

汎用の高速液体クロマトグラフ（HPLC）を用いたアミノ酸分析

八木 潤*, 五十嵐 智大*, 片山 貴之*

Amino acid analysis using a general high-performance liquid chromatograph (HPLC).

Jun YAGI, Tomohiro IGARASHI and Takayuki KATAYAMA

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

In this study, we examined an analysis method for amino acids using a general HPLC, a substitute for an automated amino acid analyzer. The HPLC method was based on an automated pre-column-derivatization using a functional autosampler with OPA (o-phthaldialdehyde) and FMOC (9-Fluorenylmethyl chloroformate) as derivatization reagents. The HPLC method produced good calibration curves for 17 amino acids that constitute proteins with the same level of linearity as those by the automated amino acid analyzer. For measured values of amino acids in commercial alcoholic beverages, hydrolysates of yeast and peptone by the HPLC method were almost the same as those with the automated amino acid analyzer. Furthermore, even for hydrolysates generated with methanesulfonic acid (MSA) or sodium hydroxide (NaOH), the HPLC method showed similar trends in measured amino acid values with the automated amino acid analyzer. The results above suggest that the HPLC method has an equivalent analysis ability using the automated amino acid analyzer in amino acids analysis.

1. 緒 言

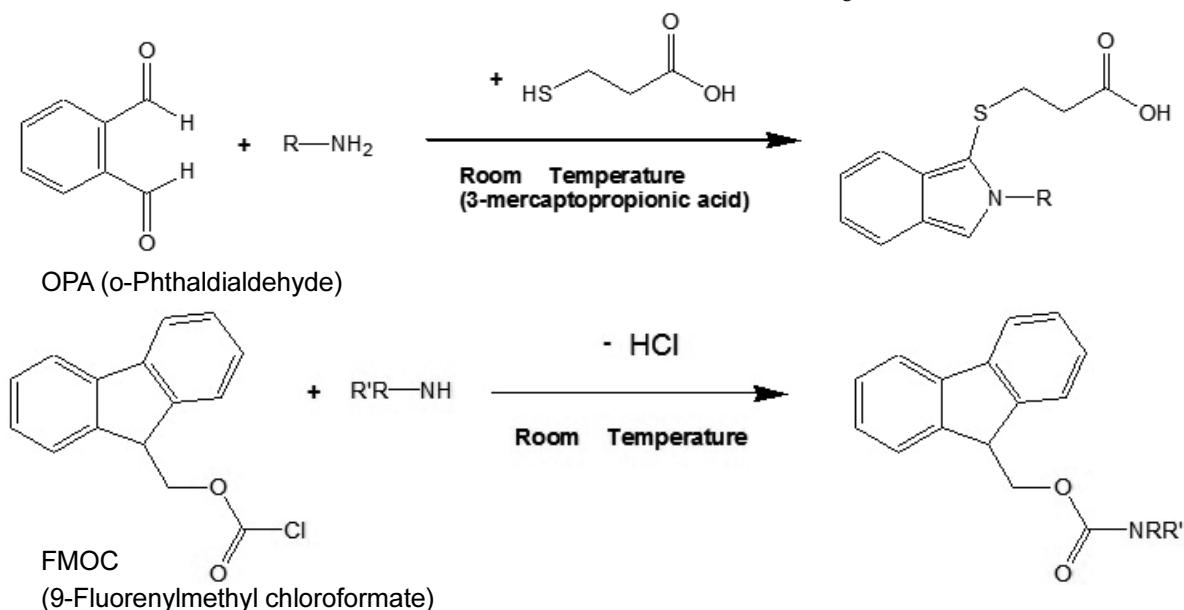
関税分類において、輸入品に含まれるたんぱく質の同定や、たんぱく分解物の由来を確認するために、アミノ酸分析が必要な場合がある。例えば、「酵母」については、加水分解したのち、各アミノ酸を定量し、算出したアミノ酸組成比を、文献値と比較することで、酵母かどうか判断している。

現在、関税中央分析所で実施しているアミノ酸分析は、全自動アミノ酸分析装置(以下、アミノ酸分析計と呼ぶ。)を用いている。アミノ酸分析計は、高速液体クロマトグラフ（HPLC）の一種であり、ニンヒドリンを発色剤としてポストカラム法により測定を行うものである。アミノ酸分析計は、精度、再現性及び利便性に優れるが、アミノ酸分析に特化した装置であるため他の分析には使用できない。また、装置本体が大型であり、窒素ガスが必要であることから、設置にガスボンベや配管等を要し、広い空間を必要とする。価格面においては、使用する試薬及びカラム等が汎用品に比べて高額である。

一方、汎用 HPLC を用いたプレカラム誘導体化法によるアミノ酸分析について、近年、アミノ酸分析計を用いた測定と同程度の精度と再現性が認められる報告がなされている^{1),2)}。同分析法は既存の HPLC で実施でき、アミノ酸分析を行わない時には、カラムや移動相を替えることで同装置を他の分析に使用可能となるメリットがある。

そこで、本研究における汎用 HPLC を用いたプレカラム誘導体化法では、誘導体化試薬として、オルトフタルアルデヒド（OPA）及び 9-フルオレニルメチルクロロギ酸（FMOC）を用い、オートサンブラの前処理機能によりプレカラム処理（誘導体化）の自動化を図った。誘導体化試薬による反応機構は、Scheme 1 の通りであり、OPA と反応しない 2 級アミノ酸が FMOC で誘導体化される。上記のプレカラム誘導体化法で以下の試料のアミノ酸分析を行い、アミノ酸分析計の結果と比較を行ったので報告する。

Scheme 1 Reaction formula of OPA and FMOC derivatization reagent



①標準アミノ酸 17 種

②アルコール飲料 (韓国焼酎)

③酵母及びペプトン (遊離アミノ酸及び加水分解物)

更に、加水分解の効率化のため、分解条件を 4 M メタンスルホン酸による方法等^{3),4)}に替えて測定を行ったので、併せて報告する。

2. 実 験

2.1 試 料

アミノ酸含有アルコール飲料 (韓国焼酎「チャミスル」)

ビール酵母 (アサヒフードアンドヘルスケア社製「エビオス錠」原料)

パン酵母 (市販品)

大豆ペプトン、肉ペプトン (和光純薬工業)

2.2 試 薬

2.2.1 アミノ酸標準試薬

たんぱく質の加水分解で生成するアミノ酸のうち 17 種 (L-アスパラギン酸, L-アラニン, L-アルギニン, L-イソロイシン, グリシン, L-グルタミン酸, L-システイン, L-セリン, L-チロシン, L-トレオニン, L-バリン, L-ヒスチジン, L-フェニルアラニン, L-プロリン, L-メチオニン, L-リジン, L-ロイシン), 内部標準溶液用のアミノ酸 2 種 (L-ノルロイシン, L-ノルバリン) (以上, SIGMA)

2.2.2 アミノ酸分析計用試薬

ニンヒドリン試薬セット, 全自動アミノ酸分析機専用試薬・加水分解系 (クエン酸ナトリウム緩衝液 4 種 (H-01, H-02, H-03, H-04), 水酸化ナトリウム水溶液 (H-09)) (以上, 和光純薬工業)

2.2.3 汎用 HPLC 用試薬

OPA (0.4 M ホウ酸緩衝液中にオルトフタルアルデヒド及び 3-メルカプトプロピオン酸を各 10 mg/mL 含有), FMOC (アセトニトリル中に 9-フルオレニルメチルクロロ酸を 2.5 mg/mL 含有), ホウ酸緩衝液, (以上, Agilent Technologies), 移動相 A (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.6)), 移動相 B (アセトニトリル: メタノール: 水 = 50 : 50 : 10), 注入希釈液 (移動相 A を 10 mL にリン酸 50 μ L を加えた溶液)

2.2.4 加水分解用試薬

6 M 塩酸 (0.04 % (v/v) 2-メルカプトエタノール含有), 4 M メタンスルホン酸, 3 M 水酸化ナトリウム

2.3 装置及び分析条件

2.3.1 アミノ酸分析計

装置 : 全自動アミノ酸分析装置「JLC-500/V2」(日本電子)

カラム : 16 cm 高分離カラム LCR-6 充填 加水仕様

プレカラム : 7 cm 標準仕様 LCR-7 充填

試料注入量 : 50 μ L

カラム温度 : 52 $^{\circ}$ C (5 min) $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C (15.5 min) $\rightarrow$ 62 $^{\circ}$ C (19.5 min)

送液条件 : Table 1 に示す通り.

流速 : 0.20 mL/min

Table 1 Mobile phase switching condition for Automated Amino Acid (AA) Analyzer

Time (min:sec)	Solution Type	Product code
00:00 - 02:01	Sodium Citrate Buffer (pH 3.15)	H-01
02:01 - 06:48	Sodium Citrate Buffer (pH 3.20)	H-02
06:48 - 26:01	Sodium Citrate Buffer (pH 4.25)	H-03
26:01 - 40:00	Sodium Citrate Buffer (pH 9.70)	H-04

2.3.2 汎用 HPLC

装置 : HPLC 「1260 Infinity Series」 (Agilent Technologies)
オートサンブラ 「G1367E」 を装備したもの。
検出器 : ダイオードアレイ検出器 「G4212B」
検出波長 : 0.0 min~10.4 min : 測定波長 338 nm・対照波長 390 nm (OPA で誘導体化された 1 級アミノ酸が対象) →
10.4 min~25.0 min : 測定波長 262 nm・対照波長 324 nm (FMOC で誘導体化された 2 級アミノ酸が対象)
カラム : Poroshell EC-C-18 3.0×100 mm 2.7μm
(Agilent Technologies)
ガードカラム : Poroshell EC-C-18 3.0×5 mm 2.7μm
(Agilent Technologies)
カラム温度 : 40 °C (恒温)
送液条件 : Table 2 に示す通り。
流速 : 0.85 mL/min
注入パラメータ : 文末の Supplemental information に示す。

Table 2 Mobile phase gradient condition for General HPLC

Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B(%)
0.00 - 1.50	96	4
1.50 - 3.50	Gradient	
3.50	88.5	11.5
3.50 - 14.50	Gradient	
14.50	20	80
14.50 - 15.50	Gradient	
15.50 - 18.00	0	100
18.00 - 20.00	96	4

2.4 実験

2.4.1 内部標準溶液の調製

L-ノルロイシン 131.18 mg を 500 mL 容メスフラスコに入れ、クエン酸ナトリウム緩衝液 H-01 (pH 3.15) で定容したものを内部標準溶液 I とし、アミノ酸分計用とした。また、L-ノルバリン 61.67 mg を 500 mL 容メスフラスコに入れ、移動相 A で定容したものを内部標準溶液 II とし、汎用 HPLC 用とした。

2.4.2 標準アミノ酸溶液の調製

17 種類のアミノ酸試薬をそれぞれ約 0.2 m mol (約 20~40 mg) 精秤し、0.1 M 塩酸溶液を用いて完全に溶解させ、100 mL 容メスフラスコにより、超純水で定容し、これを標準原液とした (濃度 : 約 2 μ mol/mL)。標準原液を用いて、標準アミノ酸溶液の濃度が、約 1600, 800, 400, 120, 10, 5, 1 p mol/μL の 7 種類となるよう調製した。なお、それぞれのアミノ酸溶液には、内部標準溶液 I 又は II を 5.0 mL を加えた。

2.4.3 アミノ酸含有アルコール飲料の調製

ナス型フラスコに、アミノ酸含有アルコール飲料を 30.0 mL 採取し、ロータリーエバポレーター及び減圧乾燥器で、十分乾燥させたのち、内部標準溶液 I 又は II を 5.0 mL 加えて溶解させ、0.45 μm メンブレンフィルターでろ過したものを検体とした。

2.4.4 酵母・ペプトンの遊離アミノ酸溶液の調製

ビール酵母, パン酵母, 肉ペプトン及び大豆ペプトンを、それ

ぞれ約 400 mg ずつ採取し、50 mL 容プラスチック製遠心分離管に入れた。超純水を 30.0 mL 加え、よく混合したのちに、4 °C で静置した。12 時間後に室温に戻し、遠心分離 (6000 rpm・15 min) を行ったのち、上澄みを 5.0 mL 採取し、内部標準溶液 I 又は II を 5.0 mL 加え、0.45 μm メンブレンフィルターでろ過したものを検体とした。

2.4.5 酵母・ペプトンの塩酸加水分解溶液の調製

ビール酵母, パン酵母及び大豆ペプトンは約 20 mg, ミートペプトンは約 3 mg をそれぞれ採取し、ガラス製真空加水分解管に入れた。各分解管に、6 M 塩酸 (0.04 % (v/v) 2-メルカプトエタノール含有) を 5.0 mL ずつ加え、循環アスピレーターを用いて 15 分間脱気したのちに封管し、アルミブロック恒温槽に入れて 110 °C で 24 時間加熱した。加熱終了後、冷却、開管し、分解管中の試料液を超純水で洗浄しながらナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーターと減圧乾燥器を用いて塩酸及び水を減圧除去したのち、超純水を 10.0 mL 加えて、十分溶解させた。調製した溶液から 2.0 mL を採取し、内部標準溶液 I 又は II を 2.0 mL 加え 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過したものを検体とした。

2.4.6 酵母・ペプトンのメタンスルホン酸加水分解溶液の調製

ビール酵母, パン酵母及び大豆ペプトンは約 20 mg, ミートペプトンは約 3 mg それぞれ採取し、ガラス製真空加水分解管に入れた。各分解管に、4 M メタンスルホン酸を 1.0 mL ずつ加え、循環アスピレーターを用いて 15 分間脱気したのちに封管し、アルミブロック恒温槽に入れて 165 °C で 1 時間加熱した。加熱終了後、冷却、開管し、分解管中の試料液を超純水で洗浄しながら 10 mL 容メスフラスコに移し、4 M 水酸化ナトリウムを約 1 mL 加えた後、少量をキャピラリーで採取して pH 試験紙で中和を確認し、超純水で 10.0 mL に定容した。定容した溶液から、2.0 mL 採取し、内部標準溶液 I 又は II を 2.0 mL 加え 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過したものを検体とした。

2.4.7 酵母・ペプトンの水酸化ナトリウム加水分解溶液の調製

ビール酵母, パン酵母, ミートペプトン及び大豆ペプトンを約 40 mg それぞれ採取し、ガラス製真空加水分解管に入れた。各分解管に、3 M 水酸化ナトリウムを 1.0 mL ずつ加え、循環アスピレーターを用いて 15 分間脱気した後に封管し、アルミブロック恒温槽に入れて 100 °C で 6 時間加熱した。加熱終了後、冷却、開管し、分解管中の試料液を超純水で洗浄しながら 10 mL 容メスフラスコに移し、3 M 塩酸を約 1 mL 加えた後、少量をキャピラリーで採取して pH 試験紙で中和を確認し、超純水で 10.0 mL に定容した。定容した溶液から、2.0 mL 採取し、内部標準溶液 I 又は II を 2.0 mL 加え 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過したものを検体とした。

3. 結果及び考察

3.1 標準アミノ酸溶液のクロマトグラムの比較

標準アミノ酸溶液 (約 400 p mol/μL) をアミノ酸分析計及び汎用 HPLC により測定したクロマトグラムを Fig. 1 及び Fig. 2 に示す。

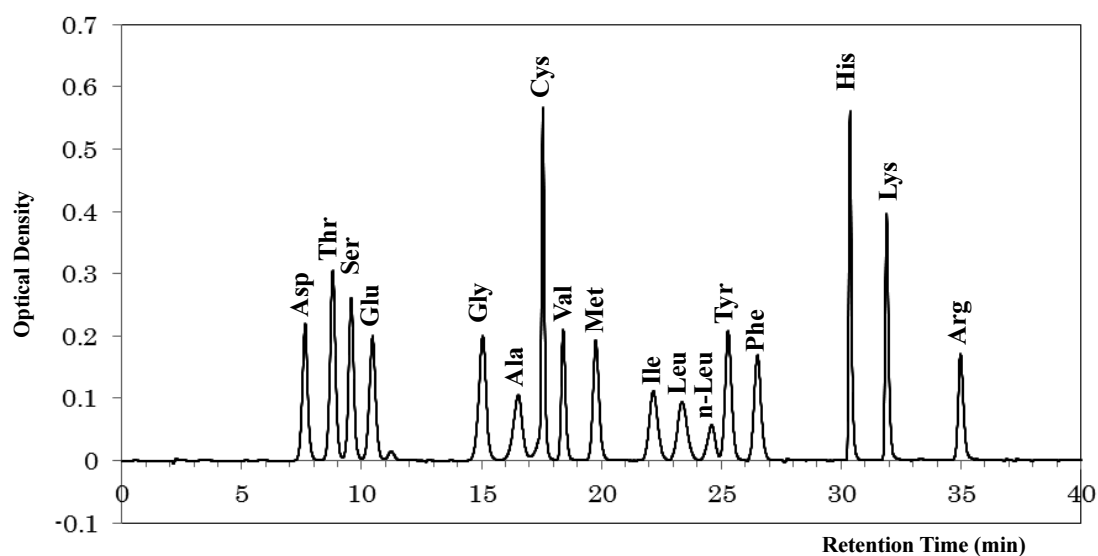
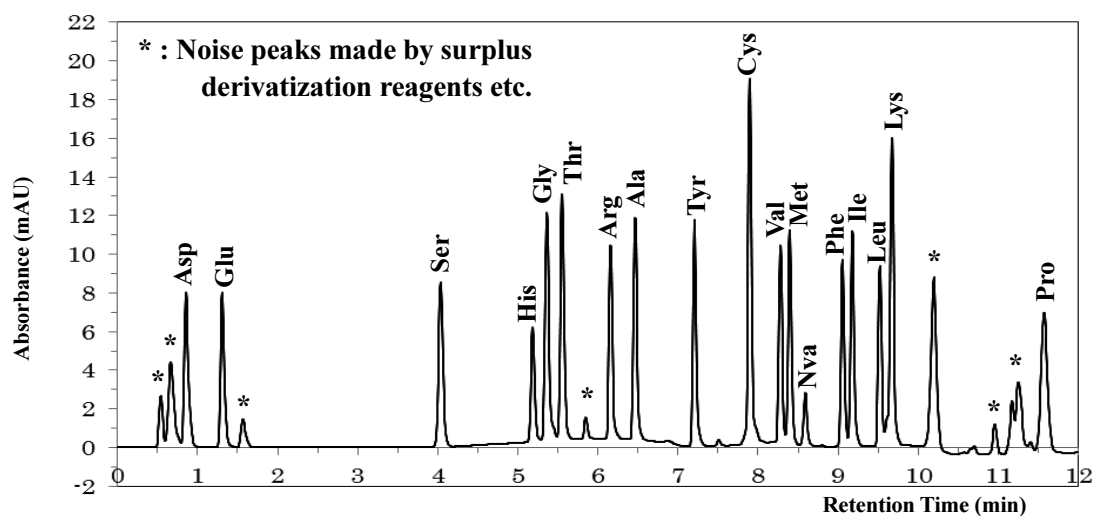


Fig. 1 Chromatogram of Automated AA Analyzer : Standard amino acids solution (About 400 p mol/ μ L)



アミノ酸分析計は、全てのアミノ酸のピークを検出するまで約 37 分かかるのに対し、汎用 HPLC は約 12 分であり、短時間での測定が可能であった。一方、汎用 HPLC のクロマトグラムは、OPA と FMOC の未反応物及びアセトニトリル等に起因するノイズピークが存在し、アスパラギン酸などはピークの末端がノイズと若干重なる。また、移動相のグラジエント送液の影響により、保持時間が 4 分から 7 分の範囲で、ベースラインにわずかなドリフトが認められた。

3.2 標準アミノ酸溶液による検量線作成

各濃度の標準アミノ酸溶液について、両装置で測定し、3 回の測定値の平均から検量線を作成した。検量線から算出した決定係数（相関係数の二乗値）を Table 3 に示す。

Table 3 Comparison of Coefficient of determination (R^2) in calibration curves about each amino acid

Amino acid name	Amino acid abbreviation	Coefficient of determination (R^2)	
		Automated AA Analyzer	General HPLC
L- Asparagine	Asp	0.9987	0.9998
L- Threonine	Thr	0.9982	1.0000
L- Serine	Ser	0.9989	0.9999
L- Glutamic Acid	Glu	0.9985	0.9999
L- Glycine	Gly	0.9969	0.9999
L- Alanine	Ala	0.9983	1.0000
L- Cysteine	Cys	0.9946	1.0000
L- Valine	Val	0.9982	1.0000
L- Methionine	Met	0.9964	0.9999
L- Isoleucine	Ile	0.9972	1.0000
L- Leucine	Leu	0.9972	1.0000
L- Tyrosine	Tyr	0.9968	1.0000
L- Phenylalanine	Phe	0.9976	1.0000
L- Histidine	His	0.9945	0.9999
L- Lysine	Lys	0.9992	0.9996
L- Arginine	Arg	0.9949	1.0000
L- Proline	Pro	0.9993	0.9998

汎用 HPLC の測定結果から得られた検量線の決定係数は、全てのアミノ酸に対して 0.9998~1.0000 であり、検量線は高い直線性を示した。アミノ酸分析計と比較しても遜色なく、同等の濃度範囲での定量が可能であると考えられる。

3.3 アミノ酸含有アルコール飲料の定量結果による両装置の比較

2.4.3 で調製した検体について、両装置で測定した結果を Table 4 に示す。両装置の定量値を比較したところ、ほぼ一致し、相対標準偏差はいずれも低い値となった。

Table 4 Comparison of amino acid amounts and relative standard deviation in the alcoholic beverage containing amino acid

	Automated AA Analyzer	General HPLC
Amount of Gly ($\mu\text{g}/\text{Sample 1 mL}$)	14.66	14.61
Relative standard deviation (%)	0.45	0.47

3.4 遊離アミノ酸溶液の測定結果における両装置の比較

2.4.4 で調製した遊離アミノ酸溶液について、両装置で測定した結果を Table 5 に示し、一例としてビール酵母の結果を棒グラフにしたものを Fig. 3 に示す。

Table 5 Comparison of amino acids composition analyzed by Automated AA Analyzer and General HPLC (Free amino acid)

Sample name	Hydrolysis Type	Analysis system	Composition of amino acids (%)																
			Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Pro
Beer Yeast	Free AA	Automated AA Analyzer	3.34	1.49	1.80	16.81	5.57	16.25	4.50	3.04	1.45	1.78	2.02	3.25	2.76	5.90	5.08	21.14	3.83
		General HPLC	4.07	0.90	1.67	19.41	7.81	18.27	0.45	3.30	1.02	1.30	1.88	2.58	1.95	3.95	4.13	22.83	4.49
Bread Yeast	Free AA	Automated AA Analyzer	1.88	2.70	2.78	43.48	1.56	11.54	1.73	4.78	1.25	1.84	1.64	2.51	2.15	4.67	4.51	8.45	2.52
		General HPLC	1.81	5.80	2.27	51.83	1.74	11.30	0.25	3.81	0.79	1.57	1.73	1.75	1.58	2.74	2.65	7.10	1.29
Meat Peptone	Free AA	Automated AA Analyzer	3.56	3.47	2.98	6.45	4.94	6.60	0.67	4.52	2.07	5.31	7.43	3.44	8.55	4.97	10.34	24.15	0.55
		General HPLC	3.46	3.32	3.25	8.27	5.34	7.09	0.36	5.21	1.70	4.09	8.87	2.59	7.38	2.24	11.88	23.97	1.00
Soybean Peptone	Free AA	Automated AA Analyzer	3.60	3.93	5.39	5.78	6.53	4.38	1.59	2.20	2.27	1.04	12.30	5.89	7.72	8.19	9.37	19.36	0.47
		General HPLC	1.82	3.17	6.37	7.14	7.07	5.23	1.11	2.44	2.24	1.41	15.79	4.72	6.09	3.25	11.11	21.02	0.03

* “AA” means “Amino Acid”

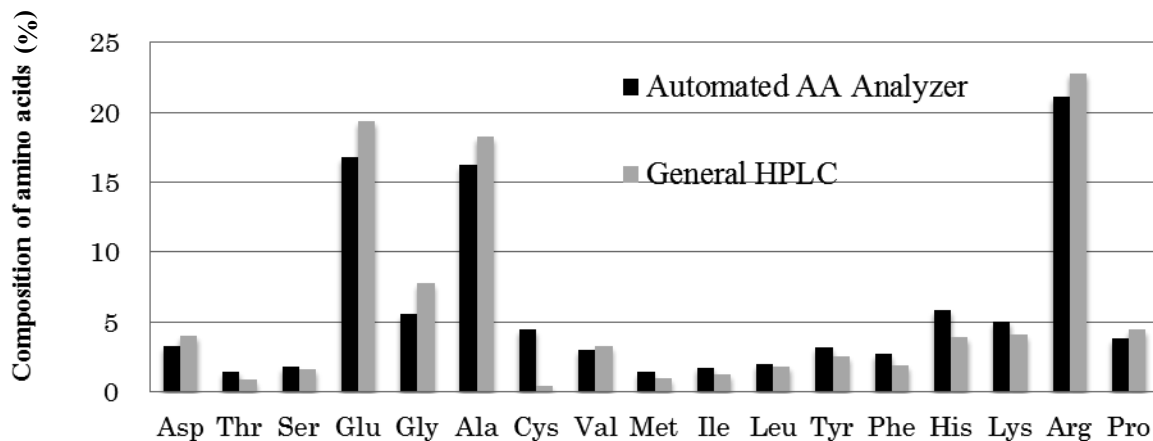


Fig. 3 Comparison bar graph of Free amino acids composition of Beer Yeast

両装置による各アミノ酸組成比を比較したところ、概ね一致しているが、システインなど一部のアミノ酸については組成比に若干の差異があった。定量値の差異の原因は、共存する塩や色素等の不純物が溶液中に残留しており、OPA や FMOC による誘導体化の反応効率を下げていると考えられる。ポストカラム法と異なり、プレカラム法は誘導体化の際に、溶液中に夾雑物が混在しているため、夾雑物の種類や濃度によっては、誘導体化反応を阻害

する可能性がある⁵⁾。

3.5 塩酸加水分解溶液の測定結果における両装置の比較

2.4.5 で調製した塩酸加水分解溶液について、両装置で測定した結果を Table 6 に示し、一例としてビール酵母の結果を棒グラフにしたものを Fig. 4 に示す。

Table 6 Comparison of amino acids composition analyzed by Automated AA Analyzer and General HPLC (HCl hydrolysis)

Sample name	Hydrolysis Type	Analysis System	Composition of amino acids (%)																
			Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Pro
Beer Yeast	HCl hydrolysis	Automated AA Analyzer	9.31	5.03	4.86	12.44	5.61	7.60	0.18	5.99	1.89	4.85	7.74	4.46	4.84	4.56	9.29	9.09	2.24
		General HPLC	10.86	5.12	5.27	14.93	5.24	7.29	0.64	6.21	1.53	4.77	7.54	3.80	4.66	3.24	8.35	7.87	2.66
Bread Yeast	HCl hydrolysis	Automated AA Analyzer	9.10	4.93	4.45	15.68	5.49	6.65	0.65	6.12	1.76	4.92	7.88	4.56	4.85	4.05	9.24	7.57	2.09
		General HPLC	10.54	5.15	4.92	19.34	4.93	6.11	0.46	6.11	1.44	4.76	7.60	3.79	4.57	3.00	8.40	6.36	2.51
Meat Peptone	HCl hydrolysis	Automated AA Analyzer	8.98	3.15	3.47	10.47	20.08	7.93	0.08	3.51	1.99	2.51	3.96	2.22	3.23	5.08	6.89	10.63	5.81
		General HPLC	7.52	2.47	3.70	14.24	22.42	9.00	1.75	3.42	1.11	2.13	4.17	0.80	2.51	1.52	5.52	9.65	8.05
Soybean Peptone	HCl hydrolysis	Automated AA Analyzer	11.0	4.0	4.9	17.1	5.5	4.7	0.6	4.8	1.3	4.4	7.9	4.5	5.0	3.7	7.3	10.4	2.7
		General HPLC	12.4	4.0	5.3	20.6	4.8	4.3	0.6	4.8	1.0	4.3	7.4	3.8	4.7	3.2	6.8	8.7	3.4

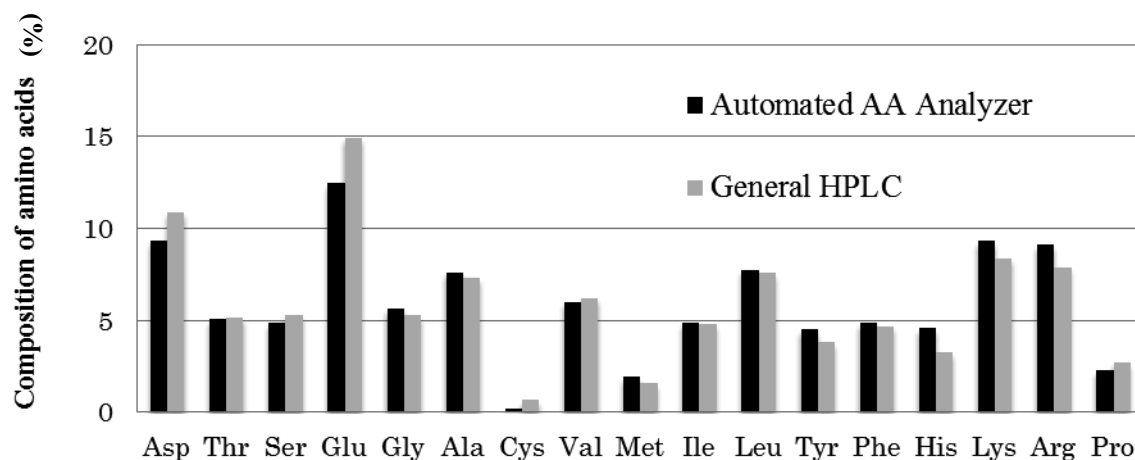


Fig. 4 Comparison bar graph of HCl Hydrolysis amino acids composition of Beer Yeast

両装置による各アミノ酸組成比を比較したところ、概ね一致しているが、遊離アミノ酸の結果と同様に、アスパラギン酸やグルタミン酸など一部のアミノ酸については組成比に差異があった。組成比の差異の原因は、遊離アミノ酸の測定結果と同様に、夾雑物の影響と考えられる。

3.6 メタンスルホン酸加水分解溶液の測定結果における両装置の比較

2.4.6 で調製したメタンスルホン酸加水分解溶液について、両装置で測定を行った結果を、Table 7 に示す。各アミノ酸組成比は概ね一致し、グルタミン酸など一部のアミノ酸については若干の差異があった。組成比の差異の原因は、遊離アミノ酸及び塩酸加水

分解溶液の測定結果と同様に、夾雑物の影響と考えられる。特に、メタンスルホン酸は、塩酸とは異なり揮発させて除去することが困難であることから、加水分解後に中和作業を行ったため、溶液内にはメタンスルホン酸ナトリウムが存在し、塩酸加水分解溶液より夾雑物が多いと考えられる。

3.7 水酸化ナトリウム加水分解溶液の測定結果における両装置の比較

2.4.7 で作製した水酸化ナトリウム加水分解溶液について、両装置で測定を行った結果を、Table 8 に示す。各アミノ酸組成比は概ね一致し、ヒスチジンなど一部のアミノ酸については若干の差異があった。組成比の差異の原因は、夾雑物の影響と考えられる。

特に、加水分解後に中和作業を行ったため、溶液内には塩化ナトリウムが存在し、塩酸加水分解溶液より夾雑物が多いと考えられる。

3.8 三法の加水分解の比較

異なる三法の加水分解によって得られた溶液のアミノ酸組成比を比較するため、一例として汎用 HPLC によるビール酵母の結果を棒グラフにしたものを Fig. 5 に示す。

塩酸とメタンスルホン酸による加水分解溶液のアミノ酸組成比は、各アミノ酸において近似した。このことから、メタンスル

ホン酸による短時間（1 時間）の加水分解であっても、塩酸による長時間（24 時間）の加水分解と同程度のアミノ酸の定性分析が可能と考えられる。

一方、水酸化ナトリウムによる加水分解溶液のアミノ酸組成比については、他の二法と比べると全体的に差異があった。このことから、水酸化ナトリウムによる加水分解は、一部のアミノ酸においてアミノ酸自体の分解が起きていると推測され³⁾、たんぱく質の加水分解法として、定性分析に用いるには望ましくないと考えられる。

Table 7 Comparison of amino acids composition analyzed by Automated AA Analyzer and General HPLC (MSA hydrolysis)

Sample name	Hydrolysis Type	Analysis System	Composition of amino acids (%)																
			Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Pro
Beer Yeast	HCl hydrolysis	Automated AA Analyzer	9.91	5.10	5.42	13.28	5.53	7.69	0.05	5.03	2.07	4.02	7.17	4.36	4.73	4.72	9.53	8.89	2.49
		General HPLC	11.36	4.78	5.77	15.45	5.11	7.74	0.62	5.44	2.09	3.84	7.38	4.15	4.68	3.22	8.21	7.38	2.79
Bread Yeast	HCl hydrolysis	Automated AA Analyzer	9.71	4.98	5.01	16.55	5.43	6.73	0.11	5.16	1.76	4.12	7.52	4.37	4.75	5.00	9.48	7.08	2.24
		General HPLC	11.13	4.81	5.36	19.96	4.91	6.48	0.56	5.27	1.76	3.86	7.50	3.97	4.56	2.93	8.43	5.86	2.64
Meat Peptone	HCl hydrolysis	Automated AA Analyzer	6.35	3.18	3.88	10.99	20.46	8.18	0.16	3.50	1.51	2.30	4.03	2.11	3.30	4.70	7.01	11.07	7.26
		General HPLC	7.94	2.73	4.06	13.57	19.84	8.91	1.80	3.20	1.44	2.19	4.24	2.16	3.00	2.30	5.85	9.71	7.05
Soybean Peptone	HCl hydrolysis	Automated AA Analyzer	11.13	4.02	5.20	18.55	5.40	4.63	0.58	4.02	1.45	3.34	7.33	4.52	4.78	4.76	7.71	9.98	2.61
		General HPLC	12.93	3.86	5.51	22.39	4.73	4.46	0.45	3.88	1.38	3.19	7.40	4.14	4.57	3.17	6.75	8.36	2.83

Table 8 Comparison of amino acids composition analyzed by Automated AA Analyzer and General HPLC (NaOH hydrolysis)

Sample name	Hydrolysis Type	Analysis System	Composition of amino acids (%)																
			Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Pro
Beer Yeast	HCl hydrolysis	Automated AA Analyzer	11.23	2.48	4.13	16.57	11.37	13.15	0.55	2.59	2.38	1.38	5.31	5.64	5.23	5.59	7.93	1.56	2.93
		General HPLC	15.16	1.37	4.61	20.32	11.89	13.65	1.96	1.72	1.59	1.00	5.95	4.07	4.19	0.85	7.79	0.74	3.12
Bread Yeast	HCl hydrolysis	Automated AA Analyzer	10.59	2.20	4.02	21.93	11.04	10.67	0.64	2.66	2.44	1.35	5.25	5.48	4.98	4.93	8.41	1.38	2.02
		General HPLC	13.77	1.17	4.37	27.49	10.76	10.82	2.07	1.60	1.66	1.03	5.65	3.90	3.87	0.82	7.80	0.66	2.57
Meat Peptone	HCl hydrolysis	Automated AA Analyzer	3.45	2.06	3.35	14.62	32.09	13.10	0.24	2.73	1.31	1.55	4.45	1.31	3.66	1.59	6.69	0.53	7.28
		General HPLC	8.19	1.73	4.70	15.24	28.69	11.51	2.82	0.88	0.84	1.26	4.15	1.15	2.68	0.32	6.14	0.24	9.46
Soybean Peptone	HCl hydrolysis	Automated AA Analyzer	11.84	3.02	6.69	21.15	9.23	6.88	1.37	2.22	1.88	1.61	8.54	5.64	5.65	2.69	8.27	0.88	2.45
		General HPLC	14.45	2.11	7.50	25.16	8.46	6.62	1.99	1.25	1.30	1.17	8.59	4.19	5.06	0.61	7.96	0.74	2.84

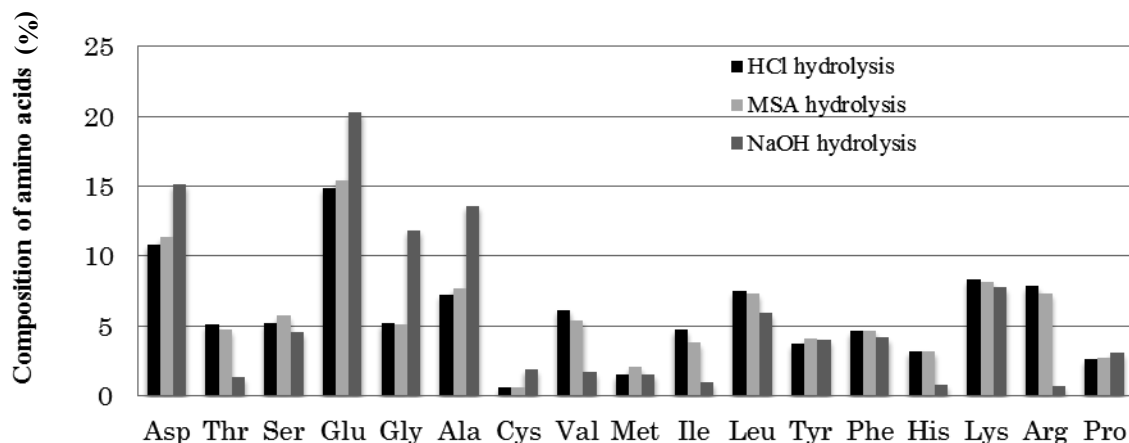


Fig. 5 Comparison bar graph of amino acids composition of Beer Yeast hydrolyzed with different 3-way methods by General HPLC

4. 要 約

汎用 HPLC を用いたプレカラム誘導体化法で、たんぱく質構成アミノ酸のうち 17 種からなる標準混合溶液について、低濃度から高濃度まで測定する事で検量線を作成し、アミノ酸分析計で作成した検量線との比較を行ったところ、両装置とも全てのアミノ酸において高い決定係数を持つ検量線が得られ、定量精度は同等であることが分かった。また、アルコール飲料中のアミノ酸含有量を定量したところ、両装置の結果は一致した。

次に、酵母及びペプトンについて、それぞれの遊離アミノ酸及び塩酸加水分解溶液を測定した。その結果、全ての検体において、両装置から得られる各アミノ酸組成比は概ね一致した。このことから、汎用 HPLC によってアミノ酸分析計と同程度のアミノ酸分析が可能であると考えられる。

効率化を目的に、塩酸に替えてメタンスルホン酸および水酸化ナトリウム水溶液による加水分解を実施し、比較したところ、塩酸加水分解とメタンスルホン酸加水分解の結果はほぼ一致し、同程度の定性分析が可能であった。しかし、水酸化ナトリウム加水分解は、他の二法と比べると全体的に差異があり、定性分析に用いるには望ましくないことが分かった。

Supplemental information.

Injection program for HPLC

Dip the injection needle in pure water vial for cleaning.

- 1) Draw 2.5 μ L from borate vial (p/n 5061-3339).
- 2) Dip the injection needle in pure water vial for cleaning.
- 3) Draw 0.5 μ L from sample vial.
- 4) Mix 3.0 μ L in wash port five times.
- 5) Dip the injection needle in pure water vial for cleaning.
- 6) Draw 0.5 μ L from OPA vial (p/n 5016-3335).
- 7) Mix 3.5 μ L in wash port five times.
- 8) Dip the injection needle in pure water vial for cleaning.
- 9) Draw 0.25 μ L from FMOC vial (p/n 5016-3337).
- 10) Dip the injection needle in acetonitrile vial for cleaning.
- 11) Mix 3.75 μ L in wash port 20 times.
- 12) Wait 0.1 minutes.
- 13) Dip the injection needle in pure water vial for cleaning.
- 14) Draw 10.0 μ L from injection diluent vial.
- 15) Mix 13.75 μ L in wash port five times.
- 16) Wait 1.0 minute.
- 17) Inject.
- 18) Wait 0.1 minutes.
- 19) Valve bypass.

文 献

- 1) Angelika Gratzfeld-Huesgen, "Sensitive and Reliable Amino Acid Analysis in Protein Hydrolysates using the Agilent 1100 Series HPLC" Agilent Pub.# 5968-5658EN (1999)
- 2) Jason Greene, John W. Henderson Jr., John P. Wikswo, "Rapid and Precise Determination of Cellular Amino Acid Flux Rates Using HPLC with Automated Derivatization with Absorbance Detection" Agilent Pub.# 5990-3283EN (2009)
- 3) Michael Fountoulakis*, Hans-Werner Lahm, "Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins", Journal of Chromatography A, 826 (1998) 109-134
- 4) 鈴木忠直, 安井明美:「食品中の総アミノ酸測定のための加水分解法の改良」, 食総研報(Rep. Natl. Food Res. Inst.) No. 59, 43~50 (1995)
- 5) Masuda, A., Dohmae, N., "Examination of an absolute quantity of less than a hundred nanograms of proteins by amino acid analysis", Anal Bioanal Chem, 405, 8073-8081 (2013)