ガスクロマトグラフィーによるアミノ酸の分析

第1報 分析条件の検討

東京大学医学部老年病学教室

吉川 政己

東京大学医学部中尾内科教室 (指導 中尾喜久教授)

寺尾 寿夫 茂 在 敏 司

SEPARATION OF AMINO ACIDS BY GAS CHROMATOGRAPHY

I

STUDIES ON THE ANALYTICAL PROCEDURES

Masaki YOSHIKAWA

Department of Geriatrics, Faculty of Medicine, University of Tokyo

Toshio TERAOKA and Toshiji MOZAI

The Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo

(Director: Prof. Dr. Kiku Nakao)

概要 ガスクロマトグラフィーによる血中アミノ酸の微量分析法を確立すべく、その基礎的検討を行なった。N-トリフロロアセチルメチルエステル誘導体について行なったが、この誘導体はアミノ酸のみの混合物の分析には適しているが、それ以外のものが混在する場合には厳密にアミノ酸のみを分離しておく必要があるため、血中アミノ酸の測定には適当でない。DNP誘導体のメチルエステルをSE30およびQF-1の充填薬を用い分析条件を検討したところ、alanine, glycine, valine, leucine, proline, aspartic acid, glutamic acid, methionineおよびphenylalanineの9種のアミノ酸についてはシャープな良く分離したピークが得られた。この誘導体は血中から遊離アミノ酸を分離するのにも適当である。ガスクロマトグラフィーによれば少量の試料(血液約1cc)で短時間に分析できるので、微量定量法として充分用いることが明らかになった。

I. 序

アミノ酸の分析法は近年非常に進歩し、ペーパークロマトグラフィーまたはイオン交換樹脂カラムによるアミノ酸アナライザー等がもっぱら用いられている。しかし、微量の生体試料の分析にはこれらはなお満足な方法とはいえない。すなわち前者では分離能と定量の点で、また後者では分析時間と試料量の点で難点があり、試料が微量しかえられない場合にこれらによつて正確に分析することは困難である。血中アミノ酸の正確な微量分析は非常に重要な問題であるが、これまでペーパークロマトグラフィー、微生物法、またはイオン

交換樹脂クロマトグラフィーで行なわれている¹⁾~⁴⁾。著者ら⁵⁾⁶⁾も先にイオン交換樹脂クロマトグラフィーを用いて血中アミノ酸を分析し、その一部をすでに報告した。この方法は優れた方法ではあるが、長時間を要することと、1回の分析に血液10~15ccを必要とすることから多くのデータをうることは幾分困難であつた。このような事情からより微量試料で分析できる方法が要望されてきた。

近年ガスクロマトグラフィーによるアミノ酸の分析法が次第に進歩し、まだ未解決の問題を残してはいるが、限られたアミノ酸に対しては正確に

分離定量できる段階になった。この方法を血中アミノ酸の分析に応用すべく基礎的研究を行なった。すなわち、先に著者の一人、池川⁷⁾はN-トリフロロアセチルメチルエステルにして分析する方法を報告したが、この方法とDNP誘導体にして分析する方法を比較検討したので報告する。

II. N-トリフロロアセタートメチルエステル

アミノ酸をN-トリフロロアセタートメチルエステル誘導体としてneopentyl glycol succinate (NGS)の充填薬を用い、昇温ガスクロマトグラフィーによって極めて満足すべきデータがえられたことを先に報告した⁸⁾。その方法によってhistidine, arginine, cystineなどのピークはえられず、これらについてはその前処置の改良が必要であるが、他の通常存在する15種のアミノ酸は γ 単位の試料で迅速に分離できる。しかし生体中に存在する α -, β -, および γ -aminobutyric acidのガスクロマト上の挙動については全く報告がないので、これらの保持時間を測定した。これらを含む純品の混合物を3 m NGSのカラムを用い、昇温クロマトによって図1の如き結果がえられた。aminobutyric acidの溶出順序は α -, β -, γ の順であるが、 β はleucineと保持時間が同一で分離できなかつた。他はよく分離できるが、serineとmethionineは、先に報告したごとく、分離できない。これらの保持時間を表1に示す。この方法はアミノ酸混合物の試料については再現性よく、分離できる。すなわち、ペプチドの加水分解物の分析にはよい結果

Table 1. Retention times of N-trifluoroacetyl methyl ester^{a)}.

Column	1%NGS(3m $\times$ 4mm)	1%NGS(1.5m $\times$ 4mm)
Column Temp.	85 $\rightarrow$ 185 $^{\circ}$, 3 $^{\circ}$ /min. 185 $\rightarrow$ 220 $^{\circ}$, 6 $^{\circ}$ /min.	85 $\rightarrow$ 225 $^{\circ}$, 4 $^{\circ}$ /min.
Carrier Gas(N ₂)	44ml/min.	50ml/min.
	Time min. Approximate Temp.	Time min. Approximate Temp.
Alanine	11.0 (114 $^{\circ}$)	4.9 (99 $^{\circ}$)
Valine	11.9	5.4
α -Aminobutyric acid	12.3	
Isoleucine	14.7 (125 $^{\circ}$)	
Glycine	16.2 (130 $^{\circ}$)	8.1
Leucine	17.1	8.8 (115 $^{\circ}$)
β -Aminobutyric acid	17.1	
Proline	21.1 (144 $^{\circ}$)	11.0 (123 $^{\circ}$)
Aspartic acid	26.7 (159 $^{\circ}$)	15.0 (140 $^{\circ}$)
γ -Aminobutyric acid	27.2	
Threonine	29.8 (167 $^{\circ}$)	18.0 (150 $^{\circ}$)
Serine	33.0 (177 $^{\circ}$)	19.2
Methionine	33.0	19.2
Glutamic acid	34.1 (181 $^{\circ}$)	20.1 (160 $^{\circ}$)
Phenylalanine	35.1 (184 $^{\circ}$)	20.7
Hydroxyproline	43.6 (220 $^{\circ}$)	28.0 (190 $^{\circ}$)
Lysine	50.3	34.3
Tyrosine	64.5	40.0
Tryptophan		48.1

a) Detector temp., 240 $^{\circ}$; Sample heater temp., 250 $^{\circ}$.

がえられるが、アミノ酸以外のものが混在する場合には、それらのピークが障害となつてアミノ酸の分析ができない。そこで、血中の遊離アミノ酸の分析にこの方法を用いるには、予めアミノ酸だけを分離しておく必要がある。本報では、血中からのアミノ酸の分離は、Thompson⁹⁾が植物中のアミノ酸の単離に用いている方法に準じて行なつた。これはpicric acid溶液を加えて除蛋白後、Dowex-50のカラムを通して中性および酸性アミノ酸のフラクションをえ、それをメチルエステル化後、トリフロロアセタートにしてガスクロマト

1% NGS on Gas Chrom P (86-100 mesh), 3 m $\times$ 4 mm i.d.:
N, 50 ml/min.; 85 $\rightarrow$ 185 $^{\circ}$, 3 $^{\circ}$ /min.; 185 $\rightarrow$ 220 $^{\circ}$, 6 $^{\circ}$ /min.

Fig. 1. Separation of mixture of N-trifluoroacetyl methyl ester.

1% NGS on Gas Chrom P (80-100 mesh), 1.5 m×4 mm i.d.;
N 50 ml/min.; 85→225°, 4°/min.

Fig. 2. (A) Separation of a mixture of N-trifluoroacetyl methyl ester
(B) Analysis of plasma amino acids

で分離した。そのチャートの1例を図2-Bに示す。また図2-Aは同じ条件で標準混合物を分離したチャートであり、その保持時間を表1に示す。図2-Bにみるごとく、この方法で行なった結果は、多くのアミノ酸以外のピークが出現し、繰り返し本法を検討したにもかかわらず、これらの小さなピークを除去することはできなかった。また、場合によっては、分離生成物と思われる大きなピークによる障害がみられた。Thompsonのアミノ酸の分離法はすべて0°～6°Cの低温で操作しているが、われわれは実験室の事情により室温(約15°C)で行なわざるをえなかった。この分離の不成功はこの操作温度によっているかも知れないが、この点は明らかでない。いずれにしてもN-TFAメチルエステルにして血中アミノ酸を分析するには、前処理で厳密にアミノ酸のみをえておくの でなければ適当でないと思われる。

最近Cruickshank, Sheehan¹⁰⁾および牧角, Saroff¹¹⁾らによつてN-TFAメチルエステルのNGSによる分析法が報告されている。それによれば、

塩基性アミノ酸の分析もほぼ解決され、ガスクロマトグラフィーはアミノ酸の分析法として有用であることがさらに明らかにされている。著者らはこれらの方法を検討の結果、アミノ酸混合物に対しては優れた結果を与えるが、血液のようにアミノ酸以外のものを混有する場合には、なお多くの検討が必要であると思う。

III. Dinitrophenyl 誘導体 (DNP誘導体)

次いでdinitrophenyl誘導体について検討した。近年低液相充填薬が開発され、分子の大きいもののガスクロマトグラフィーによる分離も可能になったが、ステロイド等の分離に用いるのと同じ充填薬を用いてアミノ酸のDNPおよびPTH誘導体の分析が可能になった¹²⁾。わが国においても既にその研究が発表されている。

血漿をdinitrofluorobenzeneと反応させ、アミノ酸をDNP誘導体としてエーテルで抽出すると、アミノ酸はエーテル可溶物として他の物質と分離できるので、アミノ酸を取り出すのに有利な方法である。すでにDNP誘導体をペーパークロマト

グラフィーによつて分離した後、紫外スペクトルなどによつて定量する方法が行なわれているが、正確かつ簡易な方法とはいえない。抽出されたものをメチルエステルにしてガスクロマトグラフィーで分析できるので、まず、その分析条件について検討した。

Alanine, glycine, valine, leucine, proline, aspartic acid, glutamic acid, methionine, phenylalanine の DNP 誘導体はジアゾメタンのエーテル溶液でメチル化後、ガスクロマトグラフに注入してシャープなピークがえられ、それぞれ分離できる。図 3 は 1.5% SE-30 の充填薬を用いてこれらの混合物を恒温ガスクロマトグラフィーで分離した 1 例で、図 4 は同じ混合物を昇温ガスクロマトグラフィーで分離した 1 例である。このようにアミノ酸混合物の分離には昇温方式がすぐれている。特

1.5% SE-30 on Chromosorb W (80-100 mesh),
1.5 m × 4 mm i.d., 216°: N₂, 90 ml/min.

Fig. 3. Separation of a mixture of dinitrophenyl derivatives.

1.5% SE-30 on Chromosorb W (80-100 mesh),
1.5 m × 4 mm i.d., 160°→230°, 2°/min.; N₂,
90 ml/min.

Fig. 4. Separation of a mixture of dinitrophenyl derivatives.

に生体試料の場合には保持時間10分以内のピークはアミノ酸以外の揮発性化合物のピークによつてかくれる可能性があるので、図 3 のような分析条件は適当でない。

同じような混合物を 2% QF-1 のカラムを用いて昇温ガスクロマトグラフィーで分離した結果を図 5-A に示す。この場合 methionine についてまだ検討していないが、SE-30 と QF-1 の場合では glycine と valine の溶出順序が異なっている。SE-30 に比較して QF-1 の方がテーリングがなく、シャープなピークがえられ、さらに QF-1 の利点は、血中アミノ酸を分離する場合に SE-30 ではアミノ酸以外のピークが出ることがあるが、QF-1 の場合にはほとんどそのようなピークがみられなかった。これらの条件における種々のアミノ酸の保持時間を表 2 に示す。

血漿を常法によつて、dinitrofluorobenzene と反応させ、えられた DNP 誘導体のメチルエステルを図 5-A と同じ条件で分析して図 5-B の如き結果がえられた。cholestane は定量する際の内部標準として加えたものである。図 5-B から、こゝにピークとして現われているアミノ酸の分離定量は可能であることが明らかになった。この方法の応用例については次報で述べる。

Tyrosine などの diDNP 誘導体は溶出されなか

Table 2. Retention times of dinitrophenyl derivatives^{a)}.

Column Temp.	1.5% SE-30		2.0% QF-1	
	Isothermal 216°	Programmed 160°→230° 2°/min.	Programmed 160°→230° 2°/min.	
	Time min.	Time min.	Time min.	Approximate Temp. °C
Alanine	4.6	13.7 (183°)	26.0	(207°)
Glycine	5.6	16.0	29.0	
Valine	6.0	16.9 (189°)	27.7	(211°)
Leucine	7.3	19.4	30.1	
Proline	8.3	20.9 (196°)	32.8	(220°)
Aspartic acid	10.9	25.0	38.9	(230°)
Glutamic acid	15.5	29.7 (211°)	43.9	
Methionine	17.1	30.7	—	
Phenylalanine	24.2	35.4 (220°)	45.4	

a) Detector temp., 240°. Sample heater temp., 250°,
carrier gas, N₂, 90 ml/min.

2% QF-1 on Gas Chrom P (80-100 mesh), 1.5 m × 4 mm;
N, 90 ml/min; 160°→230°, 2°/min.

(A) standard mixture (B) plasma amino acids

Fig. 5. Separation of a mixture of dinitrophenyl derivatives.

つた. threonine, serine, hydroxyprolineのごとく水酸基のあるもののDNP化合物はメチル化したのみではピークがえられず, アセタートまたはトリメチルシリールエステルにしてはじめてシャープなピークがえられた. これらについては目下検討中であるので後に報告する.

IV. 実験の部

1. 装置

本研究には島津製作所GC-1B型水素炎検出器付装置を用いた. ディフレンシャルカラム, ダブルフレーム方法であるので, 昇温ガスクロマトグラフィーにおけるベースラインドリフトはほとんどみられなかつた. カラムは内径4mmのステンレス製75cmのU字管2本をシリーズに連結したものを用了. すなわち, 担体を濃塩酸で洗浄後, 乾燥し, ジメチルジクロロシランのトルエン溶液でシラン処理後, SE-30のトルエン溶液またはQF-1のアセトン溶液を用いて, 濾過法によつてコーティングした. カラムに充填後, からやきはSE-30では270°C 24時間, QF-1では230°C 24時間行なつた.

2. N-TFA-メチルエステル

N-TFA-メチルエステルは前に報告したごとく次の方法で作製した. 10mgのアミノ酸混合物を10ccのメタノールにとかし, 乾燥塩酸ガス飽和後3時間還流冷却, メタノールを留去後, 残渣を1.5ccのメタノール, 0.5ccのトリフロロ酢酸メチルエステルおよび0.2ccのトリエチルアミンに20°Cで2時間放置, 溶媒を減圧留去後, 酢酸エチルにとかし, 水洗, 芒硝乾燥後, 酢酸エステルを留出, 残渣をアセトンにとかしてガスクロマトグラフィーに注入する.

この方法ではトリフロロ酢酸メチルエステルを用いているので, 水酸基はTFA化されていない. 後に報告されている如く, 無水トリフロロ酢酸を用いると水酸基もTFA化されるので, 同じ充填薬を用いても溶出順序が異つている.

血漿中のアミノ酸の単離は次の方法で行なつた. 血漿2ccにピクリン酸0.5%水溶液20ccを加え, 振盪後, 遠沈して上清を次のイオン交換樹脂カラムに通す. Dowex50の水素型とアンモニウム型を, それぞれ20cm × 0.9cmのカラムに7cmの高

さにつめて水素型カラムの上にアンモニウム型カラムをつなぎ、上のアミノ酸水溶液をpH 7.0にしてこのカラムにそゞぎ、さらに10ccの水で4回溶出する。塩基性アミノ酸はアンモニウム型に吸着され、酸性・中性アミノ酸は水素型の方に吸着されているので、両者を分離して、後者を2*N*-アンモニア水で溶出し、留液を蒸発乾固した後、上述の方法で誘導体にした。

3. DNP誘導体

本実験の分析条件の検討に用いたDNP誘導体は、市販されている、味の素社製のものを使用した。血漿中のアミノ酸のDNP化は次のようにして行なつた。

血漿1ccをアルコール3ccにとかし、これにdinitrofluorobenzeneの4%アルコール溶液0.5cc、水1cc、重炭酸ソーダ0.5gを加えて40°Cで2時間暗所で振盪後、遠心分離して沈殿を除く、上清液に2%NaHCO₃30ccを加え、エーテルで3回抽出、水層を2*N*HClで酸性にして酢酸エステル30ccで3回抽出、抽出液を水10ccで洗浄後、芒硝で乾燥して、溶媒を留去、残渣をメタノール0.5ccにとかし、ジアゾメタンのエーテル溶液3ccを加え、室温で2時間放置後溶媒を留去、えられたDNPメチルエステルをアセトンにとかしてガスクロマトに注入する。

V. 考察および結論

以上、血中アミノ酸のガスクロマトグラフィーによる分析法としてN-TFAメチルエステルとDNP誘導体にして分析する方法を検討し、後者の方

が簡便であることを述べた。DNP法で定量できるアミノ酸の種類は限られており、生体試料中の全アミノ酸についての分離定量は困難である。しかし、少量の試料でできるので、アミノ酸の経時的变化を追求するには非常に便利な方法である。ガスクロマトグラフィーは感度が良いことと迅速性の点で従来の方よりもすぐれている。その点を利用してアミノ酸の負荷実験を行ない、その消長を知るには有利である。その実験結果については後報で述べる。

できるだけ多くのDNP誘導体がガスクロマトグラフィーで分離できることが望ましいが、それについては目下実験中であり、ガスクロマトグラフィーによる微量分析法を確立すべく研究中である。

文 献

- 1) 水島, 赤堀編: 蛋白質化学, Vol. 1~4, 1965 (共立出版)。
- 2) Dent, C.E.: Biochem. J., 41: 240, 1947。
- 3) Dent, C.E.: Biochem. J., 43: 169, 1948。
- 4) Stein, W.H. and Moore, S.: J. biol. Chem., 211: 915, 1954。
- 5) 寺尾寿夫: 精神神経誌, 62: 1, 1960。
- 6) 中尾喜久, 寺尾寿夫, 茂在敏司: 臨床神経学, 5: 145, 1965。
- 7) 池川信夫: 日本臨床, 22: 468, 1964。
- 8) 池川信夫: J. Biochem. (Japan), 54: 279, 1963。
- 9) Thompson, J.F., Morris, C.T. and Gering, R.K.: Anal. Chem., 31: 1028, 1959。
- 10) Cruickshank, P.A. and Sheehan, J.C.: Anal. Chem., 36: 1191, 1964。
- 11) Makisumi, S. and Saroff, H.A.: J. Gas Chromatog., 3: 21, 1965。
- 12) Pisano, J.J., Vanden Heuvel, W.J.A. and Horning, E.C.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 7: 82, 1962。