

アミノ酸分析計の概要と測定例

清水 克敏, 成松 郁子, 伊藤 正人

1 はじめに

アミノ酸はタンパク質やペプチドを構成し、生体内に存在して重要な役割を果たしている。また、生体内で合成することのできない必須アミノ酸は食品から摂取する必要がある。食品においてアミノ酸はおいしさにかかわっており、味覚には甘味、苦味、酸味、塩味、うま味の5種類があり、アミノ酸は塩味以外の4種類の味に関与している。表1に味覚に関与しているアミノ酸を示す¹⁾。

アミノ酸分析計は、1958年のSpackmanらの発表²⁾以降、タンパク質、ペプチドのアミノ酸組成分析や医薬品、生体液などのアミノ酸とその類縁物質の分析に広く利用されている。当時、イオン交換クロマトグラフィーとニンヒドリン反応の技術を駆使することにより選択性高く、かつ高速、高精度にアミノ酸を分析することができた。また、液体クロマトグラフィー分野で自動化に成功し、革新的な発展を遂げたことにより記念碑的な研究としても位置づけられており、標準的な分析装置として現在も広く利用されている。

2 アミノ酸の分析手法

タンパク質を構成するアミノ酸は20成分あり、分子構造が類似している各成分を分離する必要がある。アミノ酸はアミノ基とカルボキシル基を持つ両性イオン物質であり、水溶液中ではイオン化しており、pHによって陽イオン、中性、陰イオンと変化することから分離にはアミノ酸の解離特性を利用する陽イオン交換クロマトグ

ラフィーを用いる。溶離液のpHを低い方から高い方へ変化させると等電点の低いアミノ酸から順におおむね溶出し、最後に等電点の最も高いアミノ酸が溶出する。なお、実際にはイオン交換の他に充填剤がポリマー系であることから疎水性相互作用も利用して分離を行う。

検出については、RI検出器や質量分析計での検出は可能であるが、HPLCで汎用的に用いられているUV検出器においては、ほとんどのアミノ酸はUV吸収が低く、蛍光性も無いため、そのまま検出することは困難である。そのため、UV検出器を用いる場合は誘導体化して検出する方法が用いられている。

アミノ酸の誘導体化にはプレカラム誘導体化法とポストカラム誘導体化法がある。プレカラム誘導体化法はあらかじめ誘導体化したアミノ酸をカラム注入し、分離、検出する。誘導体化試薬に疎水性の高い官能基を持つ試薬を使用することにより、試料の分離には逆相クロマトグラフィー系のカラムを用い、分析時間を短くすることができる一方、試料中の夾雑物^{きょうごつ}により分離や検出に影響を与えるといった懸案がある。ポストカラム誘導体化法はアミノ酸をカラムで分離した後に誘導体化試薬と反応させて検出する。イオン交換カラムによる分離は分析時間が比較的長いですが、誘導体化前にアミノ酸を分離することにより夾雑物の影響が小さくなり、定量性良く分析することが可能となる。ポストカラム誘導体化法に用いられる試薬の代表的なものとしてo-フタルアルデヒドとニンヒドリンがある。ニンヒドリンの方法はo-フタルアルデヒドの方法と比較して反応生成物の安定性が高く、良好な定量精度を実現する。

表1 味覚とアミノ酸の関係

味 覚	アミノ酸
甘 味	グリシン, アラニン, スレオニン, プロリン, セリン, シトルリン, リジン, グルタミン, ヒドロキシプロリン
酸 味	アスパラギン, グルタミン酸, アスパラギン酸
苦 味	トリプトファン, メチオニン, オルニチン, フェニルアラニン, バリン, ロイシン, イソロイシン, アルギニン
うま味	グルタミン酸 Na, アスパラギン酸 Na

3 アミノ酸分析計の概要

カラムには、強酸性陽イオン交換樹脂（粒径 3 μm ）を用い、ポリスチレンジビニルベンゼンにスルホン酸が修飾されている。溶離液は、タンパク質加水分解物として生成されるアミノ酸が約 20 成分の場合、pH と塩濃度の異なる 4 種類のクエン酸ナトリウム緩衝液を移動相として用い、アミノ酸各成分の解離状態を移動相の pH でコントロールしながら、塩濃度を徐々に高めていくようにプログラムを組んで溶出させる。

食品や、血液・尿などの生体液に含まれる遊離アミノ酸分析はさらに成分数が増えるため、高い分離性能が求められる。そのため、緩衝液の塩を Na から溶出力の弱い Li に変更し、Li 型陽イオン交換樹脂を用いて分離を行い、pH、塩濃度に加え温度もコントロールすることにより約 40 成分の分離が可能となる。

現在の高速アミノ酸分析計 LA8080 AminoSAAYA の外観を図 1 に、アミノ酸分析計の流路構成を図 2 により説明する。各溶離液は、ポンプ 1 により再生液を含めて電磁弁により切り替え、6 液までを送液できる。



図 1 高速アミノ酸分析計 LA8080AminoSAAYA³⁾

オートサンプラには最大 120 検体の 1.5 mL バイアルがセットできる。また、試料中にアスパラギンや、グルタミンを含む時など冷蔵保存が必要な場合、100 本用冷却ラックも用意されている。カラム恒温装置はペルチエ素子を用いて分離カラムを一定温度に保つ。20～90 $^{\circ}\text{C}$ の範囲でタイムプログラム設定が可能である。ニンヒドリン試薬は 2 液を反応直前に混合する。カラムから溶出されたアミノ酸各成分は、ポンプ 2 により送られる試薬と混合され、反応装置で 135 $^{\circ}\text{C}$ に加熱される。アミノ酸は、反応生成物ルーエマンパープル³⁾となり吸収極大である可視光 570 nm で検出され、クロマトグラムのピークとして測定・定量される。イミノ酸であるプロリンとヒドロキシプロリンは、可視光域に吸収極大がないため 440 nm で検出する。

4 アミノ酸分析計の分離条件

4・1 移動相

アミノ酸は両性イオンであることから、酸性の移動相を使用することでカルボン酸の解離を抑え、アミノ酸を陽イオンとして分離する。そのため、アミノ酸分析では溶離液の pH、溶離液のイオンの種類と濃度が重要な条

表 2 溶離液の性状（溶離液 1 L 中）

	PF-1	PF-2	PF-3	PF-4
クエン酸リチウム (g)	5.73	9.8	8.79	9.8
クエン酸 (g)	19.9	12	11.27	3.3
塩化リチウム (g)	1.24	6.36	26.62	38.15
エタノール (mL)	30	30	100	—
Li 濃度 (mol)	0.09	0.255	0.721	1
pH	約 2.8	約 3.7	約 3.6	約 4.1

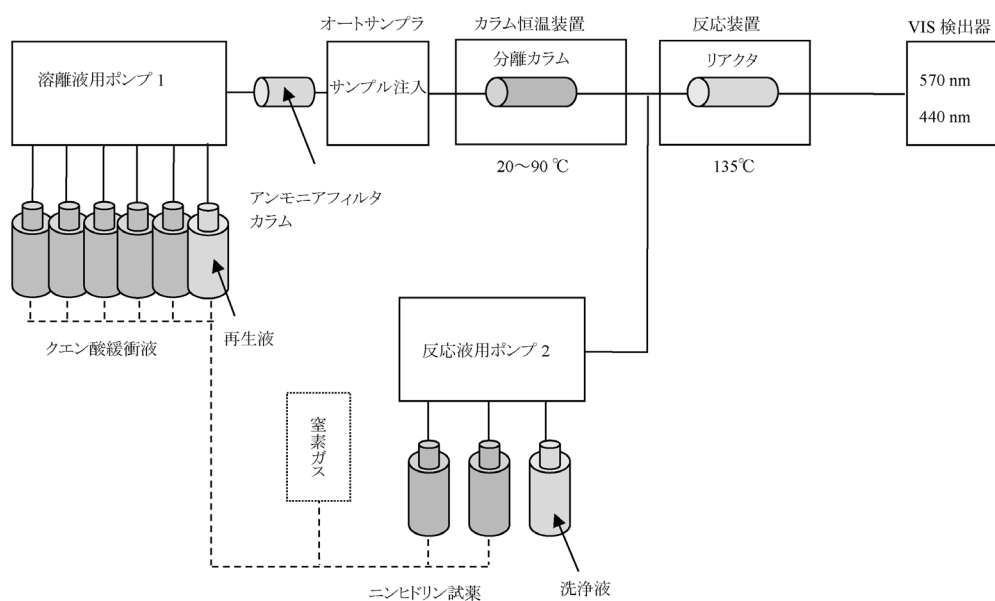


図 2 アミノ酸分析計の流路図³⁾

件となる。後述する生体液分析法で用いられる溶離液の組成として、溶離液 1 L に含まれる代表的な試薬重量と Li 濃度、pH を表 2 に示す。実際の溶離液には他の試薬類も含まれるが、緩衝液の塩としては Li を用いている。組成の異なる複数の PF-1 から PF-4 の溶離液をステップワイズ溶離法またはグラジエント溶離法を利用し、塩濃度及び pH を低い方から高い方に変化させながら測定する。なお、溶離液には有機溶媒としてエタノールを添加するが、これはイオン交換に加え、充填剤の疎水性の違いを利用するためである。

4.2 カラム温度

イオン交換クロマトグラフィーにおいてはカラム温度を分離改善に利用する場合がある。アミノ酸各成分の保持時間に関する温度応答特性に特異性があるためであ

る。カラム温度を変化させると、分離平衡、拡散速度、解離度、溶離液の粘性などの変化により、測定イオンの保持時間が変化する。一般的に温度を上げると溶離液の粘性が下がり、イオン交換基上での溶離剤イオンと測定イオンの交換速度が速くなるため溶出が速くなる傾向がある。分析条件の一例として後述する 5.2 生体分析法における標準的な分析条件ではカラム温度は 30～70℃ で変化させて測定する。

5 分析例

5.1 タンパク質加水分解物分析法

図 3 にタンパク質加水分解物のクロマトグラムを示す。クエン酸ナトリウム系の溶離液を流量 0.40 mL/min で送液し、粒径 3 μm の陽イオン交換樹脂カラム #2622 (i. d. 4.6 mm×60 mm) を 57℃ で恒温する。ニ

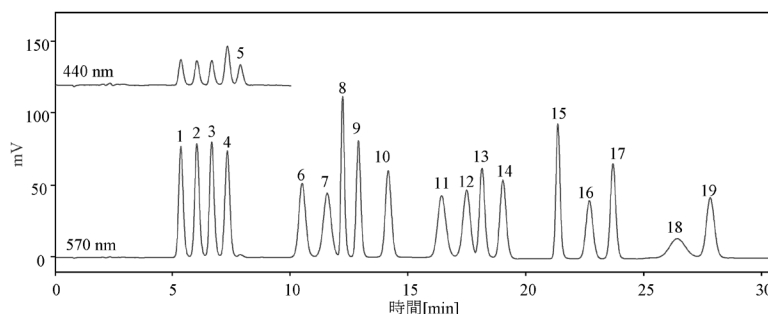


図 3 タンパク質加水分解物の分析例

1. アスパラギン酸, 2. スレオニン, 3. セリン, 4. グルタミン酸, 5. プロリン, 6. グリシン, 7. アラニン, 8. シスチン, 9. バリン, 10. メチオニン, 11. イソロイシン, 12. ロイシン, 13. チロシン, 14. フェニルアラニン, 15. リジン, 16. アンモニア, 17. ヒスチジン, 18. トリプトファン, 19. アルギニン。

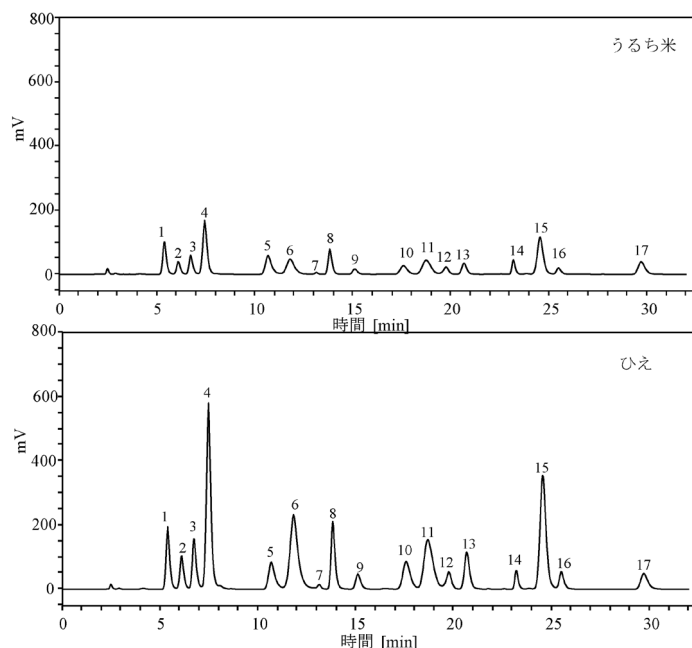


図 4 うるち米とひえの加水分解物の測定

1. アスパラギン酸, 2. スレオニン, 3. セリン, 4. グルタミン酸, 5. グリシン, 6. アラニン, 7. シスチン, 8. バリン, 9. メチオニン, 10. イソロイシン, 11. ロイシン, 12. チロシン, 13. フェニルアラニン, 14. リジン, 15. アンモニア, 16. ヒスチジン, 17. アルギニン。

ンヒドリン試薬を流量 0.35 mL/min で送液・合流し、反応温度 135℃ で発色させた後、可視光波長 570 nm で吸光度検出する。アミノ酸標準混合液は 20 µL を注入する。

分析時間 30 分で各分離度 1.2 以上が得られた。また、アスパラギン酸で検出限界は 2.5 pmol 以下 (SN 比 2)、ピーク面積再現性 (2 nmol) は RSD 1.0% 以下と良好であった。

また、実サンプルとして穀物であるうるち米とひえを測定した。ひえは近年では健康志向の高まりにより、栄養価の高さが見直され、健康食品の一つとして利用されている。図 4 にうるち米とひえのクロマトグラムを示す。うるち米とひえについて、どちらもアミノ酸の組成パターンは類似していることが分かる。一方、ひえは一般的にタンパク質構成アミノ酸が多く含有されており、栄養価が高い食材であることが分かる。

なお、タンパク質加水分解物の測定には前処理として塩酸加水分解が必要である。サンプルを粉碎混合した後、20 mg を秤量し、加水分解管に入れ、6 mol/L 塩酸 1 mL を添加する。アスピレーターで脱気した後、110℃ で 22 時間加熱する。エバポレーターで減圧乾固し、0.02 mol/L 塩酸を用いて 5 mL に定容する。その後、0.2 µm のフィルターでろ過したものを測定試料とした。

5.2 生体液分析法

生体液分析法では溶離液にクエン酸リチウム系の溶液を用いる。表 3 に生体液分析法におけるアミノ酸分析計のプログラム例と図 5 に生体液分析法によるクロマトグラムを示す。カラム洗浄を含め 5 種類の溶離液を切り替え、またカラム温度も変化させることにより約 40 種類のアミノ酸を分離することが可能となる。

実サンプルとしてバナナを測定した。図 6 にそのクロマトグラムを示す。測定結果からバナナにはバリンやロイシンのような分岐鎖アミノ酸やうまみ成分のグルタミンなど特徴的なアミノ酸が含まれており、特に機能性食品表示成分である γ-アミノ酪酸を多く含んでいることが分かる。アミノ酸を測定することは食品の特徴の評価に有用と考えられる。

なお、生体液分析法の測定には、タンパク質吸着や夾雑物質によるカラムの劣化を防止するため、前処理として徐タンパク処理が必要である。粉碎混合した試料を 5 mg 秤量し、超純水を 10 mL 入れる。超音波洗浄機でホモジナイズした後、遠心分離を行い、上清 1 mL を採取する。5% トリクロロ酢酸 1 mL を添加しさらに遠心分離を行う。その後、上清 1 mL を 0.02 mol/L 塩酸を用いて 5 mL に定容し 0.2 µm のフィルターでろ過したものを測定試料とした。

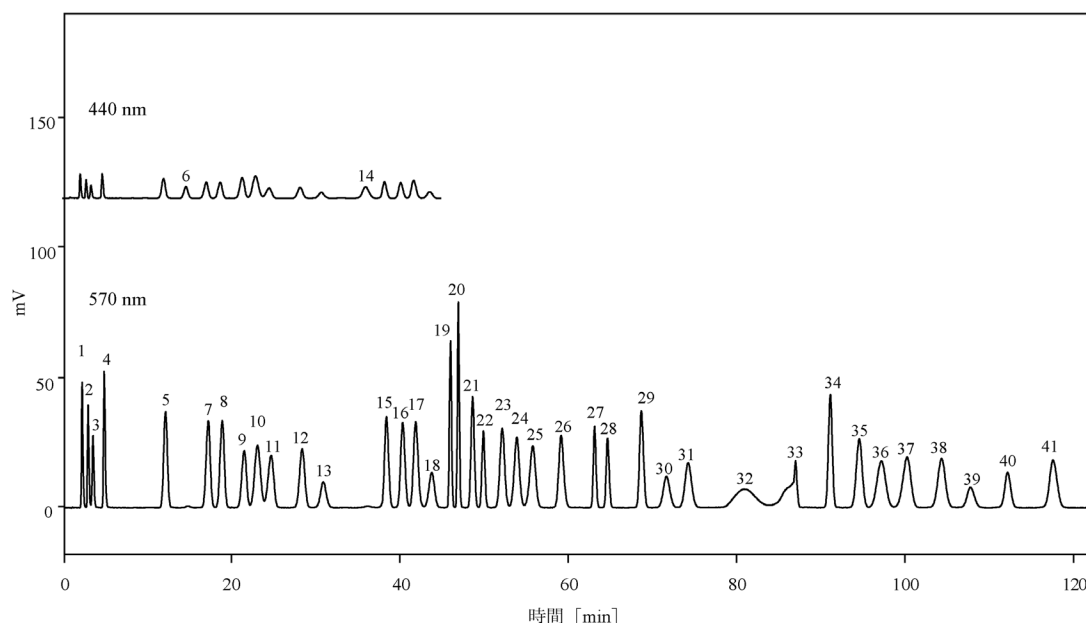


図 5 生体液分析法の分析例

1. ホスホセリン, 2. タウリン, 3. ホスホエタノールアミン, 4. 尿素, 5. アスパラギン酸, 6. プロリン, 7. スレオニン, 8. セリン, 9. アスパラギン, 10. グルタミン酸, 11. グルタミン, 12. サルコシン, 13. α-アミノアジピン酸, 14. ヒドロキシプロリン, 15. グリシン, 16. アラニン, 17. シスチン, 18. α-アミノ-n 酪酸, 19. バリン, 20. シスチン, 21. メチオニン, 22. シスタチオニン, 23. イソロイシン, 24. ロイシン, 25. チロシン, 26. フェニルアラニン, 27. β-アラニン, 28. β-アミノイソ酪酸, 29. γ-アミノ酪酸, 30. トリプトファン, 31. エタノールアミン, 32. アンモニア, 33. ヒドロキシリジン, 34. オルニチン, 35. リジン, 36. 1-メチルヒスチジン, 37. ヒスチジン, 38. 3-メチルヒスチジン, 39. アンセリン, 40. カルノシン, 41. アルギニン.

表 3 生体液分析法のプログラム

時間 (min)	溶 離 液					カラム温度 (℃)
	PF-1 (%)	PF-2 (%)	PF-3 (%)	PF-4 (%)	PF-RG (%)	
0.0	100	0	0	0	0	38
2.0						30
21.5	100	0	0	0	0	
21.6	80	20	0	0	0	60
33.5	70	30	0	0	0	
33.6	10	90	0	0	0	
36.5						40
43.5	10	90	0	0	0	
43.6	0	100	0	0	0	
50.5	0	100	0	0	0	70
50.6	0	0	100	0	0	
68.4						45
69.5	0	0	100	0	0	
69.6	60	0	0	40	0	
75.0	60	0	0	40	0	
75.1	0	0	0	100	0	
82.0	0	0	0	100	0	
82.1	0	20	0	80	0	
92.5						70
99.5	0	20	0	80	0	
99.6	0	0	0	100	0	
112.5	0	0	0	100	0	
112.6	0	0	0	0	100	

6 ま と め

高速液体クロマトグラフィーでは主に逆相クロマトグラフィーが用いられているが、アミノ酸分析計ではイオン交換クロマトグラフィーを用いる。逆相クロマトグラフィーは、溶質の溶解度の差異により分離する。一方、イオン交換クロマトグラフィーは吸着クロマトグラフィーの一種であり、アミノ酸イオンがイオン交換サイトに一回一回吸脱着される相互作用の程度の差異に基づく分離工程である。アミノ酸分析計は、溶解度とは異なる吸着性の分離モードにより成分間の保持特異性を引き出しているわけである。さらに、ポストカラム誘導体化法を用いることにより反応工程の安定性がよく、データの信頼性が高い分析法としてこれからも進歩していくものと考ええる。

文 献

- 1) 味の素株式会社：“アミノ酸ハンドブック”，（工業調査会）（2016）。
- 2) D. H. Speckman, W. H. Stein, S. Moore : *Anal. Chem.*, **1190**, 30 (1958)。
- 3) 伊藤正人, 成松郁子, 裴敏伶, 森崎敦己, 鈴木裕志, 福田真人, 八木隆, 大月繁夫, 関一也, 豊崎耕作 : *S. I. News*, **61**, 5360 (2018)。

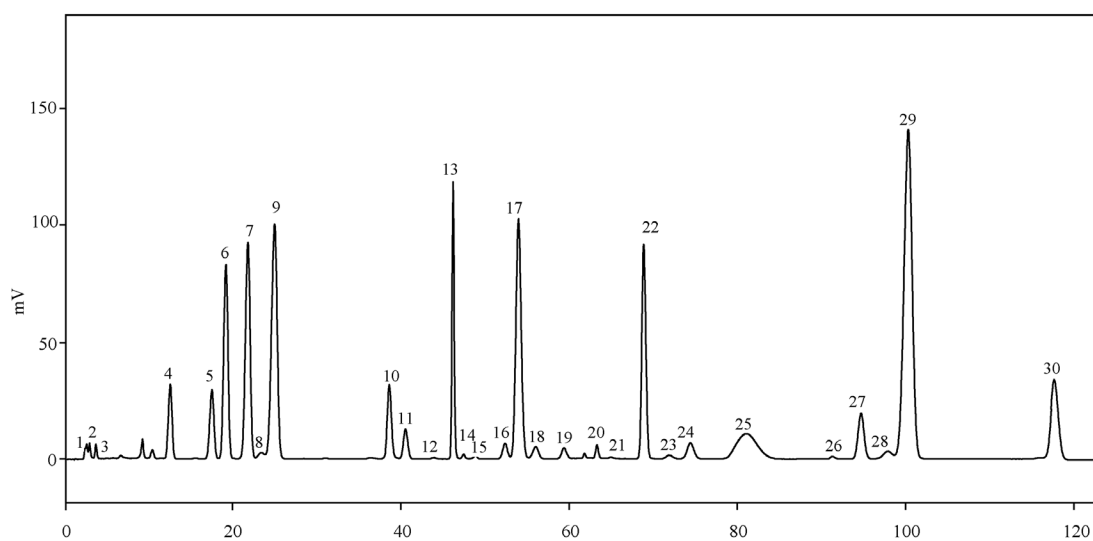


図 6 生体液分析法によるバナナの測定

1. ホスホセリン, 2. タウリン, 3. ホスホエタノールアミン, 4. アスパラギン酸, 5. スレオニン, 6. セリン, 7. アスパラギン, 8. グルタミン酸, 9. グルタミン, 10. グリシン, 11. アラニン, 12. α -アミノ-n 酪酸, 13. バリン, 14. シスチン, 15. メチオニン, 16. イソロイシン, 17. ロイシン, 18. チロシン, 19. フェニルアラニン, 20. β -アラニン, 21. β -アミノイソ酪酸, 22. γ -アミノ酪酸, 23. トリプトファン, 24. エタノールアミン, 25. アンモニア, 26. オルニチン, 27. リジン, 28. 1-メチルヒスチジン, 29. ヒスチジン, 30. アルギニン



清水 克敏 (SHIMIZU Katsutoshi)
株式会社日立ハイテクアナリシスアプリケーション開発センタ (〒104-0041 東京都中央区新富二丁目15番5号 RBM 築地ビル). 千葉大学大学院自然科学研究科修士課程修了. 修士. 《現在の研究テーマ》HPLC のアプリケーション開発. 《趣味》ガーデニング.
E-mail : katsutoshi.shimizu.wp@hitachi-hightech.com



成松 郁子 (NARIMATSU Ikuko)
株式会社日立ハイテクアナリシスアプリケーション開発センタ (〒104-0041 東京都中央区新富二丁目15番5号 RBM 築地ビル). 共立薬科大学 (現慶應義塾大学) 薬学部修士課程修了. 薬学修士, 薬剤師. 《現在の研究テーマ》アミノ酸分析計を用いたアプリケーション開発. 《趣味》映画鑑賞.
E-mail : ikuko.narimatsu.cj@hitachi-hightech.com



伊藤 正人 (Iro Masahito)
株式会社日立ハイテクアナリシス那珂事業所 (〒312-0033 茨城県ひたちなか市市毛1040 番地). 筑波大学大学院後期博士課程数理物質科学研究科化学専攻修了. 博士 (理学)・LC 分析士五段. 《現在の研究テーマ》高速アミノ酸分析計とUHPLC の開発. 《主な著書》“LC/MS, LC/MS/MS の基礎と応用”, 分担執筆 (オーム社) (2014). 《趣味》素粒子と場の物理学 (科学哲学).

会社ホームページ URL :

<https://www.hitachi-hightech.com/jp/ja/company/group/hhs/>

関連製品ページ URL :

<https://www.hitachi-hightech.com/jp/ja/products/analytical-systems/hplc/amino-acid-analyzers/la8080.html>