

## ■アミノ酸分析の紹介 (Chromaster OPAポストカラム生体液分析法)

AS/LC-013

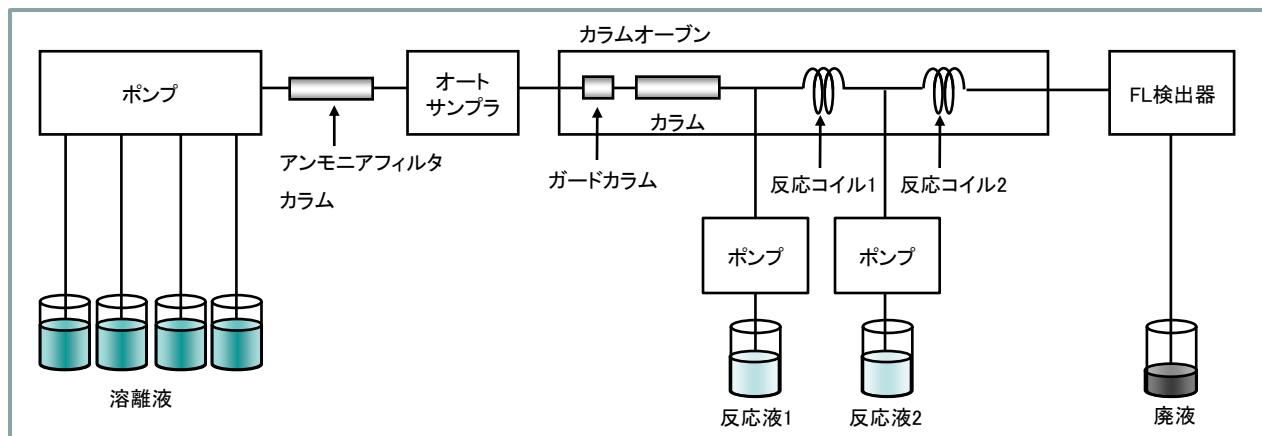
AS/LC-010では日立アミノ酸分析システム(OPAポストカラム法)として、タンパク質やペプチドを構成するアミノ酸約20種類を対象とした「標準分析法」を紹介しました。今回は遊離アミノ酸約40成分を対象とした「生体液分析法」を紹介いたします。標準分析法とは使用するカラムと溶離液が異なります。誘導体化試薬には、オルトフタルアルデヒド(OPA<sup>(\*)1)</sup>)を用いています。OPAは蛍光誘導体化試薬で、感度が高いことが特長です。その半面、試薬の寿命が短く、使用する水の純度にも気を配る必要があります。

## ◆アミノ酸分析法の種類と特徴◆

(\*1) OPA : オルトフタルアルデヒド(*o*-phthalaldehyde)

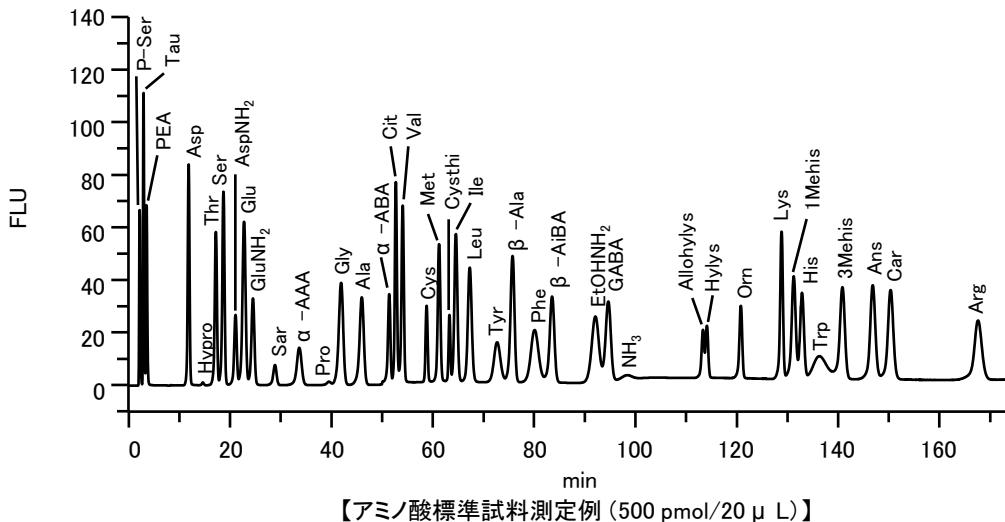
誘導体化試薬 分析法(測定対象)	NIN(ニンヒドリン) ・可視吸収検出 ・再現性良好、ルーチン分析向き ・試薬の寿命長い	OPA(オルトフタルアルデヒド) ・蛍光検出 ・高感度 ・試薬の寿命が短い ・水の純度に注意が必要
標準分析法 (タンパク質加水分解アミノ酸17成分対象)	<b>NIN標準分析法</b>	<b>OPA標準分析法</b>
生体液分析法 (遊離アミノ酸40成分対象)	<b>NIN生体液分析法</b>	<b>OPA生体液分析法</b> ・タンパク質加水分解アミノ酸17成分 ・グルタミン、アスパラギン、タウリンなど

## ■アミノ酸分析システム(OPAポストカラム法)



【流路図】

## ■アミノ酸標準試料測定例



【アミノ酸標準試料測定例 (500 pmol/20 μL)】

## &lt;生体液分析法測定条件&gt;

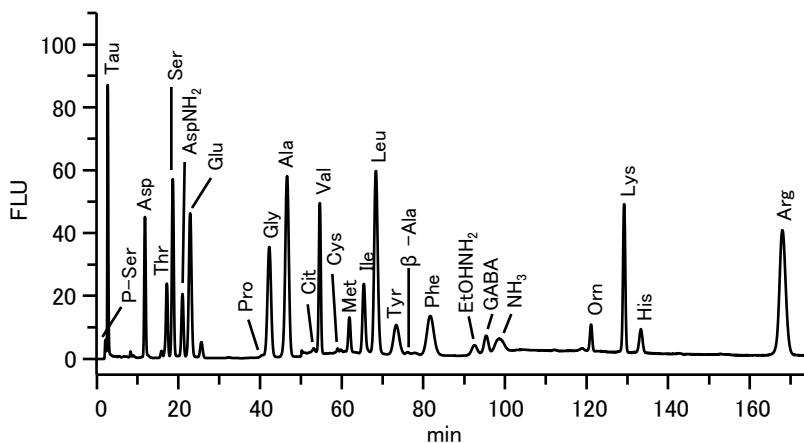
カラム : #2622PF 4.6 mm I.D. × 60 mm  
 アンモニアフィルタカラム : #2650L 4.6 mm I.D. × 60 mm  
 ガードカラム : #2619 4.0 mm I.D. × 5 mm  
 溶離液 : 4液(クエン酸Li 緩衝液3液、再生液1液)  
 流量 : 0.35 mL/min

カラム温度 : 38 °C  
 反応液 : 2液(ホウ酸緩衝液-次亜塩素酸Na)(OPA溶液)  
 反応液流量 : 0.55 mL/min, 0.35 mL/min  
 反応温度 : 38 °C  
 検出波長 : FL Ex 340 nm, Em 450 nm  
 注入量 : 20 μL

## ■アミノ酸分析の紹介 (Chromaster OPAポストカラム生体液分析法)

AS/LC-013

## ■食品中のアミノ酸測定例



【米酢の測定例 (前処理後 20 μL 注入)】

## &lt;試料の前処理&gt;

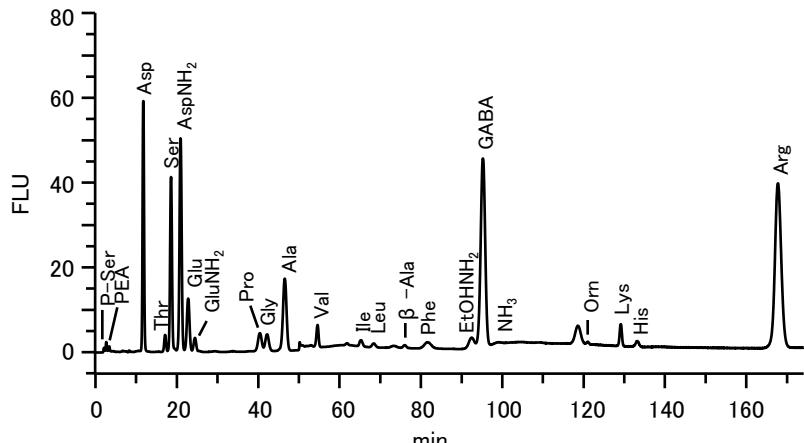
試料 米酢

| ← 0.02 mol/L 塩酸で20倍希釀

ろ過 Pore Size 0.2 μm

|

分析試料(20 μL 注入)



【オレンジジュースの測定例 (前処理後 20 μL 注入)】

## &lt;試料の前処理&gt;

試料 オレンジジュース 1 mL

| ← 5% トリクロロ酢酸 1 mL

遠心分離 10,000 rpm、10 min

|

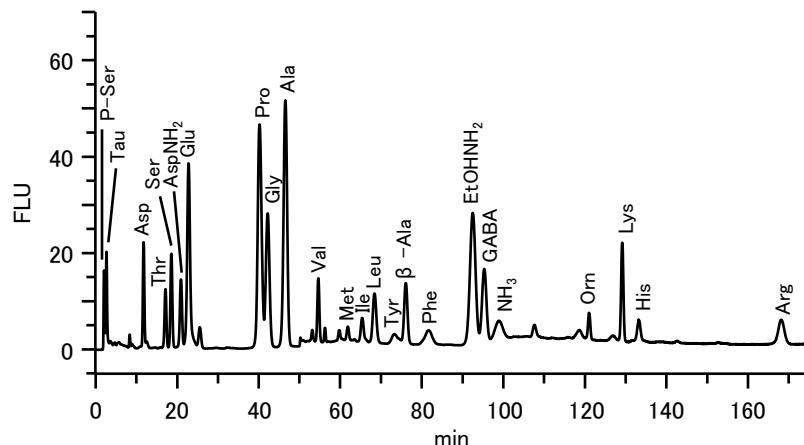
上清採取

| ← 0.02 mol/L 塩酸で50倍希釀

ろ過 Pore Size 0.2 μm

|

分析試料(20 μL 注入)



【赤ワインの測定例 (前処理後 20 μL 注入)】

## &lt;試料の前処理&gt;

試料 赤ワイン 1 mL

| ← 5% トリクロロ酢酸 1 mL

遠心分離 10,000 rpm、10 min

|

上清採取

| ← 純水で5倍希釀

ろ過 Pore Size 0.2 μm

|

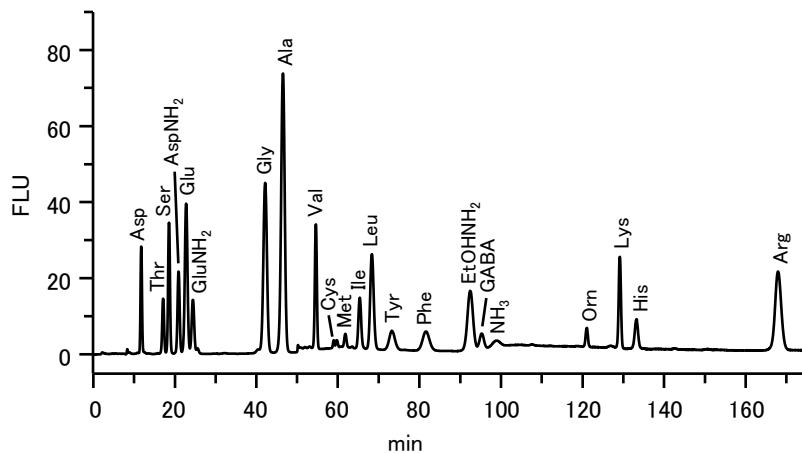
分析試料(20 μL 注入)

食品などタンパク質を含む試料は、前処理として除タンパクが必要です。ここではトリクロロ酢酸を使用して除タンパクしました。

## ■アミノ酸分析の紹介 (Chromaster OPAポストカラム生体液分析法)

AS/LC-013

## ■食品中のアミノ酸測定例

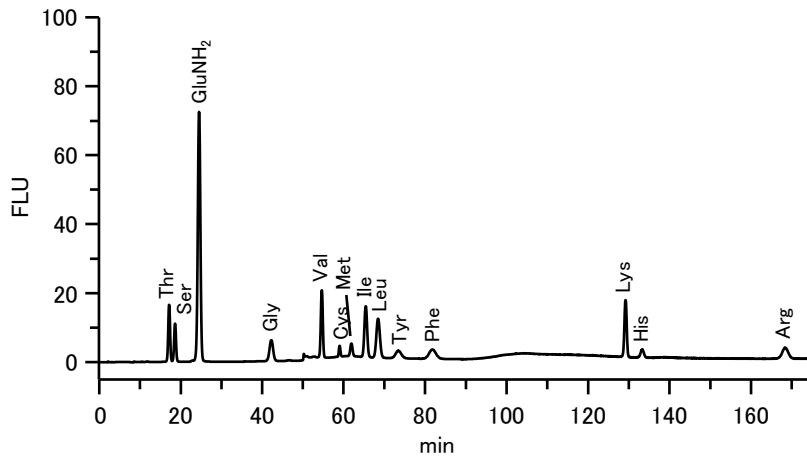


【吟醸酒の測定例（前処理後 20 μL 注入）】

## &lt;試料の前処理&gt;

試料 吟醸酒 1 mL  
| ← 5 % トリクロロ酢酸 1 mL  
遠心分離 10,000 rpm、10 min  
|  
上清採取  
| ← 0.02 mol/L 塩酸で20倍希釀  
ろ過 Pore Size 0.2 μm  
|  
分析試料(20 μL 注入)

## ■培地中のアミノ酸測定例



【培地の測定例（前処理後 20 μL 注入）】

## &lt;試料の前処理&gt;

試料 培地(粉末) 10 mg  
| ← 純水 10 mL  
1 mL 採取  
| ← 5 % トリクロロ酢酸 1 mL  
遠心分離 10,000 rpm、10 min  
|  
上清採取  
| ← 0.02 mol/L 塩酸で5倍希釀  
ろ過 Pore Size 0.2 μm  
|  
分析試料(20 μL 注入)

## 【アミノ酸成分名一覧】

各ピークの成分名		各ピークの成分名		各ピークの成分名		各ピークの成分名	
P-Ser	Phosphoserine	Sar	Sarcosine	Cysthi	Cystathione	Hylys	Hydroxylysine
Tau	Taurine	α -AAA	α -Aminoadipic acid	Ile	Isoleucine	Orn	Ornithine
PEA	Phosphoethanolamine	Pro	Proline	Leu	Leucine	Lys	Lysine
Asp	Aspartic acid	Gly	Glycine	Tyr	Tyrosine	1Mehis	1-Methylhistidine
Hypro	Hydroxy proline	Ala	Alanine	β -Ala	β -Alanine	His	Histidine
Thr	Threonine	α -ABA	α -Amino-n-butyric acid	Phe	Phenylalanine	Trp	Tryptophan
Ser	Serine	Cit	Citrulline	β -AiBA	β -Amino iso butyric acid	3Mehis	3-Methylhistidine
AspNH <sub>2</sub>	Asparagine	Val	Valine	EtOHNH <sub>2</sub>	Ethanolamine	Ans	Anserine
Glu	Glutamic acid	Cys	Cystine	GABA	γ -Amino-n-butyric acid	Car	Carnosine
GluNH <sub>2</sub>	Glutamine	Met	Methionine	AlloHylys	Allohydroxylysine	Arg	Arginine

本条件では、反応温度が低いため、Hypro、Proの感度が十分ではありません。また、すべての成分を完全に分離することはできません。より高分離・高精度な分析が必要な場合は、L-8900形 日立高速アミノ酸分析計をお勧めします。

主な装置構成 : Chromaster 5110 ポンプ×3、5210 オートサンプラー(サーモスタート付)、5310 カラムオーブン、5440 蛍光検出器、アミノ酸OPA分析キット、カラム

注意: 本資料に掲載のデータは測定例を示すもので、性能を保証するものではありません。