アミノ酸・ペプチドのガスクロマトグラフィー (1)

崎 山 文 夫

Fumio SAKIYAMA

大阪大学蛋白質研究所

(1) I はじめに

II N-アシルアミノ酸エステル型誘導体によるガスクロマトグラフィー

1) N-TFA-アミノ酸-n-ブチルエステル

(2) 2) N-TFA-アミノ酸メチルエステル 3) その他

III その他のアミノ酸誘導体によるガスクロマトグラフィー

1) DNP-アミノ酸メチルエステル

2) アミノ酸の PTH 誘導体

3) TMS-アミノ酸-TMS-エステル

IV アミノ酸・ペプチドのガスクロマトグラフィーの応用

V おわりに

I. は じ め に

アミノ酸やペプチドのガスクロマトグラフィーについての研究は、1956 年に Hunter ら⁽¹⁾によってアミノ酸について行なわれたのが最初で、それ以来今日まで長足の進歩を遂げてきた。このときに用いられた方法は、両性イオンで揮発性を持たないアミノ酸であるために、いわゆるニンヒドリン酸化を行ない、もとのアミノ酸の側鎖に由来するアルデヒドについて分析を行なったものである。

このように、アミノ酸やペプチドのガスクロマトグラフィーのためには、まずこれらの化合物を揮発性のある適当な誘導体に導くことが必要であり、さらにクロマトグラフィーの諸条件——固定相、担体の性質、展開温度など——のもとで十分な安定性を持ち、しかも定量的に誘導されなければならない。そのために、初期のころはアミノ酸の骨格構造を変える諸反応、たとえば脱炭酸反応や前述のニンヒドリンによる酸化反応などが比較的多く検討されたが、一方ではアミノ酸エステルなどでイオン性をなくす方法が試みられた。たとえば、アルブミンのメタノール分解によって生じたアミノ酸メチルエステルの分析などがその例で、Ala, Pro, Val, Leu, Ile, Glu, Asp などが検出された。しかし、この種のアミノ酸エステルはなお α -アミノ基が遊離のまま存在しており、揮発性および安定性の点で改良される必要があった。

そのころ、ペプチド合成において α -アミノ基の新しい保護基として開発されていたトリフロロアセチル ($\text{CF}_3\text{CO}-$, TFA と略す) 基でアミノ基を置換した N-TFA-アミノ酸メチルエステルが合成され、アミノ酸エステルに代わってガスクロマトグラフィーに応用された。その

後、アシル化アミノ酸エステル型誘導体によるガスクロマトグラフィーは、種々のアシル基およびエステルの組合わせについて検討が加えられ、最近ではアミノ基は TFA 基やアセチル (Ac) 基で、カルボキシ基はメチルエステル、プロピルエステル、ブチルエステル、アミルエステルなどに変えた誘導体についてよく研究され、なかでもアミノ基の置換基として、Ac 基より揮発性の大きい誘導体を生成する TFA 基が多く使われている。

一方、ペプチドのガスクロマトグラフィーはアミノ酸より少し遅れて研究が始められ、Weygand ら⁽²⁾はアミノ酸の場合と同じく、N-TFA-ペプチドメチルエステルを用いる方法についてもっぱら研究を行ない、その成果はペプチド合成におけるラセミ化の研究などに応用されている。しかし、ペプチドのガスクロマトグラフィーは、このタイプのものではその揮発性から予想されるように、せいぜいオリゴペプチドに限られる。そのほか Biemann ら⁽³⁾は、 LiAlH_4 で N-アセチルペプチドエステルのペプチド結合およびエステルを還元することを試みたが、一般に用いられるに至っていない。

このように、数多くの研究がなされてきたアミノ酸のクロマトグラフィーに限っても、今日行なわれているイオン交換クロマトグラフィーによる分析法ほど確立した分析法ではなく、まだ蛋白質組成アミノ酸の分析に利用されるまでには至っていない。しかし、それほど精度を要しない分析や定性分析または特定のアミノ酸（数種程度）の分析にはかなり利用されており、微量試料について迅速に分析できるという特徴があるので、分析条件が確立されれば有望なアミノ酸分析法であると考えられる。

本稿では、TFA-アミノ酸-n-ブチルエステルを用いる方法を中心に、N-アシルアミノ酸エステル型誘導体

による蛋白質構成アミノ酸の分析を目的とするいろいろの方法、蛋白質のアミノ末端の決定法として用いられている DNP* 法や PTH** 法における DNP-アミノ酸やアミノ酸の PTH 誘導体の同定法の 1 つとしてのガスクロマトグラフィーの利用、アミノ酸・オリゴペプチドのガスクロマトグラフィーの応用、などについて述べてみたいと思う。なお、アミノ酸のガスクロマトグラフィーについては、多くのすぐれた総説⁽⁴⁻⁶⁾があるので参照されたい。

II. N-アシルアミノ酸エステルのガスクロマトグラフィー

前述のように、N-TFA-アミノ酸メチルエステルのガスクロマトグラフィーが検討されている一方、1959年に Youngs は、N-アセチルアミノ酸-*n*-ブチルエステル⁽⁷⁾を、1961 年には Johnson らが N-アセチルアミノ酸-*n*-アシルエステル⁽⁸⁾をそれぞれ用いて、アミノ酸のガスクロマトグラフィーを研究した。そして、1962 年に Zomzely ら⁽⁹⁾は、Youngs らの N-アセチル基を N-TFA 基に変えた N-TFA-アミノ酸-*n*-ブチルエステルを用いて、19 種のアミノ酸のガスクロマトグラフィーによる分離を報告し、この研究がさらに Gehrke らによって発展されて、今日ではアミノ酸のガスクロマトグラフィーとして最も信頼性の大きい方法になっている。また、これと並行して、最も簡単でしかも揮発性のよい N-TFA-アミノ酸メチルエステルを用いるガスクロマトグラフィーも、池川、Cruickshank ら、Hagen ら、Makisumi ら、Dabre らによって研究されている。

1) N-TFA-アミノ酸-*n*-ブチルエステル

N-TFA-アミノ酸-*n*-ブチルエステルは、一般に、対応するメチルエステルに比較して揮発性は少ないけれども、このことがガスクロマトグラフィーにアミノ酸を供するための誘導体としてすぐれている点でもある。というのは、アミノ酸をその TFA-メチルエステルに変化させる際、アシル化アミノ酸エステルがいったん生成したとき、その後の溶媒の除去を注意して行なわないと揮発性がよすぎてかなりの試料の損失が起こるからである。たとえば、室温減圧下で試料を濃縮する場合、N-TFA-バリンメチルエステルは 36% も損失する。このような観点から、アミノ酸のガスクロマトグラフィーに利用しうるアシル化アミノ酸エステルとして種々検討が行なわ

れ、このタイプの誘導体として、N-TFA-アミノ酸-*n*-ブチルエステルが適していることがわかった。そして、Gehrke 一派は、この誘導体を用いるアミノ酸のガスクロマトグラフィーによる分析法の確立を目指して、定量的エステル化、TFA 化の条件、およびクロマトグラフィーの諸条件のくわしい研究を行ない、最近ではその分析法が確立されたといつてよい。この方法は、アミノ酸のイオン交換クロマトグラフィーによる分析と同じく、主として中性および酸性アミノ酸用、および塩基性アミノ酸など高温でのクロマトグラフィーの必要なアミノ酸用の 2 種のカラムを用いて分析を行なうものである。

i) アミノ酸から TFA-アミノ酸-*n*-ブチルエステルへの誘導⁽¹⁰⁻¹²⁾

20 余種の蛋白質構成アミノ酸のうち、Cys, His, Lys は *n*-ブタノールに対して溶解度が小さいので、一般のメチルエステル化の場合のようにブチルエステル化を直接ブタノール中で行なうことは賢明ではない。しかし、これらのアミノ酸のメチルエステル塩酸塩が *n*-ブタノールに溶けるのを利用して、酸触媒によるエステル交換反応を用いてアミノ酸をブチルエステル化することができる。すなわち、まずアミノ酸を塩化水素-メタノール

表 1 TFA-アミノ酸-*n*-ブチルエステルの生成収率 (%)*

アミノ酸	エステル交換反応の条件	
	90°C, 3 時間	100°C, 2 時間**
Gly	101±0.1	100
Ala	98±0.4	98
Leu	100±0.2	102
Ile	96±0.2	96
Val	99±1.7	99
Phe	97±0.4	99
Asp	99±1.6	97
Glu	97±1.6	97
Ser	102±0.9	102
Thr	91±0.1	96
Tyr	100±2.8	102
CysH	93±0.3	96
Cys	88±0.0	99
Met	98±1.8	101
Lys	100±0.1	101
Arg	—	100***
Pro	97±0.4	95
Hyp	98±0.4	100
His	97±0.3	100
Trp	—	100***

* TFA 化(トリフロロ酢酸無水物で室温, 2 時間)してガスクロマトグラフィーを行ない、そのピーク面積より計算。

** 90°C の場合のピーク面積と 100°C の場合のそれとの比から収率を換算。

*** TFA 化の条件, 150°C, 5 分(封管中)。

* DNP: 2,4-ジニトロフェニル
** PTH: フェニルチオヒダントイン

図 1 TFA-アミノ酸-*n*-ブチルエステルのガスクロマトグラフィー⁽¹⁰⁾

展開条件: 0.4×100 cm, ホウ珪酸ガラス製カラム使用. 0.75/0.25 w/w% DEGS/EGSS-X/Chromosorb W (60~80 メッシュ).

昇温プログラム: 67°C (3.3°C/min)→218°C. キャリアーガス: N₂ 38 ml/min.

a. di-TFA 誘導体, b. mono-TFA 誘導体, c. Arg のみ無水 Na₂CO₃ 存在下で TFA 化した (18 時間).

各ピークはアミノ酸 2.5 μg に相当.

でメチルエステル化し, ついで *n*-ブタノール中, 塩化水素存在下にエステル交換反応を行なわせる. この交換反応では, 90°C, 3 時間の加熱で大部分のアミノ酸は 93~102% の収率でブチルエステルに変化するが, Thr, Cys のエステル交換率はそれぞれ 91%, 88% で, 他のアミノ酸よりブチルエステルになりにくい. しかし, 1.25 N の塩化水素存在下 100°C, 2 時間の反応で, はほぼ定量的にすべてのアミノ酸をブチルエステル化することができる (表 1).

アミノ酸ブチルエステルの TFA 化は, トリフロロ酢酸無水物中で室温, 2 時間反応させる方法で行なわれてきた. そして, この条件のもとでは, 側鎖に官能基のあるアミノ酸では α-アミノ基だけでなく, これらの官能基もアシル化され, Ser, Thr, Tyr, Hyp は N,O-di-TFA 誘導体に, Lys, His は N,N'-di-TFA 誘導体にはほぼ定量的に変化する. しかし, Arg は α-アミノ基だけが TFA 化され, 側鎖のグアニジン基はそのままであり, Trp は N-α,N-インドール-di-TFA 誘導体と N-α-mono-TFA 誘導体の両者を生成する. このように, 側鎖に強いイオン性原子団がそのまま残ったり*, 1 つのアミノ酸に 2 つ以上の誘導体が生成したりすることは, できるだけ避けるべきである. そして, 封管中でこれらのアミノ酸ブチルエステルをトリフロロ酢酸無水物中で

150°C, 5 分加熱反応させると, Arg は tri-TFA 誘導体に, Trp は di-TFA 誘導体にそれぞれ定量的に変化することが明らかにされた. さらに, これらのアミノ酸以外のアミノ酸ブチルエステルも, 高温, 短時間の TFA 化でも, 室温での反応に比べて分解反応や副反応は起こっていないことが確かめられており, ここにアミノ酸より N-TFA-アミノ酸-*n*-ブチルエステルへの定量的な変換の条件が確立されたわけである.

以上のようにして得られた大部分の TFA-アミノ酸-*n*-ブチルエステルは, クロマトグラフィーの条件のもとに十分安定であるけれども, O-TFA 基を持つ Ser, Thr, Tyr は室温に放置しておくで保持時間の長い別のピークを与えるようになる. これは, CF₃CO-O-結合の加水分解によるものと思われ, トリフロロ酢酸無水物を共存させることにより防止することができる. そのほか, 後述のように, ある種のアミノ酸誘導体では, 高温で液相と反応して分解する場合がある.

[TFA-アミノ酸-*n*-ブチルエステルの調製]

各アミノ酸 10.0 mg を, 乾燥塩化水素ガス 1.25 meq/ml を含む無水メタノール 10.0 ml 中, 室温で 30 分反応させてメチルエステル化する. ついで 60°C に加温しながらロータリーエバポレーターでメタノールを除く. 残ったアミノ酸エステル塩酸塩に乾燥塩化水素ガス 1.25 meq/ml を含む *n*-ブタノール 10.0 ml を加え, 100°C の油浴上マグネチックスターラーでかきまぜながら 2.5 時間加熱してエステル交換反応を行なう. それがすんでから, *n*-ブタノールを減圧下 60°C に加温して除く.

上に得たアミノ酸-*n*-ブチルエステル塩酸塩を塩化メチレ

* 後述のように His は N-α-TFA-His として用いる場合もある.

ン 4 ml とトリフロロ酢酸無水物 1.0 ml の混合溶液に溶かし、封管（肉厚、テフロンコーティングしたネジ栓付、内容 12 ml の遠心管）にして 150°C、5 分間加熱して TFA 化を行なう。反応後、室温に冷却し、減圧下に（室温）過剰の溶媒と試薬を除き、少量のトリフロロ酢酸無水物を含む乾燥クロロホルムに溶かし（10~100 μ mole/2 ml）、そのうち 5 μ l を直接カラム上部に注入する。

ii) クロマトグラフィー^(13,14)

Zomzely らが TFA-アミノ酸-*n*-ブチルエステル 19 種の混合物のガスクロマトグラフィーを行なったときには、Gas Chrom A を担体とし、固定相に 1% ネオペンチルグリコールサクシネート (NGS と略す) をコートした 2 m のカラムを用い、75°C から 220°C までの昇温操作をしている。しかし、同種のカラム（ただし、長さは 1 m）でのその後の追試では、Thr と Leu、Pro と Ser、Asp と Phe の相互の分離が悪く、以後種々の担体、固定相、カラムサイズ、クロマト条件について検討が行なわれた。その結果、単一の固定相で全アミノ酸の分析が可能なものが見いだされず、まず 2 種のポリエステル系の固定相の混合物 (DEGS* と EGSS-X**) を用いて 1 本のカラムで 20 種のアミノ酸の分離が行なわれた（図 1, p. 173）。このクロマトグラムから明らかなように、Arg, His, Cys の相対感度は他のアミノ酸に比べて悪く、場合によってはまったくピークが現われない。このような現象は、ポリエステル系固定相を使用した場合に共通して起こっており、その原因として、これらの固定相と TFA 化アミノ酸エステルとの間に高温で反応が起こり分解するためと考えられている。このような欠点を補うために、これ

図 2 リボヌクレアーゼ加水分解物中の Arg, His, Cys の分離

展開条件: 0.4×100 cm, ガラスカラム使用. 5.0% DC-550/Chromosorb W (60~80 メッシュ).

昇温プログラム: 100°C (3.3°C/min)→190°C.

IS: 内部標準物質, ステアリン酸-*n*-ブチルエステル.

図 3 TFA-アミノ酸-*n*-ブチルエステルの分離能と固定相濃度との関係

展開条件: 0.4×100 cm, カラム EGA/Chromosorb W.

昇温プログラム: 80°C (4°C/min)→230°C.

キャリアーガス: N₂ 60 ml/min, 水素炎イオン化検出器.

* DEGS: ジエチレングリコールサクシネート

** EGSS-X: エチレングリコールサクシネートメチルシリコンポリマー

ら3種のアミノ酸の分析用に固定相として、ポリエステル系の代わりにシリコン系の DC-550 や OV-17 が適していることが見いだされた。リボヌクレアーゼ加水分解物中のこれらのアミノ酸の分離例を図2に示す⁽¹⁵⁾。

このようにして、全アミノ酸の定性分析が2本組カラムによる方法で可能になってきたわけであるが、定量分析として使用するためには、信頼性と再現性にすぐれ、さらになんかなり長期にわたって連続的に分析できるシステムが必要である。事実、前述のように、Arg, His, Cys 以外のアミノ酸の分析に2種のポリエステル系固定相の混合物を用いた場合、2種の固定相の沸点が異なるため、長期間使用している間にその組成比が徐々に変化し、それとともにアミノ酸の分離パターンに変化を起こす。たとえば、DEGS-EGSS-X 混合物の場合、くり返しカラムを使用していると Ile と Gly の分離が悪くなり、ル

ーチンの分析には適さないことが明らかにされた。そのため、再び単一液相による分析について検討され、EGA (エチレングリコールアジペート) あるいは NPGSb (ネオペンチルグリコールセバケート) がクローズアップされた。前者はすぐれた熱安定性を示し、同一カラムで分析能が劣化せずに8週間以上も定常的に使用することができる。また、アミノ酸の分離能は液相の濃度によって影響を受け(図3)、CysH と Met の分離まで可能にする濃度として0.65%、これらの分離が必要でない場合には0.5% が使用できる。しかし、担体として Chromosorb G を用いて0.325% EGA を固定相とした場合、Tyr のピークは現われず、Ser のピークは小さく、O-TFA 結合が加水分解されるためと考えられた。

このような痕跡の水による不安定な TFA 基の加水分解を避けるために、担体 Chromosorb G の熱処理による脱水効果が検討された。その結果は表2のとおりで、処理温度の増加とともに重量の減少率が大きくなり、600°C 以上ではほとんど一定になる。この状態では、担体中の水分はほとんど除かれたと考えられ、このような処理をした担体に前記2種類の固定相をそれぞれコーティングして、アミノ酸誘導体の分離について検討した(図4)。このクロマトグラムから明らかなように、600°C、

表 2 Chromosorb G の熱処理条件と重量減少率

熱 処 理 条 件	重量減少率 (%)
100°C, 15 時間, 真空	0.08
300°C, 〃	0.52
450°C, 〃	0.54
600°C, 〃	0.63
850°C, 〃	0.64

図 4 担体の熱処理とクロマトグラフィー
展開条件: 0.4×150 cm, Chromosorb G (80~100 メッシュ).
昇温プログラム: 65°C (2°C/min)→225°C (a) および 240°C (b)
キャリアーガス: N₂ 65 ml/min. IS: 内部標準物質.

15 時間熱処理した Chromosorb G では、EGA のほうが NPGSb より分離能がよく、また期待どおり Tyr や Ser のピークも見いだされた。

Arg, His, Cys の分析のためには、シリコン系の 2 種の固定相 DC-550 および OV-17 を比較してみると、これら揮発性の少ないアミノ酸誘導体が展開する温度では固定相の DC-550 がかなり流出するので、OV-17 のほうがすぐれている。そして、再現性のよいデータを得るためには、1.5% の OV-17 がよく、2.5% の場合には Cys のカラムからの流出は完全ではない。また、このカラムに試料を添加するまで水分に留意して操作を行なうと、His は di-TFA 体のみのピークとなって流出してくるが、試料の添加のために数回封管を開けて空気にふれたりすると 2 つのピークになる。これは、Im*-TFA 基の脱離のためと考えられ、ポリエステル系の固定相でも分解するところから、His を N- α -mono-TFA 体として分析することが試みられた。すなわち、試料をカラムに添加後ただちに n-ブタノールを添加することにより、

His はモノアシル体として単一のピークとして検出される (図 5)。

以上の結果をもとにして、20 種のアミノ酸混合物のガスクロマトグラフィーを 2 本組カラムで行なったのが図 6 で、各アミノ酸 2 μ g (約 0.02 μ mole) を添加したものである。図 7 はリボヌクレアーゼのアミノ酸分析のクロマトグラムで、その分析結果 (表 3) をイオン交換クロマトグラフィーによるものと比較してみると、Met を除きよく一致している。この分析は、2 種のカラムを用いているにもかかわらず、クロマトグラフィーの時間は約 1 時間で、きわめて迅速な定量分析法である。また、アミノ酸のガスクロマトグラフィーには、水素炎イオン化検出器やアルゴン検出器などの高感度検出器が使用されており、図 6 の場合には各アミノ酸 2 μ g (約 0.02 μ mole) ずつ添加されたものであるが、同じカラムで各アミノ酸 1 μ g を含む試料の 1/20、すなわち 50 ng で良好な結果が得られ、半定量分析にはその 1/10 量でよいといわれている。

蛋白質加水分解物の分析では、リボヌクレアーゼ 15 mg から調製した TFA-エステル 9~15 μ g を使用しているが、これは実際にクロマトグラフィーにかける量かもとの 1/1,000 にすぎない。このように、分析に供する量はイオン交換クロマトグラフィーに比して少ないけれども、問題はこのような極微量の試料について定量的

表 3 リボヌクレアーゼ加水分解物のアミノ酸分析*

アミノ酸	ガスクロマトグラフィー			イオン交換 クロマトグ ラフィー**
	1	2	平均	
Ala	7.27	7.47	7.37	7.60
Val	6.81	7.08	6.95	7.00
Gly	1.75	1.62	1.69	1.83
Ile	1.67	1.61	1.64	2.06
Leu	2.14	1.92	2.02	2.22
Pro	3.15	2.90	2.98	3.11
Thr	7.78	7.94	7.86	7.80
Ser	9.66	9.81	9.74	9.41
Met	2.55	2.71	2.63	3.38
Phe	3.26	3.24	3.25	3.62
Asp	13.78	13.68	13.73	14.07
Glu	11.93	12.19	12.06	12.08
Tyr	6.43	6.29	6.36	6.80
Lys	10.25	10.17	10.21	10.58
Arg	5.04	4.83	4.93	4.65
His	3.21	3.58	3.40	3.46
Cys	6.10	6.36	6.23	6.20
			103.05	105.87

* 封管中 105°C, 18 時間 (共沸塩酸) 加水分解。ガスクロマトグラフィーでは Orn を内部標準として使用。
** 内部標準として nor-Leu を使用。

図 5 His のピーク位置

展開条件: 図 6 カラム 2 と同じ。
昇温プログラム: 125°C (6°C/min) $\rightarrow$ 230°C。
1. 試料を完全に乾燥状態に保った場合。
2. 試料を空気中の水分にさらした場合。
3. 試料をカラム添加後ブタノールを添加した場合。
His-DA: di-TFA 体, His-MA: mono-TFA 体。
IS: 内部標準物質。

* Im: イミダゾール。

図 6 TFA-アミノ酸-*n*-ブチルエステル混合物のガスクロマトグラフィー

カラム 1. 0.4×150 cm (ガラスカラム), 0.325% エチレングリコールアジベート/酸洗, 熱処理した Chromosorb G (80~100 メッシュ).

昇温プログラム: 80°C (4°C/min)→215°C. キャリアーガス: N₂ 60 ml/min.

カラム 2. 0.4×100 cm (ガラスカラム), 1.5% OV-17 /H. P. Chromosorb G (80~100 メッシュ).

昇温プログラム: 125°C (6°C/min)→235°C 定温. キャリアーガス: N₂ 70 ml/min.

水素炎検出器: 検出器温度 250°C, 注入部温度 200°C, 各アミノ酸約 0.02 μmole 添加.

IS: 内部標準物質, (H)^o: hold (ここから 235°C に保つ).

図 7 リボヌクレアーゼのアミノ酸分析

カラム 1. 図 6 に同じ. 昇温プログラム: 75°C より 4°C/min.

カラム 2. 図 6 に同じ. 昇温プログラム: 135°C より 5°C/min.

試料添加量: 15 μg (5 μl) (カラム 1), 9 μg (3 μl)+*n*-ブタノール (5 μl) (カラム 2).

エステル化, アシル化などの操作⁽¹⁶⁾を常に行なうことができるかどうかにかかっている. (つづく)

文 献

- 1) I. R. Hunter, K. P. Dimick and J. W. Corse: *Chem. & Ind.*, 1956, 294.
- 2) F. Weygand, B. Kolb, A. Prox, M. A. Tilak and I. Tomida: *Z. physiol. Chem.*, 322, 38 (1960).
- 3) K. Biemann and W. Vetter: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 3, 587 (1961).

- 4) 池川信夫: "最新ガスクロマトグラフィー—基礎と応用—", 舟阪, 池川編 II, 広川書店, 1965, p. 668.
- 5) 竹西忠男: "実験化学講座 9, ガスクロマトグラフィー", 日本化学会編, 丸善, 1965, p. 416; 牧角啓: 化学と生物, 3, 500 (1965).
- 6) B. Weinstein: "Methods of Biochemical Analysis" (ed. by D. Glick), Vol. 14, Interscience, New York, 1966, p. 203.
- 7) C. G. Youngs: *Anal. Chem.*, 31, 1019 (1959).
- 8) D. E. Johnson, S. J. Scott and A. Meister: *Anal. Chem.*, 33, 669 (1961).
- 9) C. Zomzely, G. Marco and E. Emery: *Anal. Chem.*, 34, 1414 (1962). (p. 178, 下段につづく)

天然物中の

多環炭化水素の含量

斉 藤 健

協和醗酵工業株式会社第一企画本部

1. はじめに

最近、人工甘味料チクロ、防腐剤サリチル酸などの食品添加物の人体に及ぼす影響や、牛乳などの畜産物中の残留農薬などの微量分析結果の検討が進むにつれ、食品公害というような新しい現象が日本のマスコミに取り上げられるようになってきた。

しかし、この方面の研究は欧米ではすでに以前から取り上げられ研究が行なわれている。たとえば、食品中の多環炭化水素の含量と人間の癌発生との関連を究明するために、数多くの食品中の多環芳香族炭化水素の含量が微量分析によって精密に分析され、学術雑誌上に報告されているのがその一例といえよう。

多環炭化水素の中で 3,4-ベンズピレンは、1932 年 J. W. Cook らによって皮膚に塗布したときに強い発癌性があることが発見された⁽¹⁾。その後、この物質の経口投与による発癌性については世界各国で研究されているが、一説によれば、経口投与により癌を発生させるためには皮膚に癌を発生させる量の 100 倍以上の投与量が必要であり、したがって、食品などに含まれている 3,4-ベン

ズピレンの含量は、人間の胃癌発生との関連はうすいともいわれている⁽²⁾。また、北欧の漁師に胃癌の発生頻度が内陸部の人々より大きいのは、漁師が常食としている燻製の魚の中に 3,4-ベンズピレンがかなり含まれているためであろうという説⁽³⁾などもあり、定説はまだないようである。

一方、食品中の発癌性物質の含量については、ハンブルグ大学の G. Grimmer 博士によって 1965 年以来、穀類、野菜、コーヒー、紅茶、肉、燻製品、植物油、酵母などを分析の対象として精密な分析結果が一連の研究報告として発表されている。さらに、Grimmer 博士の分析方法とほぼ同じ方法が、1968 年には米国の AOAC 法 (Association Official Agricultural Chemists) として、燻製食品中の 3,4-ベンズピレンの分析法に採用されており⁽⁴⁾、FDA の J. W. Horward 博士はこの方法により 60 種類の食品中の 3,4-ベンズピレンの分析結果を報告している。

以下、Grimmer 博士および Horward 博士の分析結果の研究報告を、文献紹介をかねてまとめた。

2. 分析方法⁽⁵⁾

Grimmer 博士による 13 種類の多環炭化水素の定量分析方法の概略の工程を示すと、以下のようになる。

試料からの抽出

- 抽出液の濃縮
- 液液分配クロマトグラム
- シリカゲルクロマトグラム
- ペーパークロマトグラム
- 酸化アルミナクロマトグラム
- 分光光度計による測定

以上が概略であるが、非常に精度が要求される微量分析法であるから、抽出に用いられる溶剤はすべて再蒸溜して精製しなければならない。また、シリカゲルおよび酸化アルミナなども、あらかじめ充分な前処理によって

- 10) C. W. Gehrke, W. M. Lamkin, D. L. Stalling and F. Shahrokhi: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 19, 328 (1965).
- 11) D. L. Stalling and C. W. Gehrke: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 22, 329 (1966).
- 12) D. L. Stalling, G. Gille and C. W. Gehrke: *Anal. Biochem.*, 18, 118 (1967).
- 13) M. Stefanovic and B. L. Walker: *Anal. Chem.*, 39, 710 (1967).
- 14) C. W. Gehrke, R. W. Zumwalt and L. L. Wall: *J. Chromatog.*, 37, 398 (1968).
- 15) C. W. Gehrke: "The International Symposium on

Biochemical Application of Gas Chromatography", Kyoto, 1967, p. 1.

- 16) ミクロ分析の操作法および TFA-ブチルエステル法によるアミノ酸の定量分析については、Gehrke らの文献を参照されたい。
C. W. Gehrke, D. Roach, R. W. Zumwalt, D. L. Stalling and L. L. Wall: "Quantitative Gas Liquid Chromatography of Amino Acids in Proteins and Biological Substances—Macro, Semimicro, Micro Methods", Analytical Biochemistry Laboratories Inc., Columbia, Missouri, 1968.