

## 自動前処理機能を用いた 食品中アミノ酸の高速一斉分析

吉岡 拓哉

### ユーザーベネフィット

- ◆ ポストカラム誘導体化法と比較して、分析時間が大幅に短縮されます。
- ◆ 煩雑な誘導体化処理が自動で行えるため、非常に簡便な分析方法です。
- ◆ 通常のHPLCシステムでアミノ酸の分析が可能です。

### ■はじめに

従来より、HPLCでのアミノ酸分析にはポストカラム誘導体化法が一般的に用いられていますが、使用するカラムの特性上、分析時間が長くなってしまったり、装置構成が複雑になるためコストがかかる事が欠点です。一方、プレカラム誘導体化法は高速分析が可能で装置構成もシンプルですが、試料の誘導体化操作の煩雑さや、試料マトリクスの影響を考慮しなければならない点が課題でした。

アプリケーションニュース01-00007にて自動前処理機能を用いたプレカラム誘導体化法のアミノ酸分析を紹介しました。この方法では、誘導体化を自動で行うことにより、プレカラム誘導体化法のデメリットである煩雑さが解消されました。本稿では、この分析法を用いて種々の食品中アミノ酸を分析した事例を紹介します。

### ■自動プレカラム誘導体化

Nexera XRには自動前処理機能が標準で搭載されており、試料の希釈や試薬の添加等の動作を任意に設定できます。ここでは、試料と誘導体化試薬をオートサンプラーのニードル内にて自動的に混合するよう設定しました。その際の誘導体化の流れを図1に、誘導体化試薬の調製法を表1に示します。詳細な前処理プログラムの設定はアプリケーションニュース01-00007をご参照ください。

### ■アミノ酸混合標準溶液の分析

図2にタンパク質構成アミノ酸20種の混合標準溶液のクロマトグラムを示します。20成分を約14分で分離できました。この時の分析条件を次ページの表2~表4に示します。

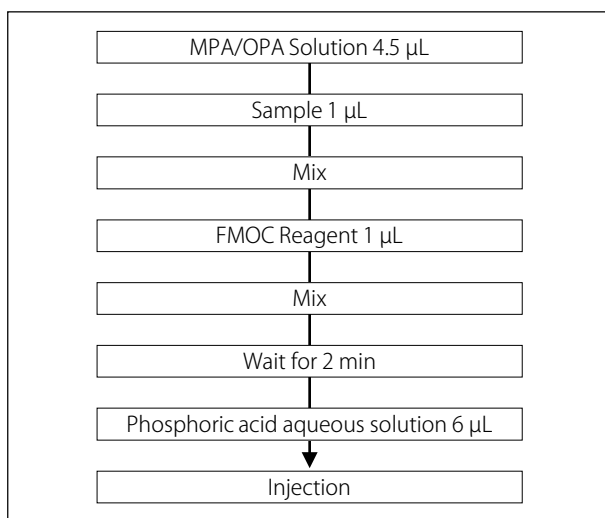


図1 自動前処理機能を用いた誘導体化の流れ  
表1 誘導体化試薬の調製法

- 0.1 mol/L Borate buffer  
Add 0.62 g of boric acid and 0.20 g of sodium hydroxide into 100 mL of ultrapure water.
- Mercaptopropionic acid Reagent (MPA 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 ultrapure water.
- MPA / OPA Solution  
Mix 600 µL of MPA Reagent and 300 µL OPA Reagent.
- FMOc Reagent  
Dissolve 10 mg of 9-fluorenylmethyl chloroformate into 100 mL of acetonitrile.
- Phosphoric acid aqueous solution  
Add 0.5 mL of phosphoric acid into 100 mL of pure water.

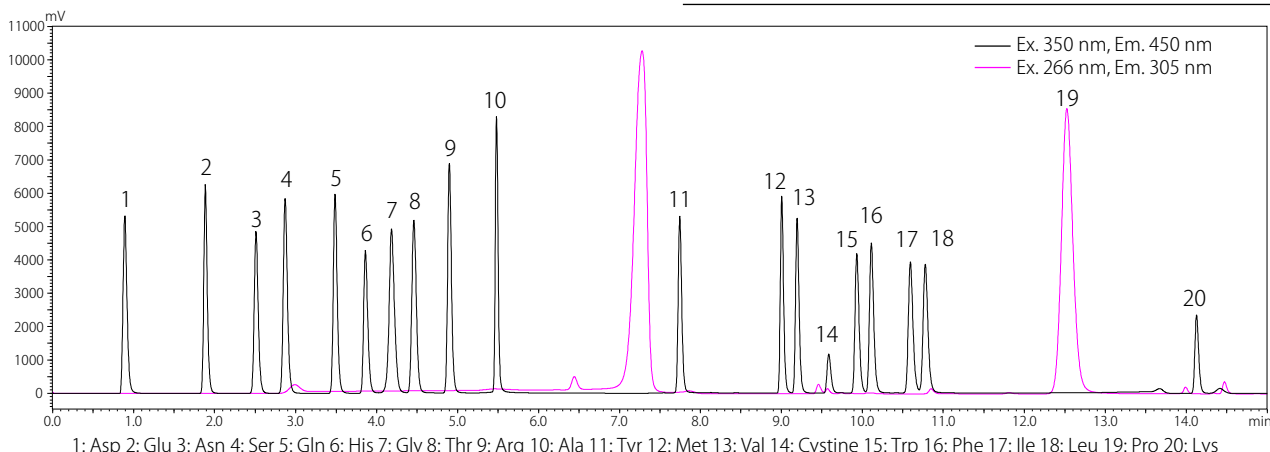


図2 タンパク質構成アミノ酸20成分の一斉分析 (各100 µmol/L)

表2 分析条件

|                  |   |
|------------------|---|
| System           | : Nexera XR   |
| Column           | : Shim-pack XR-ODSII*1<br>100 mm × 3.0 mm I.D., 2.2 μm  |
| Mode             | : Low pressure gradient   |
| Mobile phase     | : A) 20 mmol/L (Sodium) acetate buffer (pH 6)<br>B) Water/Acetonitrile = 1 : 9<br>C) 20 mmol/L (Sodium) acetate buffer (pH 5)<br>containing 0.5 mmol/L EDTA-2Na |
| Flow rate        | : 1.0 mL/min  |
| Column temp.     | : 35 °C   |
| Injection volume | : 1 μL  |
| Sample cooler    | : 4 °C  |
| Detection        | : Fluorescence detector (Cell temp.: 35 °C)<br>Ch1) Ex. 350 nm, Em. 450 nm<br>Ch2) Ex. 266 nm, Em. 305 nm   |

\*1 P/N 228-41624-92

表3 移動相の調製法

- Mobile Phase A  
Add 2.67 g of sodium acetate trihydrate and 41 μL of acetic acid into 1000 mL of pure water.
- Mobile Phase C  
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.

表4 タイムプログラム

| Time (min) | A.conc | B.conc | C.conc |
|------------|--------|--------|--------|
| 0          | 95     | 5      | 0      |
| 0.2        | 93     | 7      | 0      |
| 1          | 93     | 7      | 0      |
| 4          | 87     | 13     | 0      |
| 5          | 0      | 15     | 85     |
| 7.5        | 0      | 30     | 70     |
| 12         | 0      | 35     | 65     |
| 14         | 0      | 45     | 55     |
| 14.01      | 0      | 95     | 5      |
| 16.99      | 0      | 95     | 5      |
| 17         | 95     | 5      | 0      |
| 19.5       | 95     | 5      | 0      |

## ■ 食品中のアミノ酸分析

アミノ酸は食品中の重要な栄養素で種々の生理作用に関与すると同時に、食品の味にも関係する非常に重要な成分です。ここでは種々の食品の分析例をご紹介します（図3～図12）。その際の前処理手順を図13～図16に示します。

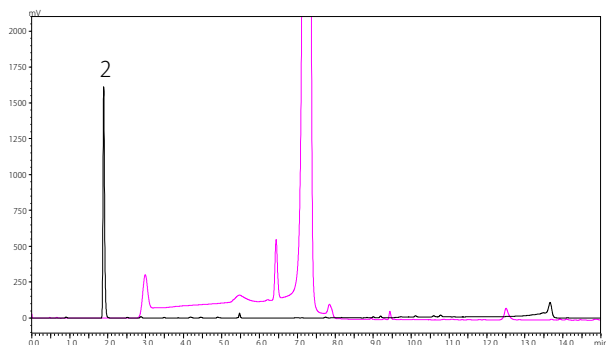


図3 コンソメのクロマトグラム

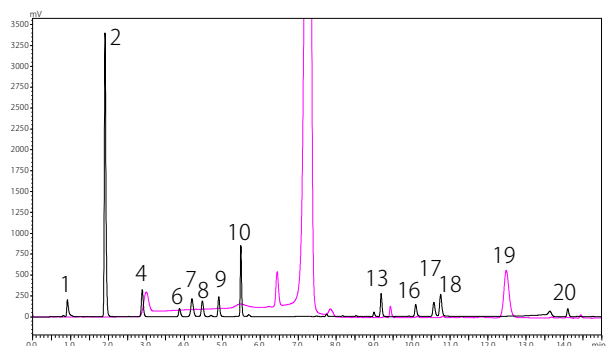


図4 めんつゆのクロマトグラム

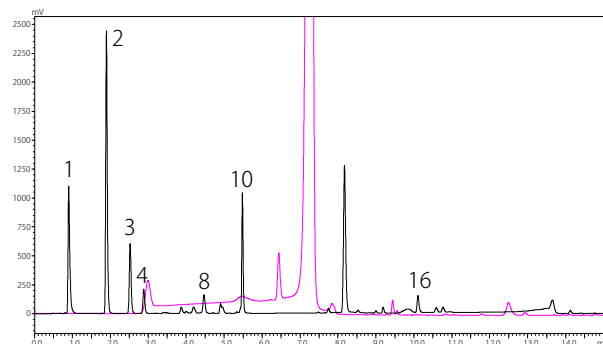


図5 ケチャップのクロマトグラム

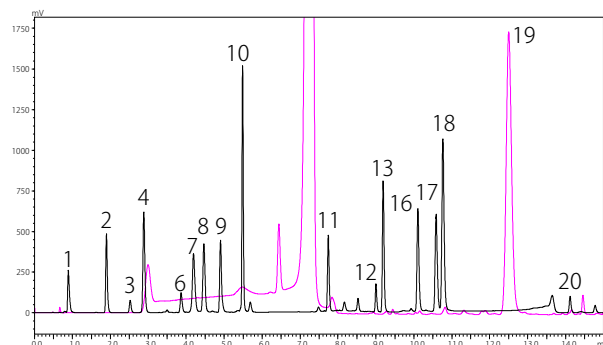


図6 味噌のクロマトグラム

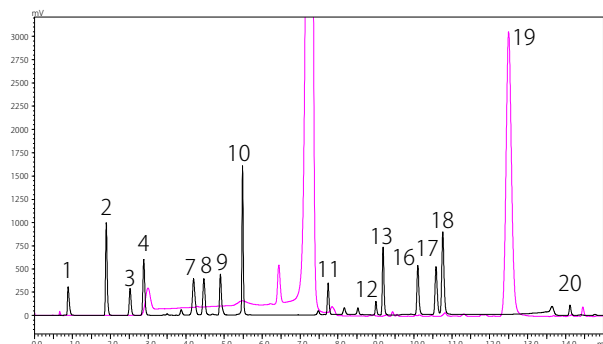


図7 コチュジャンのクロマトグラム

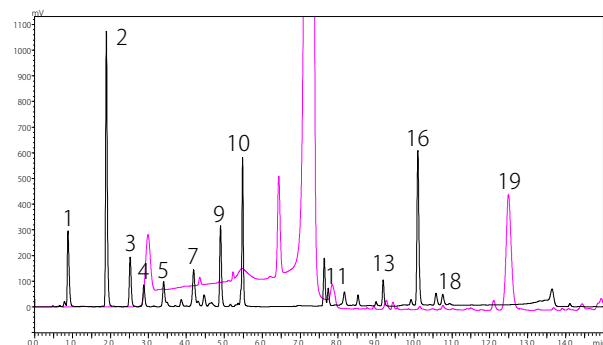


図8 ピーナッツバターのクロマトグラム

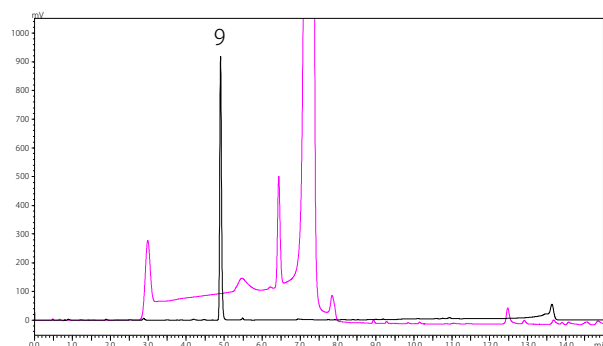


図9 エナジードリンクのクロマトグラム

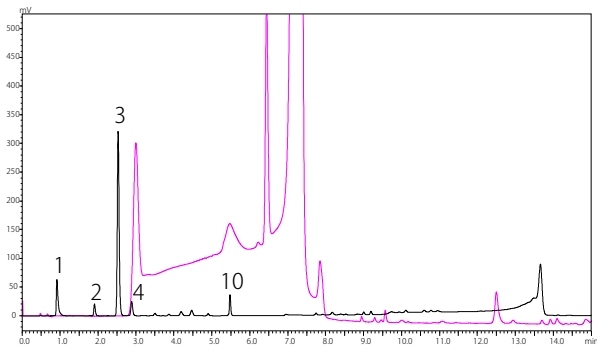


図 10 桃ジュースのクロマトグラム

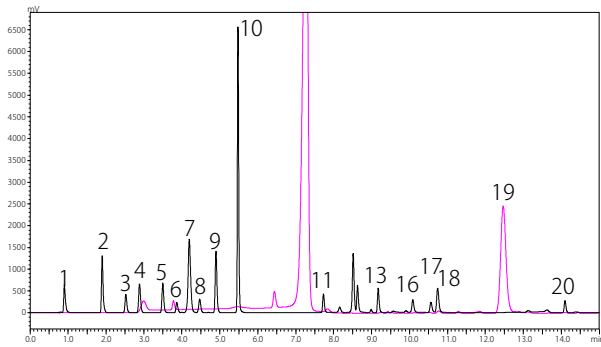


図 11 日本酒のクロマトグラム

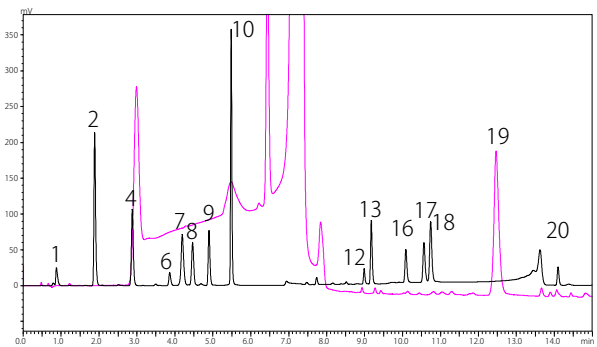


図 12 醤油のクロマトグラム

Sample 100  $\mu$ L  
 |  
 Dilute with 1 mmol/L HCl up to 10 mL  
 |  
 Centrifugation at 3500 rpm for 10 min  
 |

図 13 エナジードリンク、桃ジュース、日本酒の前処理

Sample 100  $\mu$ L  
 |  
 Dilute with 1 mmol/L HCl up to 100 mL  
 |  
 Centrifugation at 3500 rpm for 10 min  
 |

図 14 めんつゆ、醤油の前処理

Sample 1 g  
 |  
 Dilute with water up to 10 mL  
 |  
 Vortex for 5 min  
 |  
 Centrifugation at 3500 rpm for 10 min  
 |  
 Supernatant 200  $\mu$ L  
 |  
 Methanol 800  $\mu$ L  
 |  
 Vortex for 5 min  
 |  
 Centrifugation at 8000 rpm for 10 min  
 |  
 Supernatant 500  $\mu$ L  
 |  
 Evaporation to dryness  
 |  
 1 mmol/L HCl 500  $\mu$ L

図 15 ピーナッツバターの前処理

Sample 1 g  
 |  
 Dilute with water up to 10 mL  
 |  
 Vortex for 5 min  
 |  
 Centrifugation at 3500 rpm for 10 min  
 |  
 Supernatant 200  $\mu$ L  
 |  
 Methanol 800  $\mu$ L  
 |  
 Vortex for 5 min  
 |  
 Centrifugation at 8000 rpm for 10 min  
 |  
 Supernatant 100  $\mu$ L  
 |  
 Evaporation to dryness  
 |  
 1 mmol/L HCl 500  $\mu$ L

図 16 コンソメ、ケチャップ、味噌、コチュジャンの前処理

## ■ 添加回収試験

一般的に、プレカラム誘導体化法は試料マトリクスの影響を受けやすいとされています。その度合いを確認するため、種々の試料で添加回収試験を行い、その回収率を評価しました。その結果を図17に示します。多くの試料で良好な回収率を示しており、プレカラム誘導体化法が多くの食品中アミノ酸分析に適応可能であることが分かります。

## ■ まとめ

アプリケーションニュース01-00007にて紹介したプレカラム誘導体化法は、煩雑な前処理操作を自動で行えるため、非常に簡便な分析法です。本稿ではこの分析法を用いた種々の食品の分析例を紹介しました。本分析法を用いて、食品中のアミノ酸分析を迅速かつ簡便に行う事が可能です。

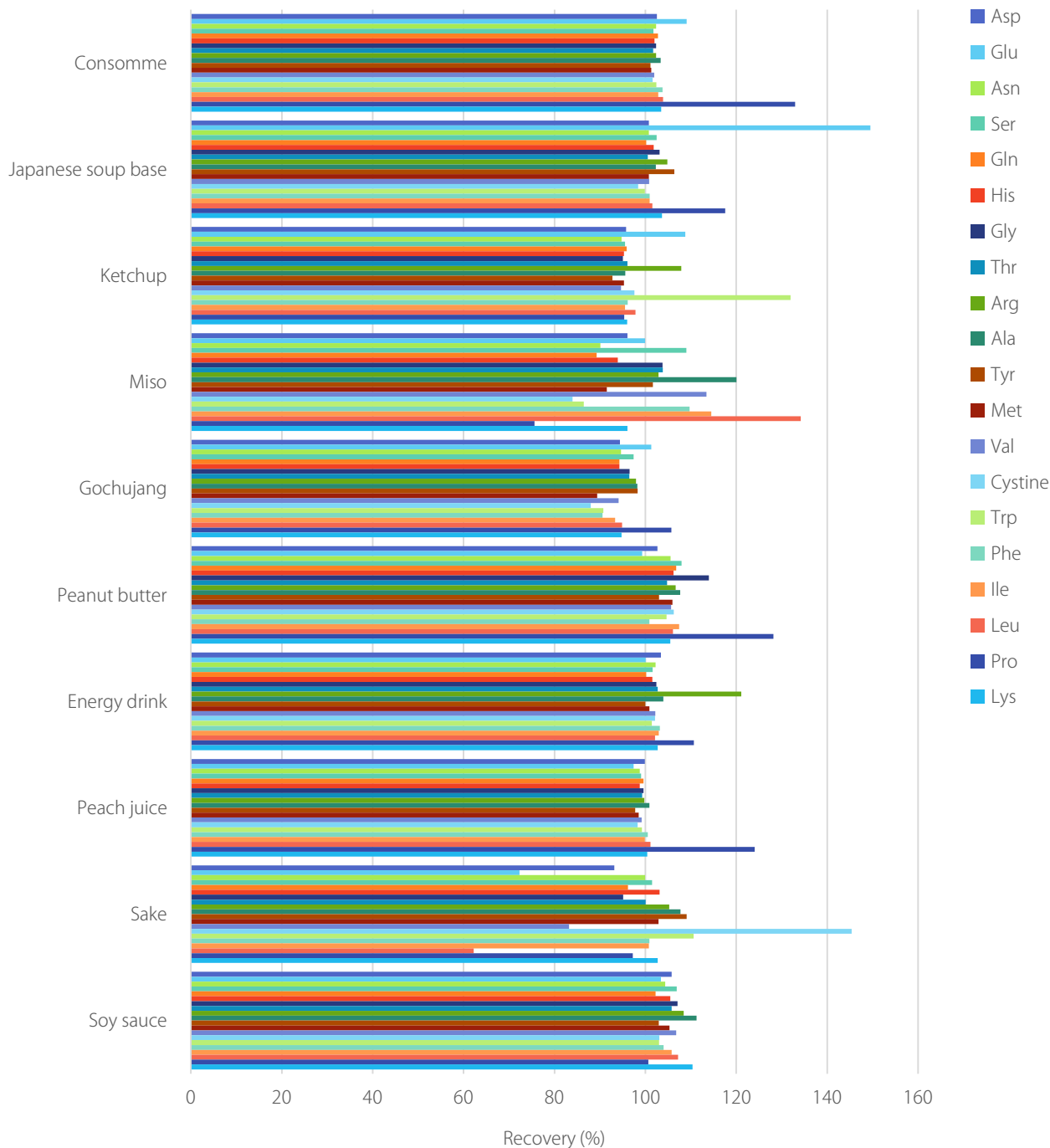


図 17 添加回収試験の結果

Nexeral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

01-00130-JP 初版発行：2021年 4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 にご登録ください。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

© Shimadzu Corporation, 2021