

Nexera™ポストカラムアミノ酸分析システムを用いた食品の分析

アミノ酸は、人間の体を作るたんぱく質を構成する重要な栄養素です。古くからたんぱく質の構造解析や病気の診断などの研究用途をはじめ、食品や製薬の品質管理など様々な分野でアミノ酸の分析が行われてきました。近年は分析の高速化に対する要求が増しており、より迅速に分析が可能なオンラインプレカラム法が開発*されました。一方で、ポストカラム法は分析時間はかかるものの、測定対象となるアミノ酸も豊富で、現在でも多く採用されています。

当社のポストカラム法は、陽イオン交換カラムを用いたグラジエント溶出法で各成分を分離後、検出に *o*-フタルアルデヒド (OPA) による蛍光誘導体化法を用いた自動分析システムです。OPA は感度、直線性に優れており、プロリンなどのイミノ酸についても、感度良く検出することが可能です。本手法では分離後に反応が行われるため、試料に含まれる夾雑物の影響を受けにくく、アミノ酸を高感度、かつ高い選択性で検出することができます。分離手法としては、加水分解型アミノ酸分析用の Na 型と、遊離アミノ酸分析用の Li 型の 2 つの分離モードがあります。それぞれの分離モードに最適なタイムプログラムを使い、アミノ酸の一斉分析を行います。専用の移動相キット、および反応液キットを用いることで、調製の手間なく精度の高いアミノ酸分析を行うことができます。

本稿では、新しく発売しました「Nexera ポストカラムアミノ酸分析システム」を用いた食品中のアミノ酸分析例をご紹介します。

* : アプリケーションニュース L529B をご参照ください。

A. Tanabe, H. Yamamoto

■加水分解型アミノ酸 (Na 型) の分析 【標準試料】

加水分解型アミノ酸分析 (Na 型) では、たんぱく質を加水分解して得られる約 20 種類のアミノ酸の分離・定量が可能です。Na 型には、通常分析に用いる高分離条件の他、高速条件、トリプトファン同時条件の 3 つの分離条件があります。図 1~3 に各条件での標準分析例を、表 1 に Na 型分析条件を示します。

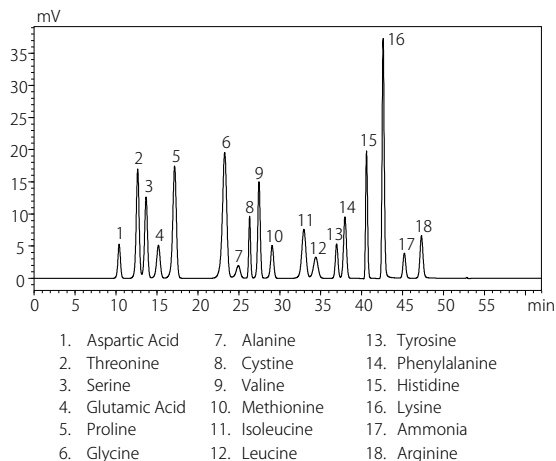


図1 標準アミノ酸 18 成分の分析 (0.1 μmol/L、Na 型高分離条件)

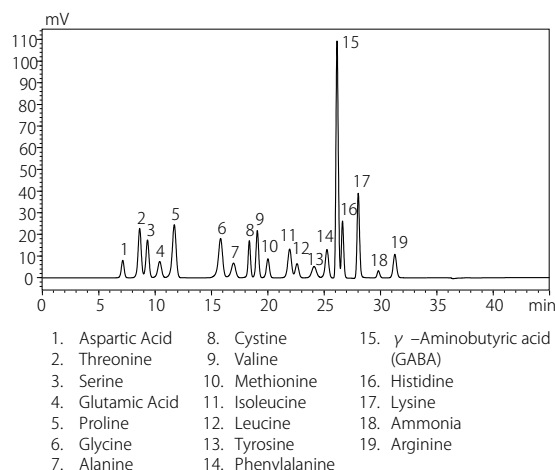


図2 標準アミノ酸 19 成分の分析 (0.1 μmol/L、Na 型高速条件)

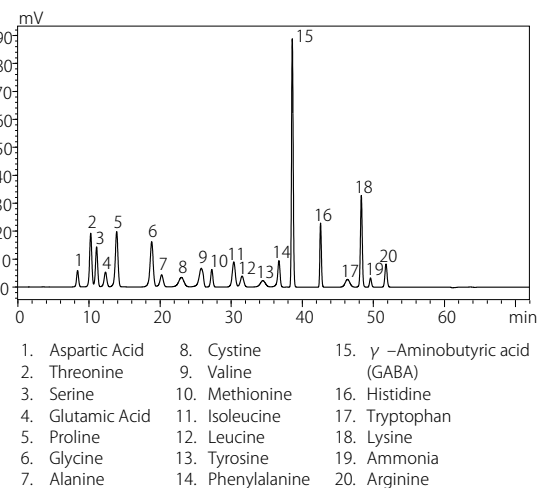


図3 標準アミノ酸 20 成分の分析
(0.1 μmol/L、Na 型トリプトファン同時条件)

表 1 Na 型 分析条件 (共通)

| | |
|----------------------|---|
| Column | : Shim-pack™ Amino-Na (100 mm × 6.0 mm I.D., 5 μm)*1 |
| Ammonia Trap column | : Shim-pack ISC-30/S0504Na (50 mm × 4.0 mm I.D.)*2 |
| Mobile Phase | : Amino Acid Mobile Phase Kits (Na type)*3 Gradient Elution |
| Flow Rate | : 0.4~0.6 mL/min |
| Column Temp. | : 60 °C |
| Injection Vol. | : 10 μL |
| Vial | : Shimadzu Vials, LC, 1.5 mL, Glass*4 |
| Reaction Reagent | : Amino Acid Reagent Kits*5 |
| Flow rate of Reagent | : 0.2 mL/min for each |
| Reaction Temp | : 60 °C |
| Detection | : Ex. 350 nm Em. 450 nm |

*1 : P/N S228-18837-91、*2 : P/N S228-14206-91、
*3 : P/N S228-21195-94、*4 : P/N S228-15652-92、
*5 : P/N S228-21195-93

■ Na 型高分離条件の分析【塩酸加水分解：大豆、液体ミルク、プロテインパウダー】

Na 型高分離条件の分析例をご紹介します。図 4~9 は、塩酸加水分解によるたんぱく質構成アミノ酸 18 成分の分析例です。これらのうち、必須アミノ酸 9 成分（スレオニン、バリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、トリプトファン、リシン）は体内で合成できないため、食物から摂取する必要があります。

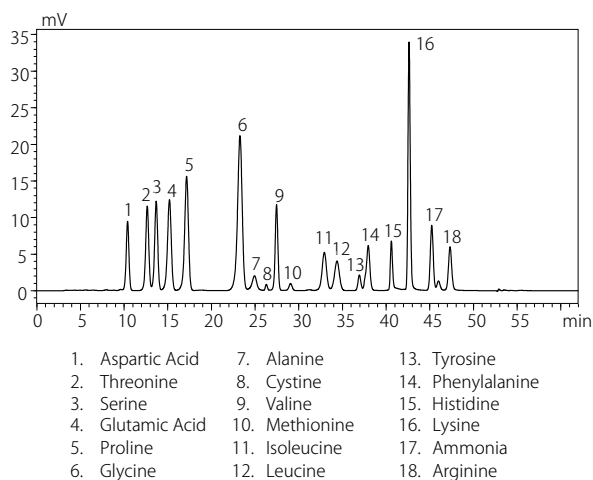


図 4 大豆（塩酸加水分解）の分析（Na 型高分離条件）

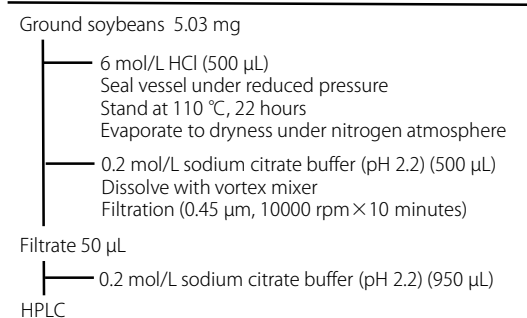


図 5 大豆（塩酸加水分解）の前処理プロトコール

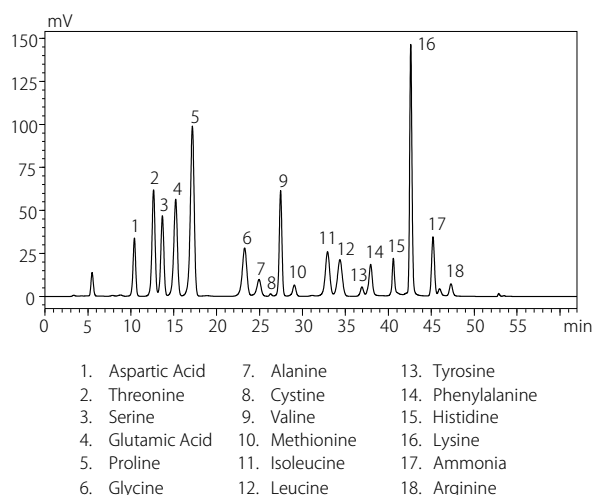


図 6 液体ミルク（塩酸加水分解）の分析（Na 型高分離条件）

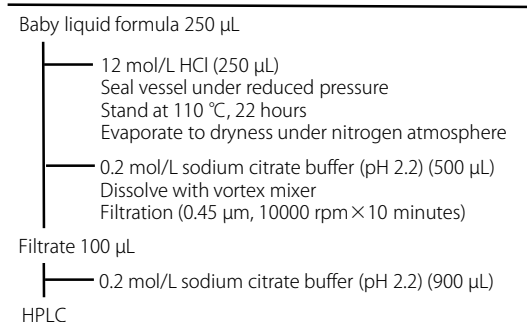


図 7 液体ミルク（塩酸加水分解）の前処理プロトコール

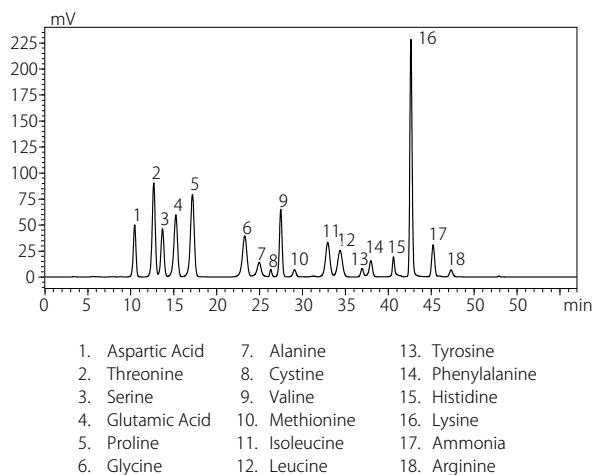


図 8 プロテインパウダー（塩酸加水分解）の分析（Na 型高分離条件）

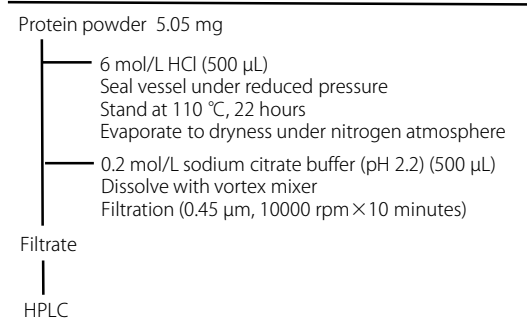
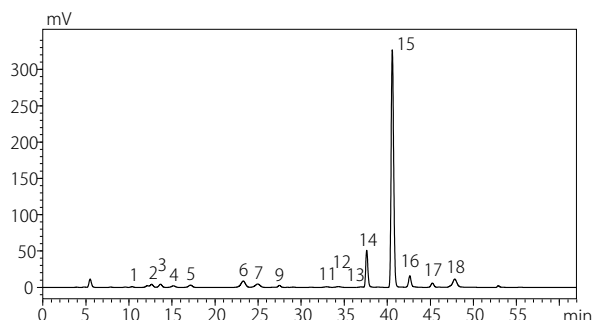


図 9 プロテインパウダー（塩酸加水分解）の前処理プロトコール

■ Na 型高分離条件の分析【鶏ムネ肉、大豆肉、ナンプラー、アミノ酸サプリメント】

図 10~17 は、試料から抽出して得られた遊離アミノ酸 18 成分の分析例です。ここでは除たんぱくに限外ろ過カートリッジを用いて行いました。



- | | | |
|------------------|-------------------|---------------|
| 1. Aspartic Acid | 7. Alanine | 15. Histidine |
| 2. Threonine | 9. Valine | 16. Lysine |
| 3. Serine | 11. Isoleucine | 17. Ammonia |
| 4. Glutamic Acid | 12. Leucine | 18. Arginine |
| 5. Proline | 13. Tyrosine | |
| 6. Glycine | 14. Phenylalanine | |

図 10 鶏ムネ肉の分析 (Na 型高分離条件)

Chopped chicken breast meat 1.668 g

- 0.2 mol/L sodium citrate buffer (pH 2.2) (10 mL)
- Homogenize (1 minute)
- Centrifuge (5000 rpm × 5 minutes)

Supernatant

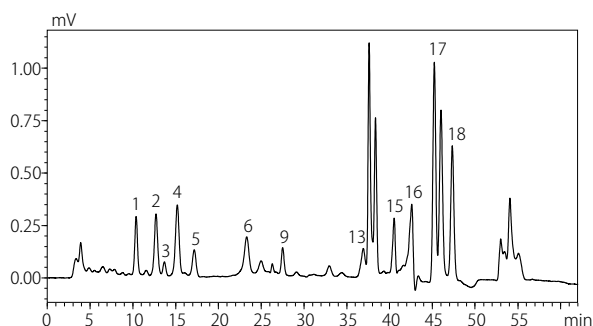
- Ultrafiltration filter (10K)
- Centrifuge (10000 rpm × 10 minutes)

Filtrate 100 μL

- 0.2 mol/L sodium citrate buffer (pH 2.2) (900 μL)

HPLC

図 11 鶏ムネ肉の前処理プロトコール



- | | |
|------------------|---------------|
| 1. Aspartic Acid | 9. Valine |
| 2. Threonine | 13. Tyrosine |
| 3. Serine | 15. Histidine |
| 4. Glutamic Acid | 16. Lysine |
| 5. Proline | 17. Ammonia |
| 6. Glycine | 18. Arginine |

図 12 大豆肉の分析 (Na 型高分離条件)

Dry soy meat 109 mg

- 0.2 mol/L sodium citrate buffer (pH 2.2) (20 mL)
- Stand at room temperature, 2 hours
- Homogenize (1 minute)

Supernatant

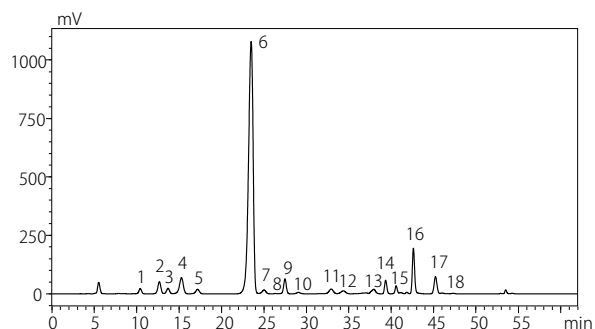
- Ultrafiltration filter (10K)
- Centrifuge (10000 rpm × 10 minutes)

Filtrate 100 μL

- 0.2 mol/L sodium citrate buffer (pH 2.2) (400 μL)

HPLC

図 13 大豆肉の前処理プロトコール



- | | | |
|------------------|----------------|-------------------|
| 1. Aspartic Acid | 7. Alanine | 13. Tyrosine |
| 2. Threonine | 8. Cystine | 14. Phenylalanine |
| 3. Serine | 9. Valine | 15. Histidine |
| 4. Glutamic Acid | 10. Methionine | 16. Lysine |
| 5. Proline | 11. Isoleucine | 17. Ammonia |
| 6. Glycine | 12. Leucine | 18. Arginine |

図 14 ナンプラー (魚醤) の分析 (Na 型高分離条件)

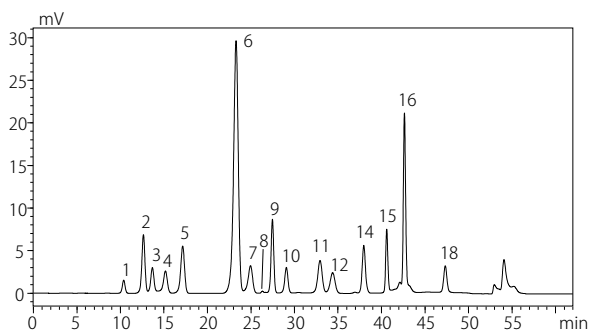
Namplur (fish sauce) 50 μL

- 0.2 mol/L sodium citrate buffer (pH 2.2) (4.95 mL)
- Ultrafiltration filter (10K)
- Centrifuge (10000 rpm × 10 minutes)

Filtrate

HPLC

図 15 ナンプラー (fish sauce) の前処理プロトコール



- | | | |
|------------------|----------------|-------------------|
| 1. Aspartic Acid | 7. Alanine | 14. Phenylalanine |
| 2. Threonine | 8. Cystine | 15. Histidine |
| 3. Serine | 9. Valine | 16. Lysine |
| 4. Glutamic Acid | 10. Methionine | 18. Arginine |
| 5. Proline | 11. Isoleucine | |
| 6. Glycine | 12. Leucine | |

図 16 アミノ酸サプリメントの分析 (Na 型高分離条件)

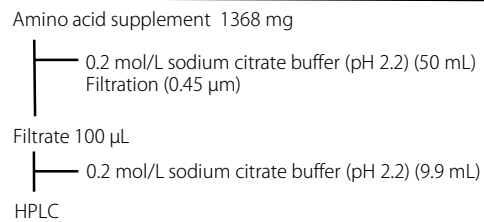
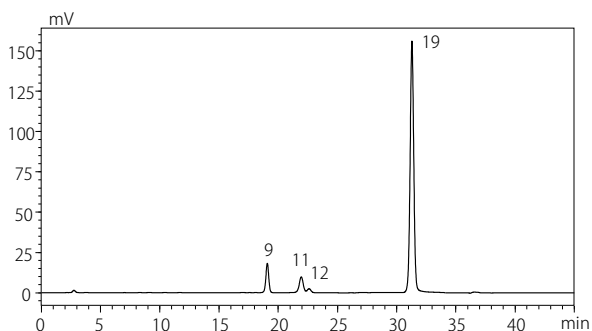


図 17 アミノ酸サプリメントの前処理プロトコル

■ Na 型高速条件の分析【スポーツ飲料、ビール、ヨーグルト】

図 18~23 は、Na 型高速条件による分析例です。分析時間が 45 分と最も短く、比較的夾雑物が少ない試料に用いることができる分離モードです。



- | | | | |
|-----------|----------------|-------------|--------------|
| 9. Valine | 11. Isoleucine | 12. Leucine | 19. Arginine |
|-----------|----------------|-------------|--------------|

図 18 スポーツ飲料の分析 (Na 型高速条件)

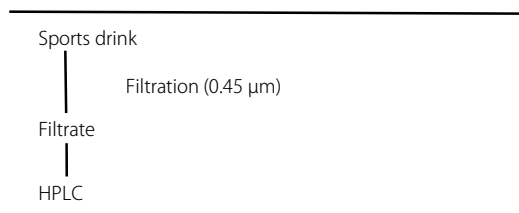
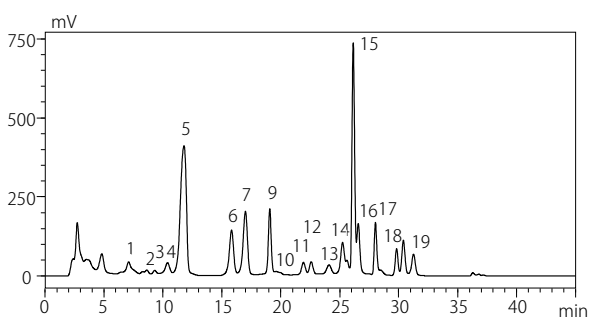


図 19 スポーツ飲料の前処理プロトコル



- | | | |
|------------------|-------------------|--|
| 1. Aspartic Acid | 9. Valine | 15. γ -Aminobutyric acid (GABA) |
| 2. Threonine | 10. Methionine | 16. Histidine |
| 3. Serine | 11. Isoleucine | 17. Lysine |
| 4. Glutamic Acid | 12. Leucine | 18. Ammonia |
| 5. Proline | 13. Tyrosine | 19. Arginine |
| 6. Glycine | 14. Phenylalanine | |
| 7. Alanine | | |

図 20 ビールの分析 (Na 型高速条件)

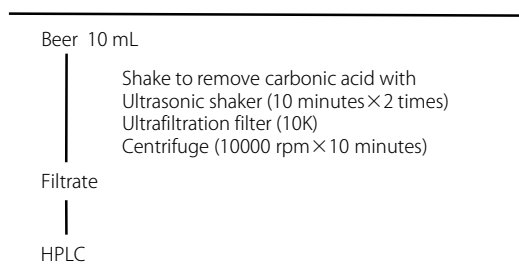
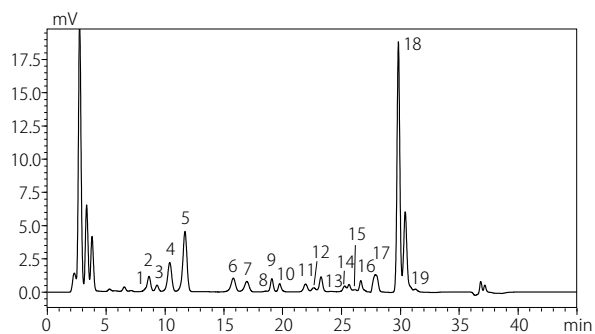


図 21 ビールの前処理プロトコル



- | | | |
|------------------|-------------------|--|
| 1. Aspartic Acid | 8. Cystine | 15. γ -Aminobutyric acid (GABA) |
| 2. Threonine | 9. Valine | 16. Histidine |
| 3. Serine | 10. Methionine | 17. Lysine |
| 4. Glutamic Acid | 11. Isoleucine | 18. Ammonia |
| 5. Proline | 12. Leucine | 19. Arginine |
| 6. Glycine | 13. Tyrosine | |
| 7. Alanine | 14. Phenylalanine | |

図 22 ヨーグルトの分析 (Na型高速条件)

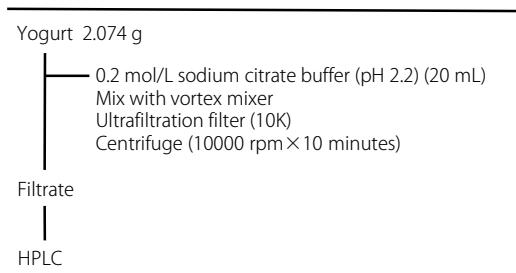
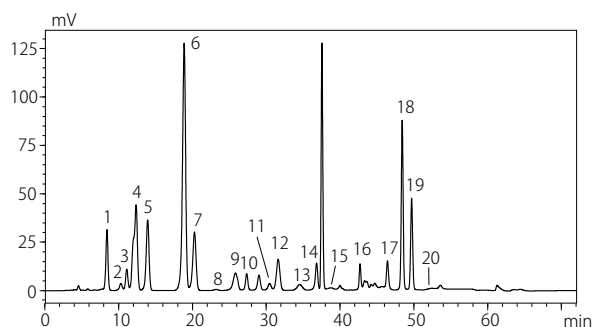


図 23 ヨーグルトの前処理プロトコール

■ Na型トリプトファン同時条件の分析【鶏ムネ肉 (アルカリ加水分解)、野菜ジュース、味噌】

図 24~29 は、Na 型トリプトファン同時条件による分析例です。トリプトファンは塩酸加水分解によって壊れてしまうため、トリプトファンを含むたんぱく質構成アミノ酸を分析する場合は、アルカリ加水分解を行います。



- | | | |
|------------------|-------------------|--|
| 1. Aspartic Acid | 8. Cystine | 15. γ -Aminobutyric acid (GABA) |
| 2. Threonine | 9. Valine | 16. Histidine |
| 3. Serine | 10. Methionine | 17. Tryptophan |
| 4. Glutamic Acid | 11. Isoleucine | 18. Lysine |
| 5. Proline | 12. Leucine | 19. Ammonia |
| 6. Glycine | 13. Tyrosine | 20. Arginine |
| 7. Alanine | 14. Phenylalanine | |

図 24 鶏ムネ肉 (アルカリ加水分解) の分析 (Na型トリプトファン同時条件)

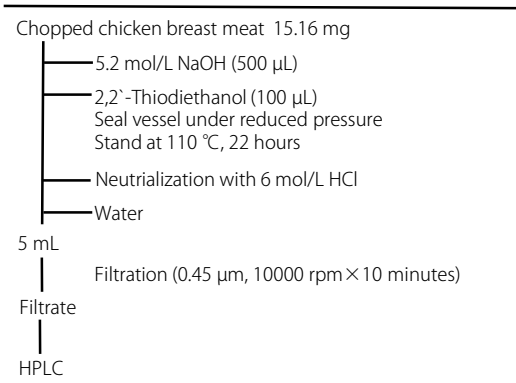
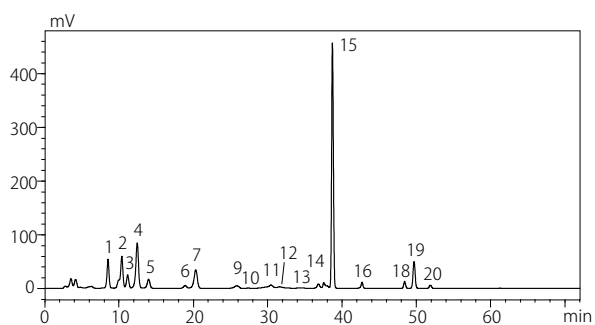


図 25 鶏ムネ肉 (アルカリ加水分解) の前処理プロトコール



- | | | |
|------------------|-------------------|--|
| 1. Aspartic Acid | 9. Valine | 15. γ -Aminobutyric acid (GABA) |
| 2. Threonine | 10. Methionine | 16. Histidine |
| 3. Serine | 11. Isoleucine | 17. Lysine |
| 4. Glutamic Acid | 12. Leucine | 18. Lysine |
| 5. Proline | 13. Tyrosine | 19. Ammonia |
| 6. Glycine | 14. Phenylalanine | 20. Arginine |
| 7. Alanine | | |

図 26 野菜ジュースの分析 (Na型トリプトファン同時条件)

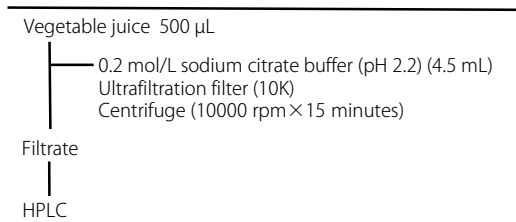


図 27 野菜ジュースの前処理プロトコール

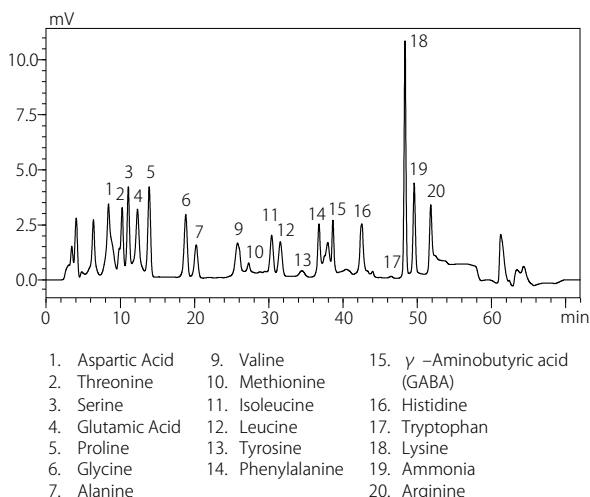


図 28 味噌の分析 (Na 型トリプトファン同時条件)

| |
|---|
| Miso (Japanese soybean paste) 2.1971 g |
| 0.2 mol/L sodium citrate buffer (pH 2.2) (20 mL) |
| Mix with vortex mixer |
| Centrifuge (3,500 rpm × 3 minutes) |
| Supernatant |
| Ultrafiltration filter (10K) |
| Centrifuge (10000 rpm × 15 minutes) |
| Filtrate 20 μL |
| 0.2 mol/L sodium citrate buffer (pH 2.2) (980 μL) |
| HPLC |

図 29 味噌の前処理プロトコール

■ Na 型システイン酸とメチオニンスルホンの分析 【標準試料、鶏ムネ肉 (過ギ酸酸化-加水分解)】

システイン、シスチン、メチオニンは、塩酸加水分解により分解してしまいます。これらを測定するためには過ギ酸酸化-加水分解を行い、システインとシスチンをシステイン酸に、メチオニンをメチオニンスルホンに変換して分析を行います。

図 30 にシステイン酸とメチオニンスルホンの標準分析例を、図 31 に過ギ酸酸化-加水分解による鶏ムネ肉の分析例を、表 2 に分析条件を示します。

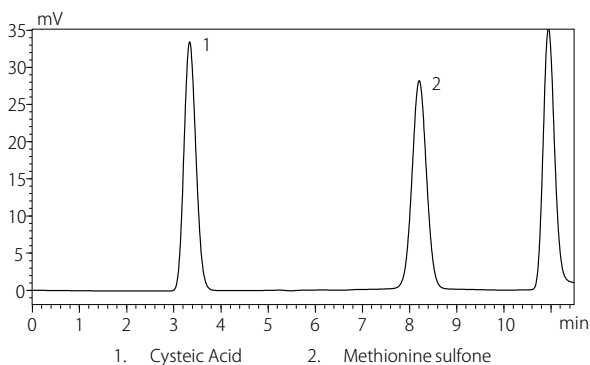


図 30 標準試料の分析
(システイン酸、メチオニンスルホン、各 0.1 mmol/L)

表 2 システイン酸とメチオニンスルホンの分析条件

| | |
|----------------------|--|
| Column | : Shim-pack Amino-Na (100 mm × 6.0 mm I.D., 5 μm) |
| Mobile Phase | : A*) 67 mmol/L sodium citrate containing 7% ethanol and 0.15 mol/L perchloric acid B) 0.2 mol/L NaOH |
| Flow Rate | : 0.4 mL/min |
| Column Temp. | : 60 °C |
| Injection Vol. | : 10 μL |
| Reaction Reagent | : Amino Acid Reagent kits not add sodium hypochlorite to reagent A |
| Flow rate of Reagent | : 0.2 mL/min each |
| Reaction Temp | : 60 °C |
| Detection | : Ex. 350 nm Em. 450 nm |

*6 : Sodium citrate 2-hydrate 19.6 g, ethanol 70 mL, perchloric acid (60%) 14 mL into 1 L of water

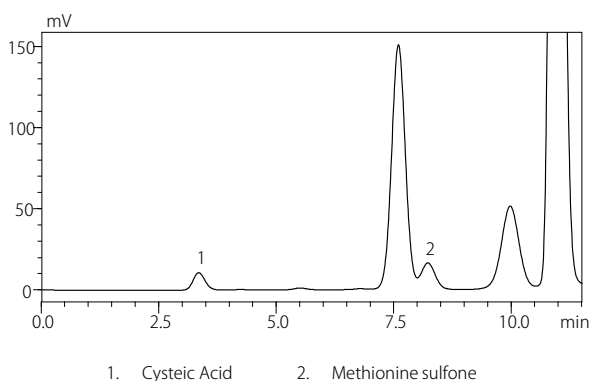


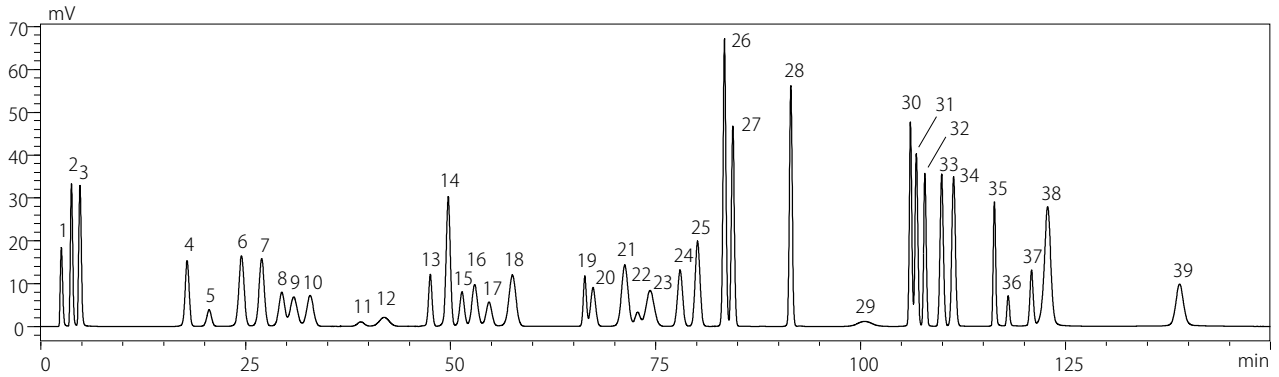
図 31 鶏ムネ肉 (過ギ酸酸化-加水分解) の分析

| |
|---|
| Chopped chicken breast meat 14.87 mg |
| Performic acid (800 μL) |
| Stand at room temperature, 1 hour |
| Store in ice through night |
| Hydrobromic acid (100 μL) |
| Evaporate to dryness under nitrogen atmosphere |
| 6 mol/L HCl (500 μL) |
| Seal Vessel under reduced pressure |
| Stand at 110 °C, 22 hours |
| Evaporate to dryness under nitrogen atmosphere |
| 0.2 mol/L Sodium citrate buffer (pH 2.2) (500 μL) |
| Dissolve with vortex mixer |
| Filtration (0.45 μm, 10000 rpm × 10 minutes) |
| Filtrate 50 μL |
| 0.2 mol/L Sodium citrate buffer (pH 2.2) (950 μL) |
| HPLC |

図 32 鶏ムネ肉 (過ギ酸酸化-加水分解) の前処理プロトコール

■遊離型アミノ酸 (Li 型) の分析【標準試料、ロースハム、黒酢、ブロッコリースプラウト】

遊離型アミノ酸分析 (Li 型) では、約 40 種類のアミノ酸の分離・定量が可能です。試薬キットを活用することで、2 時間半の分析を手軽に、再現性よく行うことができます。図 33 に Li 型による標準分析例を、表 3 に Li 型分析条件を示します。図 34 ~39 は Li 型による遊離アミノ酸の分析例です。食品のように夾雑物の多い試料でも、Li 型では高い分離能が得られます。



- | | | |
|--------------------------------|------------------------------------|--|
| 1. o-Phosphoserine | 15. Alanine | 28. γ -Aminobutyric acid (GABA) |
| 2. Taurine | 16. Citrulline | 29. Tryptophan |
| 3. o-Phosphoethanolamine | 17. α -Amino-n-butyric acid | 30. Histidine |
| 4. Aspartic acid | 18. Valine | 31. 3-Methylhistidine |
| 5. Hydroxyproline | 19. Cystine | 32. 1-Methylhistidine |
| 6. Threonine | 20. Methionine | 33. Carnosine |
| 7. Serine | 21. Isoleucine | 34. Anserine |
| 8. Asparagine | 22. Cystathionine | 35. Hydroxylysine |
| 9. Glutamic acid | 23. Leucine | 36. Ornithine |
| 10. Glutamine | 24. Tyrosine | 37. Lysine |
| 11. Sarcosine | 25. Phenylalanine | 38. Ammonia |
| 12. α -Aminoadipic acid | 26. β -Alanine | 39. Arginine |
| 13. Proline | 27. β -Aminoisobutyric acid | |
| 14. Glycine | | |

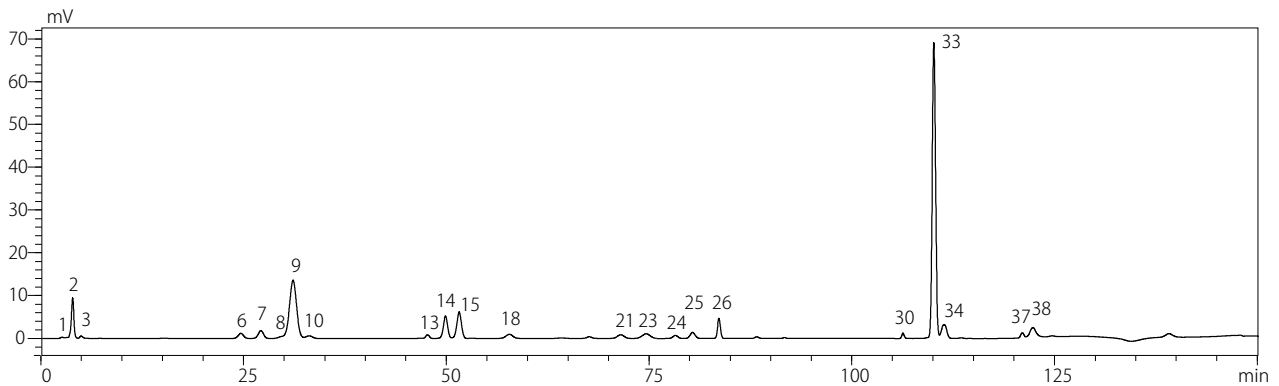
図 33 標準アミノ酸 39 成分の分析 (0.1 mmol/L**, Li 型条件)

** : ただし、1~3,12,17,22 は 0.05 mmol/L、11 は 0.25 mmol/L、29 は 0.026 mmol/L

表 3 Li 型 分析条件

| | |
|----------------------|--|
| Column | : Shim-pack Amino-Li (100 mm×6.0 mm I.D., 5 μ m)*7 |
| Ammonia Trap column | : Shim-pack ISC-30/S0504Li (50 mm×4.0 mm I.D.)*8 |
| Mobile Phase | : Amino Acid Mobile Phase Kits (Li type)*9 Gradient Elution |
| Flow Rate | : 0.6 mL/min |
| Column Temp. | : 39 °C |
| Injection Vol. | : 10 μ L |
| Vial | : Shimadzu Vials, LC, 1.5 mL, Glass |
| Reaction Reagent | : Amino Acid Reagent Kits |
| Flow rate of Reagent | : 0.2 mL/min for each |
| Reaction Temp | : 39 °C |
| Detection | : Ex. 350 nm Em. 450 nm |

*7 : P/N S228-18837-92、*8 : P/N S228-00821-91、*9 : P/N S228-21195-95



- | | | |
|--------------------------|----------------|----------------------|
| 1. o-Phosphoserine | 10. Glutamine | 24. Tyrosine |
| 2. Taurine | 13. Proline | 25. Phenylalanine |
| 3. o-Phosphoethanolamine | 14. Glycine | 26. β -Alanine |
| 6. Threonine | 15. Alanine | 30. Histidine |
| 7. Serine | 18. Valine | 33. Carnosine |
| 8. Asparagine | 21. Isoleucine | 34. Anserine |
| 9. Glutamic acid | 23. Leucine | 37. Lysine |
| | | 38. Ammonia |

図 34 ロースハムの分析 (Li 型条件)

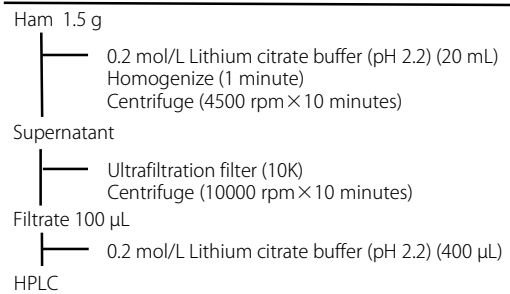
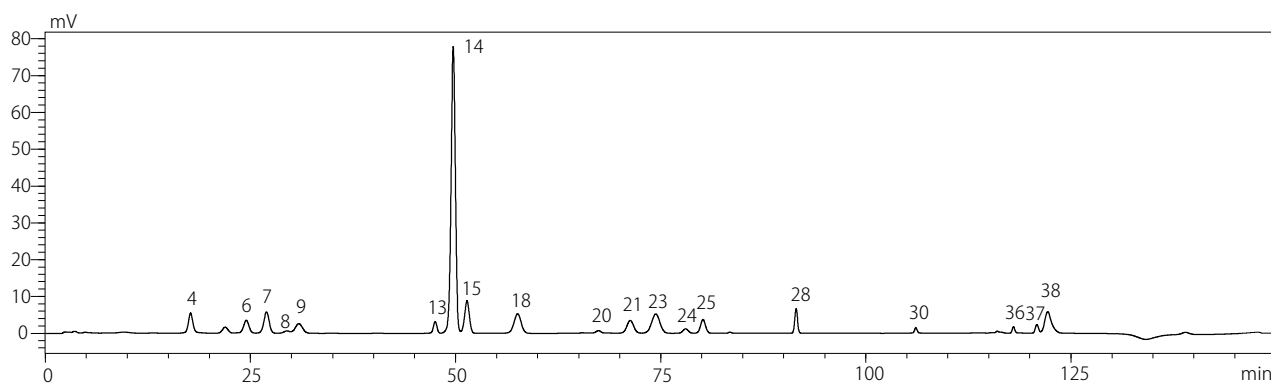


図 35 ロースハムの前処理プロトコル



- | | | |
|------------------|-------------------|--|
| 4. Aspartic acid | 15. Alanine | 28. γ -Aminobutyric acid (GABA) |
| 6. Threonine | 18. Valine | 30. Histidine |
| 7. Serine | 20. Methionine | 30. Histidine |
| 8. Asparagine | 21. Isoleucine | 36. Ornithine |
| 9. Glutamic acid | 23. Leucine | 37. Lysine |
| 13. Proline | 24. Tyrosine | 38. Ammonia |
| 14. Glycine | 25. Phenylalanine | |

図 36 黒酢の分析 (Li 型条件)

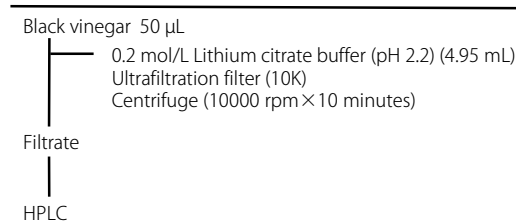
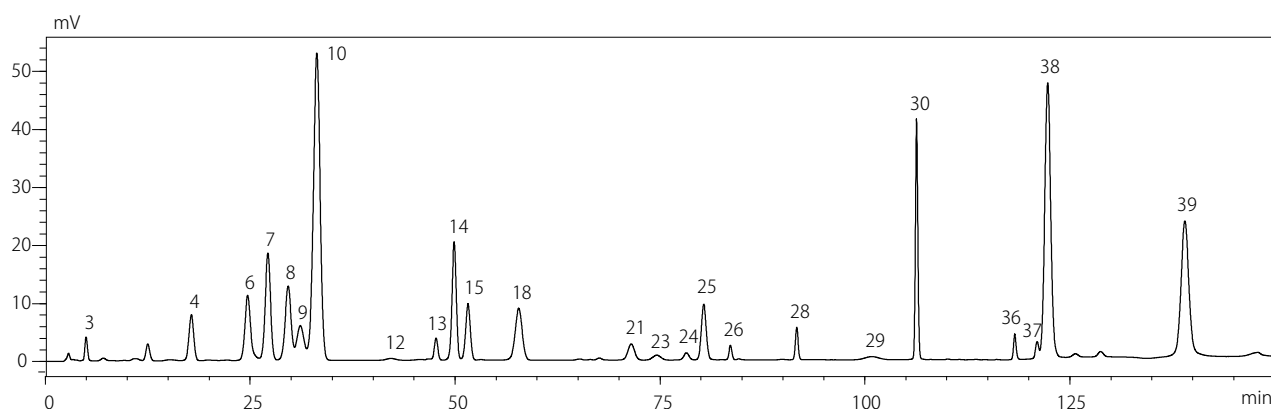


図 37 黒酢の前処理プロトコール



- | | | |
|--------------------------------|-------------------|--|
| 3. o-Phosphoethanolamine | 13. Proline | 26. β -Alanine |
| 4. Aspartic acid | 14. Glycine | 28. γ -Aminobutyric acid (GABA) |
| 6. Threonine | 15. Alanine | 29. Tryptophan |
| 7. Serine | 18. Valine | 30. Histidine |
| 8. Asparagine | 21. Isoleucine | 30. Histidine |
| 9. Glutamic acid | 23. Leucine | 36. Ornithine |
| 10. Glutamine | 24. Tyrosine | 37. Lysine |
| 12. α -Aminoadipic acid | 25. Phenylalanine | 38. Ammonia |
| | | 39. Arginine |

図 38 ブロッコリースプラウトの分析 (Li 型条件)

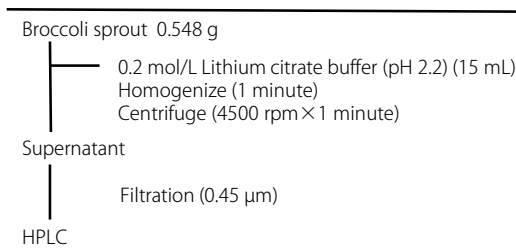


図 39 ブロッコリースプラウトの前処理プロトコール

■ まとめ

Nexera ポストカラムアミノ酸分析システムを用いた様々な食品の分析例をご紹介しました。

なお、今回行った前処理プロトコールはあくまで一例です。実際に定量分析を行う際は、添加回収試験により回収率をご確認の上、実施されることをおすすめします。

Nexera および 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

初版発行：2020年7月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075) 813-1691

※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。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

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/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。