SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

高速液体クロマトグラフNexera™ XR／RF-20Axs

代替タンパク質加水分解試料のプレカラムアミノ酸分析

早河 瑞希[1]　見城 千尋[2]　釣 沙也香[2]
1 島津製作所、2 島津テクノリサーチ

ユーザーベネフィット

- ◆ 煩雑な誘導体化処理が自動で行えるため、非常に簡便なアミノ酸分析ができます。
- ◆ 同一装置で、3種の加水分解（塩酸加水分解、アルカリ加水分解、過ギ酸酸化）を行った試料を分析することができます。
- ◆ 同じカラムと反応試薬を用い、移動相のみを変更することで2種類の分析メソッドを使用することができます。

■はじめに

タンパク質やペプチドを構成するアミノ酸を分析する際に、前処理として塩酸による加水分解が一般的です。塩酸加水分解の過程でアスパラギン、グルタミンは、それぞれアスパラギン酸とグルタミン酸に変化します。トリプトファン、含硫アミノ酸のメチオニンやシステイン、シスチンはその過程で破壊されてしまい、正確な定量を行うことはできません。正確な定量を実現するために、トリプトファンの定量では、アルカリ加水分解を行います。メチオニンやシステイン、シスチンに関しては過ギ酸処理によってメチオニンをメチオニンスルホンに、システインとシスチンをシステイン酸に酸化します。その後塩酸加水分解し、メチオニンスルホンとシステイン酸をそれぞれ定量します。

本稿では、高速液体クロマトグラフNexera XRを用いたプレカラム誘導体化法を行い、加水分解した代替タンパク質の分析例をご紹介します。

表 1　加水分解により生成される遊離アミノ酸

Proteinogenic amino acid	Hydrolysis	Target amino acid	No
Aspartic Acid	Acid hydrolysis	Aspartic Acid	1
Asparagine			
Glutamic Acid		Glutamic Acid	2
Glutamine			
Serine		Serine	3
Histidine		Histidine	4
Glycine		Glycine	5
Threonine		Threonine	6
Arginine		Arginine	7
Alanine		Alanine	8
Tyrosine		Tyrosine	9
Valine		Valine	11
Phenylalanine		Phenylalanine	14
Isoleucine		Isoleucine	15
Leucine		Leucine	16
Proline		Proline	17
Lysine		Lysine	18
Tryptophan	Alkaline hydrolysis	Tryptophan	13
Cysteine	Performic acid oxidation ＋ Acid hydrolysis	Cysteic acid	19
Cystine			
Methionine		Methionine Sulfone	20

■標準溶液の分析

加水分解により生成されるアミノ酸（表1）の混合標準溶液のクロマトグラムを図1~2に示します。

加水分解したアミノ酸の定量を行うために、塩酸加水分解とアルカリ加水分解により生成するアミノ酸を対象にした分析条件（以降、分析条件1と記載）と、過ギ酸酸化・塩酸加水分解により生成するアミノ酸を対象とした分析条件（以降、分析条件2と記載）が必要です。また本稿のプレカラムアミノ酸分析では、Nexera XRに標準で搭載されている自動前処理機能を用いて、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します。分析条件1は表2~3、誘導体化の流れは図3に示します。分析条件2は表4~5、誘導体化の流れは図4に示します。なお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01-00441-JP[1)]をご参照ください。

両分析条件では一部共通の誘導体化試薬と試料調製溶液を使用します。調製方法を表6に示します。

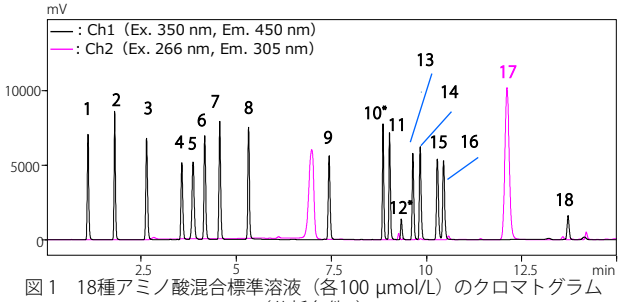

図 1　18種アミノ酸混合標準溶液（各100 µmol/L）のクロマトグラム（分析条件1）

1 Aspartic Acid, 2 Glutamic Acid, 3 Serine, 4 Histidine, 5 Glycine, 6 Threonine, 7 Arginine, 8 Alanine, 9 Tyrosine, 10* Methionine, 11 Valine, 12* Cystine, 13 Tryptophan, 14 Phenylalanine, 15 Isoleucine, 16 Leucine, 17 Proline, 18 Lysine
*は加水分解により生成されるアミノ酸ではありません。

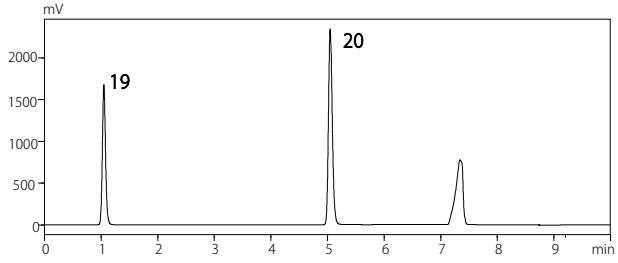

図 2　システイン酸、メチオニンスルホン（各100 µmol/L）のクロマトグラム（分析条件2）
19 Cysteic acid, 20 Methionine Sulfone

表 2　分析条件1

System	: Nexera XR
Column	: Shim-pack™ XR-ODSII*1 (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) *2 B) Water/Acetonitrile = 1:9 C) 20 mmol/L (Sodium) acetate buffer (pH 5) containing 0.5 mmol/L EDTA-2Na *3
Flow rate	: 1.0 mL/min
Column temp.	: 40 ℃
Injection volume	: 1 µL
Sample cooler	: 4 ℃
Detection	: Fluorescence detector (Cell temp. : 25 ℃) Ch1) Ex. 350 nm, Em. 450 nm Ch2) Ex. 266 nm, Em. 305 nm
Vial	: SHIMADZU LabTotal™ for LC 1.5 mL, Glass*4

*1 P/N 228-41624-92
*2 Mobile Phase A：
Add 2.67 g of sodium acetate trihydrate and 41 µL of acetic acid into 1000 mL of pure water.
*3 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.
*4 P/N 227-34001-01

表 3　タイムプログラム（分析条件1）

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
17	0	95	5
17.01	95	5	0
19.5	95	5	0

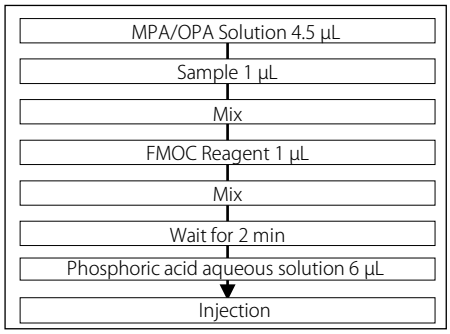

図 3　自動前処理機能を用いた誘導体化手順（分析条件1）

表 4　分析条件2

System	: Nexera XR
Column	: Shim-pack XR-ODSII (100 mm × 3.0 mm I.D., 2.2 µm)
Mode	: Low pressure gradient
Mobile phase	: A) 20 mmol/L (Sodium) citrate buffer (pH 4.6)*1 B) Water/Acetonitrile = 1:9
Flow rate	: 1.0 mL/min
Column temp.	: 40 ℃
Injection volume	: 1 µL
Sample cooler	: 4 ℃
Detection	: Fluorescence detector (Cell temp. : 25 ℃) Ex. 350 nm, Em. 450 nm

*1 Mobile Phase A：
Add 2.1 g of citric acid monohydrate and 2.94 g of trisodium citrate dihydrate into 1000 mL of pure water.

表 5　タイムプログラム（分析条件2）

Time (min)	A.conc	B.conc
0	85	15
5	78	22
6	78	22
6.01	0	100
8	0	100
8.01	85	15
10	85	15

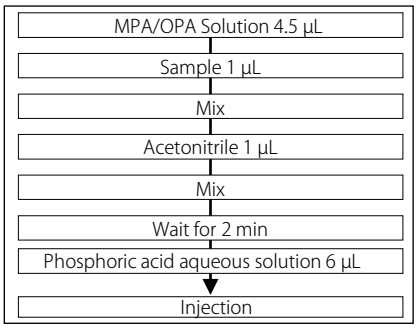

図 4　自動前処理機能を用いた誘導体化手順（分析条件2）

表 6　誘導体化試薬・試料調製溶液の調製法

● 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 ultrapure water.
● 10 mmol/L HCl　(試料調製溶液)
Add 4.35 mL of hydrochloric acid into 500 mL of ultrapure water. Then dilute this solution 10-fold with ultrapure water.

■直線性

メチオニンスルホン、システイン酸を除くアミノ酸の検量線の直線性についてはアプリケーションニュース01-00441-JPをご参照ください。

本稿ではメチオニンスルホン、システイン酸の直線性を示します。各2.5、5、10、25、50、100 µmol/Lの濃度範囲における直線性（寄与率、r^2）はいずれも0.999以上と良好でした。結果を表7に示します。

表 7　検量線の寄与率

Compound	Linearity (r^2)
Cysteic acid	0.99996
Methionine Sulfone	0.99931

■代替タンパク質の分析

図5に示す塩酸加水分解を行い、分析したクリケット（コオロギ）パウダーと大豆ミートのクロマトグラムを図6~7に示します。図8に示すアルカリ加水分解を行い、分析した各試料のクロマトグラムを図9~10に示します。図11に示す過ギ酸酸化・塩酸加水分解を行い、分析した各試料のクロマトグラムを図12~13に示します。

再現性試験では6回繰り返し分析を行い、ピーク面積の相対標準偏差を評価しました。再現性試験の結果を表8に示します。

塩酸加水分解した実試料の分析

Sample 5 mg
- 6 mol/L HCl (500 µL)
  Seal vessel under reduced pressure
  Stand at 110 ℃, 22 hours
  Evaporate to dryness under nitrogen atmosphere
- Water (500 µL)
  Filtration　(0.45 µm, 14000 rpm×5 minutes)

Dilute 100-fold with 10 mmol/L HCl

HPLC

図 5　前処理方法（塩酸加水分解）

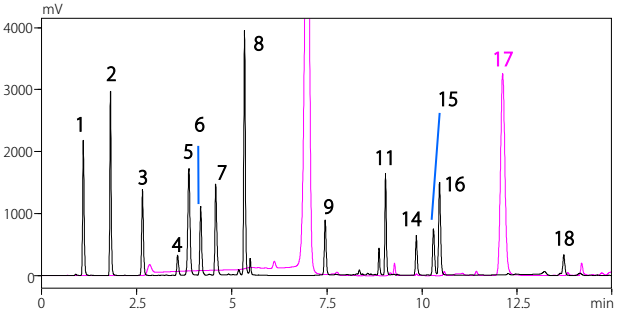

図 6　クリケットパウダーのクロマトグラム（塩酸加水分解）

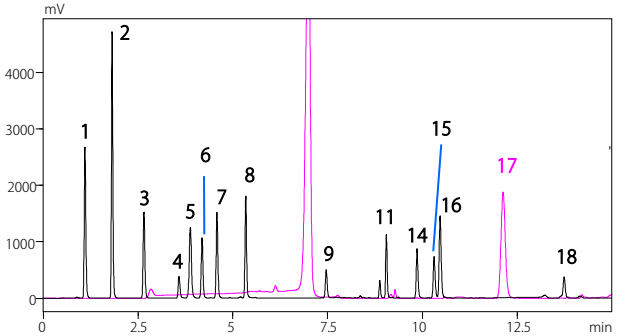

図 7　大豆ミートのクロマトグラム（塩酸加水分解）

アルカリ加水分解した実試料の分析

Sample 5 mg
- 4.2 mol/L NaOH (500 µL)
- 2,2-Thiodiethanol (100 µL)
  Seal vessel under reduced pressure
  Stand at 110 ℃, 22 hours
- Neutralization with 6 mol/L HCl

5 mL - Water

Dilute 5-fold with 10 mmol/L HCl

Filtration (0.22 µm filter)

HPLC

図 8　前処理方法（アルカリ加水分解）

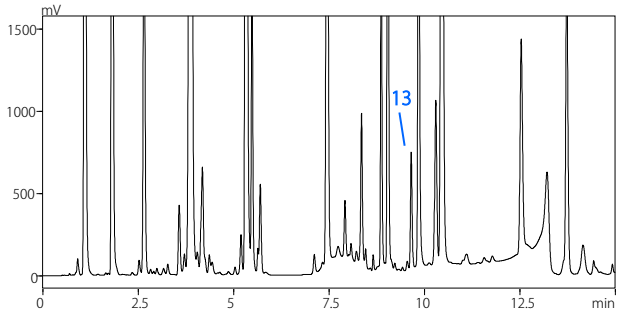

図 9　クリケットパウダーのクロマトグラム（アルカリ加水分解）

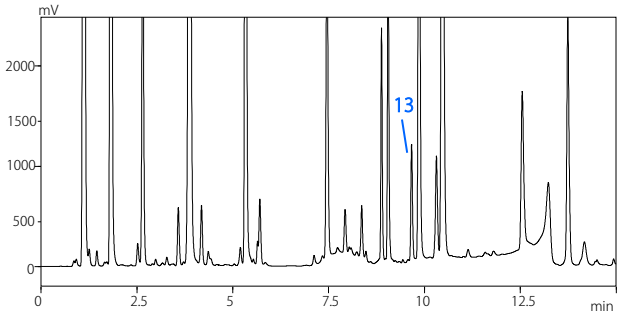

図 10　大豆ミートのクロマトグラム（アルカリ加水分解）

過ギ酸酸化・塩酸加水分解した実試料の分析

Sample 5 mg
- Performic acid reagent*1(400 µL)
  Store in ice overnight
- Hydrobromic acid (150 µL)
  Evaporate to dryness under nitrogen atmosphere
- 6 mol/L HCl (500 µL)
  Seal vessel under reduced pressure
  Stand at 110 ℃ for 22 hours
  Evaporate to dryness under nitrogen atmosphere
- Water (500 µL)
  Filtration　(0.45 µm, 14000 rpm×5 minutes)

Dilute 20-fold with 10 mmol/L HCl

HPLC

図 11　前処理方法（過ギ酸酸化・塩酸加水分解）

*1: Mix 9 mL of formic acid and 1 mL of 30% hydrogen peroxide. Stand at room temperature for 1 hour.

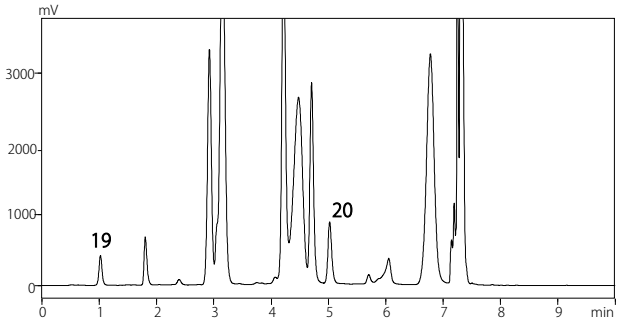

図 12　クリケットパウダーのクロマトグラム（過ギ酸酸化・塩酸加水分解）

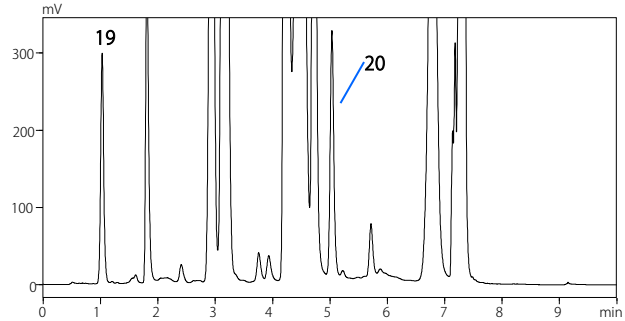

図 13　大豆ミートのクロマトグラム（過ギ酸酸化・塩酸加水分解）

表8　面積再現性試験の結果（%RSD, n=6）

Target amino acid	面積再現性	
	クリケットパウダー	大豆ミート
Aspartic Acid	1.58	1.74
Glutamic Acid	1.58	1.79
Serine	1.99	1.81
Histidine	1.72	2.02
Glycine	2.12	1.57
Threonine	1.60	1.80
Arginine	1.52	1.89
Alanine	1.69	1.67
Tyrosine	1.29	1.86
Valine	1.40	1.98
Phenylalanine	1.30	1.82
Isoleucine	1.37	1.85
Leucine	1.46	1.74
Proline	4.43	2.92
Lysine	2.26	2.09
Tryptophan	2.42	4.56
Cysteic acid	1.00	2.69
Methionine Sulfone	0.92	3.27

■まとめ

本稿では、自動前処理機能を用いたアミノ酸の分析例をご紹介しました。手動による誘導体化操作は不要で、前処理から分析までを行いました。また2種の分析条件では共通のカラム、誘導体化試薬、移動相Bを用いることで、手間や装置のダウンタイムを削減できることが期待できます。
2種の分析によって、アミノ酸量を包括的に把握することができ、アミノ酸スコア[2)]等の栄養価指標を示すことが可能です。

＜参考文献＞
1)自動前処理機能を用いたプレカラムアミノ酸の短時間一斉分析 Application News No.01-00441-JP
2)農林水産省 日本食品標準成分表 2020年版 （八訂）アミノ酸成分表編

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
https://www.an.shimadzu.co.jp/

初版発行：2024年 9月
01-00768A-JP　A改訂版発行：2024年10月

島津コールセンター　0120-131691

アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。

Nexera™シリーズ
超高速液体クロマトグラフ

関連分野

食品・飲料

栄養・機能性成分

価格お問い合わせ

製品お問い合わせ

技術お問い合わせ

その他お問い合わせ