誘導体化法に従って得られた22種の蛋白アミノ酸誘導体をGC-MSを用いて分析し, 各々の構造について検討した。

- 1) 全ての誘導体に M^+ が認められ, また $M^+ - 15(CH_3)$, $M^+ - 59(COOCH_3)$, $M^+ - 101(COOCH_2CH<\begin{smallmatrix} CH_3 \\ CH_3 \end{smallmatrix})$ などの共通するフラグメントピークが認められた。
- 2) α -アミノ基, イミノ基および α -カルボキシル基以外に官能基を持たないアミノ酸では全てに予想通りの M^+ が認められた。
- 3) Threonine, serine, hydroxyproline のアルコール性水酸基, tryptophan のインドールNH, asparagine, glutamine の酸アミド部分はいずれも isoBOC化されていなかった。
- 4) Tyrosine のフェノール性水酸基, cysteine のチオール基, histidine のイミダールNH (1位あるいは3位のいずれであるかは不明), ornithine, lysine の側鎖のアミノ基はいずれも isoBOC化されていた。

蛋白アミノ酸の場合と同様に第5章で述べる各種非蛋白アミノ酸も本誘導体としてOV-1, OV-17のような安定なカラムでGC-MSが可能で, しかも調製が簡便かつ迅速であるという利点があることから, GC-MSによるアミノ酸の同定あるいは新しいアミノ酸の構造研究などのためにも本誘導体は有用であると考えられた。

第5章 非蛋白アミノ酸の分析

本誘導体としてのG L Cの適用範囲を拡大するために sarcosine, β -alanine, β -aminoisobutyric acid, S-carboxymethyl cysteine, 3-hydroxyanthranilic acid, 5-hydroxytryptophan などを含む26種の非蛋白アミノ酸について定量性を検討した。いずれのアミノ酸も良好なピークを示し (Fig. 4, 5), 定量分析が可能であることが判明した。

結 論

アミノ酸を炭酸ナトリウム水溶液中, isoBCFと反応させN-isoBOCアミノ酸とし, 次にこれを酸性下エーテル抽出しジアゾメタンでメチルエステルとし, G L Cによって定量する方法を考案, 確立した。

本誘導体は極めて簡便かつ短時間に調製することができ, また水分 (湿気) に安定で取扱い, 保存が容易である。さらに, 第1段階の反応を水溶液中で行なうことができるという利点が考えられるなど, 従来法の短所を解消した優れた誘導体であることが判明した。

本誘導体化法においては蛋白アミノ酸のうち arginine にのみピークを得ることができなかったが,

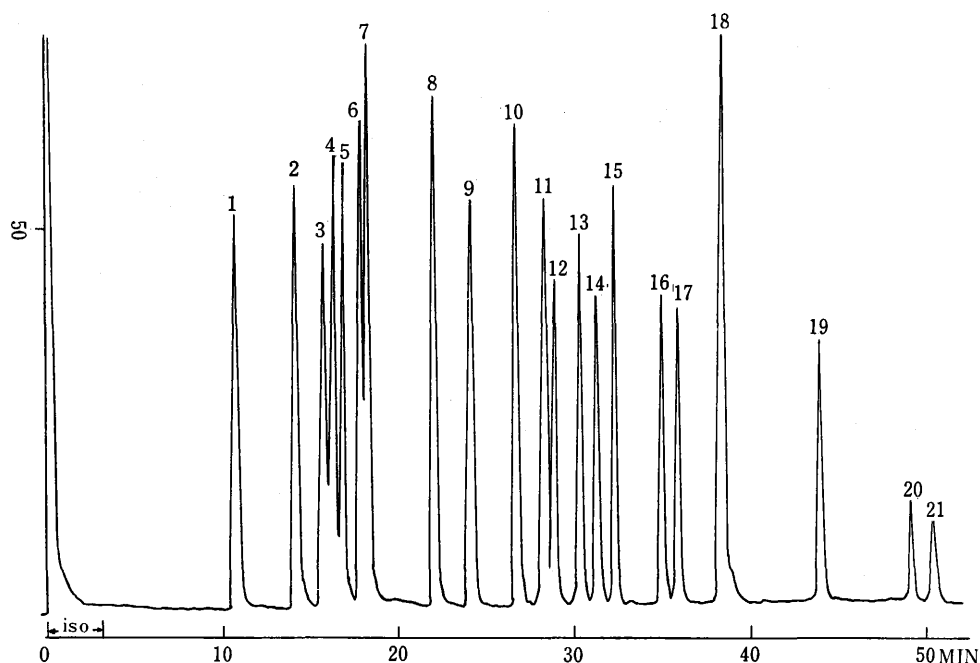


Fig. 4. Chromatogram of the N-isobOC methyl esters of selected non-protein amino acids. Column: 0.5% FFAP on silanized Gas-Chrom P (100-120 mesh), 2m×3mm I. D., glass. Conditions: iso-thermal at 80° for 3min, then programmed at a rate of 4°/min to a final temperature of 275°; attenuation, 32×10²; N₂ flow-rate, 40ml/min. Each peak represents 2 μg of amino acid. Peaks: 1=sarcosine; 2=α-amino-*n*-butyric acid; 3=alloisoleucine; 4=norvaline; 5=β-aminoisobutyric acid; 6=β-alanine; 7=norleucine; 8=γ-aminobutyric acid; 9=S-methylcysteine; 10=ε-aminocaproic acid; 11=ethionine; 12=homoserine; 13=α-aminoadipic acid; 14=δ-aminolevulinic acid; 15=kainic acid (internal standard); 16=S-carboxymethylcysteine; 17=homocysteine; 18=2,4-diaminobutyric acid; 19=methionine sulphone; 20=lanthionine; 21=δ-hydroxylysine.

arginaseでornithineに変換することによって分析することができた。全蛋白アミノ酸(arginineはornithineとして、また asparagine, glutamineを含む)の本誘導体は 0.65% Poly-A-101A および 0.70% FFAP-Poly-A-101A (1 : 1, w/w) カラムで完全に分離することができた。

本法の蛋白質、ペプチド加水分解物および血清のアミノ酸分析への応用の結果は並行して行なったアミノ酸自動分析計の定量値と良好な一致を示し、信頼度の高い方法であることが判明した。さらに、本誘導体は蛋白アミノ酸のみならず他の広範囲のアミノ酸にも応用でき、それらの誘導体は良好なピークを示し、定量分析が可能であることを明らかにした。また、本誘導体はGC-MSによるアミノ酸の同定あるいは構造研究などのためにも有用であろうと考えられた。

引用文献

- 1) H. M. Fales and J. J. Pisano, in H. A. Szymanski (Editor), "Biomedical Applications of Gas Chromatography", Vol. 1, Plenum Press, New York, 1964, p. 39.
- 2) B. Weinstein, in D. Glick (Editor), "Methods of Biomedical Analysis", Vol. 14, Interscience, New York, 1966, p. 203.

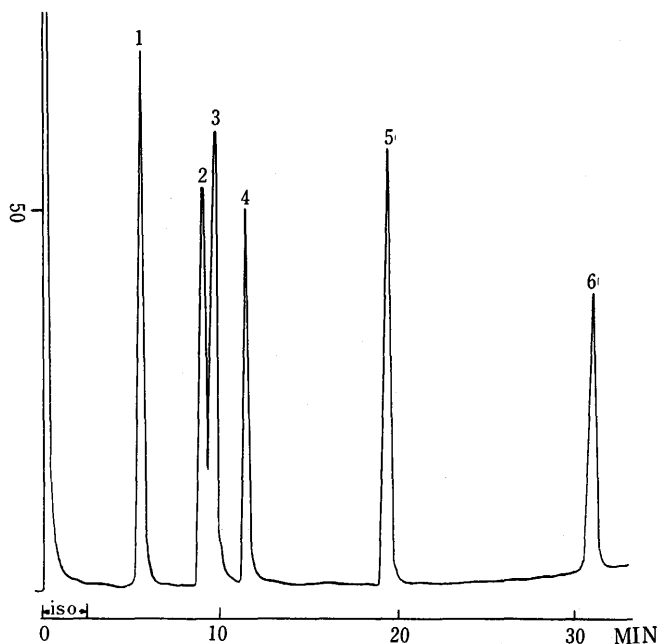


Fig. 5. Chromatogram of the N-isoBOC methyl esters of selected non-protein amino acids. Column: 1% OV-1 on silanized Gas-Chrom P (100–120 mesh), 1m×3mm I. D., glass. Conditions: iso-thermal at 130° for 2 min, then programmed at a rate of 4°/min to a final temperature of 260°; attenuation, 32×10²; N₂ flow-rate, 40ml/min. Each peak represents 2 μg of amino acid. Peaks: 1=anthranilic acid; 2=*m*-aminobenzoic acid; 3=*p*-aminobenzoic acid; 4=kainic acid (internal standard); 5=3-hydroxyanthranilic acid; 6=5-hydroxytryptophan.

- 3) K. Blau, in H. A. Szymanski (Editor), "Biochemical Applications of Gas Chromatography", Vol. 2, Plenum Press, New York, 1968, p. 1.
- 4) J. R. Coulter and C. S. Hann, in A. Niederwieser and G. Pataki (Editors), "New Techniques in Amino Acid, Peptide and Protein Analysis", Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, Mich., 1971, p. 75.
- 5) A. Darbre and A. Islam, *Biochem. J.*, **106**, 928 (1968); R. W. Zumwalt, K. Kou and C. W. Gehrke, *J. Chromatog.*, **55**, 267 (1971); F. E. Kaiser, C. W. Gehrke, R. W. Zumwalt and C. K. Kou, *ibid.*, **94**, 113 (1974).
- 6) G. E. Pollock, *Anal. Chem.*, **39**, 1194 (1967); C. W. Moss, M. A. Lambert and F. J. Diaz, *J. Chromatog.*, **60**, 134 (1971); J. Jönsson, J. Eyem and J. Sjöquist, *Anal. Biochem.*, **51**, 204 (1973); S. L. MacKenzie and D. Tenaschuk, *J. Chromatog.*, **97**, 19 (1974); M. A. Kirkman, *ibid.*, **97**, 175 (1974); J. P. Zanetta and G. Vincendon, *ibid.*, **76**, 91 (1973).
- 7) J. R. Coulter and C. S. Hann, *J. Chromatog.*, **36**, 42 (1968); R. F. Adams, *ibid.*, **95**, 189 (1974).

- 8) C. W. Gehrke, H. Nakamoto and R. W. Zumwalt, J. Chromatog., **45**, 24 (1969); C. W. Gehrke and K. Leimer, *ibid.*, **57**, 219 (1971).
- 9) M. Bergmann and L. Zervas, Chem. Ber., **65**, 1192 (1932).
- 10) S. Sakakibara, I. Honda, K. Takada, M. Miyoshi, T. Ohnishi and K. Okumura, Bull. Chem. Soc. Japan, **42**, 809 (1969).
- 11) H. Schelenk and J. L. Gellerman, Anal. Chem., **32**, 1412 (1960).
- 12) M. Makita, S. Yamamoto, M. Kōno, K. Sakai and M. Shiraishi, Chem. Ind. (London), **1975**, 355.
- 13) M. Makita, S. Yamamoto and M. Kōno, J. Chromatog., **120**, 129 (1976).
- 14) 蒔田政見, 山本重雄, 薬誌, **96**, 777 (1976).
- 15) *Idem*, *ibid.*, **96**, 813 (1976).
- 16) M. Makita, S. Yamamoto, K. Sakai and M. Shiraishi, J. Chromatog., **124**, 92 (1976).

論文の審査結果の要旨

著者はアミノ酸を N-isobutyloxycarbonyl methyl ester 誘導体に誘導してガスクロマトグラフ分析法で定量する方法を考案確立した。上記誘導体は湿気に安定で取扱い及び保存が容易であり、また、誘導体の調製法が極めて簡便で、とくにその第一段階の反応を水溶液中で行なうことができるなど本分析法は従来のアミノ酸のガスクロマト分析法においてみられた欠点を補なう優れた特長を有することを明らかにすると共に、本法を蛋白質、ペプチドの加水分解物、血清のアミノ酸および非蛋白アミノ酸の分析に応用して本法が信頼度の高い分析法であることを示した。

以上の研究は学位論文として価値あるものと認める。