

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¹、山本 洋子²
1 島津製作所、2 島津テクノロジー

ユーザーベネフィット

- ◆ 自動プレカラム誘導体化法により、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、誘導体化の前処理を省力化して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01-01047では、一体型HPLCシステム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13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。

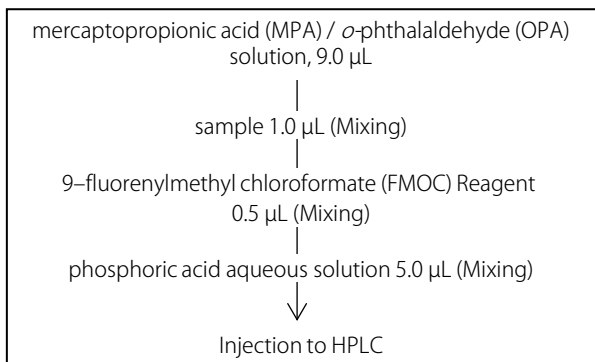


図1 LC-2070Cによる自動プレカラム誘導体化の流れ



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-2070C
Column	: Shim-pack™ XR-ODSII (100 mm × 3.0 mmI.D., 2.2 μm) *1
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 *2
Detection	: Fluorescence detector (RF-20Axs) : Ch1) Ex. 350 nm, Em. 450 nm : Ch2) Ex. 266 nm, Em. 305 nm

*1 P/N : 228-41624-92

*2 P/N : 228-15652-92

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。

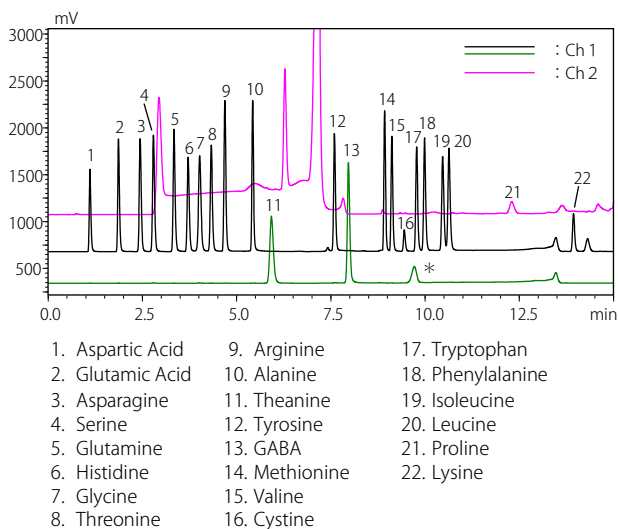


図3 標準アミノ酸22成分のクロマトグラム (各 25 µmol/L)

■ 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 9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) 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29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)

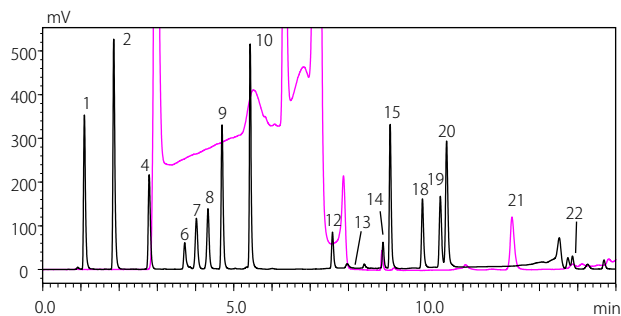


図4 玄米 (塩酸加水分解) のクロマトグラム

- 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)

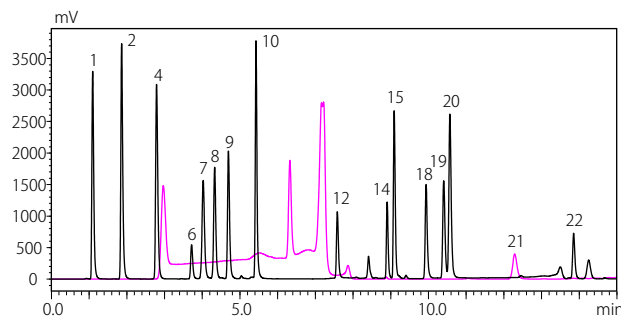
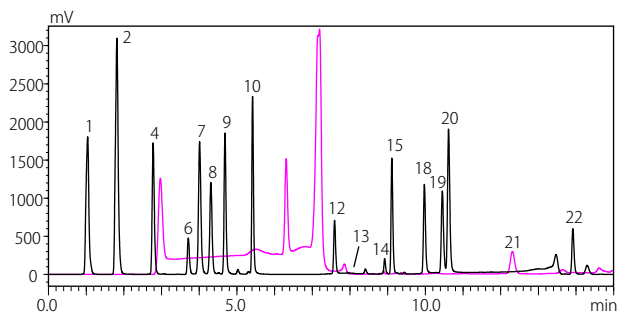


図6 鶏卵 (塩酸加水分解物) のクロマトグラム

- 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

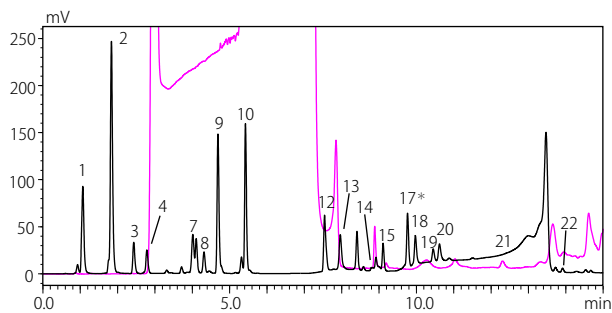
■大豆抽出液（塩酸加水分解物）



- | | | |
|------------------|----------------|-------------------|
| 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

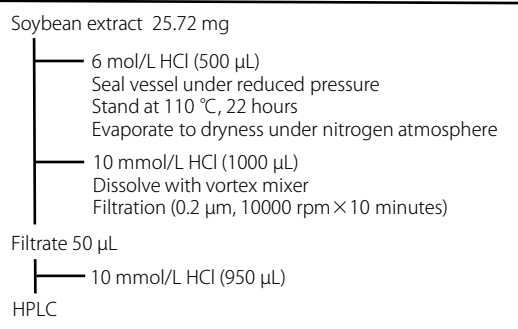


図9 大豆抽出液（塩酸加水分解物）の前処理プロトコール

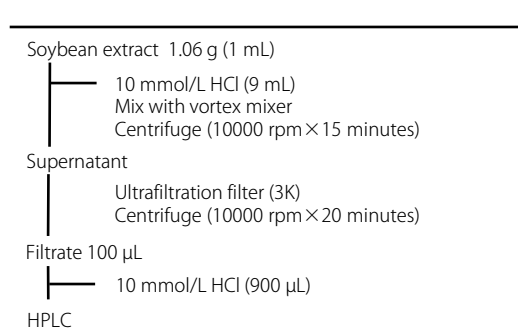
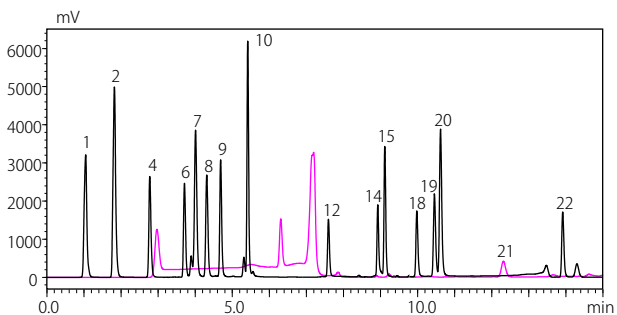


図13 大豆抽出液の前処理プロトコール

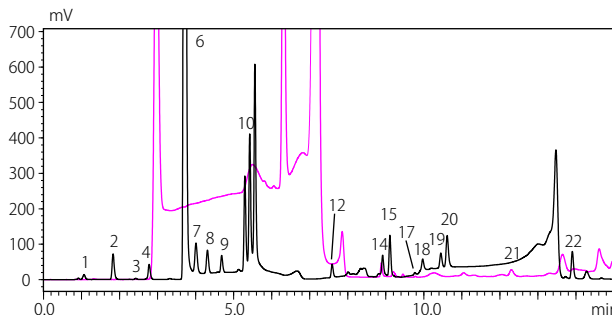
■まぐろ水煮（塩酸加水分解物）



- | | | |
|------------------|-------------------|----------------|
| 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

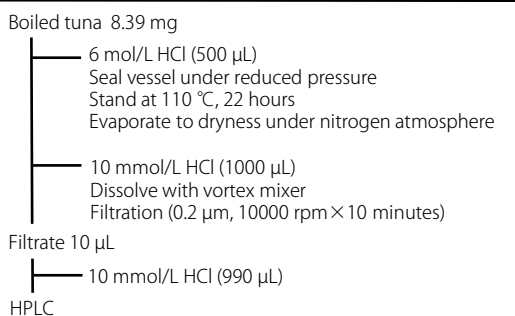


図11 まぐろ水煮（塩酸加水分解物）の前処理プロトコール

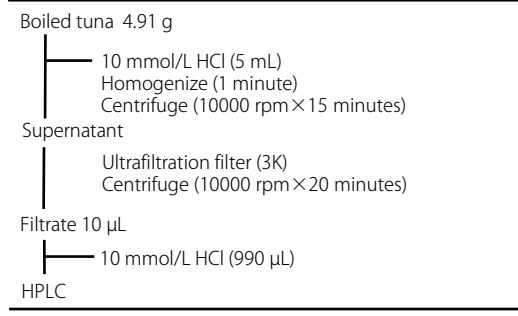
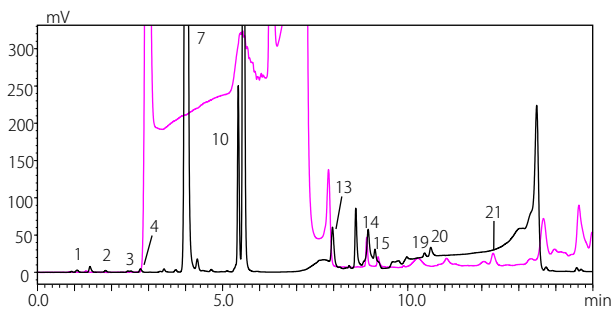


図15 まぐろ水煮の前処理プロトコール

■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)

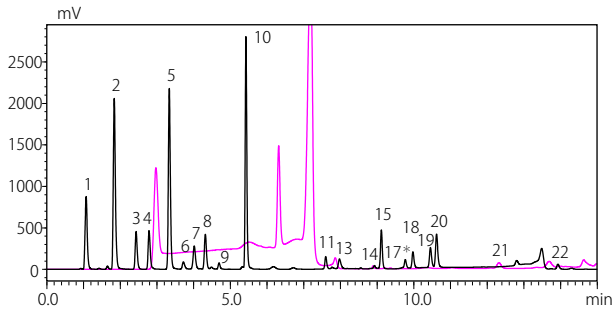
Filtrate 10 μL

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)

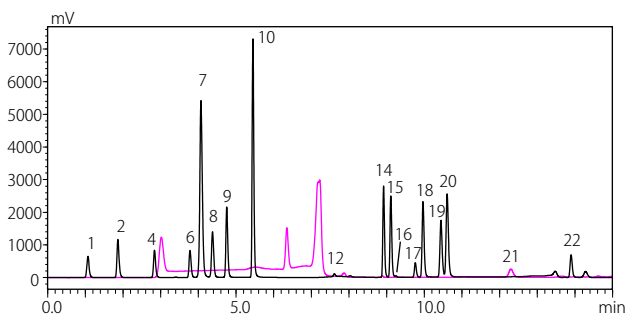
Filtrate 20 μL

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)

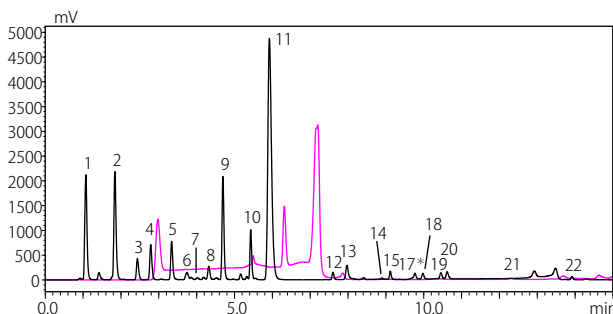
Filtrate 5 μL

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)

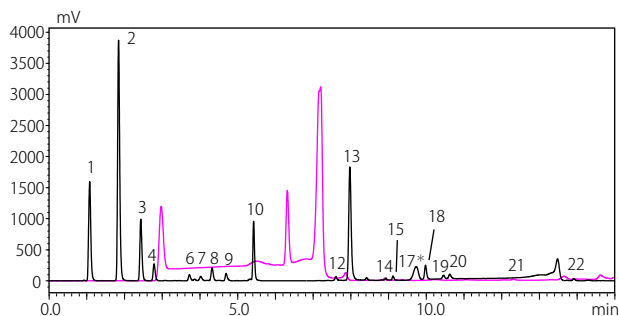
Filtrate 20 μL

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

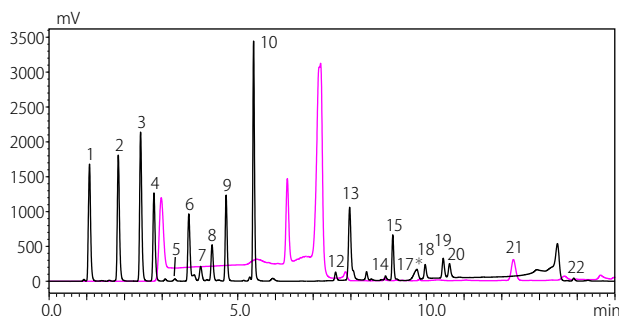


- | | | |
|------------------|----------------|--------------------------|
| 1. Aspartic Acid | 9. Arginine | 17. (Tryptophan + GABA)* |
| 2. Glutamic Acid | 10. Alanine | 18. Phenylalanine |
| 3. Asparagine | 12. Tyrosine | 19. Isoleucine |
| 4. Serine | 13. GABA | 20. Leucine |
| 6. Histidine | 14.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

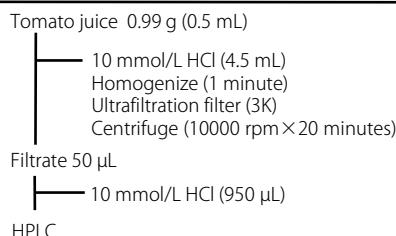


図 25 トマトジュースの前処理プロトコール

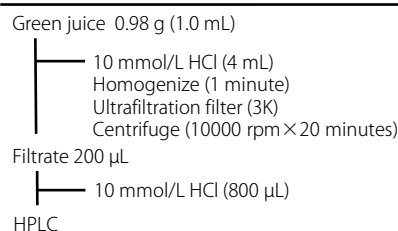
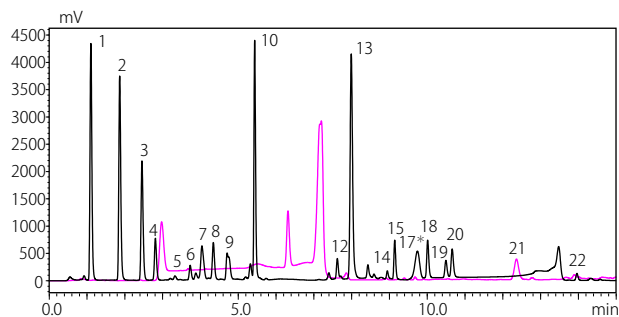


図 29 青汁の前処理プロトコール

■ 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

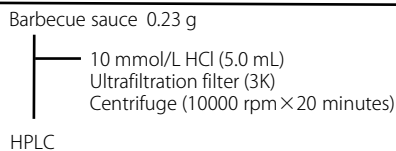


図 27 バーベキューソースの前処理プロトコール

■ まとめ

一体型HPLCシステム LC-2070Cに標準搭載されている自動前処理機能を用い、食品中のアミノ酸分析を行いました。オートサンプラを用いた自動誘導体化により再現性の良い作業が行え、試薬の消費量が少なく、多検体の連続的な分析が可能となります。また逆相分離モードが適用できるため、20種アミノ酸を短時間で分離できるという長所があります。

夾雑物の多い食品試料に含まれるアミノ酸を、希釈、ろ過、限外ろ過等の簡単な前処理で感度良く検出することができるため、掲載したもの以外に幅広い試料への適用が期待できます。

<関連アプリケーション>

- 一体型HPLCシステムの自動前処理機能を用いたアミノ酸の一斉分析 [Application News No.01-01047](#)

Shim-packは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

＞ 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。



＞ i-Series

一体型液体クロマトグラフ



＞ Shim-pack XR シリーズ

高速・高分離カラムラインナップ Shim-pack XR シリーズ

関連分野

＞ 食品・飲料

＞ 栄養・機能性成分

＞ ライフサイエンス

＞ 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