

■アミノ酸分析の紹介 (Chromaster NINポストカラム標準分析法)

AS/LC-011

自然界に存在するアミノ酸は数百種類あることが知られていますが、タンパク質やペプチドを構成するアミノ酸は約20種類です。このアミノ酸を対象とした分析法を日立ハイテックでは、「標準分析法」と呼んでいます。それに対し遊離アミノ酸約40成分を対象とした分析法を「生体液分析法」と呼んでいます。

またアミノ酸はUV吸収が弱いため、通常は誘導体化して測定します。カラム溶出後反応試薬を混合するポストカラム法の誘導体化試薬には、ニンヒドリン(NIN<sup>(\*)</sup>)とオルトフタルアルデヒド(OPA<sup>(\*)</sup>)があり、それぞれ異なった特徴があります。

今回は、タンパク質加水分解アミノ酸を対象とし、ニンヒドリン試薬を用いたポストカラム法を紹介いたします。この試薬は安定で、寿命が長いことが特長です。溶離液と反応液は、市販キットを使用できます。また再現性も良好でルーチン分析に向いています。検出は、これまで570 nmで行っていましたが、5420 UV-VIS検出器の2波長測定機能を用い 440 nm を同時に測定することでPro(プロリン)の感度向上を図りました。

(\*) NIN : ニンヒドリン(ninhydrin) (\*) OPA : オルトフタルアルデヒド(o-phthalaldehyde)

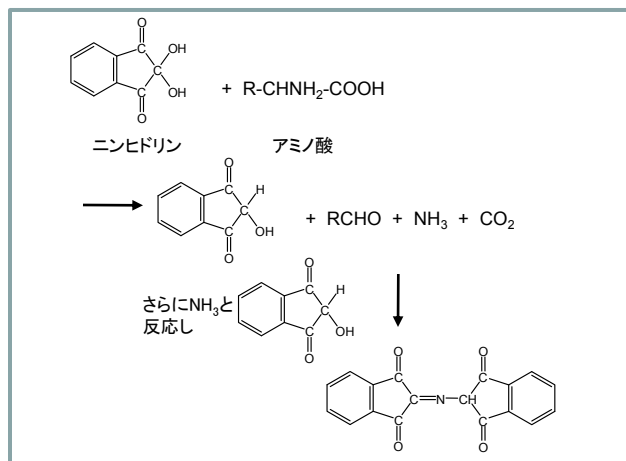
◆アミノ酸分析法の種類と特徴◆

誘導体化試薬	NIN(ニンヒドリン)	OPA(オルトフタルアルデヒド)
分析法 (測定対象)		
標準分析法 (タンパク質加水分解アミノ酸 17成分対象)	<b>NIN標準分析法</b> ・可視吸収検出 <b>2波長測定によるPro感度向上</b> ・再現性良好、ルーチン分析向き ・試薬の寿命長い	<b>OPA標準分析法</b> ・蛍光検出 ・高感度 ・試薬の寿命が短い ・水の純度に注意が必要
生体液分析法 (遊離アミノ酸40成分対象)	<b>NIN生体液分析法</b>	<b>OPA生体液分析法</b>

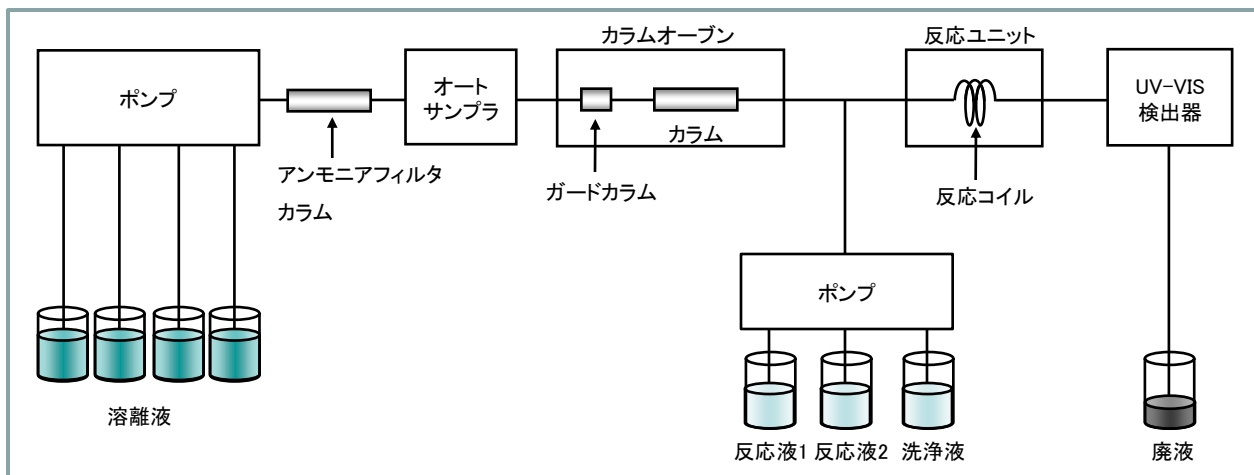
■アミノ酸分析システム(NINポストカラム法)



【システム写真】

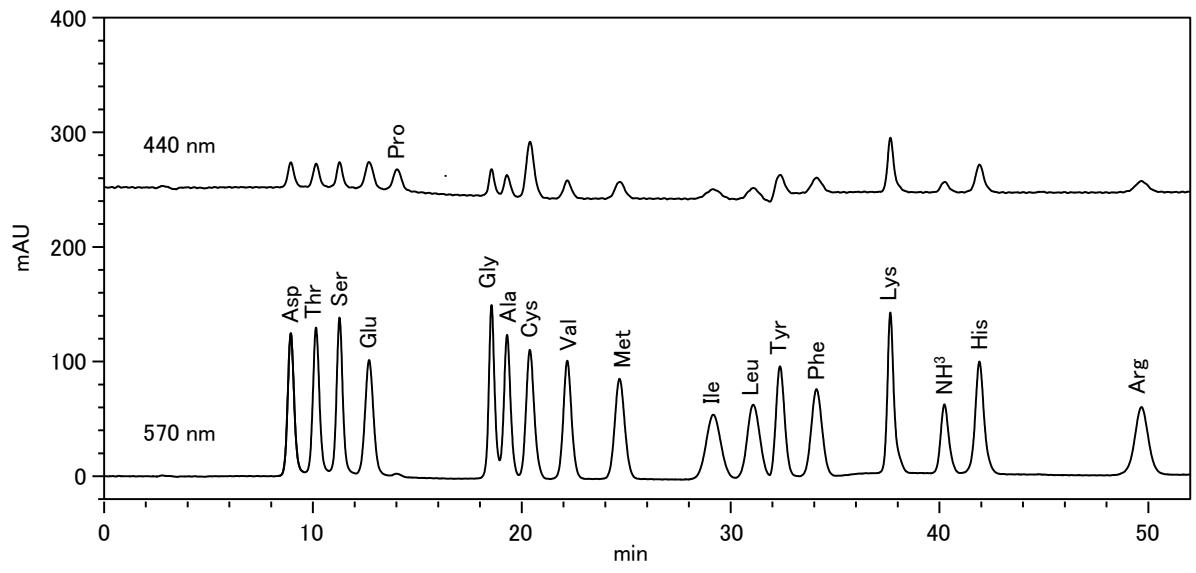


【NINによる誘導体化反応】



【流路図】

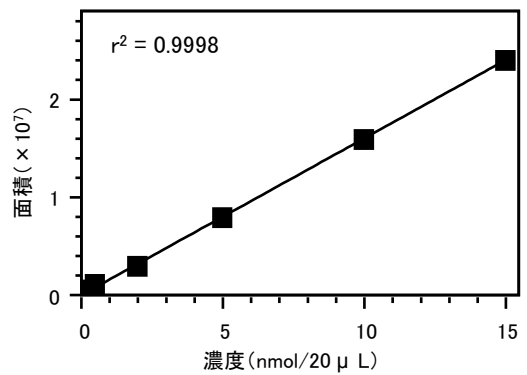
■アミノ酸標準試料測定例



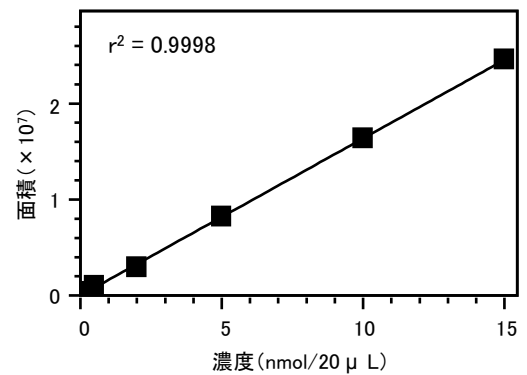
【アミノ酸標準試料測定例 (各 2 nmol/20 μ L)】

No.	各ピークの成分名		No.	各ピークの成分名	
1	Asp	Aspartic acid [アスパラギン酸]	10	Met	Methionine [メチオニン]
2	Thr	Threonine [スレオニン]	11	Ile	Isoleucine [イソロイシン]
3	Ser	Serine [セリン]	12	Leu	Leucine [ロイシン]
4	Glu	Glutamic acid [グルタミン酸]	13	Tyr	Tyrosine [チロシン]
5	Pro	Proline [プロリン]	14	Phe	Phenylalanine [フェニルアラニン]
6	Gly	Glycine [グリシン]	15	Lys	Lysine [リジン]
7	Ala	Alanine [アラニン]	16	His	Histidine [ヒスチジン]
8	Cys	Cystine [シスチン]	17	Arg	Arginine [アルギニン]
9	Val	Valine [バリン]			

＜標準分析法測定条件＞  
 カラム : #2619PH 4.0 mm I.D. × 150 mm  
 アンモニアフィルタカラム : #2650L 4.0 mm I.D. × 120 mm  
 ガードカラム : #2619 4.0 mm I.D. × 5 mm  
 溶離液 : MCI緩衝液L-8500 PH-Kit (\*) (PH-1, PH-3, PH-4, PH-RG)  
 流量 : 0.4 mL/min  
 カラム温度 : 57 °C  
 反応液 : 日立用ニンヒドリン発色溶液キット(\*) (R1 / R2 = 50 / 50)  
 反応液流量 : 0.3 mL/min  
 反応温度 : 130 °C  
 検出波長 : VIS 440 nm, 570 nm (2波長同時測定)  
 注入量 : 20 μ L  
 (\*) 販売元 : 和光純薬工業株式会社



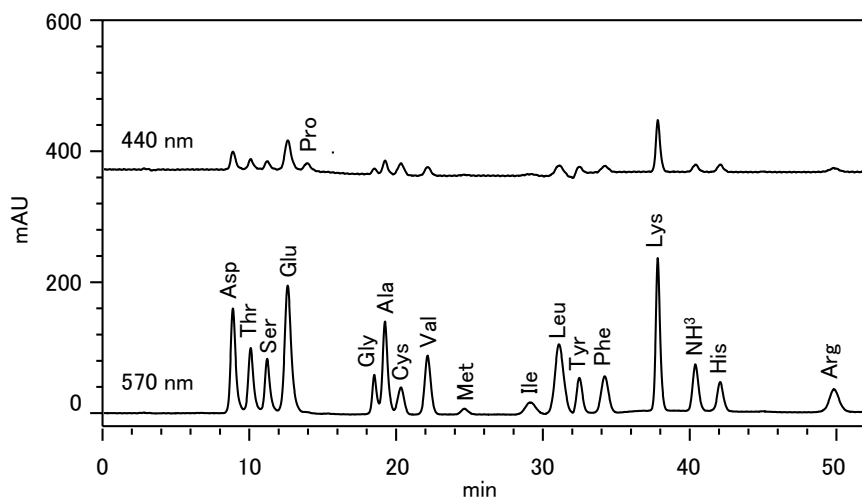
【Valの直線性】



【Hisの直線性】

Proを除く16成分の検量線は、0.05 ~ 15 nmol/20 μ L の範囲で寄与率 0.9996 以上と良好な直線性を示しました。

■BSA加水分解物中のアミノ酸測定例



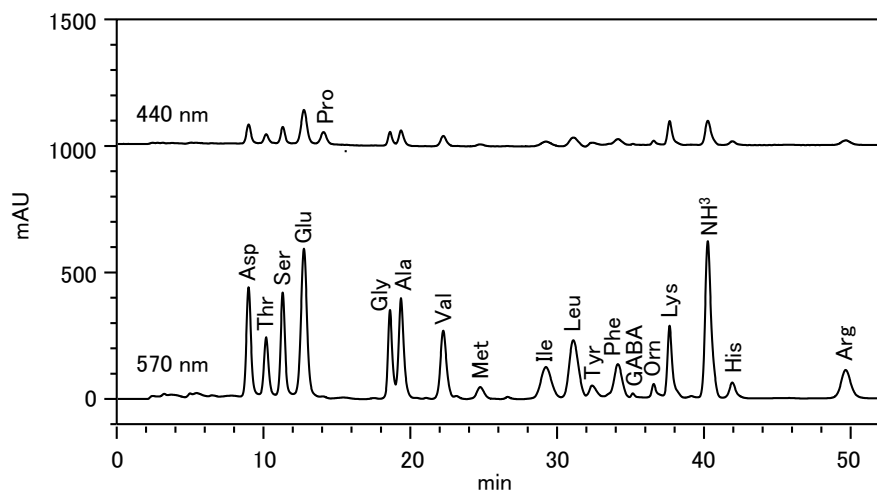
<前処理(加水分解)>

- 試料 BSA(牛血清アルブミン) 2 mg
- ← 6 mol/L 塩酸 1mL
- 脱気 15 min
- 加水分解 110 °C、22 hr
- 減圧乾固
- ← 0.02 mol/L 塩酸で 1 mL に溶解
- 0.02 mol/L 塩酸で 10 mL に定容
- ろ過 Pore Size 0.2 μ m
- 分析試料(20 μ L 注入)

【BSA(牛血清アルブミン)加水分解溶液の測定例(前処理後 20 μ L 注入)】

分離用溶離液に3液を使用することで、分離の改善を図りました。特にIle-Leuの分離が向上しました。  
BSA測定例において、Proは 570 nm で検出が困難ですが、440 nm で同時に測定することで検出が可能になりました。

■薄口醤油中のアミノ酸測定例



<試料の前処理>

- 試料 薄口醤油 1mL
- ← 5%トリクロロ酢酸 1mL
- 遠心分離(10,000 rpm、10 min)
- 上清
- ← 0.02 mol/L 塩酸で50倍希釈
- ろ過 Pore Size 0.2 μ m
- 分析試料(20 μ L 注入)

【薄口醤油の測定例(前処理後 20 μ L 注入)】

本分析条件では、他のアミノ酸と同時にGABA(γ-アミノ酪酸)とOm(オルニチン)も検出されています。

醤油など発酵食品に含まれるアミノ酸の網羅的な測定には、より多くのアミノ酸を同時に測定できる「生体液分析法」も選択いただけます。

主な装置構成 : Chromaster 5110 ポンプ×2、5210 オートサンブラ(サーモスタット付)、5310 カラムオープン、5420 UV-VIS検出器、5510反応ユニット(N<sub>2</sub>ガス制御ユニット付)、アミノ酸NIN分析キット、カラム

注意: 本資料に掲載のデータは測定例を示すもので、性能を保証するものではありません。