



ORIST

Technical Sheet

No. 22-21

HPLCによるアミノ酸の分析

キーワード：アミノ酸、高感度分析、定量、HPLC

はじめに

アミノ酸は、うま味調味料、健康食品、医薬品原料などとして様々な分野で利用されています。通常、酵素反応を用いた手法によりアミノ酸特異的に検出されたり、HPLCを用いて一斉に検出されたりします。ほとんどのアミノ酸は UV 吸収や蛍光を示さないため、HPLCで選択的/高感度に検出するためには、吸光・蛍光を示す化合物と反応させ、誘導体化する必要があります。本稿では、HPLC のカラムの前でアミノ酸を誘導体化する手法(プレカラム誘導体化法)により、食品中の遊離アミノ酸を分析した例についてご紹介します。

アミノ酸の誘導体化は *o*-フタルアルデヒド(OPA)を用いて実施しました(図 1)。OPA は室温で迅速に標識が進行し、蛍光検出器を用いることで非常に高感度な検出が可能です。一方、標識化合物が脱落しやすいため、標識 → 分析を再現性良く短時間で実施することが望ましいとされています。そこで、当センターでは HPLC オートサンプラー内で標識反応を行い、アミノ酸の検出・定量を実施しています。



図 1 OPA による 1 級アミノ酸の誘導体化

サンプル調製

食品サンプルは水分を多量に含みます。さらに、サンプリングする部分によって性状、組成が様々です。そのため、サンプルの均一化処理が必要です。本例では、燕麦や角切りにしたジャガイモを凍結乾燥し、ビーズ破砕装置で粉砕しました。粉砕サンプルを秤量し、超純水を加えて再懸濁、遠心分離することでアミノ酸を含む上清を得ました。得られた上清からタンパク質や多糖類を除去し、遠心濃縮により含有成分を乾固させました。乾固サンプルは再度溶解・希釈して HPLC にて分析しました。

分析条件

装置名	Nexera 40D XR シリーズ (島津製作所製)
カラム	YMC-Triart C18 (150×3.0 mm i.d., 3 μm)
温度	40°C
溶離液 A	10 mM Na ₂ HPO ₄ /10 mM Na ₂ B ₄ O ₇ pH 8.2
溶離液 B	ACN/MeOH/Water = 45/45/10 (v/v/v)
流量	0.55 mL/min
検出波長	励起波長 350 nm, 蛍光波長 450 nm

なお、OPA による蛍光標識はオートサンプラーの自動前処理機能を用いて実施しました。

分析結果

アミノ酸標品(STDs; 富士フィルム和光純薬製)、燕麦、ジャガイモの遊離アミノ酸を測定した結果を図 2 に示します。

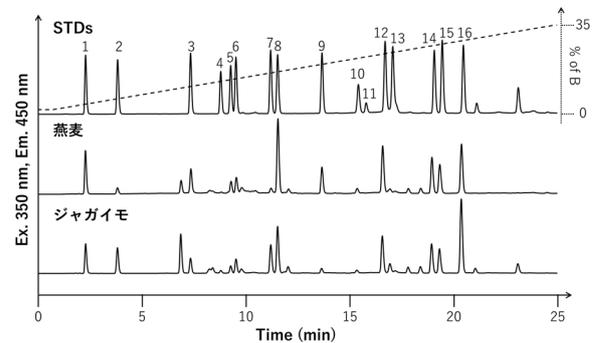


図 2 アミノ酸組成の分析結果

ピーク 1 - 16 は以下の通り。

- 1: Asn, 2: Gln, 3: Ser, 4: His, 5: Gly, 6: Thr, 7: Arg, 8: Ala, 9: Tyr, 10: Cys-Cys, 11: Val, 12: Met, 13: Phe, 14: Ile, 15: Leu, 16: Lys

この結果から、抽出した溶液中に含有されるピーク 7(アルギニン)や 9(チロシン)の面積値が有意に違うことが解ります。なお、これらを定量すると、燕麦抽出液には Arg 5.30 μmol/L; Tyr 8.93 × 10² μmol/L、ジャガイモ抽出液には Arg 1.20 × 10² μmol/L; Tyr 6.24 μmol/L が含有されると算出されました。このように HPLC を用いることでアミノ酸の一斉分析や、高感度なアミノ酸の検出が可能です。