衛生化学
EISEI KAGAKU
34 (5) 430-435 (1988)

熱分解ガスクロマトグラフィーの裁判化学への応用 (第1報)
アミノ酸及びタンパク質試料の分析

土橋 均, 三木昭宏
大阪府警察本部科学捜査研究所

Application of Pyrolysis Gas Chromatography for Forensic Chemistry. I.
Analysis of Amino Acids and Protein Samples

HITOSHI TSUCHIHASHI and AKIHIRO MIKI
Forensic Science Laboratory, Osaka Prefectural Police Headquarters,
Otemaenochi, Higashi-ku, Osaka 540, Japan

(Received April 5, 1988)

In order to carry out a rapid analysis of amino acids, proteins and related materials without troublesome pretreatment, application of pyrolysis gas chromatography (PGC) for these samples was investigated. Highly resolved pyrograms were obtained from these materials by using Curie point pyrolyser and fused-silica capillary column with moderate polarity. At first, PGC of 21 major L- α -amino acids was studied, and 18 of them were identified by using 1 μ g of each sample. Secondly, PGC of protein samples, such as egg white lysozyme, wool fiber, etc. was examined. The major peaks observed on these pyrograms were well assigned, and it was possible to discriminate trace protein samples by comparison with the differences in the amino acid residues.

Keywords—pyrolysis gas chromatography; fused-silica capillary column; amino acid; protein; pepsin; egg white lysozyme; wool; silk; leather

緒 言

タンパク質関連物質は自然界で最も重要な化学物質の1つであり、裁判化学分野でもウール・絹などの動物性繊維、皮革類、乳製品・肉・卵・豆腐などの食品片、胃内容物や産業廃棄物、毛髪・獣毛、爪・皮膚などの組織片及び一部の医薬品等、犯罪の捜査や立証を行う上で鑑定要望の多いものである。これらタンパク質関連試料の分析においては、そのアミノ酸組成を明らかにし、各試料のアミノ酸組成の相違に基づいた分析を行うことが何よりも重要と考えられる。しかし従来のタンパク質中構成アミノ酸の分析法では、酸加水分解、誘導体化などの前処理に長時間を要する場合も多く、裁判化学的には不向きである。更に加水分解中の一部アミノ酸の変化といった問題も起こり得る。¹⁾ そこで今回、我々は前処理をほとんど必要としない熱分解ガスクロマトグラフィー (PGC) の手法をアミノ酸及びタンパク質関連物質の分析に用いることを目的として検討を行った。

PGC は試料を不活性ガス中で瞬間的に強熱し、その

とき発生する熱分解ガスをガスクロマトグラフ (GC) に導入して分析する手法であり、前処理をほとんど必要とせず、1 mg 以下の微小試料でも直接、迅速に分析できることから鑑識科学分野でも微小塗膜片、各種プラスチック片など工業製品由来の高分子化合物等の検査手段として広く利用されている。²⁾

PGC によるアミノ酸関連物質の分析については、Simmonds ら³⁾ による検討や、Smith ら⁴⁾ による L-プロリン (Pro) 及びその関連物質の分析、Lyle ら⁵⁾ による L-シスチン (Cys) 等 5 種類のアミノ酸の分析、Posthumus ら⁶⁾ による L-メチオニン (Met) の熱分解質量分析等の報告が散見されるのみであり、アミノ酸及びタンパク質関連物質全体の分析法としては確立されていない。

本報では熱分解装置に再現性の点ですぐれるキュリーポイントパイロライザーを、また GC の分離カラムには高分解能、不活性な特性を有する溶融シリカキャピラリーカラムを用いて、アミノ酸及びその関連物質の

PGC を行ったところ、主要 L- α -アミノ酸21種類中18種の識別が可能となった。またペプシンなどの単純タンパク質の PGC では、そのパイログラム中に構成アミノ酸由来の熱分解生成物のピークが検出され、その主なピークのアミノ酸由来を明らかにすることができた。更にウールなどの天然タンパク質の PGC についても検討を行ったので併せて報告する。

実験の部

試薬 L- α -アミノ酸はすべて東京化成製の特級品、ペプシン (品番 P-6887) 及び卵白リゾチーム (品番 L-7001) はシグマ社製、ウール及び絹糸は染色試材株式会社、牛皮革は堀下栄株式会社より供与された標品を用いた。L- α -アミノ酸及び単純タンパク質は、あらかじめ濃度 1–10 mg/ml の水溶液又はメチルアルコール溶液を調製し、実験の項に記載の方法により分析した。ウール、絹糸、牛皮革は約 100 μ g となるように切り取りメタノールで洗浄の上、使用した。

装置 熱分解装置：日本分析工業社製 JHP-3 型キューリーポイントパイロライザー、ガスクロマトグラフ：島津 GC-7 AG 型 (CLH-702 スプリット、水素炎イオン化検出器付き)、データ処理装置：島津クロマトパック C-R 3 A、質量分析計：島津 QP-1000 GC-MS。

熱分解装置、GC 及び質量分析の条件 熱分解装置：熱分解温度 590 $^{\circ}$ C (同温度用フェロマグネチックホイール使用)、熱分解時間 3 s、熱分解炉恒温槽温度 180 $^{\circ}$ C。GC：分離カラム 島津溶融シリカキャピラリーカラム CBP-10 (シアノプロピル OV-1701 相当) 内径 0.2 mm、膜厚 0.25 μ m、長さ 40 m、カラム温度 70–260 $^{\circ}$ C (4 分間据え置いた後毎分 10 $^{\circ}$ C の昇温分析)、試料注入口及び検出器の温度 280 $^{\circ}$ C、キャリアーガス 窒素、線速度 30 cm/s、スプリット比 1 : 80。質量分析：セパレート温度 280 $^{\circ}$ C、イオン化電圧 70 eV、他の条件は GC と同じ。

分析方法 L- α -アミノ酸は 10 μ g、単純タンパク質は 100 μ g となるように、あらかじめ調製したこれらの水溶液又はメチルアルコール溶液の一定量をフェロマグネチックホイールに滴下、ホットプレート上約 50 $^{\circ}$ C で乾燥させたうえ包み込み、上記条件下で分析した。ウール、絹糸、牛皮革については約 100 μ g をフェロマグネチックホイールに包み込み分析した。

結果と考察

1. 熱分解条件の検討

主要 L- α -アミノ酸 21 種類のうち芳香族モノアミノカルボン酸として L-フェニルアラニン (Phe) と L-トリプトファン (Trp)、脂肪族モノアミノカルボン酸としてグ

リシン (Gly) と L-イソロイシン (Ile)、モノアミノジカルボン酸として L-グルタミン酸 (Glu)、ジアミノモノカルボン酸として L-リジン (Lys)、含硫アミノ酸として Met、以上 7 種類の L- α -アミノ酸各 10 μ g 並びに天然タンパク質として卵白リゾチーム 100 μ g について、それぞれ、445 $^{\circ}$ C、500 $^{\circ}$ C、590 $^{\circ}$ C、650 $^{\circ}$ C、764 $^{\circ}$ C 用の各フェロマグネチックホイールを使用し、熱分解時間を 3 秒間に設定して分析を行った。L- α -アミノ酸については各パイログラムの検出ピーク面積の和を、また卵白リゾチームについては主要ピーク (アセトアルデヒド、トルエン、3-メチルブタンニトリル、フェノール、*p*-クレゾール、インドール、スカトール) の各面積を熱分解温度に対してプロットしたところ、Fig. 1, 2 に示すようなグラフが得られた。

Fig. 1, 2 から熱分解温度は 590–650 $^{\circ}$ C 程度とするのが妥当であると考えられたが、熱分解温度を 650 $^{\circ}$ C 以上になると、パイログラムの高沸点部位にノイズ的ピークが見られること、また Phe では熱分解生成物の二次反応によるものと考えられるジフェニル、ジベンジルの生成量が増加することなどの弊害が見られた。よって本報では熱分解温度を 590 $^{\circ}$ C、すなわち同温度用のフェロマグネチックホイールを用いて分析を行うことにした。

更に、上記アミノ酸のうち Fig. 1 における検出ピーク面積の和が最大であった Phe と最小であった Glu 各 10 μ g、並びにタンパク質としてウール 100 μ g について、それぞれ 590 $^{\circ}$ C 用のフェロマグネチックホイールに包み、熱分解時間を 1, 2, 3, 4, 5 秒間に設定して熱分解を行った。L- α -アミノ酸については各パイログラムの検出ピーク面積の和を、またウールについては主要検出ピ

Fig. 1. Effects of Pyrolysis Temperature on Peak Intensity of Degradation Products of 7 Amino Acids

○: L-phenylalanine, □: L-isoleucine, ▽: L-glutamic acid, ●: L-methionine, ▲: L-tryptophan, ●: L-lysine, △: glycine.

TABLE I. Degradation Products Identified in Pyrograms of Aromatic Amino Acids

Peak No. ^{a)}	L-Phenylalanine	L-Tyrosine	L-Tryptophan
1	Benzene	Phenol	Indole
2	Toluene	<i>p</i> -Cresol	Skatole
3	Styrene	<i>p</i> -Hydroxystyrene	3-Ethylindole
4	Unknown	Unknown	
5	Phenethylamine		
6	Diphenyl		
7	Dibenzyl		
8	Unknown		

a) Peak numbers correspond to those in the pyrograms in Fig. 4.

Fig. 2. Effects of Pyrolysis Temperature on Peak Intensity of Degradation Products of Egg White Lysozyme

■: acetone, △: toluene, ○: 3-methylbutanenitrile, ▽: pyrrole, ▲: phenol, □: *p*-cresol, ●: indole, ●: skatole.

ーク (アセトアルデヒド, トルエン, 3-メチルブタンニトリル, フェノール, *p*-クレゾール, インドール, スカトール) の各面積の和を熱分解時間に対してプロットしたところ, Fig. 3 に示すように, アミノ酸については2-3秒間ではほぼ平衡に達していた. なお, ウールについては3秒間では平衡に達していないが, 熱分解時間を4秒間以上に延長するとパイログラム中の一部のピークにテーリングが見られ, 分解能が低下する傾向が見られた. そこで, 熱分解時間はアミノ酸, タンパク質とも3秒間に統一して実験を行った.

2. 主要 L-α-アミノ酸の熱分解生成物

主要 L-α-アミノ酸についてそれぞれ PGC を行い, 主なピークについて質量分析を行ったところ, 標品との比較により以下のような熱分解生成物が検出 同 定 され

Fig. 3. Effects of Pyrolysis Time on Peak Intensity of Degradation Products Detected on Pyrolysis of L-Phenylalanine, L-Glutamic Acid and Wool Fiber

○: L-phenylalanine, ●: L-glutamic acid, △: wool fiber.

た. まず芳香族アミノ酸の熱分解では, Table I に示すようにカルボキシル基のα位又はβ位の C-C 結合の開裂による生成物, すなわち Phe からはトルエン, L-チロシン (Tyr) からはフェノールと *p*-クレゾール, Trp からはインドールとスカトールがそれぞれ検出され, これらの生成物は各アミノ酸がタンパク質分子鎖中にアミノ酸残基として含まれている場合にも検出された. 上記以外に, Phe からはフェネチルアミン及び微量のジフェニル, ジベンジルなどが検出された. このうちフェネチルアミンは脱炭酸, ジフェニルとジベンジルは熱分解生成物の二次反応により生成したものと考えられる.

脂肪族アミノ酸の熱分解では Table II に示すように元のアミノ酸より炭素数の1つ少ないアルデヒドとニトリル, *N*-アルキルアルドイミンとがそれぞれ共通して検出され, このうちアルデヒドとニトリルは各アミノ酸がタンパク質分子鎖中にアミノ酸残基として含まれている場合にも検出された. これらの生成物は, Chart 1 に示

TABLE II. Degradation Products Identified in Pyrograms of Aliphatic Amino Acids

Peak No. ^{a)}	L-Alanine	L-Leucine	L-Isoleucine
1	CH ₃ -CHO	CH ₃ -CH-CH ₂ -CHO CH ₃	CH ₃ -CH ₂ -CH-CHO CH ₃
2	CH ₃ -CN	CH ₃ -CH-CH ₂ -CN CH ₃	CH ₃ -CH ₂ -CH-CN CH ₃
3		CH ₃ CH ₃ -CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -N CH ₃	CH ₃ CH ₃ -CH ₂ -CH-CH ₂ -CH ₂ -N CH ₃

a) Peak numbers correspond to those in the pyrograms in Fig. 4.

Chart 1

すような過程により生成したものと考えられる。³⁾

一方, Pro と L-ヒドロキシプロリン (Hyp) からは共に脱炭酸と脱水素によると考えられる 1-ピロリンとピロールとが標品の質量分析の結果⁴⁾ との比較によりそれぞれ共通して検出され, このうちピロールは各アミノ酸がタンパク質分子鎖中にアミノ酸残基として含まれる場合にも検出された. 上記以外の L-α-アミノ酸についても PGC を行った結果, Fig. 4 に示すように各アミノ酸からそれぞれ固有のパイログラムが得られ, 相互に識別が可能であり, 試料の必要量は 1 μg であった.

しかし, Hyp, L-グルタミン (Gln), L-アスパラギン (Asn) のパイログラムについては, それぞれ Pro, Glu, L-アスパラギン酸 (Asp) のものと差は認められず, 本法による識別は困難であった.

3. 単純タンパク質の熱分解生成物

アミノ酸組成既知の単純タンパク質として ペプシン (アラニン: Ala 16, アルギニン: Arg 2, アスパラギン: Asn 12, Asp 29, Cys 6, Gln 13, Glu 13, Gly 35, ヒスチジン: His 1, Ile 25, ロイシン: Leu 26, Lys 1, Met 4, Phe 14, Pro 15, セリン: Ser 44, スレオニン: Thr 26, Trp 5, Tyr 16, バリン: Val 23

Fig. 4. Chart of Peak Bands Observed in Pyrograms of 21 L-α-Amino Acids

計アミノ酸残基数326, カルボキシル末端 Ile, アミノ末端 Ala) 及び卵白リゾチーム (Ala 12, Arg 11, Asn 13, Asp 8, Cys 8, Gln 3, Glu 2, Gly 12, His 1, Ile 6, Leu 8, Lys 6, Met 2, Phe 3, Pro 2, Ser 10, Thr 7, Trp 6, Tyr 3, Val 6 計アミノ酸残基数129, カルボキシル末端 Leu, アミノ末端 Lys) について PGC を行った.

両試料からは、同一のピークパターンを有するパイログラムが得られ、その1例としてペプシンのものを Fig. 5 に示す。また、主要ピークについて質量分析を行ったところ標品との比較により Table III に示すような生成物が同定された。Table III に示す熱分解生成物のうちトルエンは Phe、フェノールと *p*-クレゾールは Tyr、インドールとスカトールは Trp の各芳香族アミノ酸残基に由来するものと考えられる。なお、Phe の PGC においてはフェネチルアミンが主要熱分解生成物であったが、ペプシン、卵白リゾチムの PGC ではフェネチルアミンは検出されなかった。これは、Phe の PGC では脱炭酸によりフェネチルアミンが生成するが、Phe がアミノ酸残基としてペプチド結合鎖の中間部に位置する場合、このような脱炭酸は考えられず、その熱分解としてはカルボキシル基の α 位の C-C 結合の解裂、すなわち側鎖の脱離が起こるためと考えられる。また、アセトアルデヒドは Ala、3-メチルプロパニトリルは Val、3-メチルブタンニトリルと3-メチルブタナールは Leu、2-メチルブタンニトリルと2-メチルブタナールは Ile の各脂肪族アミノ酸に由来するものと考えられ

Fig. 5. Pyrogram of Pepsin

る。また、ピロールは Pro 又は Hyp に由来するもの、更にピーク番号11, 12の各ピークの質量分析の結果はそれぞれ Glu (又は Gln), Asp (又は Asn) の熱分解生成物のものと共通しており、これらのアミノ酸残基に由来するものと考えられるが、その化学構造については現在検討中である。

4. ウールなどの天然タンパク質の PGC

ウール、絹糸、牛皮革の PGC を行ったところ、Fig. 6 に示すようなパイログラムが得られ、その主要ピークについて質量分析を行ったところ、いずれも Table III に示したものと同様に、各アミノ酸残基に由来する熱分解生成物が検出された。Fig. 6 において、絹糸では Tyr に由来するフェノールと *p*-クレゾールが、また牛皮革では Pro 又は Hyp に由来するピロールのピークが目立って大きく現れている。これは、絹糸では Tyr 残基

Fig. 6. Pyrograms of Wool Fiber, Silk Fiber and Leather

TABLE III. Degradation Products Identified in Pyrograms of Pepsin

Peak No.	Degradation products	Amino acid residues assigned
1	Acetaldehyde	Alanine
2	3-Methylbutanal	Leucine
3	2-Methylbutanal	Isoleucine
4	2-Methylpropanenitrile	Valine
5	Toluene	Phenylalanine
6	2-Methylbutanenitrile	Isoleucine
7	3-Methylbutanenitrile	Leucine
8	Pyrrole	Proline, hydroxyproline
9	Phenol	Tyrosine
10	<i>p</i> -Cresol	Tyrosine
11	Unknown	Glutamic acid, glutamine
12	Unknown	Aspartic acid, asparagine
13	Indole	Tryptophan
14	Skatole	Tryptophan

a) Peak numbers correspond to those in the pyrogram of pepsin (Fig. 5).

Fig. 7. The Relationship between Quantity of Egg White Lysozyme and Peak Intensity of Toluene in Its Pyrogram

数が、牛皮革では Pro 又は Hyp 残基数が他のアミノ酸残基に比べて多いという特徴によるものと考えられる。⁶⁾ また、牛皮革では Trp に由来するインドールとスカトールのピークが検出されないのは、一般的に皮革類では構成アミノ酸として Trp を含まないという事実を反映した結果であると考えられる。⁷⁾ このように、ウールなどの天然タンパク質の PGC では、各試料の構成アミノ酸残基の構成比率を反映したパイログラムが得られ、これによってタンパク質試料の異同識別が可能であることが示唆された。

5. 本法における再現性の検討

L- α -アミノ酸として Trp 10 μg , タンパク質として卵白リゾチーム 100 μg について、それぞれ5回ずつ、590 $^{\circ}\text{C}$, 3秒間の熱分解を行い、得られたパイログラム中のトルエンのピーク面積について、繰り返し精度を調べた結果、その変動係数は、それぞれ2.79%, 3.30%であり、良好な再現性が得られた。

6. 熱分解生成物の定量性の検討

熱分解生成物の定量性について、卵白リゾチームの量を20—200 μg の範囲で変化させ、それぞれ590 $^{\circ}\text{C}$, 3秒間の熱分解を行い、得られたパイログラム中のトルエンのピーク面積を試料量に対してプロットしたところ、Fig. 7 に示すように、良好な直線関係を示し、その相関係数は0.994であった。また、20 μg 程度の試料量でも明瞭なパイログラムが得られ、分析可能であった。

ま と め

PGC による L- α -アミノ酸、単純タンパク質等の分析について検討を行った。その結果、590 $^{\circ}\text{C}$, 3秒間の熱分解により、主要 L- α -アミノ酸のうち18種のアミノ酸の識別が可能であり、試料必要量は1 μg であった。また、卵白リゾチーム、ウール等のタンパク質試料のパイログラムには構成アミノ酸由来の熱分解生成物のピークが検出され、その主なピークのアミノ酸由来が明らかになった。

本法によるタンパク質試料の分析では20 μg 程度の微小試料でも前処理なしで迅速に分析可能であり、タンパク質を構成する主要アミノ酸のうち、13種のアミノ酸残基を検出することができ、これら試料のアミノ酸組成の相違に基づく異同識別に応用可能であった。

引 用 文 献

- 1) 水島三一郎, 赤堀四郎編, “蛋白質化学2,” 共立出版, 1957, pp.179—183.
- 2) R.W. May, J. Potter, *J. Forensic Sci.*, **15**, 135 (1975); E. Küllik, M. Kaljurand, K. Koel, *J. Chromatogr.*, **126**, 249 (1976).
- 3) P.G. Simmonds, E.E. Medley, M.A. Ratcliff, Jr., G.P. Shulman, *Anal. Chem.*, **44**, 2060 (1972).
- 4) R.M. Smith, S.A.K. Shawkat, W.P. Hayes, *Analyst* (London), **105**, 1176 (1980).
- 5) S.J. Lyle, M.S. Tehrani, *J. Chromatogr.*, **240**, 209 (1982).
- 6) M.A. Posthumus, N.M.M. Nibbering, *Org. Mass Spectrom.*, **12**, 334 (1977).
- 7) 水島三一郎, 赤堀四郎編, “蛋白質化学5,” 共立出版, 1957, pp.317—320.