

高速液体クロマトグラフィーを用いた アミノ酸のプレカラム紫外誘導体化による分析

鷹羽 美佳*, 小川 浩史*, 馬越 秀一*, 松本 啓嗣*

Analysis of Amino acids by High Performance Liquid Chromatography Using Pre-Column Derivatization with Ultraviolet

TAKABA Mika*, OGAWA Hirofumi*, UMAKOSHI Shuichi* and MATSUMOTO Yoshitsugu*

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

The analysis method for amino acids using a HPLC (High Performance Liquid Chromatograph), a generally-used instrument, was examined. When analyzing amino acids, a pre-column derivatization method had been used until now. However, this method had some problems. First of all, this method involves the reaction of OPA (o-phthalaldehyde) and FMOC (9-Fluorenylmethyl chloroformate) to amino acids. OPA-amino acids respond selectively to primary amine. In addition, OPA-amino acids are unstable. In other words, generation and decomposition occur concurrently. Secondly, there are some weak retention amino acids; therefore, accurate quantification cannot be achieved. Thirdly, separation of a few amino acids is insufficient. Therefore, a method which could solve the aforementioned problems was explored in this study.

1. 緒 言

適正な関税分類のためにアミノ酸分析が必要となる場合がある。例えば、健康茶（関税率表第 09.02 項に分類される茶属以外の植物から製造されたもの）は関税分類上、第 12.11 項または第 12.12 項に分類されることが多く、健康茶に第 09.02 項の茶を混合したものは、主に第 21 類に分類され、茶の含有によって税率格差が生じる。この茶の検出は、茶に特有のアミノ酸であるテアニンの有無等により判断することが出来る。中村ら、宗像らは、茶に特有のアミノ酸であるテアニンを検出し、報告している^{1), 2)}。また、達家らは、税率格差の要因となる調味の有無を判断する指標としてアミノ酸に着目し、うに中のグルタミン酸等のアミノ酸を定量し、報告している³⁾。

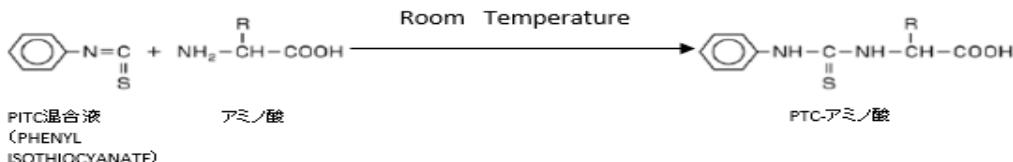
アミノ酸の分析は、これまで関税中央分析所のみに配備されてアミノ酸分析装置を用いて行う必要があった。同装置は精度や再現性に優れるが、アミノ酸分析に特化しており他の分析には使用できない。また装置本体が大型であり、窒素ガスのボンベを設置するための空間の確保、使用的試薬、消耗品類が高価等の問題点があった。そこで八木らは、アミノ酸分析装置に代えて蛍光検出器付きの高速液体クロマトグラフ（以下、HPLC と略記する。）によるアミノ酸分析について報告した⁴⁾。

一方で、この報告にはいくつかの分析上の注意点及び運用上の問題点がある。分析上の注意点としては、①プレカラム誘導体化法により o-フタルアルデヒドを反応させ、生成した OPA-アミノ酸を分析しているが、OPA-アミノ酸は安定性が非常に低く生成と

同時に分解も開始するとされている点⁵⁾。②アスパラギン酸及びグルタミン酸の誘導体の保持が非常に弱く夾雑物との分離が困難である一方、保持が比較的強くクロマトグラム後半に検出されるピークにも一部分離が不十分なもの（例えば、メチオニン及びバリン）があるため、定量分析に支障をきたす場合がある点。③o-フタルアルデヒドは 1 級アミンにしか反応しないため、9-フルオレニルクロロギ酸メチルを併用する必要がある点。以上の 3 点が挙げられる。さらに、運用上の問題点としては、税関分析法で蛍光検出器を必要とするものが一つもなく、アミノ酸分析装置と同様他の分析には使用することができず汎用的ではないという点が挙げられる。

そこで、本研究ではフェニルイソチアネート (PITC 試薬) を用いてアミノ酸を誘導体化し、より汎用的な紫外分光検出器等による分析方法を検討した。PITC 試薬は、アミノ酸と反応して 254 nm に吸収極大を有する PTC アミノ酸を生成するため、アミノ酸分析に広く用いられているものであり、その反応を Scheme1 に示す。PTC アミノ酸は、分析時の条件であれば 3 日間はクロマトグラフ上で目立った変化が起こらないと報告されていることから安定性もあり、PITC 試薬は一級及び二級アミンの両方に反応するため別の試薬を併用する必要もない^{6), 7)}。また PTC アミノ酸の分析用の専用カラムも市販されているが、今回はより汎用的な逆相カラムを使用した。これらの条件で PTC アミノ酸の分析を実施したところ、いくつかの知見が得られたので報告する。

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

Scheme 1 Reaction formula PITC derivatization reagent⁶⁾

2. 実験

2.1 試料

大豆ペプトン（富士フィルム和光純薬）
ミートペプトン（富士フィルム和光純薬）
カゼイン（富士フィルム和光純薬）
緑茶（市販品）
ブレンド茶（健康茶及び第09.02項の茶を混合したもの、市販品） 2種類

2.2 試薬

2.2.1 アミノ酸溶液

アミノ酸標準試薬 H 型（富士フィルム和光純薬）
L-アスパラギン酸, L-トレオニン, L-セリン, L-グルタミン酸,
L(-)-プロリン, グリシン, L-アラニン, L(-)-シスチン, L-バリン,
L-メチオニン, L-イソロイシン, L-ロイシン, L-チロシン,
L-フェニルアラニン, L-リシン, L-ヒスチジン, L-アルギニン,
塩化アンモニウム
含有量は全て 2.50 μmol/mL

テアニン（東京化成工業）

2.2.2 内部標準溶液用アミノ酸

p-ヒドロキシフェニルグリシン（東京化成工業）

2.2.3 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）

2.2.4 抽出用試薬

75%エタノール

2.2.5 誘導体化試薬

フェニルイソチアネート（東京化成工業）、トリエチルアミン（富士フィルム和光純薬）、エタノール（富士フィルム和光純薬）

2.3 装置及び分析条件

2.3.1 HPLC

装置 : HPLC 「1260 Infinity Series」 (Agilent Technologies)
オートサンプラー「G7129A」を装備したもの。
移動相 : A 0.1M 酢酸ナトリウム-酢酸(ph6.6*)/アセトニトリル 94/6
B 0.1M 酢酸ナトリウム-酢酸(ph6.6*)/アセトニトリル 40/60

*0.1M の酢酸ナトリウム溶液 1 L に酢酸 30 μL を添加した。

検出器 : ダイオードアレイ検出器「G7117C」

検出波長 : 250 nm

カラム : Sunniest RP-AQUA 粒径 5 μm 4.6mm i.d. × 250 mm (クロマニックテクノロジーズ)

カラム温度 : 40 °C (恒温)

流速 : 1.0 mL/min

2.4 実験

2.4.1 標準アミノ酸混合溶液の分離条件の検討

アミノ酸標準試薬 H 型を下記 2.4.2 (2) に従い誘導体化操作を実施し、HPLC により移動相 A 及び B のグラジエントプログラムを調整しながら測定することにより、最適な分離条件を検討した。

2.4.2 検量線用標準アミノ酸溶液の調製

2.4.2 (1) 検量線用標準アミノ酸溶液の調製

エッペンドルフチューブにアミノ酸標準試薬 H 型溶液をそれぞれ 5, 10, 40 μL ずつ（それぞれ 12.5, 25, 100 nmol となるよう）正確に取ったのち、内部標準溶液として 5.0 nmol/μL の p-ヒドロキシフェニルグリシンの水溶液を加えた。

2.4.2 (2) 誘導体化操作⁶⁾ 及び検液の調製

2.4.2 (1) でエッペンドルフチューブに調製した溶液を、減圧下にて乾燥させた。次に、エタノール 8 μL、精製水 8 μL 及びトリエチルアミン 4 μL それぞれのエッペンドルフチューブに加え攪拌し、減圧下にて完全に乾燥させた。そこへさらにエタノール 14 μL、精製水 2 μL、トリエチルアミン 2 μL 及び PITC 試薬 2 μL を加えて攪拌し、室温にて 20 分間反応させた。反応後の溶液を減圧下にて完全に乾燥させたのち、1 mL の溶離液 A に溶解させたものを検量線用検液とした。これを HPLC で測定し、3 点検量線を作成した。

2.4.3 アミノ酸組成によるたんぱく質の定性⁴⁾

2.4.3 (1) ペプトン・カゼインの塩酸加水分解溶液の調製

大豆ペプトンを約 18.6 mg、ミートペプトンを約 3.3 mg、カゼインを約 13.4 mg 採取し、それぞれ異なるガラス製真空加水分解管に入れた。6 M 塩酸（0.04% (v/v) 2-メルカプトエタノール含有）を各分解管に 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、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 ずつ加えて、十分溶解させた。調製した溶液から 2.0 mL を採取し、5.0 mmol/L の内部標準溶液を 0.2 mL 加え 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過した。

2.4.3 (2) HPLCによるアミノ酸の定量及び文献値との比較

2.4.3 (1)で調製した検液を100 μLエッペンドルフチューブにとり、減圧下にて乾燥させ、2.4.2 (2)と同様に誘導体化操作を実施した。これをHPLCで測定し、定性・定量分析を実施した。さらに定量した結果を文献値と比較した。

2.4.4 テアニン同定用標準テアニン溶液の調製

テアニンを4.5 mg採取し、10 mLの水に溶かした。そこから10 μLエッペンドルフチューブにとり、2.4.2 (2)と同様に誘導体化操作を実施した。

2.4.5 ブレンド製品中のテアニンの確認

2.4.5 (1) 試料検液の調製⁸⁾

緑茶1種類及びブレンド茶2種類について、約10 gずつ採取し、それぞれ異なる容量100 mLの三角フラスコに入れ、75%エタノール20 mLを加え冷却管を付けて、80 °Cの水浴上で20分間抽出を行い、上澄み液を濾紙で濾過した。次に、75%エタノール20 mLを加え抽出する操作を3回繰り返した。残渣を75%エタノールで洗浄し、5.0 mmol/Lの内部標準溶液を5 mL加え、100 mLに定容した。この溶液1 mLをエッペンドルフチューブに採取し、減圧乾燥したものを全量メンブレンフィルターでろ過した。

2.4.5 (2) HPLCによるテアニンの定性

2.4.5 (1)で調整した検液を100 μLエッペンドルフチューブにとり、減圧下にて乾燥させ、2.4.2 (2)と同様に誘導体化操作を実施した。これをHPLCで測定し、定性分析を実施した。

3. 結果及び考察

3.1 標準アミノ酸混合溶液の分離条件

本研究で使用したカラムは、水系移動相のみでの使用が可能

であるため、親水性化合物の保持や分離が期待でき、シリカゲル基材の表面にオクタデシル基ではなくオクタコシル基を結合させているため、一般的な逆相カラムと異なる選択性が期待できるものである。そこで、標準混合アミノ酸溶液を用いて分離条件を検討した結果、Table 1に示すグラジェントプログラムにより、Fig. 1に示すクロマトグラムが得られた。内標準物質として添加したp-ヒドロキシフェニルグリシンを含めて、最も近接して検出されたのはロイシン及びイソロイシンであるが、その分離度は1.56とピークの完全分離を意味する分離度の1.5以上であることから、内部標準物質を含む18種のアミノ酸を十分に分離することができた。また、前報のOPA誘導体化では保持が不十分であったアスパラギン酸及びグルタミン酸が適度に保持されており、夾雑物のピークがほとんど検出されなかった。

Table 1 Mobile phase gradient condition for HPLC

Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0.00–7.00	100	0
7.00–17.00	Linear Gradient	
17.00	90	10
17.00–22.00	Linear Gradient	
22.00	80	20
22.00–27.00	Linear Gradient	
27.00–32.00	60	40
32.00–42.00	Linear Gradient	
42.00–47.00	0	100
47.01–60.00	100	0

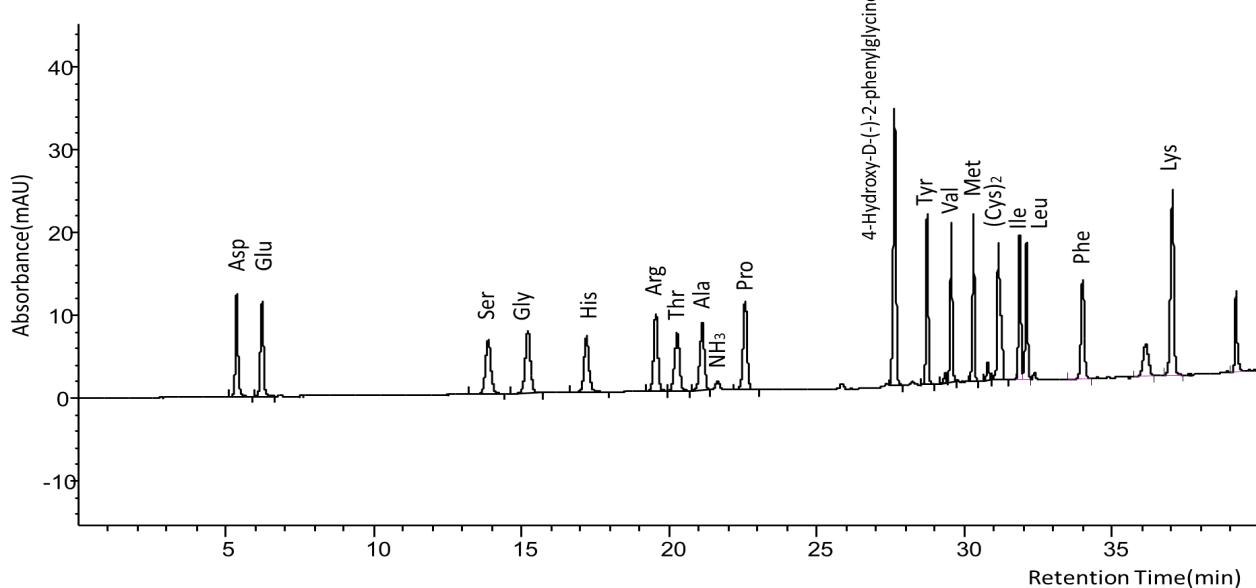


Fig. 1 Chromatogram of PTC-amino acids by HPLC

3.2 検量線の直線性の確認

次に、2.4.2において調製した検量線用検液を測定し、内部標準法による検量線を作成した。検量線から算出した決定係数（相関係数の二乗値）をTable2に示す。検量線の決定係数は、いずれも0.9994以上となっており高い直線性を示した。

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

Amino acid	Symbol (3-letter)	Retention time (min)	Coefficient of determination
L-Asparagine	Asp	5.4	0.99978
L-Glutamic acid	Glu	6.2	0.99998
L-Serine	Ser	13.9	0.99977
Glycine	Gly	15.2	0.99991
L-Histidine	His	17.2	0.99942
L-Arginine	Arg	19.6	0.99991
L-Threonine	Thr	20.3	0.99965
L-Alanine	Ala	21.1	0.99991
L(-)-Proline	Pro	22.6	0.99992
L-Tyrosine	Tyr	28.7	0.99991
L-valine	Val	29.6	0.99989
L-Methionine	Met	30.3	0.99994
L(-)-Cystine	(Cys) ₂	31.2	0.99972
L-Isoleucine	Ile	31.9	0.99991
L-Leucine	Leu	32.1	0.99993
L-Phenylalanine	Phe	34.0	0.99994
L-Lysine	Lys	37.0	0.99988

3.3 ペプトン・カゼインの塩酸加水分解物の定性・定量結果

2.4.3において、大豆ペプトン、ミートペプトン及びカゼインの加水分解物より調製した検液を測定し、得られたクロマトグラムをFig. 2に示す。各ピークは、Fig. 2の標準アミノ酸溶液のクロマトグラムと保持時間を比較することで、同定した。いずれも夾雜成分のピークはほとんど検出されておらず、アミノ酸の検出が容易であることが確認できる。

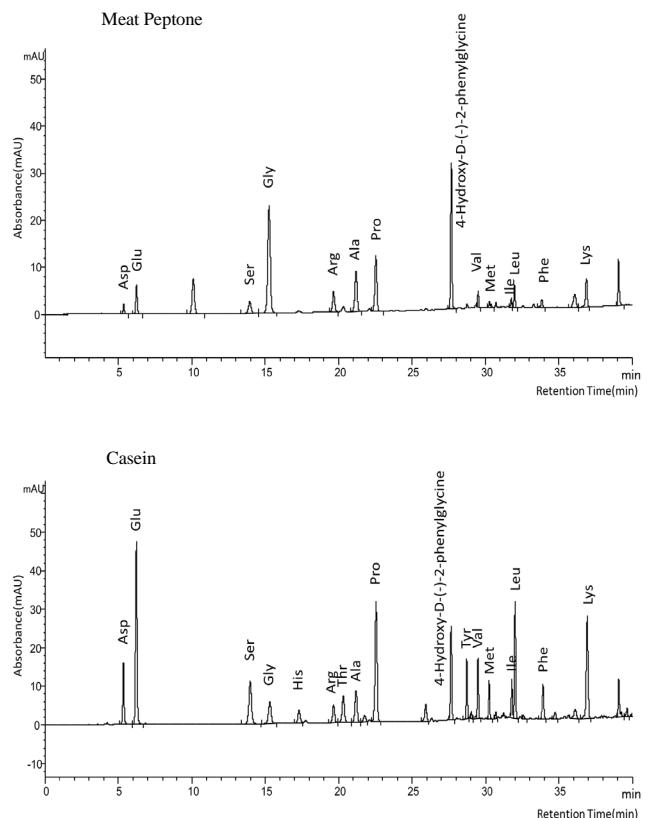
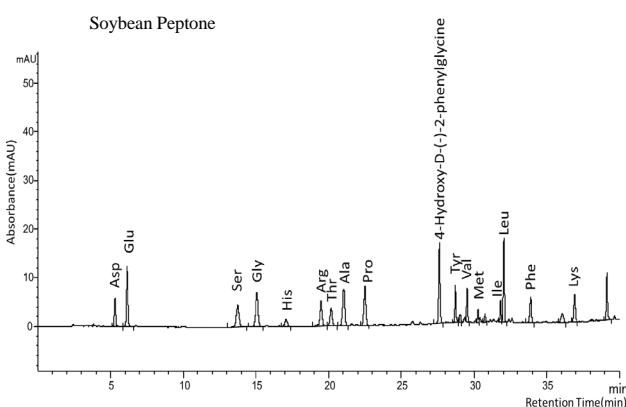


Fig. 2 Chromatogram of hydrolyzed and PTC derivatized Peptone and Casein by HPLC

次に、定量した各アミノ酸の含有量と文献値をTable 3に示す。アミノ酸の含有量は、文献値と比較していずれも低い値となっており、カゼインでは相対誤差が比較的小さいが、大豆ペプトン及びミートペプトンでは相対誤差が大きい結果となった。また、検出されたアミノ酸の総重量に対する各アミノ酸の重量比と文献値をFig. 3及びTable 4に示す。検出されたアミノ酸の総重量に対する各アミノ酸の重量比のパターンは、アミノ酸分析計と代替可能と判断した八木らの報告と比較して、概ね一致した。

以上から、本研究によるアミノ酸の測定により、定量値については文献値との差異が認められ、その原因を検証する必要があるが、重量比のパターンはOPA誘導体化法と遜色ない結果が得られ、アミノ酸分析計を使用した場合と同程度のたんぱく質の同定が可能であると考えられる。

Table 3 Comparison of amino acids measured value and reference value^{4), 9), 10)} (each amino acid content(mg))

	Soybean Peptone		Meat Peptone		Casein	
	measured value(mg)	reference value(mg)	measured value(mg)	reference value(mg)	measured value(mg)	reference value(mg)
Asp	15.7	97.1	13.7	87.0	44.6	63.0
Glu	42.8	160.0	60.7	150.0	172.5	190.0
Ser	18.9	42.8	31.9	60.0	46.3	52.0
Gly	18.8	34.1	195.6	510.0	14.6	17.0
His	12.6	22.2	0.0	13.5	24.2	27.0
Arg	27.2	63.6	60.9	82.5	21.2	34.0
Thr	15.7	31.9	0.0	37.5	29.0	40.0
Ala	22.2	34.6	78.2	163.5	23.6	27.0
Pro	22.3	44.0	101.2	180.0	88.1	100.0
Tyr	18.0	31.2	0.0	6.0	35.0	52.0
Val	11.3	40.1	15.1	45.0	27.6	62.0
Met	4.3	10.4	8.2	13.5	20.2	27.0
(Cys) ₂	0.0	10.0	0.0	3.0	0.0	4.4
Ile	8.0	38.5	8.5	22.5	18.6	50.0
Leu	35.1	65.0	26.5	51.0	63.7	85.0
Phe	17.9	44.1	13.5	24.0	31.8	46.0
Lys	9.4	51.8	33.5	54.0	48.2	72.0

Table 4 Comparison of amino acids measured value and reference value^{4), 9), 10)} (each amino acid ratio(%))

	Soybean Peptone		Meat Peptone		Casein	
	measured value(%)	reference value(%)	measured value(%)	reference value(%)	measured value(%)	reference value(%)
Asp	5.2	12.4	2.1	7.5	6.3	6.6
Glu	14.3	20.6	9.4	14.2	24.3	20.0
Ser	6.3	5.3	4.9	3.7	6.5	5.5
Gly	6.3	4.8	30.2	22.4	2.1	1.8
His	4.2	3.2	0.0	1.5	3.4	2.8
Arg	9.1	8.7	9.4	9.7	3.0	3.6
Thr	5.2	4.0	0.0	2.5	4.1	4.2
Ala	7.4	4.3	12.1	9.0	3.3	2.8
Pro	7.4	3.4	15.6	8.1	12.4	10.5
Tyr	6.0	3.8	0.0	0.8	4.9	5.5
Val	3.8	4.8	2.3	3.4	3.9	6.5
Met	1.4	1.0	1.3	1.1	2.8	2.8
(Cys) ₂	0.0	0.6	0.0	1.8	0.0	0.5
Ile	2.7	4.3	1.3	2.1	2.6	5.3
Leu	11.7	7.4	4.1	4.2	9.0	9.0
Phe	6.0	4.7	2.1	2.5	4.5	4.9
Lys	3.1	6.8	5.2	5.5	6.8	7.6

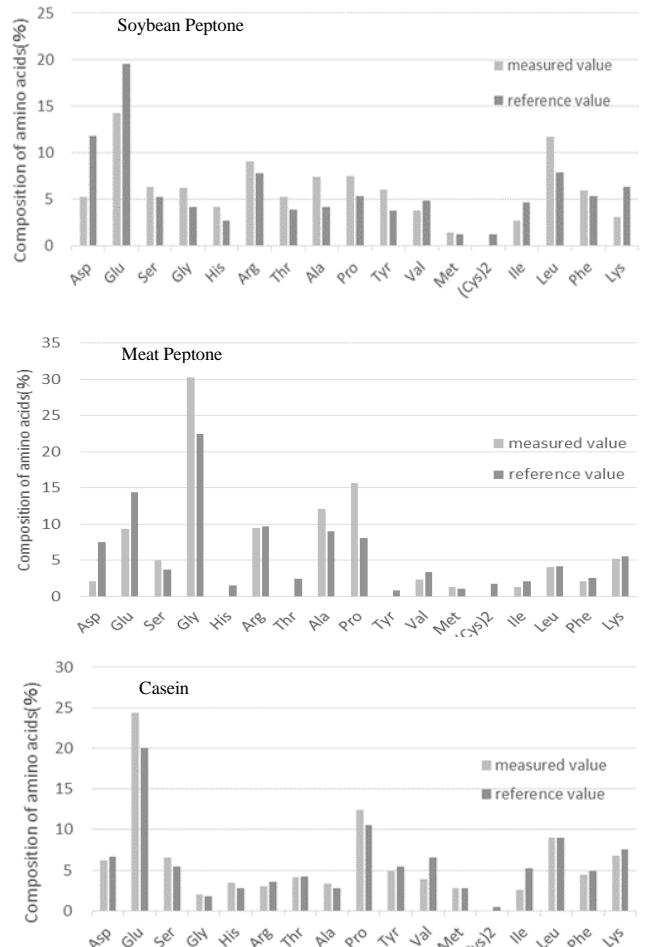


Fig. 3 Comparison of amino acids measured value and reference value^{4), 9), 10)} (each amino acid ratio(%))

3.4 テアニンの定性分析

2.4において、標準テアニン溶液より調製した検液を測定し、得られたクロマトグラムをFig. 4に示す。

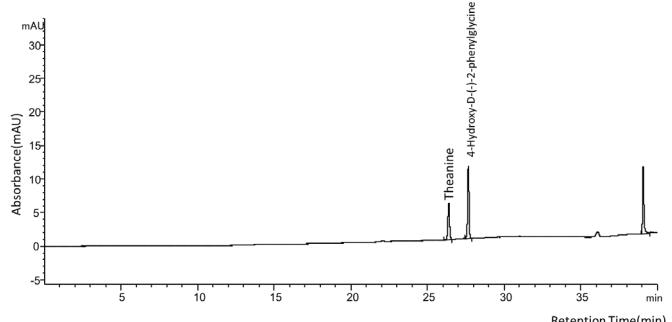


Fig. 3 Chromatogram of PTC derivatized Theanine and Internal Standard by HPLC

テアニンのピークは 26.5 分に検出され、他のアミノ酸や内部標準物質のピークと重複せずに検出できることを確認した。

次に 2.4.4において、茶及びブレンド茶の抽出物より調製した検液を測定し、得られたクロマトグラムを Fig. 5 に示す。Fig. 1 及び Fig. 4 のクロマトグラムと保持時間を比較し、Fig. 5 のクロマトグラムのピークの同定を行った。茶葉に含まれる遊離アミノ酸は、主にテアニンであることが知られており¹¹⁾、今回試験した緑茶及びブレンド茶の全てのクロマトグラム上で、テアニンのピークを確認することができた。したがって、本研究の方法は、ブレンド茶中の茶の含有の有無を判別するための分析法として活用することも可能だと考えられる。

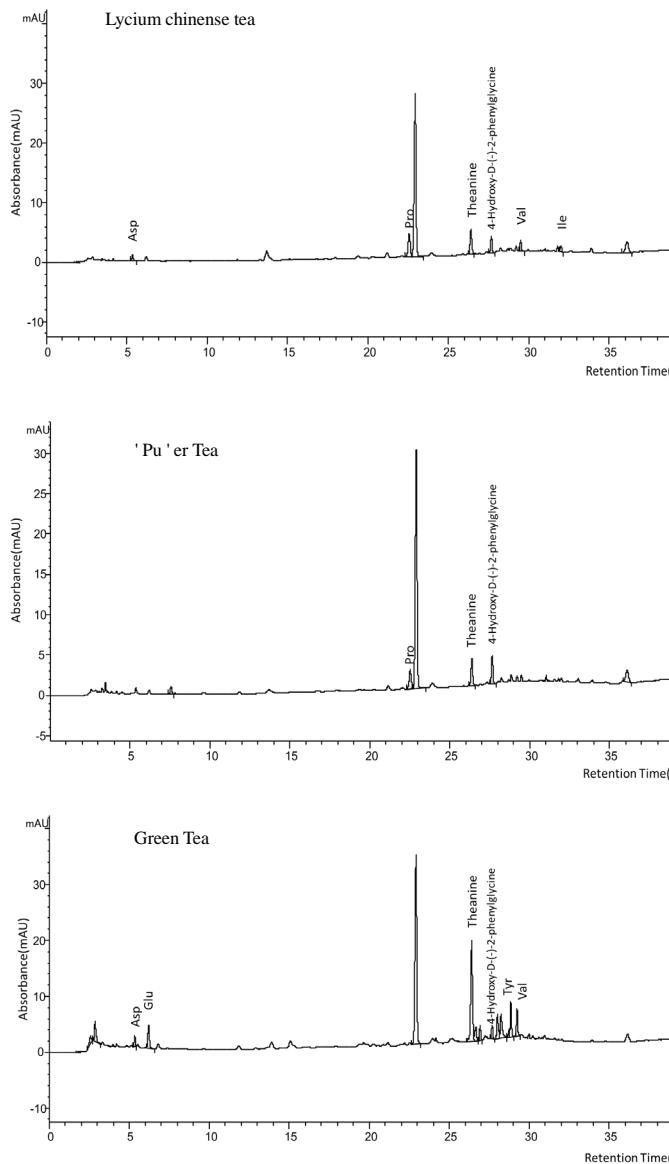


Fig. 5 Chromatogram of extracted and derivatized amino acids by HPLC

なお、これらのクロマトグラムには、夾雜成分のピークも多数確認された。これは茶やブレンド茶の原料植物から抽出されたボリフェノール類及びカフェインを主体とすると考えられる¹¹⁾が、テアニンのピークとは重複していないため、テアニンの同定には問題ないと考えられる。

4. 要 約

PITC 試薬により誘導体化したアミノ酸を、汎用性のある逆相カラムを使用し、さらに検出器も選択で多用され、すべての税関に配備されている紫外分光検出器又はダイオードアレイ検出器を用いてグラジエント溶出法により分析したところ、アミノ酸標準試薬 H 型に含まれるアミノ酸、内部標準物質及びテアニンを充分に分離することができた。特に、OPA 誘導体化法において保持が弱かった、アスパラギン酸及びグルタミン酸の保持も充分であり、クロマトグラム後半に検出される多数のアミノ酸の誘導体のピークも充分に分離できていた。また、

OPA 誘導体化法では二種類の誘導体化試薬を混合して使用する必要があるところ、PITC 試薬は一級及び二級アミンに反応することから、誘導体化操作を簡素化することができた。

今回検討した分析条件により、大豆ペプトン、ミートペプトン及びカゼインをそれぞれ塩酸加水分解して得られたアミノ酸を誘導体化し、得られた検液を測定したところ、OPA 誘導体化法と遜色ない結果が得られ、アミノ酸組成比を文献値や標準たんぱく質と比較することで、アミノ酸分析計や OPA 誘導体化法による場合と同程度のたんぱく質の同定が可能と考えられる。さらに、市販茶製品から遊離アミノ酸を抽出し、誘導体化して得られた検液を測定したところ、茶葉に含まれる主要なアミノ酸であるテアニンを検出することができ、ブレンド茶中の茶の含有の有無を判別するための分析法として活用可能と考える。

文 献

- 1) 中村 文雄, 三坂 純子, 新井 健司, 朝長 洋祐: 関税中央分析所報, 44, 33 (2004)
- 2) 宗像 健人, 坂本 隆宏, 森尾 広志, 五十嵐 智大, 松本 啓嗣: 関税中央分析所報, 60, 51 (2020)
- 3) 達家 清明, 牧田 兼正, 浅野 成子: 関税中央分析所報, 19, 95 (1978)
- 4) 八木 潤, 五十嵐 智大, 片山 貴之: 関税中央分析所報, 57, 67 (2017)
- 5) アミノ酸分析特集. “HPLC を用いたアミノ酸分析（アミノ酸分析）”. JASCO . <https://www.jasco.co.jp/jpn/technique/topics/amino/index.html> (参照 2021-02-25)
- 6) “第十五改正 日本薬局方解説書”, F-12 (2006), (日本薬局方解説書編集委員会)
- 7) siyaku blog. “PTC 誘導体化アミノ酸分析法における、アミノ酸混合標準液成分以外のアミノ酸分析（クロマト Q&A）” . 富士フイルム. <https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/siyaku-blog/019538.html> (参照 2021-02-25)
- 8) 鈴木 忠直, 安井 明美, 杉村 豊裕, 堀 忠一: 「果実・野菜およびその加工品中の遊離アミノ酸測定のための試料前処理方法の比較検討」, 食総研報 (Rep. Natl. Food Res. Inst.), No.55, 31~36 (1991)
- 9) Sayuri Kitagawa, Nobuhiko Mukai, Yuko Furukawa, Kanako Adachi, Akihiro Mizuno, Haruyuki Iefuji :「Effect of soy peptide on brewing beer」, Journal of Bioscience and Bioengineering, No.105, 360~366, (2008)
- 10) 日本食品標準成分表・資源に関する取組. “日本食品標準成分表 2020 年版 (八訂) 第 2 章第 1 表 (データ)” . 文部科学省. https://www.mext.go.jp/a_menu/syokuhinseibun/mext_01110.html (参照 2021-02-12)
- 11) 後藤 哲久, 堀江 秀樹, 大関 由紀, 増田 英昭, 薩科 二郎: 「化学成分から見た市販緑茶の品質」, 茶研報, 80, 23 (1994)