

ガスクロマトグラフィーによる ミコバクテリア菌株同定の試み

本宮 雅吉・武田 俊平・荒井 秀夫
横沢 厚信・佐藤 博・岡 捨己

東北大学抗酸菌病研究所内科

受付 昭和 47 年 7 月 18 日

ATTEMPTS OF IDENTIFYING MYCOBACTERIAL STRAINS BY MEANS OF GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY*

Masakichi MOTOMIYA, Shumpei TAKEDA, Hideo ARAI,
Atsunobu YOKOZAWA, Hiroshi SATO and Sutemi OKA

(Received for publication July 18, 1972)

Attempts were made to detect nicotinic acid, nicotinamide and 3-pyridinemethanol by gas-liquid chromatography analysis for the purpose of differentiating mycobacterial strains by quantitative estimation of the above three compounds. They could be detected without converting them into derivatives.

With a 3 mm×2 m coiled glass column containing 3% of SE-52 on Chromosorb W, AW, DMCS at 120°C (flame ionization detector), nicotinic acid was found at 4.4 min, nicotinamide at 9.2 min, 3-pyridinemethanol at 2.4 min and P-nitrophenol as an internal standard at 13.8 min of retention time.

緒 言

ガスクロマトグラフィーによる微量分析の方法は脂肪酸、炭水化物などの分析法として、医学、生物学の領域でも広く応用されている。

Prosser および Sheppard は、ニコチン酸をニコチン酸エチルエステル、または N-メチルニコチンアミドの形に変え、neopentyl glycol succinate+SE-30 の液相を用いて検出した¹⁾。一方ガスクロマトグラフィーの細菌学的分野への応用もみられるようになってきた。MacGee は菌体を tetramethyl ammonium hydroxide で処理した後のエタノール可溶分を用いて、連鎖球菌、大腸菌などのガスクロマトグラフィーによる分析を行った²⁾。Kubica らは熱分解ガスクロマトグラフィー法を用い、その結果生ずる finger-print に基づいてミコバ

クテリア菌株の同定を試みた³⁾⁴⁾。Prosser および Sheppard はニコチン酸はそのままの形では昇華性があり、カルボキシル基のため、ほとんどすべての有機溶媒に不溶であり、ガスクロマトグラフィーによる分析のためには、なんらかの誘導体に変える必要があると報告している⁵⁾ので、われわれはまずガスクロマトグラフィーに最も適した誘導体の検討から始め、引き続きミコバクテリア培養濾液中のニコチン酸、ニコチンアミド 3-ピリジンメタノールのガスクロマトグラフィーによる検出法について検討した。かくしてナイアシンテストの原理をガスクロマトグラフィーに應用することを試みた。

実験材料ならびに方法

エタノール、メタノールは Lund-Bjerrum 法⁵⁾により精製し、プロパノールは K₂CO₃ により脱水後使用した。

* From the Research Institute for Tuberculosis and Leprosy, Tohoku University, 4-12, Hirose-machi, Sendai 980 Japan.

1. ニコチン酸エチルエステルの合成⁶⁾

ニコチン酸 60g, エタノール 46ml, 特級濃硫酸 25ml を混合し, 4時間還流冷却下に加熱, 反応終了後, 10% Na_2CO_3 で pH を 9.0 に修正し, エーテルで抽出した。エーテル抽出液を Na_2SO_4 で脱水し, 濃縮した後, 残存する油状の物質を 16mmHg, 116°C で蒸留することにより, ニコチン酸エチルエステルを得た。また 10% 塩酸エタノールを用いて, ニコチン酸エチルエステルを合成する方法も併用した⁷⁾。

ニコチン酸メチルエステル, ニコチン酸プロピルエステルも全く同様にして合成した。

2. 3-ピリジンメタノールの合成⁸⁾

上記の方法で得られたニコチン酸エチルエステル 30.2g を無水エーテルに溶解し, 無水エーテル 100ml に LiAlH_4 14.8g を浮遊させた液を分液ろうとからゆつくり滴下させた。反応終了後, 反応混液の色調は灰白色から白色に変化した。この時点で十分量の水を加え, 残存する LiAlH_4 を分解した。次いで反応混液を Büchner ろうとで濾過し, 残渣は 300ml のメタノールに浮遊させ, このメタノール浮遊液は炭酸ガスで飽和した後, 加熱し再び濾過した。エーテル濾液およびメタノール濾液を合わせて減圧濃縮した。残存する褐色の液を K_2CO_3 で脱水し, まず蒸留によつてエーテルを除去し, 次いで反応の結果生じた 3-ピリジンメタノールを 20mmHg, 144°C で蒸留精製した。

3. 薄層クロマトグラフィー

Silicagel G のプレートを使用し, 展開溶媒としては 10% NH_4OH 飽和ブタノールを用いた。検出には BrCN 蒸気処理に引き続き 2% p-アミノアセトフェノンのスプレーを行つた。(p-アミノアセトフェノン 2g を 0.75N HCl 75ml に溶解し, エタノール 25ml を加える)

4. TMS 化 (トリメチルシリル化)^{9)~11)}

水素炎イオン化検出 (FID) 方式の場合, 次の2つの方法によつた。イ) ニコチン酸 10mg をピリジン 0.2ml に溶解し, これにヘキサメチルジシラザン 0.3ml, トリメチルクロールシラン 0.1ml を加え, 得られた混合物は 40°C, 1時間加熱し, ガスクロマトグラフに注入する試料として用いた。ロ) ビス(トリメチルシリル)アセトアミドとアセトニトリル (1:3) の混合液とニコチン酸の混合物を封管, 80°C, 1時間加熱して使用した。

ニコチンアミドおよび 3-ピリジンメタノールの TMS 化も全く同様にして行つた。

電子捕捉型検出方式の場合は, ヘキサメチルジシラザン 2.5ml, ピリジン 2.0ml, トリメチルプロモシラン 0.5ml を混合し 1時間放置し, その上清 250 μl とニコチン酸 50 μg を 40°C, 1時間反応させてから, ヘキササンで希釈し, 試料として用いた。3-ピリジンメタノール, ニコチンアミドも同様に処理して, ガスクロマトグ

ラフィーの試料とした。

5. ガスクロマトグラフィーの条件

実験にはすべて 3mm \times 2m のガラスカラムを使用した。実験 I~V には FID 検出方式の日本電子 JGC-750 型器を使用, 実験 VI には電子捕捉型検出方式の日本電子 JGC-1100 型器を使用した。

実験 I : 10% polyneopentyl glycol succinate, Gaschrom Z, メッシュ 100~120, カラム温度 170°C, FID 240°C, N_2 0.75 kg/cm², ニコチン酸エステルはヘキササンに溶解して注入した。

実験 II : 2.5% polyethylene glycol succinate+10% SE-30, Gaschrom Z, メッシュ 100~120, カラム温度 130°C, N_2 1.0 kg/cm²。

実験 III : 2.5% polyneopentyl glycol sebacate+10% SE-30, Gaschrom Z, メッシュ 100~120, カラム温度 150°C, N_2 1.0 kg/cm²。

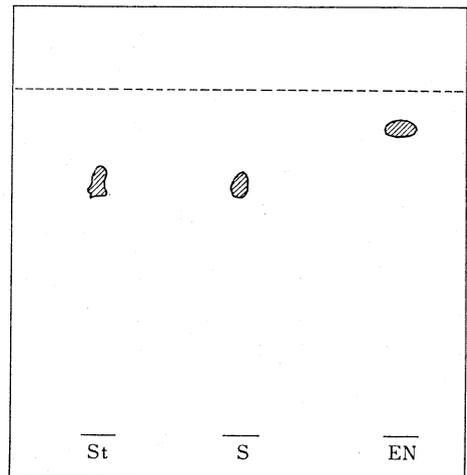
実験 IV : 5% OV-17, chromosorb W, AW, DMCS, メッシュ 60~80, カラム温度 130°C, N_2 1.0 kg/cm²。

実験 V : 3% SE-52, chromosorb W, AW, DMCS, メッシュ 80~100, カラム温度 120°C, N_2 1.0 kg/cm²。

実験 II, III, IV, V で, TMS 化しない試料を直接用いる場合はテトラヒドロフラン (NaOH で脱水, Na 線およびベンゾフェノンを用いて精製¹²⁾) またはピリジンに溶解して用いた。

実験 VI : 1.5% SE-30, Gaschrom Q, メッシュ 80~100, カラム温度 110°C, N_2 1.4 kg/cm²。

Fig. 1.



Solvent : Butanol saturated with 10% NH_4OH , ascending \square chromatography at room temperature, 20 \times 20 cm plates of Silicagel G.

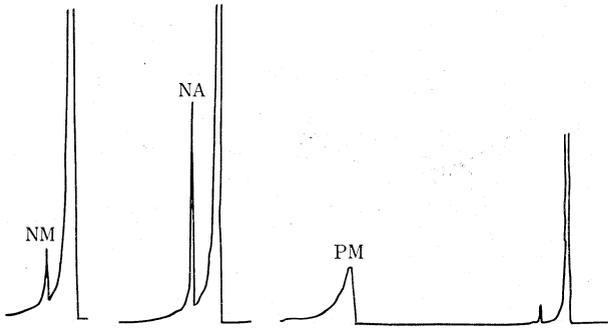
Detection : Vapor of BrCN and spray of 2% p-aminoacetophenone (2g of p-aminoacetophenone dissolved in 75 ml of 0.75N HCl+25 ml of absolute ethanol).

St : 3-pyridinemethanol

S : A sample of 3-pyridinemethanol synthesized in the present experiment

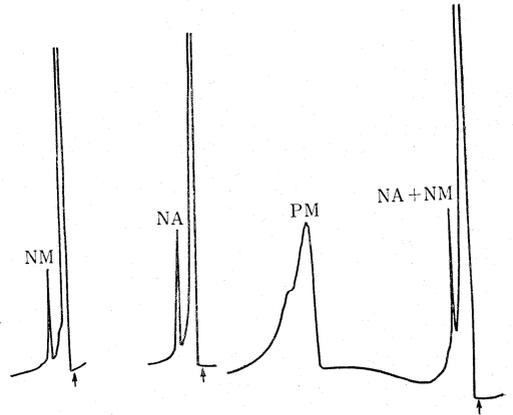
EN : Ethyl nicotinate

Fig. 2-a.



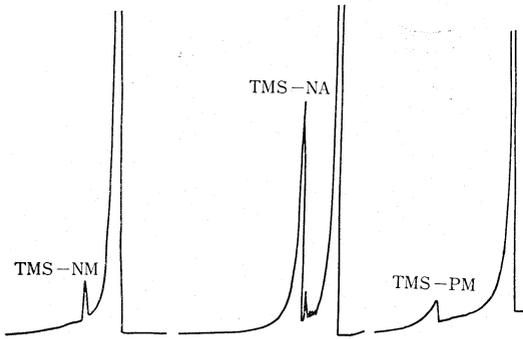
NA: Nicotinic acid (before trimethylsilylation)
 NM: Nicotinamide
 PM: 3-pyridinemethanol
 2.5% polyethylene glycol succinate+10% SE-30 on Gaschrom Z
 Column temperature: 130°C
 Chart speed: 1cm/min.

Fig. 3-a.



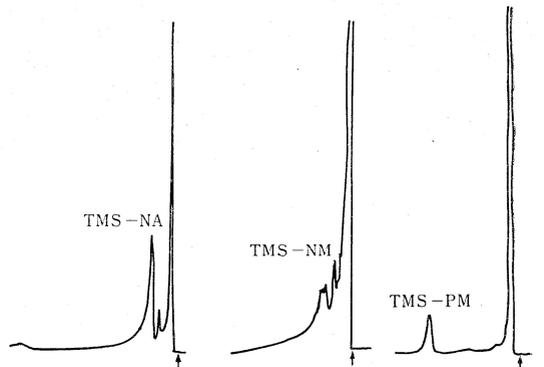
NA: Nicotinic acid (before trimethylsilylation)
 NM: Nicotinamide
 PM: 3-pyridinemethanol
 2.5% polyethylene glycol sebaccate+10% SE-30 on Gaschrom Z
 Column temperature: 150°C
 Chart speed 0.5 cm/min.

Fig. 2-b.



TMS-NA: Nicotinic acid (after trimethylsilylation)
 TMS-NM: Nicotinamide
 TMS-PM: 3-pyridinemethanol
 2.5% polyethylene glycol succinate+10% SE-30 on Gaschrom Z
 Column temperature: 130°C
 Chart speed: 1cm/min.

Fig. 3-b.



TMS-NA: Nicotinic acid (after trimethylsilylation)
 TMS-NM: Nicotinamide
 TMS-PM: 3-pyridinemethanol
 2.5% polyethylene glycol sebaccate+10% SE-30 on Gaschrom Z
 Column temperature: 150°C
 Chart speed: 0.5 cm/min.

ミコバクテリア培養濾液は M/100 磷酸緩衝液で pH を 6.8 に修正し, Amberlite-120, H型に添加する。まずグリセリンを含む培地成分は水で溶出して除き, 次いで 1N-NH₄OH で溶出し, この溶出液は乾固して, ガスクロマトグラフィーの試料として用いた。(実験 II~IV の結果, ニコチン酸, ニコチンアミドのいずれもが前処理なしに検出しうる事がわかつたので, そのままガスクロマトグラフィーの試料として使用した)

定量の目的のためには, 内部標準として, p-ニトロフェノールを用い, Hoffman および Gooding の方法¹³⁾に従つて標準曲線を作製した。検出しうる最小量は Attenuator ×2 の条件で (実験 V) ニコチン酸およびニコチンアミドでは 0.5 μg, 3-ピリジンメタノールでは, 0.1 μg であつた。

実験結果

合成によつて得られた 3-ピリジンメタノールは薄層クロマトグラフィー上, 10% NH₄OH 飽和ブタノールの展開溶媒で均一な物質として認められた。(R_f=0.76) (図 1)

実験 I の条件で, ニコチン酸エチルエステルは保持時間 4.2 分の位置に, ニコチン酸プロピルエステルは 6.2 分の位置に単独のピークとして検出された。実験 II の条件では, TMS 化を行わないニコチン酸およびニコチンアミドは保持時間 2.3 分の位置に 3-ピリジンメタノールは 14.8 分の保持時間の位置に検出された。イ) の方法で (ピリジン+ヘキサメチルジシラザン+トリメチルクロールシラン) TMS 化を行つた場合は 2.3 分, 3.4

分、4.2分、5分の保持時間の位置に4コの大小不同のピークが認められた。ロ)の方法(ビス(トリメチルシリル)アセトアミド)でTMS化を行つた場合、ニコチン酸およびニコチンアミドは3.2分の保持時間の位置に、また3-ピリジンメタノールは5.6分の保持時間の位置に検出された(図2-a, b)。実験IIIではTMS化を行わない場合、ニコチン酸およびニコチンアミドのピークは2.8分の保持時間の位置に3-ピリジンメタノールのピークは18.6分の保持時間の位置に検出された。イ)の方法でTMS化した後、ニコチン酸、ニコチンアミドのピークは3.2分の保持時間の位置に3-ピリジンメタノールは10.4分の保持時間の部位に現われた(図3-a, b)。一方ロ)の方法でTMS化した場合には数コのピークが現われ必ずしも一定の結果は得られなかつた。

実験IV: この実験はTMS化を行わない試料を用いたもので、ニコチン酸、ニコチンアミドは6.8分の保持時間の位置に3-ピリジンメタノールは2.4分の保持時間の位置に検出された。(図4)

実験V: この条件では3-ピリジンメタノールは2.4分、ニコチン酸は4.4分、ニコチンアミドは9.2分、内部標準として用いたp-ニトロフェノールは13.8分の保持時間の位置に別々に検出された。

実験VI: ニコチン酸、ニコチンアミド3-ピリジンメタノールいずれも単独のピークとして認められなかつた。(図6-a, b)

考 案

実験Iでは、ニコチン酸、ニコチンアミドのいずれもがニコチン酸エチルエステルとして検出され、両者の和として現われ、感度は増すという利点はあるが分離定量の目的には不適當なので詳しい検討は行わなかつた。実験II, IIIではニコチン酸、ニコチンアミドのピークが3-ピリジンメタノールのピークより先に現われ、一方、実

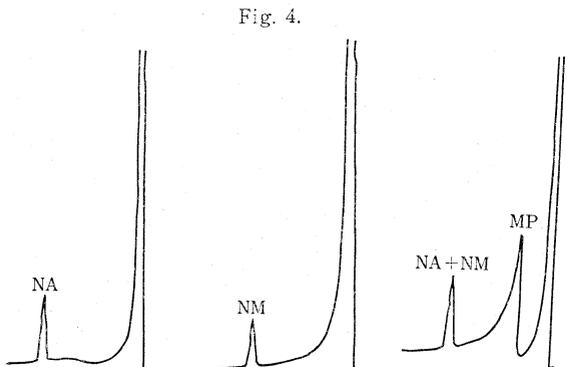


Fig. 4.

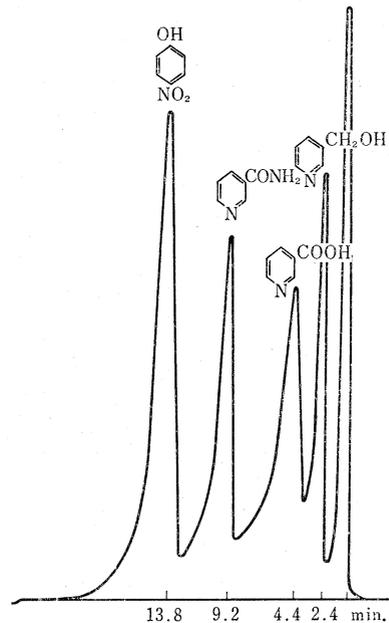
NA: Nicotinic acid (without trimethylsilylation)
 NM: Nicotinamide
 PM: 3-pyridinemethanol
 5% OV-17 on Chromosorb W, AW, DMCS
 Column temperature: 130°C
 Chart speed: 1 cm/min.

験IVでは3-ピリジンメタノールのピークがニコチン酸およびニコチンアミドのピークより先に現われた。このように、ガスクロマトグラフィーで、液相の種類のみならず担体の種類によつても保持時間が逆転することは他の物質についても知られている。

本実験に用いたTMS化試料はきわめて不安定で通常反応終了後、直ちに使用したが、保存する場合は蓋付き共栓試験管に入れ、デシケーターに保存した。このようにしても時間の経過とともに出現するピークが増加する傾向がみられた。上記のごとくTMS化した試料は、特に湿気に対し不安定であるため、水を含む展開溶媒で薄層クロマトグラフィーなどにより、均一性を検討することは不可能であつた。しかしTMS化剤処理前と比べて、TMS化剤処理後は保持時間の全く異なるピークが出現し、かつ出発材料と同一のピークがみられることもあつたので、なんらかの形で反応が起つていることは確実である。もつとも反応は完全には進行しないか、または予期せざる副反応が起つている可能性もある。

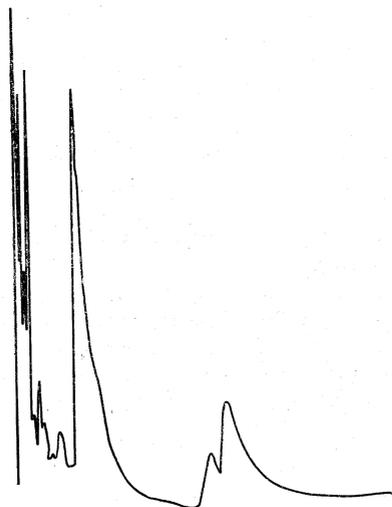
ミコバクテリアの培養濾液中のニコチン酸とニコチンアミドの量比が菌株によつて異なることが知られており¹⁴⁾、また菌株によつては、3-ピリジンメタノールの存在も¹⁵⁾¹⁶⁾報告されているので、これらを分離定量することが必要となる。この条件は実験Vで求めることができた。ニコチン酸のピークが出にくい場合は試料を60°C

Fig. 5.



3% SE-52 on Chromosorb W, AW, DMCS, Column temperature 120°C. Chart speed 0.5 cm/min. Internal standard, P-nitrophenol, 3-pyridinemethanol, 0.25 μg: Nicotinic acid 4.6 μg: Nicotinamide 3.9 μg: P-nitrophenol 2.8 μg.

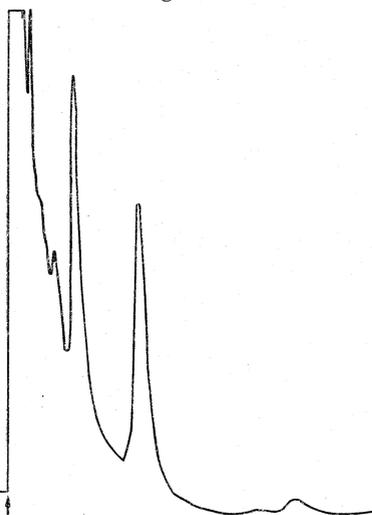
Fig. 6-a.



Nicotinic acid after trimethylsilylation with trimethylbromosilane+pyridine+hexamethyldisilazane (The major peak of nicotinamide, when treated in the same way appeared at the same position).

1.5% SE-30, Gaschrom Q, Column temperature : 110°C
Chart speed : 0.5 cm/min.

Fig. 6-b.



3-pyridinemethanol treated as above.

数秒間暖めてから注入することにより明瞭なピークを得ることができた。

この実験に用いた3種の化合物(ニコチン酸, ニコチンアミド, 3-ピリジンメタノール)のほかにも, ミコバクテリヤ代謝産物のなかで, ニコチン類と関係ある物質としては, ニコチンアミドリポシド, ニコチンアミド-アデニン-ジヌクレオチド¹⁷⁾, N'-メチルニコチン酸¹⁸⁾などが報告されている。これらの化合物では, ピリジン核のNが糖残基またはCH₃基との結合に関与して、本実験に用いた3種の化合物とは構造上, かなり異なっているため, ガスクロマトグラフィーによる分析でもかな

り異なつた態度を示すものと予想される。

ガスクロマトグラフィーによる物質の同定は保持時間に基づいて行うものであり, 保持時間の同じ物質を誤認する可能性はある。このような誤りをできるだけ少なくするため, ガスクロマトグラフィーに用いる試料を小試験にとり, 乾燥させた後, BrCN結晶の入つた容器でBrCN蒸気処理を行い, 次いでアニリンを添加してKönig反応¹⁹⁾を行うと, ピリジン核が開裂し, グルタコン誘導体に変化するため, もとの位置ではピークが消失または縮小した。この事実を利用して, 同定の一補助手段とすることができた。

電子捕捉型検出器では, ハロゲンを含んだ化合物の検出感度は水素炎イオン化型検出器を用いた場合よりも飛躍的に増強しうることが知られている。そこでトリメチルプロモシランを用いて試料のTMS化を行つたが本実験の条件下では単一のピークは得られなかつた。定量の目的で内部標準とする物質は, 分子内にハロゲンを含んでいることがより便利なので, この点に関しても検討を行っている。

本実験に用いた3種の化合物のうち3-ピリジンメタノールはそのままの形でも, TMS化した後も検出がきわめて容易であり, 実験Vでカラム温度を60°Cまで下げても鮮明なピークとして検出することができた。

ピリジンNのpK_bが8.96であるため²⁰⁾, 培養濾液を陽イオン交換樹脂に添加する場合pHは6.8に修正した。これまでNH₄OH溶出液を用い人型菌H₃₇Ra, BCG, 非定型抗酸菌P-6²¹⁾, M. platypoecilusなどについて実験を行つたが, 薄層クロマトグラフィーで展開し, 測定したニコチン酸, ニコチンアミド, 3-ピリジンメタノールの量は, ガスクロマトグラフィーで測定した量比とはほぼ平行するようである。

ガスクロマトグラフィーの利点は微量の試料で同一カラムで連続的に試料を処理しうることであるが, できれば2種類以上のカラムの併用が理想的である。また容器内の試料全体を分析に用いることは現在の注入方式では不可能なので, なんらかの形で1つの容器内の全試料を測定に使用しうる方式の開発が望まれる。

謝 辞

本稿を終わるにあたり, ご指導を賜つた東北大学薬学部南原利夫教授に深謝します。

文 献

- 1) Prosser, A. R. and Sheppard, A. J.: J. Pharm. Sci., 57: 1004, 1968.
- 2) MacGee, J.: J. Gas Chromato., 6: 48, 1968.
- 3) Reiner, E. and Kubica, G. P.: Amer. Rev. Resp. Dis., 99: 42, 1969.
- 4) Reiner, E., Beam, R. E. and Kubica, G. P.:

- Amer. Rev. Resp. Dis., 99 : 750, 1969.
- 5) Vogel, A. I.: A text-book of practical organic chemistry, Longmans, p. 167, 1964.
 - 6) Vogel, A. I.: *ibid.*, p. 849, 1964.
 - 7) Engler, C.: Ber. Deutsch. Chem. Gesell., 27 : 1784, 1894.
 - 8) Jones, R. G. and Kornfeld, E. C.: J. Amer. Chem. Soc., 73 : 107, 1951.
 - 9) Sweeley, C. C., Bentley, R., Makita, M. and Wells, W. W.: J. Amer. Chem. Soc., 85 : 2497, 1963.
 - 10) Klebe, J. F., Finkbeiner, H. and White, D. M.: J. Amer. Chem. Soc., 88 : 3390, 1966.
 - 11) Aringer, L., Eneroth, P. and Gustaffson, J. Å.: Steroids, 17 : 377, 1970.
 - 12) Yates, P.: Organic synthesis, 48 : 46, 1968.
 - 13) Hoffman, N. E. and Gooding, K. M.: Analyt. Biochem., 31 : 471, 1969.
 - 14) Nagayama, H.: Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ. Ser-C, 10 : 13, 1960.
 - 15) Miura, Y.: Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ. Ser-C, 14 : 114, 1967.
 - 16) Gross, D., Feige, A., Zureck, A. und Schütte, H. R.: Z. Naturforsch., 22 b : 835, 1967.
 - 17) 山根續・宮川コウ・松谷豊 : 抗研誌, 14 : 170, 1959.
 - 18) Raimondo, d. F.: Inter. Z. Vitaminforsch., 21 : 48, 1949.
 - 19) König, W.: J. Prak. Chem., 69 : 105, 1904.
 - 20) Sykes, P.: Reaktionsmechanismen der organischen Chemie, Verlag Chemie, Weinheim, p. 59, 1964.
 - 21) Sato, H.: J. Bact., 100 : 469, 1969.