

一体型HPLCシステムの自動前処理機能を用いた食品中のアミノ酸分析

田邊 彩乃、山本 洋子

ユーザーベネフィット

- ◆ 自動プレカラム誘導体化により、感度および選択性の高い分析が可能です。
- ◆ たんぱく質構成アミノ酸を約20分で分析することができます。
- ◆ 汎用HPLCシステムを用いて、手軽にアミノ酸分析を行うことができます。

■はじめに

食品には、うまみ成分として知られるグルタミン酸をはじめ多くのアミノ酸が含まれています。各アミノ酸の含有量の測定は、栄養価や味覚の評価だけでなく、最近は機能性成分としての研究にも役立てられています。

アプリケーションニュースL529Bでは、一体型HPLCの自動前処理機能を用いたアミノ酸分析についてご紹介しました。本稿では、この分析手法を用いて14種の食品中のアミノ酸分析を行いました。前処理プロトコールと合わせて、ご報告いたします。

■プレカラム誘導体化

図1に、本システムを用いた自動プレカラム誘導体化の流れを示します。設定はオートサンプラーの前処理プログラム画面で行います。図2に設定画面を示します。ここでは、トレイ3のバイアル1番にMPA/OPA試薬を、2番にFMOC試薬を、3番にりん酸水溶液をセットしています。

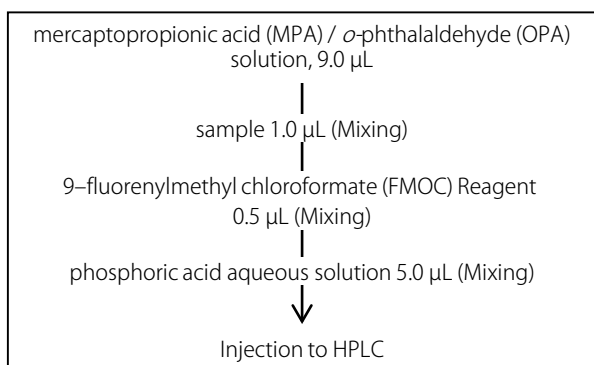


図1 LC-2050Cによる自動プレカラム誘導体化の流れ

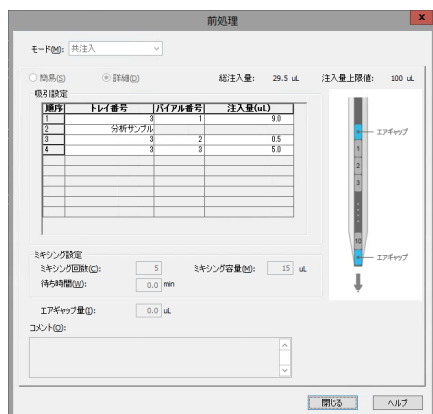


図2 自動プレカラム誘導体化の設定画面

■分析条件

注入前に誘導体化を行うプレカラム誘導体化では、カラムによる分離前にアミノ酸に疎水性の高い官能基が修飾されるため、逆相クロマトグラフィーによる分離が可能となります。分析条件を表1に、グラジエントプログラムを表2に示します。誘導体化試薬および移動相の作成方法は表3をご覧ください。

表1 分析条件

System	: LC-2050C ^{*1}
Column	: Shim-pack™ XR-ODSII (100 mm × 3.0 mmI.D., 2.2 μm) ^{*2}
Mobile phase	: A) 20 mmol/L (Sodium) acetate buffer (pH 6) : B) Water/Acetonitrile = 10:90 : C) 20 mmol/L (Sodium) acetate buffer (pH 5) containing 0.5 mmol/L EDTA-2Na
Mode	: Low pressure gradient
Flow rate	: 1.0 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 1 μL
Vial	: Shimadzu Vials, LC, 1.5 mL, Glass ^{*3}
Detection	: Fluorescence detector (RF-20Axs) : Ch1) Ex. 350 nm, Em. 450 nm : Ch2) Ex. 266 nm, Em. 305 nm

*1 LC-2030CPlusにも適用できます。

*2 P/N S228-41624-92

*3 P/N S228-15652-92

表2 グラジエントプログラム

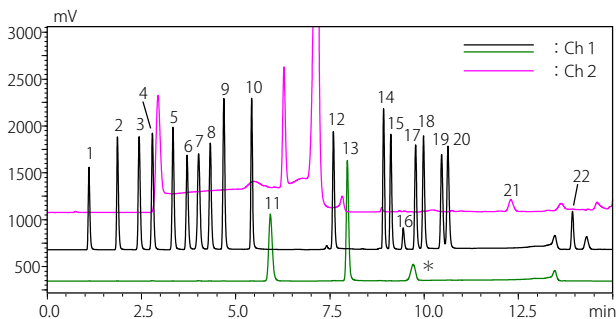
時間 (min)	ユニット	処理命令	数値
0.20	ポンプ	B.Conc	7
1.00	ポンプ	B.Conc	7
4.00	ポンプ	C.Conc	0
5.00	ポンプ	B.Conc	15
5.00	ポンプ	C.Conc	85
7.50	ポンプ	B.Conc	30
7.50	ポンプ	C.Conc	70
12.00	ポンプ	B.Conc	35
12.00	ポンプ	C.Conc	65
14.00	ポンプ	B.Conc	45
14.00	ポンプ	C.Conc	55
14.01	ポンプ	B.Conc	95
14.01	ポンプ	C.Conc	5
17.00	ポンプ	B.Conc	95
17.00	ポンプ	C.Conc	5
17.01	ポンプ	B.Conc	5
17.01	ポンプ	C.Conc	0
19.50	コントローラ	Stop	

表3 誘導体化試薬および移動相の作成方法

- 0.1 mol/L Borate Buffer
Add 0.62 g of boric acid and 0.2 g of sodium hydroxide into 100 mL of pure water.
- Mercaptopropionic Acid Reagent
Add 10 µL of 3-mercaptopropionic acid into 10 mL of 0.1 mol/L borate buffer.
- OPA Reagent
Add 0.3 mL of ethanol into 10 mg of o-phthalaldehyde and dissolve completely. Then add 0.7 mL of 0.1 mol/L borate buffer and 4 mL of pure water.
- Mercaptopropionic Acid / OPA Solution
Mix 300 µL of Mercaptopropionic Acid Reagent and 600 µL OPA Reagent.
- FMOc Reagent
Add 10 mg of 9-fluorenylmethyl chloroformate into 50 mL of acetonitrile.
- Mobile phase A
20 mmol/L (Sodium) acetate buffer (pH 6): Add 2.67 g of sodium acetate trihydrate and 41 µL of acetic acid into 1000 mL of pure water.
- Mobile phase B
Water/Acetonitrile = 10:90
- Mobile phase C
20 mmol/L (Sodium) acetate buffer (pH 5) containing 0.5 mmol/L EDTA-2Na: Add 0.19 g of EDTA-2Na, 2.03 g of sodium acetate trihydrate and 308 µL of acetic acid into 1000 mL of pure water.
- Phosphoric Acid Aqueous Solution
Add 0.5 mL of phosphoric acid into 100 mL of pure water.

■ 標準試料の分析

たんぱく質構成アミノ酸20成分、およびテアニンとγ-アミノ酪酸 (GABA) 2成分の分析例を図3に示します。試料中にトリプトファンとGABAが混在する場合、GABA由来のピーク (クロマトグラム中の*印がついたもの) がトリプトファンの定量に影響する場合がありますので、ご注意ください。



- | | | |
|------------------|----------------|-------------------|
| 1. Aspartic Acid | 9. Arginine | 17. Tryptophan |
| 2. Glutamic Acid | 10. Alanine | 18. Phenylalanine |
| 3. Asparagine | 11. Theanine | 19. Isoleucine |
| 4. Serine | 12. Tyrosine | 20. Leucine |
| 5. Glutamine | 13. GABA | 21. Proline |
| 6. Histidine | 14. Methionine | 22. Lysine |
| 7. Glycine | 15. Valine | |
| 8. Threonine | 16. Cystine | |

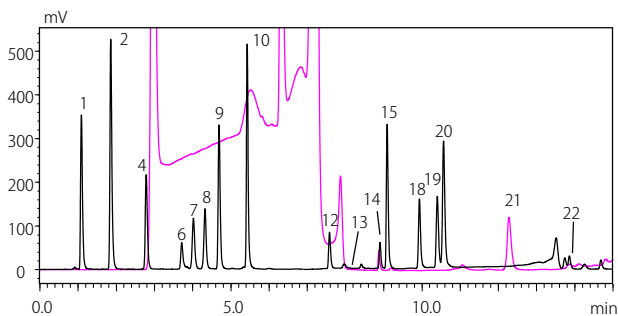
図3 標準アミノ酸22成分のクロマトグラム (各 25 mmol/L)

■ 実試料の分析

本システムを用いて、塩酸加水分解物 4点 (玄米、大豆抽出液、まぐろ水煮、鶏卵) と、遊離アミノ酸試料 10点 (大豆抽出液、ほたて、まぐろ水煮、サプリメント、マッシュルーム、抹茶、トマトジュース、青汁、バーベキューソース、ココナッツミルク) の分析を行いました。クロマトグラムと前処理プロトコルを図4から図31に示します。

プレカラム誘導体化法では、試料に誘導体化試薬を直接加えて反応させるため、試料マトリクスが誘導体化反応に影響する恐れがあります。ここではなるべく試料マトリクスを合わせるため、除たんぱくは限外ろ過カートリッジ (分画分子量3000) を使用し、希釈溶媒はすべて10 mmol/L 塩酸を用いて前処理を行いました。

■ 玄米 (塩酸加水分解物)



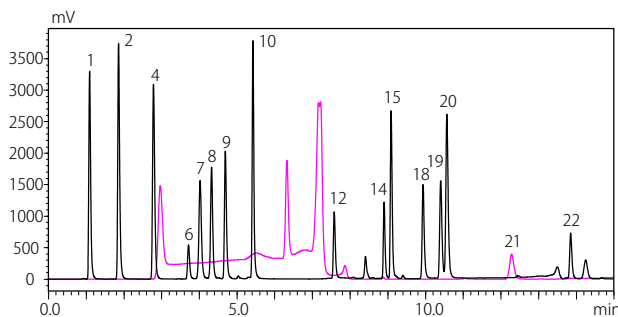
- | | | |
|------------------|----------------|-------------------|
| 1. Aspartic Acid | 9. Arginine | 18. Phenylalanine |
| 2. Glutamic Acid | 10. Alanine | 19. Isoleucine |
| 4. Serine | 12. Tyrosine | 20. Leucine |
| 6. Histidine | 13. GABA | 21. Proline |
| 7. Glycine | 14. Methionine | 22. Lysine |
| 8. Threonine | 15. Valine | |

図4 玄米 (塩酸加水分解) のクロマトグラム

- Ground brown rice 4.91 mg
- 6 mol/L HCl (500 µL)
Seal vessel under reduced pressure
Stand at 110 °C, 22 hours
Evaporate to dryness under nitrogen atmosphere
 - 10 mmol/L HCl (1000 µL)
Dissolve with vortex mixer
Filtration (0.2 µm, 10000 rpm × 10 minutes)
- Filtrate 50 µL
- 10 mmol/L HCl (950 µL)
- HPLC

図5 玄米 (塩酸加水分解物) の前処理プロトコル

■ 鶏卵 (塩酸加水分解物)



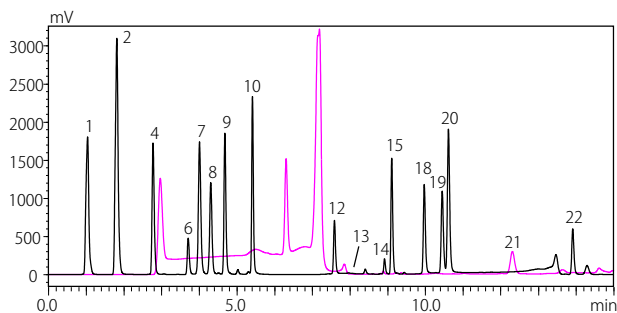
- | | | |
|------------------|-------------------|----------------|
| 1. Aspartic Acid | 9. Arginine | 19. Isoleucine |
| 2. Glutamic Acid | 10. Alanine | 20. Leucine |
| 4. Serine | 12. Tyrosine | 21. Proline |
| 6. Histidine | 14. Methionine | 22. Lysine |
| 7. Glycine | 15. Valine | |
| 8. Threonine | 18. Phenylalanine | |

図6 鶏卵 (塩酸加水分解物) のクロマトグラム

- Stirred egg 14.26 mg
- 6 mol/L HCl (500 µL)
Seal vessel under reduced pressure
Stand at 110 °C, 22 hours
Evaporate to dryness under nitrogen atmosphere
 - 10 mmol/L HCl (1000 µL)
Dissolve with vortex mixer
Filtration (0.2 µm, 10000 rpm × 10 minutes)
- Filtrate 50 µL
- 10 mmol/L HCl (950 µL)
- HPLC

図7 鶏卵 (塩酸加水分解物) の前処理プロトコル

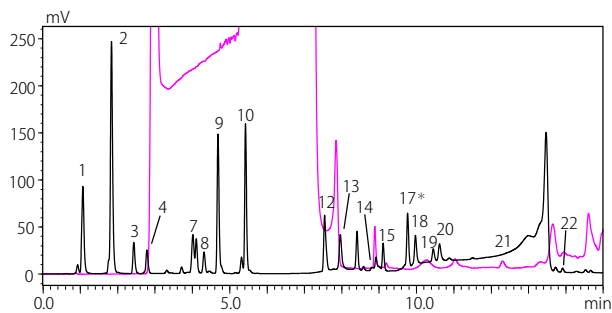
■大豆抽出液（塩酸加水分解物）



- | | | |
|------------------|----------------|-------------------|
| 1. Aspartic Acid | 9. Arginine | 18. Phenylalanine |
| 2. Glutamic Acid | 10. Alanine | 19. Isoleucine |
| 4. Serine | 12. Tyrosine | 20. Leucine |
| 6. Histidine | 13. GABA | 21. Proline |
| 7. Glycine | 14. Methionine | 22. Lysine |
| 8. Threonine | 15. Valine | |

図8 大豆抽出液（塩酸加水分解物）のクロマトグラム

■大豆抽出液



- | | | |
|------------------|----------------|--------------------------|
| 1. Aspartic Acid | 9. Arginine | 17. (Tryptophan + GABA)* |
| 2. Glutamic Acid | 10. Alanine | 18. Phenylalanine |
| 3. Asparagine | 12. Tyrosine | 19. Isoleucine |
| 4. Serine | 13. GABA | 20. Leucine |
| 7. Glycine | 14. Methionine | 21. Proline |
| 8. Threonine | 15. Valine | 22. Lysine |

* トリプトファンとGABA由来のピークが重なっている可能性があります。

図12 大豆抽出液のクロマトグラム

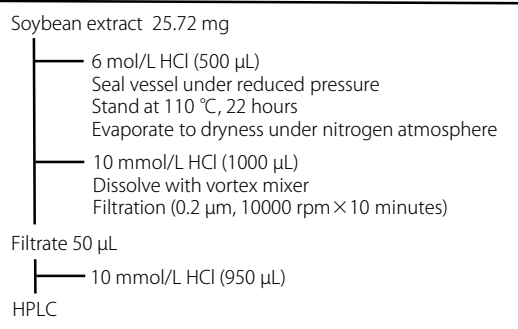


図9 大豆抽出液（塩酸加水分解物）の前処理プロトコール

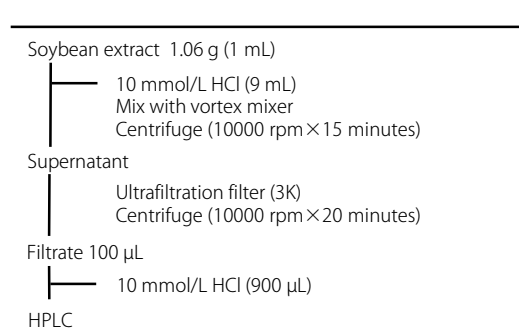
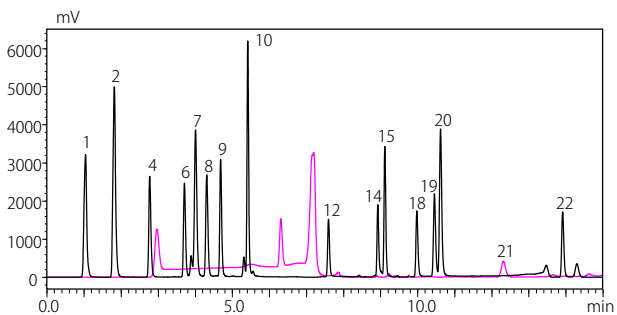


図13 大豆抽出液の前処理プロトコール

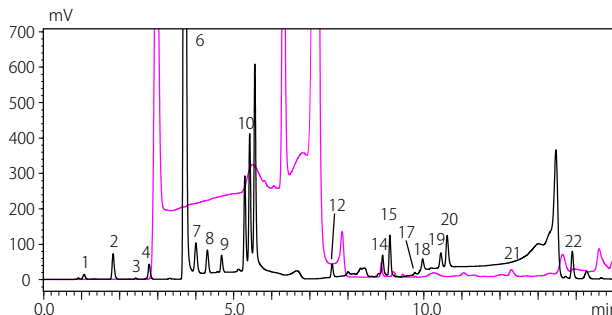
■まぐろ水煮（塩酸加水分解物）



- | | | |
|------------------|-------------------|----------------|
| 1. Aspartic Acid | 9. Arginine | 19. Isoleucine |
| 2. Glutamic Acid | 10. Alanine | 20. Leucine |
| 4. Serine | 12. Tyrosine | 21. Proline |
| 6. Histidine | 14. Methionine | 22. Lysine |
| 7. Glycine | 15. Valine | |
| 8. Threonine | 18. Phenylalanine | |

図10 まぐろ水煮（塩酸加水分解物）のクロマトグラム

■まぐろ水煮



- | | | |
|------------------|----------------|-------------------|
| 1. Aspartic Acid | 8. Threonine | 17. Tryptophan |
| 2. Glutamic Acid | 9. Arginine | 18. Phenylalanine |
| 3. Asparagine | 10. Alanine | 19. Isoleucine |
| 4. Serine | 12. Tyrosine | 20. Leucine |
| 6. Histidine | 14. Methionine | 21. Proline |
| 7. Glycine | 15. Valine | 22. Lysine |

図14 まぐろ水煮のクロマトグラム

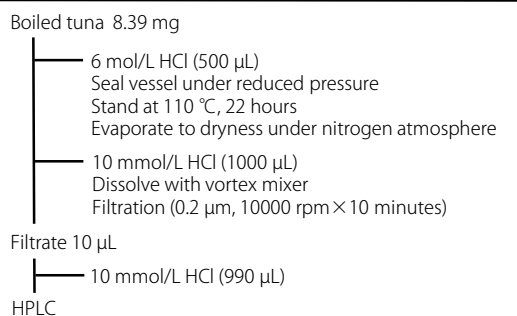


図11 まぐろ水煮（塩酸加水分解物）の前処理プロトコール

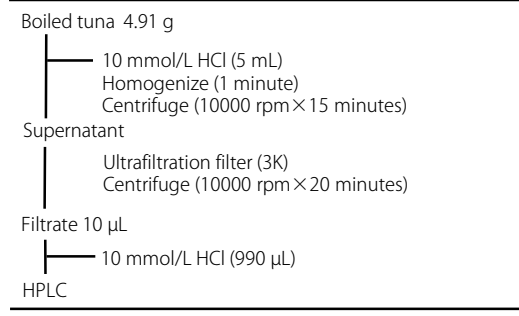
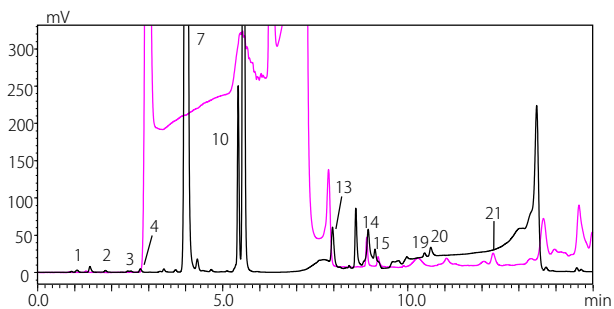


図15 まぐろ水煮の前処理プロトコール

■ほたて



- | | | |
|------------------|----------------|----------------|
| 1. Aspartic Acid | 7. Glycine | 15. Valine |
| 2. Glutamic Acid | 10. Alanine | 19. Isoleucine |
| 3. Asparagine | 13. GABA | 20. Leucine |
| 4. Serine | 14. Methionine | 21. Proline |

図 16 ほたてのクロマトグラム

Raw scallop 1.02 g

10 mmol/L HCl (5 mL)
Homogenize (1 minute)
Centrifuge (10000 rpm × 15 minutes)

Supernatant

Ultrafiltration filter (3K)
Centrifuge (10000 rpm × 20 minutes)

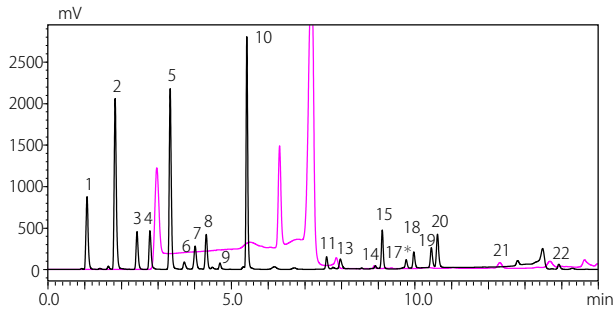
Filtrate 10 μL

10 mmol/L HCl (4990 μL)

HPLC

図 17 ほたての前処理プロトコール

■マッシュルーム



- | | | |
|------------------|----------------|--------------------------|
| 1. Aspartic Acid | 8. Threonine | 17. (Tryptophan + GABA)* |
| 2. Glutamic Acid | 9. Arginine | 18. Phenylalanine |
| 3. Asparagine | 10. Alanine | 19. Isoleucine |
| 4. Serine | 11. Tyrosine | 20. Leucine |
| 5. Glutamine | 13. GABA | 21. Proline |
| 6. Histidine | 14. Methionine | 22. Lysine |
| 7. Glycine | 15. Valine | |

* トリプトファンとGABA由来のピークが重なっている可能性があります。

図 20 マッシュルームのクロマトグラム

Cutted mushroom 2.06 g

10 mmol/L HCl (10 mL)
Homogenize (1 minute)
Centrifuge (10000 rpm × 15 minutes)

Supernatant

Filtration (0.2 μm)

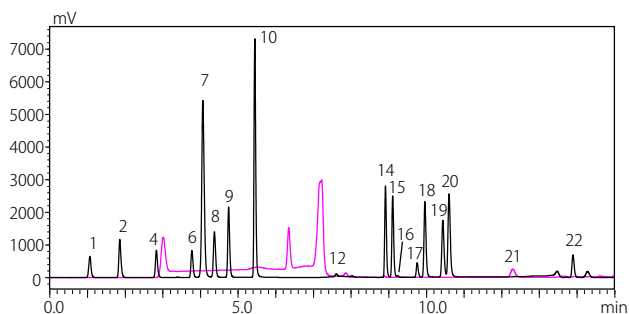
Filtrate 20 μL

10 mmol/L HCl (980 μL)

HPLC

図 21 マッシュルームの前処理プロトコール

■アミノ酸サプリメント



- | | | |
|------------------|----------------|-------------------|
| 1. Aspartic Acid | 9. Arginine | 17. Tryptophan |
| 2. Glutamic Acid | 10. Alanine | 18. Phenylalanine |
| 4. Serine | 12. Tyrosine | 19. Isoleucine |
| 6. Histidine | 14. Methionine | 20. Leucine |
| 7. Glycine | 15. Valine | 21. Proline |
| 8. Threonine | 16. Cystine | 22. Lysine |

図 18 アミノ酸サプリメントのクロマトグラム

Amino acid supplement 1.40 g

10 mmol/L HCl (25 mL)
Homogenize (1 minute)
Filtration (0.2 μm)

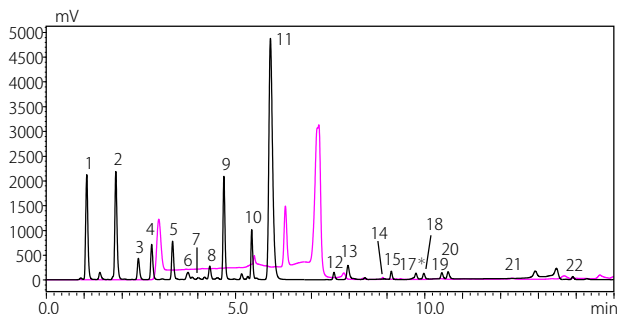
Filtrate 5 μL

10 mmol/L HCl (995 μL)

HPLC

図 19 アミノ酸サプリメントの前処理プロトコール

■抹茶



- | | | |
|------------------|----------------|--------------------------|
| 1. Aspartic Acid | 8. Threonine | 15. Valine |
| 2. Glutamic Acid | 9. Arginine | 17. (Tryptophan + GABA)* |
| 3. Asparagine | 10. Alanine | 18. Phenylalanine |
| 4. Serine | 11. Theanine | 19. Isoleucine |
| 5. Glutamine | 12. Tyrosine | 20. Leucine |
| 6. Histidine | 13. GABA | 21. Proline |
| 7. Glycine | 14. Methionine | 22. Lysine |

* トリプトファンとGABA由来のピークが重なっている可能性があります。

図 22 抹茶のクロマトグラム

Matcha (Powdered green tea) 0.99 g

10 mmol/L HCl (10 mL)
Homogenize (1 minute)
Put in the fridge over night
Centrifuge (10000 rpm × 15 minutes)

Supernatant

Filtration (0.2 μm)

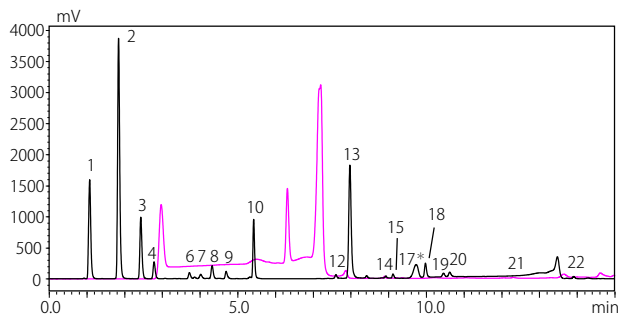
Filtrate 20 μL

10 mmol/L HCl (980 μL)

HPLC

図 23 抹茶の前処理プロトコール

■ トマトジュース

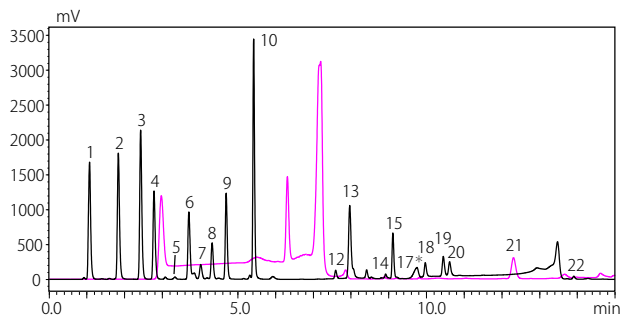


- | | | |
|------------------|----------------|--------------------------|
| 1. Aspartic Acid | 9. Arginine | 17. (Tryptophan + GABA)* |
| 2. Glutamic Acid | 10. Alanine | 18. Phenylalanine |
| 3. Asparagine | 12. Tyrosine | 19. Isoleucine |
| 4. Serine | 13. GABA | 20. Leucine |
| 6. Histidine | 14. Methionine | 21. Proline |
| 7. Glycine | 15. Valine | 22. Lysine |

* トリプトファンとGABA由来のピークが重なっている可能性があります。

図 24 トマトジュースのクロマトグラム

■ 青汁



- | | | |
|------------------|----------------|--------------------------|
| 1. Aspartic Acid | 8. Threonine | 17. (Tryptophan + GABA)* |
| 2. Glutamic Acid | 9. Arginine | 18. Phenylalanine |
| 3. Asparagine | 10. Alanine | 19. Isoleucine |
| 4. Serine | 12. Tyrosine | 20. Leucine |
| 5. Glutamine | 13. GABA | 21. Proline |
| 6. Histidine | 14. Methionine | 22. Lysine |
| 7. Glycine | 15. Valine | |

* トリプトファンとGABA由来のピークが重なっている可能性があります。

図 28 青汁のクロマトグラム

Tomato juice 0.99 g (0.5 mL)

- 10 mmol/L HCl (4.5 mL)
- Homogenize (1 minute)
- Ultrafiltration filter (3K)
- Centrifuge (10000 rpm × 20 minutes)

Filtrate 50 μL

- 10 mmol/L HCl (950 μL)

HPLC

図 25 トマトジュースの前処理プロトコール

Green juice 0.98 g (1.0 mL)

- 10 mmol/L HCl (4 mL)
- Homogenize (1 minute)
- Ultrafiltration filter (3K)
- Centrifuge (10000 rpm × 20 minutes)

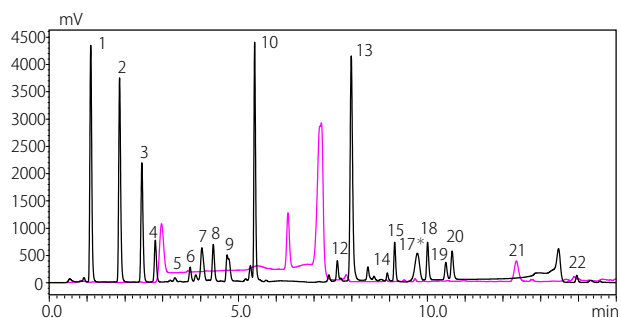
Filtrate 200 μL

- 10 mmol/L HCl (800 μL)

HPLC

図 29 青汁の前処理プロトコール

■ バーベキューソース



- | | | |
|------------------|----------------|--------------------------|
| 1. Aspartic Acid | 8. Threonine | 17. (Tryptophan + GABA)* |
| 2. Glutamic Acid | 9. Arginine | 18. Phenylalanine |
| 3. Asparagine | 10. Alanine | 19. Isoleucine |
| 4. Serine | 12. Tyrosine | 20. Leucine |
| 5. Glutamine | 13. GABA | 21. Proline |
| 6. Histidine | 14. Methionine | 22. Lysine |
| 7. Glycine | 15. Valine | |

* トリプトファンとGABA由来のピークが重なっている可能性があります。

図 26 バーベキューソースのクロマトグラム

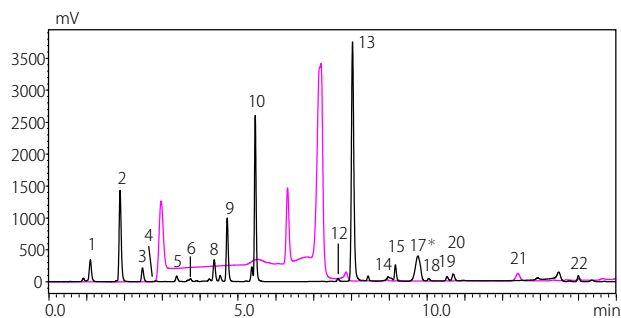
Barbecue sauce 0.23 g

- 10 mmol/L HCl (5.0 mL)
- Ultrafiltration filter (3K)
- Centrifuge (10000 rpm × 20 minutes)

HPLC

図 27 バーベキューソースの前処理プロトコール

■ ココナッツミルク



- | | | |
|------------------|----------------|--------------------------|
| 1. Aspartic Acid | 9. Arginine | 17. (Tryptophan + GABA)* |
| 2. Glutamic Acid | 10. Alanine | 18. Phenylalanine |
| 3. Asparagine | 12. Tyrosine | 19. Isoleucine |
| 4. Serine | 13. GABA | 20. Leucine |
| 5. Glutamine | 14. Methionine | 21. Proline |
| 6. Histidine | 15. Valine | 22. Lysine |
| 8. Threonine | | |

* トリプトファンとGABA由来のピークが重なっている可能性があります。

図 30 ココナッツミルクのクロマトグラム

Coconut milk 0.53 g (0.5 mL)

- 10 mmol/L HCl (9.5 mL)
- Mix with vortex
- Ultrafiltration filter (3K)
- Centrifuge (10000 rpm × 20 minutes)

HPLC

図 31 ココナッツミルクの前処理プロトコール

Shim-packは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00028-JP 初版発行：2021年3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

改訂版は会員制サイト Solutions Navigator で閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>
閲覧には、会員制情報サービス Shim-Solutions Club に登録してください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

© Shimadzu Corporation, 2021