

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

AS/LC-010

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(\*1))とオルトフタルアルデヒド(OPA(\*2))があり、それぞれ異なる特徴があります。

今回は、タンパク質加水分解アミノ酸を対象とし、OPA試薬を用いたポストカラム法を紹介いたします。OPAは蛍光誘導体化試薬で、感度が高いことが特長です。その反面、試薬の寿命が短く、使用する水の純度にも気を配る必要があります。

(\*1) NIN : ニンヒドリン(ninhydrin) (\*2) OPA : オルトフタルアルデヒド(o-phthalaldehyde)

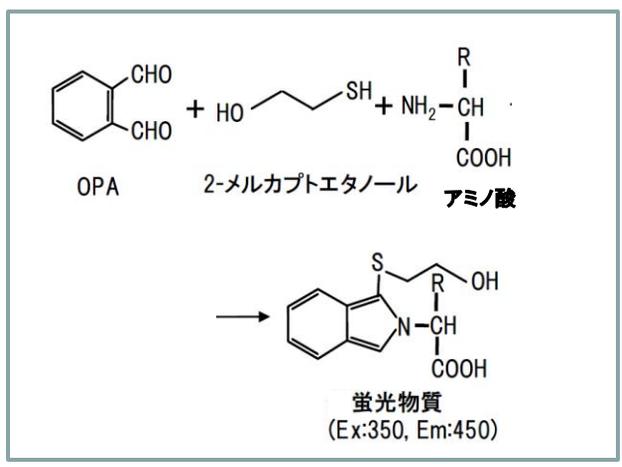
◆アミノ酸分析法の種類と特徴◆

分析法 (測定対象)	NIN(ニンヒドリン)	OPA(オルトフタルアルデヒド)
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 ・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>

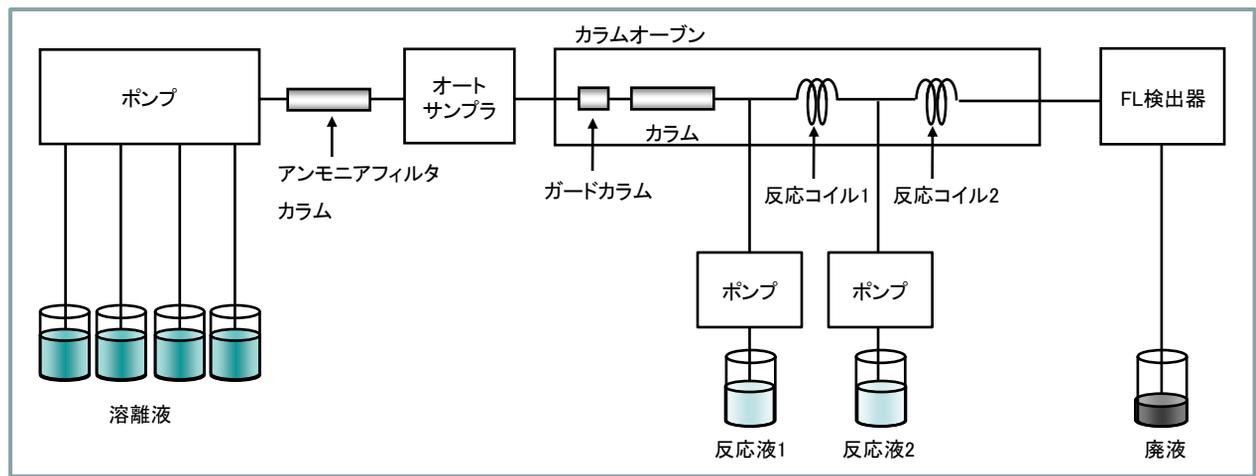
■アミノ酸分析システム(OPAポストカラム法)



【システム写真】

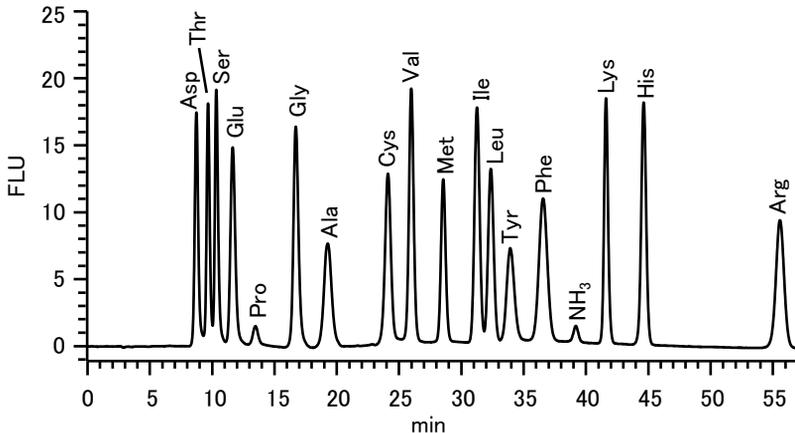


【OPAによる誘導体化反応】



【流路図】

■アミノ酸標準試料の測定例

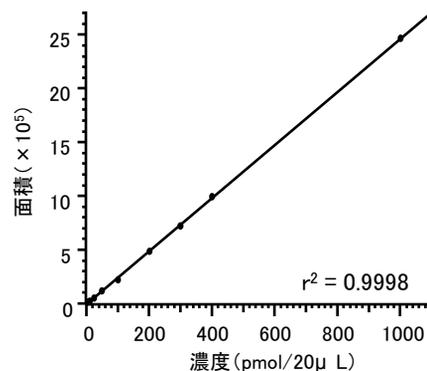


【アミノ酸標準試料測定例 (各 200 pmol/20μ L)】

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＞

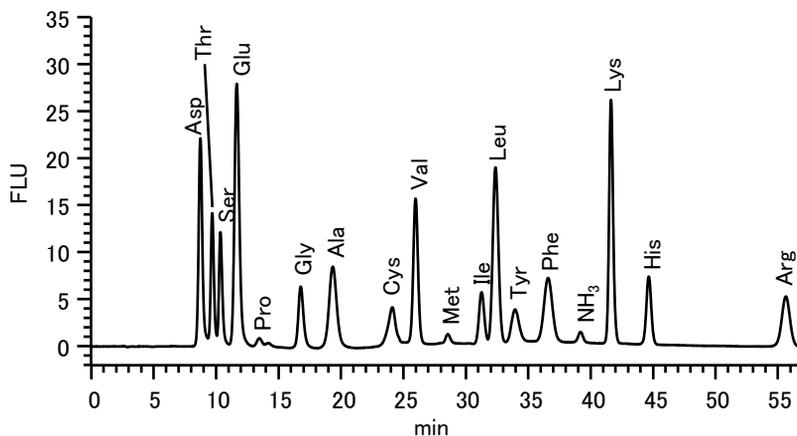
カラム : #2619PH 4.0 mm I.D. × 150 mm  
 アンモニアフィルタカラム  
 ガードカラム : #2650L 4.0 mm I.D. × 120 mm  
 溶離液 : 4液 (クエン酸Na緩衝液3液、再生液1液)  
 流量 : 0.4 mL/min  
 カラム温度 : 57 °C  
 反応液 : 2液 (ホウ酸緩衝液-次亜塩素酸Na) (OPA溶液)  
 反応液流量 : 0.65 mL/min、0.4 mL/min  
 反応温度 : 57 °C  
 検出波長 : FL Ex 340 nm, Em 450 nm  
 注入量 : 20 μ L



【Glyの直線性】

Proを除く16成分について、5 ~ 1000 pmol/20 μ L の範囲で寄与率 0.9990 以上と良好な直線性を示しました。Proは 10 ~ 2000 pmol/20 μ L の範囲で寄与率 1.0000 でした。

■BSA加水分解物中のアミノ酸測定例



【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)】

＜試料の前処理法(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 100 mL に定容  
 |  
 ろ過 Pore Size 0.2 μ m  
 |  
 分析試料 (20 μ L)

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。またBSAのアミノ酸組成も十分な感度で確認することができました。(BSA 400 ng/20 μ L)

主な装置構成 : Chromaster 5110 ポンプ×3、5210 オートサンプラ(サーモスタット付)、5310 カラムオープン、5440 蛍光検出器、アミノ酸OPA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。