- 2) 菊地哲也; 繊維機械学会誌, **29**, 45 (1973)
- 3) ステファニー・ルイス・クオレック(デュボン); 特開昭 45-36852
- 4) トーマス・アーベン・ペアー, ポール・ウインスロップ・モーガン(デュボン); 特開昭 47-2489
- 5) K. Tashiro, M. Kobayashi and H. Tadokoro, *Macromolecules*, **10**, 413 (1977)
- 6) 長谷川隆平, 木本和幸, 茶谷陽三, 田所宏行, 関口煜; 第23回高分子討論会講演要旨集, 713 (1974)
- 7) M. G. Northolt, J. J. van Aartsen; *J. Polym. Sci.*, **B**, **11**, 333 (1973); M. G. Northolt; *Eur. Polym. J.*, **10**, 799 (1974)
- 8) 菊地哲也; 高分子, **25**, 182 (1976)
- 9) V. Frosini, E. Butta; *J. Polym. Sci.*, **B**, **9**, 253 (1971)
- 10) A. E. Woodward, H. Stefanou; *J. Macromol. Sci.-Phys.*, **B9**(2), 267 (1974)
- 11) G.F.L. Ehlers, K.R. Fisch, W.R. Powell; *J. Polym. Sci.*, **A-1**, **8**, 3511 (1970)
- 12) 田所宏行; 織学誌, **31**, P-278 (1975)
- 13) 矢吹和之, 伊藤 弘, 太田利彦; 織学誌, **31**, T-524 (1975); 織学誌, **32**, T-55 (1976)
- 14) K.H. Illers, H. Breuer; *Kolloid-Z.*, **176**, 110 (1961); D.G. Legrand, P.F. Erhardt; *J. Appl. Polym. Sci.*, **13**, 1707 (1969)

(昭和52年4月12日受理)

種々のエポキシ化合物で処理した絹フィブロイン のアミノ酸ガスクロマトグラフ分析

東京工業大学工学部 坂本宗仙・梶山孝一・中山文孝
神奈川県工業試験所 塩崎英樹
繊維高分子材料研究所 田中芳雄

GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF AMINO ACIDS FOR SILK FIBROINS TREATED WITH VARIOUS EPOXIDES

By Munenori Sakamoto*, Koh-Ichi Kajiyama*, Fumitaka Nakayama*,
Hideki Shiozaki** and Yoshio Tanaka***

* (Department of Textile and Polymeric Materials, Tokyo Institute of Technology,
Meguro-ku, Tokyo Japan.)

** (Industrial Research Institute of Kanagawa, Kanazawa-ku, Yokohama, Japan.)

*** (Research Institute of Polymers and Textiles, Kanagawa-ku, Yokohama, Japan.)

Amino acid analysis of the chemically modified silk fibroin samples which were obtained by the treatment with glycidol (G), epichlorohydrin (E), glycidyl methacrylate (GMA), methyl glycidyl ether (MGE), ethyl glycidyl ether (EGE), isopropyl glycidyl ether (IPRGE) and allyl glycidyl ether (AGE) in the presence of aqueous neutral salt was made by the gas-liquid chromatographic (GC) method with amino acids being converted to *n*-butyl esters of N, (O)-trifluoroacetyl derivatives and by the conventional ion-exchange chromatographic method with an automated amino acid analyzer. It was found that all the chemically modified silk fibroins yielded G-tyrosine adduct, i.e., O-(2,3-dihydroxypropyl)tyrosine (G-TYR) by acid hydrolysis, indicating that chlorine in E-tyrosine adduct and aliphatic ether linkages in alkyl glycidyl ether-tyrosine adducts were unstable under the hydrolytic conditions.

The GC amino acid analysis revealed that, in addition to G-TYR, the G-treated silk yielded two minor products of unknown structure and the E-treated and the EGE-treated silk samples yielded E-tyrosine adduct and EGE-tyrosine adduct, respectively, when being hydrolyzed. The Kováts retention indices of the epoxide-modified tyrosines were determined on OV-17 and on Dexsil 300 GC and the relationship between the indices and the structure of the tyrosine derivatives was discussed.

(Received April 12, 1977)

1. 緒 言

塩崎, 田中¹⁻⁴⁾は, 中性塩水溶液存在下で各種のエポキシ化合物が絹フィブロインと反応することを見出し, 絹の重量増加に伴いチロシン(TYR)含有量が大きく減少するところから, この反応が主としてTYR残基へのエポキシ化合物の付加であると推定した。我々は前報^{5,6)}において, プロピレンオキシド(PO), 1,2-ブチレンオキシド(BO), フェニルグリシジルエーテル(PGE)および

-トリルグリシジルエーテル(TGE)で処理した絹フィブロインの酸加水分解物について, Gehrkeら⁷⁾の方法に準じて揮発性のN(O)-トリフルオロアセチル *n*-ブチルエステル(BTFA)誘導体としたのがガスクロマトグラフ(GC)分析を行い, これらのエポキシドのTYR残基への付加反応に由来する変性アミノ酸, すなわち, O-(2-ヒドロキシプロピル)チロシン(PO-TYR), O-(2-ヒドロキシブチル)チロシン(BO-TYR), O-(2-ヒドロキシ-3-フェノキシプロピル)チロシン(PGE-TYR)およびO-(2-ヒドロキシ-3-*p*-トリルオキシプロピル)チロシン(TGE-TYR)によると考えられるピークがクロマトグラム上に現われることを報告した。本報においては, グリシドール(G); エピクロロヒドリン(E), メタクリル酸グリシジル(GMA), メチルグリシジルエーテル(MGE), エチルグリシジルエーテル(EGE), イソプロピルグリシジルエーテル(IPRGE)およびアリルグリシジルエーテル(AGE)で処理した絹について同様のGC分析を行ったところ, これらの酸加水分解物にはいずれもO-(2,3-ジヒドロキシプロピル)チロシン(G-TYR)が含まれていることを見出したので, このことについて以下報告する。

2. 実 験

2.1 β -クロロ- α -アラニン

シスチンのメチルエステル塩酸塩⁸⁾と塩素の反応により, β -クロロ- α -アラニンメチルエステル塩酸塩⁹⁾を合成した。mp, 153°C(文献値156°C)。このものを加水分解しアンモニア処理することにより, β -クロロ- α -アラニン¹⁰⁾を得た。mp, 160-170°C(分解)(文献値160-170°C分解)。

2.2 試料および試薬

絹織物試料は前報⁵⁾で述べたものを用いた。各種エポキシ化合物は市販品を減圧蒸留して用いた。その他の試薬は前報⁵⁾で述べたものを用いた。

2.3 絹織物のエポキシ化合物処理

前報に準じて行った。処理条件は表2に示す。

2.4 アミノ酸のGC分析

酸加水分解, BTFA誘導体化ならびにOV-17およびDexsil 300 GCカラムを用いるGC分析は前報⁵⁾と同様にして行った。

2.5 アミノ酸分析計による分析

日本電子製, JLC-5AH自動アミノ酸分析計を用い標準の条件で分析した。

3. 結果と考察

3.1 G, EおよびGMA処理絹についての定性分析

未処理絹, G処理絹, E処理絹およびGMA処理絹の酸加水分解物のBTFA誘導体について, OV-17およびDexsil 300 GCを液相として用い, 昇温法で得たガスクロマトグラムを図1および2に示した。G処理絹のクロマトグラムには未処理絹のクロマトグラムに見られない3つの新しいピークが見出された。外部標準として加えたステアリン酸 *n*-ブチル(BS)のピークの前に現われる第一のピークの保持指標¹¹⁾は, OV-17に対して2337, Dexsil 300 GCに対して2329である。またBSピークの後に現われる第二のピークの保持指標は, OV-17に対し2707, Dexsil 300 GCに対し2705, また第三の

Fig. 1 Gas chromatograms of the hydrolysates (with or without BS) of (A), untreated silk; (B), glycidol-treated silk; (C), glycidyl methacrylate-treated silk; and (D), epichlorohydrin-treated silk on OV-17.

Fig. 2 Gas chromatograms of the hydrolysates (with or without BS) of (A), untreated silk; (B), glycidol-treated silk; (C), glycidyl methacrylate-treated silk; and (D), epichlorohydrin-treated silk on Dextsil 300 GC.

ピークの保持指標は、OV-17に対し3079, Dextsil 300 GCに対し2931であった。GMA処理絹のクロマトグラムには、G処理絹のクロマトグラムの第一の未知ピークと同じ位置に新たなピークが認められ、これ以上に顕著な未知ピークは認められない。これに対し、E処理絹のクロマトグラムには二つの新しいピークが認められ、第一の未知ピークは、G処理絹のクロマトグラムの第一の未知ピークと同じ位置にある。第二の未知ピークの保持指標は、OV-17に対して2539, Dextsil 300 GCに対して2408であり、この位置は、G処理絹の他の未知ピークのいずれとも一致しない。図3には、これらエポキシ化合物で処理した絹の酸加水分解物をアミノ酸分析計にかけて得られるクロマトグラムの一部を示した。G, GMAおよびE処理絹に共通した未知ピークがTYRのピーク

Fig. 3 Automatic ion-exchange chromatography of the hydrolysates of (A), untreated silk; (B), glycidyl methacrylate-treated silk; (C), glycidol-treated silk; (D), epichlorohydrin-treated silk; (E), allyl glycidyl ether-treated silk; (F), ethyl glycidyl ether-treated silk; and (G), isopropyl glycidyl ether-treated silk.

の前に認められる。G-処理絹の場合はさらにロイシン (LEU)のピークの後に未知ピークが認められるが、第三の未知ピークは見出されなかった。E処理絹についても第二の未知ピークは見出されなかった*。GC分析で見出されるアミノ酸のピークが、アミノ酸分析計による分析で見出されない例は他にも報告⁶⁾されている。

以上の結果より、G, GMAおよびE処理絹の酸加水分解物中には共通の変性アミノ酸が含まれていることは明らかであり、その構造はO-(2,3-ジヒドロキシプロピル)チロシン(G-TYR)であると考えられる。絹フィブロイン中のG付加TYR残基の酸加水分解によりG-TYRが生成することは当然である。GMA付加TYR残基の酸加水分解では側鎖のエステル結合の加水分解もおり、G-TYRが生成する。

* 通常の分析時間よりもずっと長時間緩衝液を流し続けたところ、第二の未知ピークが現われた。

これに対し、E処理網からもG-TYRが生成するのは予想外であったが、E付加TYR残基を酸加水分解する際、一部の塩素原子が水酸基に置換されるものと考えられる。したがってE処理網の第二の未知ピークは、E付加TYRすなわちO-(2-ヒドロキシ-3-クロロプロピル)チロシン(E-TYR)であろうと推定される。

この推定が妥当といえるか否かをGC分析における保持指標をもとに考察した。保持指標に及ぼす塩素原子の効果をj知るために、 β -クロロ- α -アラニン(CLALA)を合成し、その保持指標を求めアラニン(ALA)の保持指標と比較したところ、アラニンの β 炭素に塩素原子が結合することにより、OV-17に対し175, Dexsil 300 GCに対して137だけ保持指標が増加することがわかった。そこでE処理網の第二の未知ピークの保持指標とPO-TYRの保持指標の差を調べたところ、OV-17に対し205, Dexsil 300 GCに対して165であり、これは前述のCLALAについて求めた塩素原子の効果にはほぼ一致している。したがってこの未知ピーク物質が、PO-TYRに塩素原子が結合した形のE-TYRであることは充分考えられる。ついでに、G-TYRの保持指標について考察してみる。セリン(SER)とALAの保持指標の差、すなわち、ALAの水素原子を水酸基(BTFA誘導体化してCF₃COO基になっている)でおきかえる効果は、OV-17に対して56, Dexsil 300 GCに対し82である。G-TYRとPO-TYRの構造には同様に水酸基一つの差があるが、その保持指標の差はOV-17に対し43, Dexsil 300 GCに対し86であり、これらの値は前述のSERとALAの保持指標の差にはほぼ等しい。したがって、G, GMAおよびE処理網に共通するピークがG-TYRによるものであると考えたことは妥当であると考えられる。

以上で述べてきたアミノ酸の保持指標を表1にまとめて示した。なお、E処理網の酸加水分解物のBTFA誘導体についてGC-MS分析を行い、上述の未知ピークがそれぞれG-TYRおよびE-TYRによるものであることを確認し、第5回国際羊毛繊維研究会議で簡単に報告した

Table 1 Retention indices of BTFA amino acids.

Amino acid	Retention indices		Difference (ΔI)	Lit
	OV-17	Dexsil 300 GC		
Alanine	1261	1218	43	12
β -Chloro- α -alanine	1436	1355	81	This work
Serine	1317	1300	17	5
PO-TYR	2334	2243	46	5
E-TYR	2539	2408	131	This work
G-TYR	2377	2329	48	This work
EGE-TYR	2519	2424	95	This work

Abbreviation used: PO-TYR, O-(2-hydroxypropyl)tyrosine; E-TYR, O-(2-hydroxy-3-chloropropyl)tyrosine; G-TYR, O-(2,3-dihydroxypropyl)tyrosine; EGE-TYR, O-(2-hydroxy-3-ethoxypropyl)tyrosine; and BTFA amino acids, N-trifluoroacetyl *n*-butyl esters.

が¹⁸⁾、その詳細については他の場合とあわせ、別の機会に報告する予定である。

最後に、G処理網のガスクロマトグラムに認められる残りの二つの未知ピークについては、チロシン残基に対するGのジ付加体やトリ付加体による変性アミノ酸である可能性が考えられるが、保持指標の検討だけで結論を下すことは出来ないため、これについては後日、GC-MS分析により検討する予定である。

3.2 アルキルグリンジルエーテル処理網についての定性分析

MGE, EGE, IPRGEおよびAGE処理網について同様にGC分析を行って得られるクロマトグラムを図4および5に示した。これらいずれの試料のクロマトグラムにもG-TYRのピークが認められた。このことはアミノ酸分析計による分析でも認められた。AGE処理網の場合を図3に示した。TYR残基へのこれらアルキルグリンジルエーテル付加体のエーテル結合は、アリアルグリンジルエーテル付加体の場合¹⁾とことなり、酸加水分解時に容易に切断されることを意味する結果である。

EGE処理網の場合にはかなり顕著な第二の未知ピークが認められ、その保持指標はOV-17に対し2519, Dexsil

Fig. 4 Gas chromatograms of the hydrolysates (with or without BS) of (A), untreated silk; (B), methyl glycidyl ether-treated silk; (C), ethyl glycidyl ether-treated silk; (D), isopropyl glycidyl ether-treated silk; and (E), allyl glycidyl ether-treated silk on OV-17.

300 GC に対し 2424 であり、E-TYR の値に近いが、この場合 E-TYR が生成することは考えにくく、むしろ EGE の TYR 付加体すなわち O-(2-ヒドロキシ-3-エトキシプロピル)チロシン (EGE-TYR) であると考えた方が妥当である。この未知物質が E-TYR でないということを確認するために、EGE 処理絹の酸加水分解物をアミノ酸分析計にかけてみたところ、G-TYR のピークが認められる他にフェニルアラニン (PHE) のピークの後に第二の未知ピークが認められた*が、この位置に E 処理絹の酸加水分解物ではピークは認められない (Fig. 3)。したがって EGE 処理絹についてのガスクロマトグラムに認められる第二の未知ピークは E-TYR によるものではないと判断される。EGE-TYR の構造は PO-TYR の水素原子一つをエトキシ (C_2H_5O) 基で置換したものに相当する。EGE-TYR と考えられる未知ピークの保持指標と PO-TYR の保持指標の差は、OV-17 に対し 185、Dexsil 300 GC に対し 181 であり、この値はエトキシ基による値としては小さすぎるくらいがある。この点が疑問であるが、その後の GC-MS 分析によりこの未知ビ

* エリ蚕を EGE 処理した場合も同様な結果が得られている¹⁴⁾。

Fig. 5 Gas chromatograms of the hydrolysates (with or without BS) of (A), untreated silk; (B), methyl glycidyl ether-treated silk; (C), ethyl glycidyl ether-treated silk; (D), isopropyl glycidyl ether-treated silk; and (E), allyl glycidyl ether-treated silk on Dexsil 300 GC.

ークが EGE-TYR であることを確認した。このことについては別の機会に報告する予定である。

AGE 処理絹のガスクロマトグラムには G-TYR のピークの他に小さくないつかの未知ピークが認められる。これらの未知ピークについては検討しなかった。

3.3 G-TYR の定量分析

G-TYR の GC による定量分析に必要な相対モル感度は前報^{5,6)}と同様に ECN 法により推定した。 $-CO_2-$ 、 $-NHCOCF_3$ および $-COCF_3$ 基の ECN をそれぞれ $-0.5^{12)}$ 、 $-0.7^{12)}$ および $0.4^{16)}$ とし、G-TYR について ΣECN を求めると 13.6 となる。グルタミン酸 (GLU) の ΣECN は 9.3 となるので G-TYR の GLU に対する相対モル感度は 1.46 となる。実際にはさらに BS に対する相対モル感度に換算しなおし、BS を外部標準として定量分析を行う。

一部の試料についてはアミノ酸分析計を用いた定量分析を同時に行った。G-TYR の発色係数は PHE の値に等しいと仮定し、この値を用いて定量分析を行った。いずれの分析法の場合も、アミノ酸分析値はエポキシ処理による重量増加を考慮して補正し、未処理絹 1 g 当りのモル数で示した。得られた結果を表 2 に示す。

Table 2 Amino acid analysis of silk fabrics treated with various epoxides.^a

Epoxide	Reaction conditions ^b	Add on % μmoles/g		Hydrolysis time, hr	Method ^c	Amino acids, μmoles/g		
						TYR	G-TYR	TYR+G-TYR
Untreated				8	GC	657		657
					LC	631		631
G	Ethanol/15/68/6	6.08	821	24	GC	462	57	519
					LC	631	70	482
GMA	Toluene/15/75/6	4.85	341	8	GC	232	301	533
				24	GC	223	278	501
					LC	259	280	539
E	Ethanol/15/75/3	3.03	327	24	GC	355	58	413
					LC	323	63	386
MGE	Ethanol/20/68/6	6.60	750	24	GC	252	280	532
EGE	Ethanol/20/75/6	7.78	762	24	GC	116	296	412
					LC	125	327	452
IPRGE	Ethanol/20/75/6	5.39	464	24	GC	364	192	556
					LC	375	203	578
AGE	Ethanol/15/68/6	6.53	572	8	GC	168	267	435
				24	GC	144	257	401
					LC	177	280	457

^a Silk fabrics were padded with 1 N Na₂S₂O₃ to about 100% pick up and treated with an epoxide solution as given below. Hydrolysis of the sample was made with constant-boiling HCl in a sealed tube at 100 °C.

^b Given in the order: solvent/concentration in v/v%/reaction temperature in °C/reaction time in h.

^c GC, gas-liquid chromatography; LC, with an automatic amino acid analyzer.

GCで推定されたG-TYRの量を、アミノ酸分析計(LC法)で推定されたG-TYRの値に対しプロットしたのが図6である。各点は原点を通る直線上にあり、両者の値はほぼ一致することが示されている。TYRとG-TYR含有量の和(表2)は、いずれの試料でも未処理のTYR含有量より小さな値となっている。G処理絹の場合、重量増加率より予想されるG付加量は、生成するG-TYRの量よりきわめて大きく、また反応によるTYR減少量にくらべてきわめて大きい。この場合、GMAやEの場合のようにTYR残基への単純な付加反応のみではその大きな付着量を説明できないことがわかる。MGE、EGEおよびIPRGE処理の場合も、重量増加率より求められる付加量はTYR減少量よりかなり大きい。

絹中にはTYRよりも多量のSER残基が含まれている。エポキシド処理絹のアミノ酸分析の結果¹⁻⁴⁾では処理によるSERの減少量は小さい。いまSER残基にエポキシ化合物が付加した構造を考えると、ジアルキルエーテル型の結合が生ずる筈であるが、本研究の結果から考えるとこの結合は塩酸加水分解時に切断される可能性がある。もしもその結果、SERが生成するものとなれば、みかけ上SER残基は反応していないだけであって、実際にはかなりエポキシ化合物の付加がおきていることになる。この点は今後に残された興味ある問題点である。

Fig. 6 Comparison of the G-TYR contents, in silk samples treated with various epoxides (see Table 2), estimated by gas chromatography (GC) and by automatic ion exchange chromatography (LC).

4. 結 論

G, GMA, E, MGE, EGE, IPRGEおよびAGEで処理した絹フィブロインの酸加水分解物をBTFA誘導体にしたのちGC分析したところ、いずれの試料にもO-(2,3-ジヒドロキシプロピル)チロシン(G-TYR)が含まれていることがわかった。またこのアミノ酸は、アミノ酸分析計ではTYRのすぐ前に溶出する。G処理絹フィブロインからG-TYRが生成するのはGの付加したTYR残基の加水分解で説明される。GMA処理絹の場合は、GMAの付加したTYR残基の加水分解処理でペプチド結合の他にエステル結合も加水分解を受けるため、E処理絹の場合はEの付加したTYR残基の加水分解処理中、一部の塩素原子が水酸基で置換されるため、またアルキルグリシジルエーテル処理絹の場合は、アルキルグリシジルエーテルの付加したTYR残基の加水分解処理でエーテル結合が切断されるためいずれもG-TYRが生成する。EおよびEGE処理絹の場合は、これらがTYRの水酸基に付加した形のアミノ酸(E-TYRおよびEGE-TYR)と考えられるピークがガスクロマトグラム上に認められた。またG処理絹の場合、G-TYRの他に二つの顕著な未知ピークが認められた。

付 記：本研究の一部に協力して頂いた佐藤康正氏および山川一三男氏に感謝の意を表します。

文 献

- 1) H. Shiozaki, Y. Tanaka; *J. Polymer Sci., B*, 7, 325 (1969)
- 2) Y. Tanaka, H. Shiozaki; *Makromol. Chem.*, 129, 12 (1969)
- 3) H. Shiozaki, Y. Tanaka; *Makromol. Chem.*, 143, 25 (1971)
- 4) H. Shiozaki, Y. Tanaka; *Makromol. Chem.*, 152, 217 (1972)
- 5) 坂本宗仙, 梶山孝一, 塩崎英樹, 田中芳雄; *織学誌*, 31, T-158 (1975)
- 6) 坂本宗仙, 梶山孝一, 塩崎英樹, 田中芳雄; *織学誌*, 32, T-335 (1976)
- 7) C. W. Gehrke, D. Roach, R. W. Zumwalt, D. L. Stalling, L. L. Wall; *Quantitative Gas-Liquid Chromatography of Amino Acids in Proteins and Biological Substances*, Analytical Laboratories Inc., Columbia, Missouri, U.S.A. (1968)
- 8) R. G. Webb, M. W. Haskell, C. H. Stammer; *J. Org. Chem.*, 34, 576 (1969)
- 9) E. Fischer, K. Raske; *Ber.*, 93, 782 (1960)
- 10) H. Baganz, G. Dransch; *Ber.*, 40, 3717 (1907)
- 11) E. Kováts; *Helv. Chim. Acta*, 41, 1915 (1958), *Z. Anal. Chem.*, 181, 351 (1961)
- 12) M. Sakamoto, K.-I. Kajiyama, H. Tonami; *J. Chromatogr.*, 94, 189 (1974)
- 13) M. Sakamoto, K.-I. Kajiyama, Y. Sato, F. Nakayama; *Proc. 5th Internat. Wool Text. Res. Conf., Aachen*, 1975, Vol. V, 339 (1976)
- 14) Y. Tanaka, H. Shiozaki; *J. Polymer Sci., Polymer Chem. Ed.*, 12, 2741 (1974)
- 15) A. Islam, A. Darbre; *J. Chromatogr.*, 71, 223 (1972)