

20. アミノ酸分析法

アミノ酸分析法は、たん白質、ペプチド、その他の医薬品のアミノ酸組成やアミノ酸含量を測定する方法をいう。たん白質及びペプチドはアミノ酸残基が共有結合で直鎖的に重合した高分子であり、そのアミノ酸配列はたん白質やペプチドの特性を規定している。たん白質は通常特定のコンホメーションを持った折りたたみ構造をとる大きな分子と考えられる。一方、ペプチドは比較的小さな分子であり、2～3個のアミノ酸で構成されていることもある。アミノ酸分析法は、たん白質やペプチドの定量、同定、構造解析に利用でき、ペプチドマップ法におけるペプチド断片の評価、たん白質やペプチド中の異常アミノ酸の検出などにも利用できる。分析する前にたん白質あるいはペプチドを各構成アミノ酸に加水分解する必要があるが、加水分解のあとに行うアミノ酸分析操作は他の医薬品中の遊離アミノ酸の分析で行われている方法と同じであり、加水分解試料中のアミノ酸は一般に誘導体化して分析する。

装置

アミノ酸分析に用いる方法論は通常、試料中のアミノ酸のクロマトグラフ法による分離に基づいている。最近の技法は専らアミノ酸分析用に作られた自動クロマトグラフ装置を利用している。アミノ酸分析装置は、基本的にはカラム上でアミノ酸を分離するための移動相勾配を作成できる低圧又は高圧液体クロマトグラフ装置である。装置にはプレカラム誘導体化で分析する以外はポストカラム誘導体化機能を備えていなければならない。検出器は利用する誘導体化の方法によって異なるが、通常紫外可視検出器か蛍光検出器が用いられる。記録計（例えば、インテグレーター）は検出器からのシグナルをアナログ信号に変換し、定量できるものを用いる。使用する装置はアミノ酸分析専用のものが望ましい。

一般的注意

アミノ酸分析中、分析者は目立たないところでの汚染に常に注意を払う必要があり、高純度の試薬が必要となる（例えば、低純度の塩酸はグリシンの混入を招くことがある）。分析試薬類は高速液体クロマトグラフ（HPLC）用溶媒類のみを使用し、数週間毎に定期的に変換すべきである。混入の可能性のある微生物や溶媒中に存在する異物は使用する前にろ過して除き、ふたをした容器に保存し、分析装置は直射日光のあたらない場所に設置する。

実験のやり方がアミノ酸分析の質を左右する。装置は実験室内の人通りの少ない場所に設置し、室内は清潔に保つこと。ピペット類は保守手順書に従って清潔にし、調整すること。ピペットチップはふたのある箱に保管し、素手でチップをつまんだりしないこと。実験者はパウダーの付いていないラテックス製の手袋を着用すること。埃がグリシン、セリン及びアラニンの含量を増加させることがあるので、試料バイアルの開け閉めの回数は制限すること。

良好な分析結果を得るにはよく手入れされた装置が必要である。分析装置が日常的に使用されている場合には、漏れ、検出器・ランプの安定性、カラムの性能を毎日チェックする。装置のすべてのフィルター及びその他の点検箇所は規定の保守管理表に従って清掃あるいは交換する。

標準物質

分析に用いるアミノ酸の標準物質としては市販品が入手可能であり、通常、アミノ酸の混合水溶液となっている。アミノ酸組成を測定する場合、全体の操作が完全であることを示すために、たん白質又はペプチドの標準品/標準物質を対照として試料と共に分析する。この目的のためのたん白質としては高純度のウシ血清アルブミンが用いられる。

装置の校正

アミノ酸分析装置の校正は通常、標準アミノ酸混液を分析して行い、各アミノ酸の感度係数や測定範囲を調べる。標準アミノ酸混液の各アミノ酸濃度は既知であるので、校正にあたっては、用いる分析方法で直線関係が得られると思われる濃度範囲内のいくつかの異なる濃度に標準アミノ酸混液を希釈し、これらについて試験を繰り返す。得られた各アミノ酸のピーク面積を希釈液中の各アミノ酸の既知濃度に対してプロットする。この結果から、あるアミノ酸のピーク面積がアミノ酸濃度と直線関係にある濃度範囲を調べることができる。正確で再現性のある結果を得るには、使用する分析方法での分析限界以内（例えば、直線範囲内）にある濃度の試料を調製することが重要である。

各アミノ酸の感度係数を調べるには、4～6種の濃度の標準アミノ酸について分析する。感度係数は標準液中に存在するアミノ酸1 nmol当たりの平均ピーク面積あるいは平均ピーク高さとして算出する。各アミノ酸の感度係数を校正ファイルに記録しておき、試料中のアミノ酸の算出に利用する。この計算はアミノ酸のピーク面積をそのアミノ酸の感度係数で除し、そのアミノ酸の nmol 数を求める。日常の分析では一点校正でじゅうぶんである。しかしながら、校正ファイルは異常のないことを確認するために対照標準物質の分析によってじゅうぶんに吟味され頻繁に更新されている。

再現性

一貫した良好な分析結果は試験の再現性に注意を払う実験室から得られるものである。高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) によるアミノ酸あるいはその誘導体の分離では、各アミノ酸に対応する多数のピークがクロマトグラム上にみられる。ピークの数が多いため、保持時間でピークを同定したり、定量のためにピーク領域を積分したりすることのできる分析システムが必要となる。一般的な再現性の評価では、標準アミノ酸溶液を調製し、同一標準液を用いて多数回 (例えば、6 回以上) 分析を繰り返し、各アミノ酸の保持時間及びピーク面積の相対標準偏差 (RSD) を求める。更に、実験者を変えた数日間にわたる複数回の測定で再現性の評価を行う。この場合、試料の取扱いに起因する変動も調べるため、標準液の希釈操作も毎回行う。標準たん白質 (例えば、ウシ血清アルブミン) のアミノ酸組成の分析も再現性の評価の一部としてしばしば行われる。変動 (すなわち、RSD) を評価することによって、その実験室から得られる分析値が管理されたものであることを確認するための限度値を設定することができる。最良の結果を得るためには、最も低い実際的な変動の限度値を設定することが望ましい。アミノ酸分析の変動を小さくするために注意すべき事柄には、試料の調製、試薬の品質や実験操作に起因するスペクトル妨害、装置の性能及び保守、データの解析とその解釈、実験者の技量や癖などがある。バリデーションは、関連するすべてのパラメータについてじゅうぶんに検討する。

試料調製

アミノ酸分析の正確な結果を得るためには精製されたたん白質又はペプチド試料が必要である。緩衝液組成 (例えば、塩類、尿素、界面活性剤) は分析に影響を与えることがあるので、分析の前に試料から取り除く必要があるが、一般にポストカラム誘導化法はプレカラム誘導化法ほどにはこれらの物質の影響を受けない。汚染の可能性を減少させ、回収率を高め、労力を減少させるためには、試料の処理操作の回数を少なくする方がよい。たん白質試料から緩衝液成分を除去する一般的な方法には、1) 逆相 HPLC 装置に試料を注入し、有機性の揮発性溶媒でたん白質を溶出させ、これを真空遠心分離で乾燥させる；2) 揮発性の緩衝液又は水に対して透析する；3) 緩衝液を遠心限外ろ過で揮発性緩衝液又は水に置き換える；4) 有機溶媒 (例えば、アセトン) でたん白質を沈殿させる；5) ゲルろ過、などがある。

内標準物質

アミノ酸分析中での物理的及び化学的損失及び変化をチェックするために、内標準物質を用いることが推奨される。加水分解の前にたん白質溶液に正確な既知量の内標準物質を添加すると、たん白質溶液からのアミノ酸の概略の回収率が内標準物質の回収率から得られる。しかし、たん白質中のアミノ酸の遊離あるいは分解の速度には違いがあるため、遊離アミノ酸の加水分解中の挙動はたん白質に含まれるアミノ酸と同じではない。従って、加水分解中に生じる損失を補正するために内標準物質を用いるとき、信頼できる結果が得られないことがある。結果を解釈するとき、この点を考慮に入れる必要がある。試料の分析ごとの差異及び試液の安定性や流量の変動を補正するために加水分解後のアミノ酸混液に内標準物質を添加することもできる。理想的には、内標準物質は市販品として入手可能で安価な自然界に存在しない α -アミノ酸がよい。しかも、加水分解に対して安定でなければならず、感度も濃度と直線関係にあり、他のアミノ酸と重ならない保持時間を持っていることが必要である。一般的に用いられる内標準物質にはノルロイシン、ニトロチロシン又は α -アミノ酪酸がある。

たん白質の加水分解

たん白質及びペプチドのアミノ酸分析にはこれら試料の加水分解が必要である。加水分解用のガラス器具には誤った結果を避けるために極力清浄にしたものを使用する必要がある。加水分解管壁面の指紋や手袋のパウダーは汚染の原因となる。ガラス製加水分解管は、1 mol/L 塩酸中で 1 時間煮沸するか、硝酸又は塩酸/硝酸混液 (1:1) に浸して洗浄する。洗浄した加水分解管は高純度の水で洗い、更に高速液体クロマトグラフ (HPLC) 用メタノールで洗う。その後、乾燥器で一夜乾燥し、使用するまで覆いをして保存する。ガラス容器を 500°C で 4 時間乾熱して汚染物を除去してもよい。適当な使い捨ての実験用器具を用いることもできる。

酸加水分解は、アミノ酸分析の前にたん白質試料を加水分解する最も一般的な方法である。この加水分解方法はいくつかのアミノ酸を完全に又は部分的に破壊するため、分析結果に変動をもたらすことがある。トリプトファンは破壊され、セリンとスレオニン是一部破壊され、メチオニンは酸化され、システインは一般にシスチンとして回収される (ただし、シスチンの一部は破壊されたりシステインに還元されるため、通常その回収率は低い)。加水分解容器の内部を適切な真空度 (0.0267 kPa 以下) にするか不活性ガス (アルゴン) で置換すると酸化による破壊を抑えることができる。イソロイシンやバリンを含むペプチド結合のうち、Ile-Ile、Val-Val、Ile-Val 及び Val-Ile のアミド結合は一部しか切断されず、アスパラギンとグルタミンは脱アミド化されてそれぞれアスパラギン酸とグルタミン酸になる。酸加水分解中にトリプトファン、アスパラギン及びグルタミンは消失するため、定量できるのは 17 種のアミノ酸に限られる。以下に述べる加水分解法のいくつかはこれらの問題に対処するために利用する。また、この加水分解法のいくつか (すなわち、方法 4 ~ 11) はシステイン、メチオニン、アスパラギン、グルタミンを他のアミノ酸に変換させ

る方法である。従って、酸加水分解以外の方法を用いる前に、その方法を用いることの利点と問題点をよく比較検討しておく。

一部が破壊されるアミノ酸やペプチド結合の開裂が遅いアミノ酸の濃度を分析するために、時間経過に沿った試験（すなわち、酸加水分解時間 24, 48 及び 72 時間での分析）がしばしば行われる。不安定なアミノ酸（すなわち、セリンとスレオニン）の測定濃度を加水分解時間に対してプロットし、得られた直線を時間ゼロに外挿することによりそれらの濃度を決定することができる。時間経過に沿った加水分解試験は開裂の遅いアミノ酸（例えば、イソロイシンやバリン）に対しても用いられ、これらのアミノ酸の濃度がプラトーに達した点を調べ、これをこれらのアミノ酸の濃度とする。加水分解時間が長くなりすぎるとこのアミノ酸の濃度は減少しはじめるが、これはこの加水分解条件で分解することを示している。

時間経過に沿った試験方法に代わる方法として、標準アミノ酸を試料と同一条件で加水分解する方法がある。加水分解において、遊離アミノ酸はペプチドあるいはたん白質中の不安定なアミノ酸の分解速度を完全には再現できない。このことは特に開裂の遅いペプチド結合（例えば、Ile-Val 結合）についていえる。しかし、この方法によって破壊されるアミノ酸の量を測定することができる。マイクロ波による酸加水分解が利用されている。この方法は迅速ではあるが、特別な機器と注意が必要である。マイクロ波加水分解での至適条件はそれぞれの試料たん白質又はペプチドについて調べる必要がある。一般にこの方法での処理時間はわずか数分間であるが、1分間の変動でも適切な結果をもたらさない（例えば、不安定なアミノ酸の不完全な加水分解や破壊）。数種のプロテアーゼを用いた完全たん白質消化も利用されているが、これは処理が複雑で、厳密な調節が必要である。そのため、一般にはたん白質よりもペプチドに適用される。

注：未知たん白質を初めて分析するときには、異なる加水分解時間や温度条件で実験して至適条件を決定する。

方法1

フェノールを含む塩酸を用いた酸加水分解がたん白質又はペプチドの加水分解に用いられる最も一般的な方法である。フェノールの添加はチロシンのハロゲン化を防止する。

加水分解液 フェノールを 0.1 ~ 1.0% 含む 6 mol/L 塩酸。

操作法

液相加水分解 試料たん白質又はペプチドを加水分解管に入れ、乾燥する。（注：試料中の水分で加水分解用の塩酸が希釈されないように、試料を乾燥する。）凍結乾燥たん白質 500 μg 当たり加水分解液 200 μL を加え、ドライアイス-アセトン浴中で凍結させた後、減圧下で管を熔封する。酸化を防ぐため、通常 110°C で 24 時間、減圧下又は不活性ガス置換下で試料を加水分解する。たん白質が完全に加水分解されない懸念がある場合は、長時間の加水分解（例えば、48, 72 時間）についても調べる。

気相加水分解 この方法は最も一般的な酸加水分解法の一つであり、試料が少量しか入手できない場合の微量分析に適している。塩酸からの試料の汚染も本法を用いることによって最小限に抑えられる。乾燥した試料の入ったバイアル瓶を適量の加水分解液を入れた容器の中に置く。このとき、加水分解液が試料の入ったバイアル瓶に入らないように注意する。容器の内部を不活性ガスで置換するか減圧（0.0267 kPa 以下）にして、約 110°C で 24 時間加熱する。気体状の酸が乾燥試料を加水分解する。試料バイアル瓶中での酸の凝結は最小限にする。加水分解後、試料を減圧乾燥して残留する酸を除く。

方法2

加水分解によるトリプトファンの酸化は、メルカプトエタンスルホン酸を酸に用いることで減少させることができる。

加水分解液 2.5 mol/L メルカプトエタンスルホン酸溶液。

気相加水分解 試料たん白質又はペプチド約 1 ~ 100 μg を加水分解管に入れ、乾燥する。この加水分解管を加水分解液約 200 μL を入れたより大きなガラス管の中に入れ、この管を減圧（約 0.067 kPa）下で熔封し、加水分解液を気化させる。これを 170 ~ 185°C で約 12.5 分間加熱する。加水分解後、加水分解管を減圧下で 15 分間乾燥し、残留する酸を除く。

方法3

加水分解によるトリプトファンの酸化はチオグリコール酸を還元剤として用いることによって防げる。

加水分解液 10% トリフルオロ酢酸、20% チオグリコール酸及び 1% フェノールを含む 7 mol/L 塩酸溶液。

気相加水分解 試料たん白質又はペプチド約 10 ~ 50 μg を試料管中で乾燥する。この試料管を加水分解液約 200 μL を入れたより大きなガラス管の中に入れ、この管を減圧（約 0.0067 kPa）下で密封してチオグリコール酸を気化させ、166°C で約 15 ~ 30 分間加熱する。加水分解後、試料管を減圧下で 5 分間乾燥し、残留する酸を除く。この方法によるトリプトファンの回収率は用いる試料の量に依存する。

方法4

たん白質の加水分解に先立ち、過ギ酸を用いてシステイン/シスチン及びメチオニンを酸化する。

酸化液 ギ酸と 30% 過酸化水素を 9 : 1 で混ぜ、1 時間室温に放置する。用時、調製する。

操作法 試料たん白質又はペプチドをギ酸 20 μL に溶かし、50°C で 5 分間加熱した後、酸化液 100 μL を

加え、10～30分間放置する。この反応で、システインはシステイン酸に、メチオニンはメチオニンスルホンに変換される。過剰の試薬は真空遠心分離して試料から除く。ハロゲン化合物が存在するとチロシンの修飾が起こる。過ギ酸酸化したたん白質は方法1又は方法2で加水分解する。

方法5

システイン/シスチンの酸化はアジ化ナトリウムを用いた液相加水分解中に行われる。

加水分解液 0.2%のフェノールを含む6 mol/L塩酸にアジ化ナトリウムを最終濃度0.2 w/v%になるように加える。フェノールはチロシンのハロゲン化を防止する。

液相加水分解 試料たん白質又はペプチドを約110℃で24時間加水分解する。この加水分解中に、試料中のシステイン/シスチンは加水分解液に含まれるアジ化ナトリウムによってシステイン酸に変換される。この方法は方法4よりもチロシンの回収率はよいが、メチオニンは定量的に回収されない。メチオニンは一部が酸化されて、メチオニンスルホキシド及びメチオニンスルホンに変わる。

方法6

システイン/シスチンの酸化はジメチルスルホキシドで行われる。

加水分解液 0.1～1.0%のフェノールを含む6 mol/L塩酸にジメチルスルホキシドを最終濃度2 vol%になるように加える。

気相加水分解 試料たん白質又はペプチドを約110℃で24時間加水分解する。この加水分解中に、試料中のシステイン/シスチンは加水分解液に含まれるジメチルスルホキシドによってシステイン酸に変換される。バラツキを少なくし、部分破壊を補正する方法として、1～8モルのシステインを含む標準たん白質を酸化的加水分解して得られるシステイン酸の回収率を調べることが推奨される。たん白質又はペプチドの加水分解物からの回収率は、加水分解していないシステイン酸標準品からの回収率より一般に約30%低い。ヒスチジン、メチオニン、チロシン及びトリプトファンも修飾されるので、本法では完全なアミノ酸組成分析は行えない。

方法7

システイン/シスチンの還元及びアルキル化は気相ピリジルエチル化反応で行われる。

還元液 ピリジン 83.3 μ L, 4-ビニルピリジン 16.7 μ L, トリブチルホスフィン 16.7 μ L 及び水 83.3 μ L を適当な容器にとり、混和する。

操作法 試料たん白質又はペプチド(1～100 μ g)を加水分解管にとり、この管をより大きなガラス管の中に入れる。大きいガラス管の中に還元液を入れ、減圧(約0.0067 kPa)下で密封し、約100℃で5分間放置する。次に、加水分解管を取り出し、減圧デシケータ中で15分間乾燥し、残留する試薬を除く。ピリジルエチル化したたん白質又はペプチドは前記の方法で酸加水分解する。このピリジルエチル化反応をシステイン1～8モルを含む標準たん白質について同時に行い、ピリジルエチル化システインの回収率を補正する。ピリジルエチル化反応を長時間行くと、たん白質中の末端 α -アミノ基及びピリジンの ϵ -アミノ基が修飾される可能性がある。

方法8

システイン/シスチンの還元及びアルキル化は液相ピリジルエチル化反応で行われる。

原液 次の3種類の原液を調製し、ろ過する。原液A: 4 mmol/L エデト酸二ナトリウムを含むpH 8.5の1 mol/L トリス緩衝液、原液B: 8 mol/L 塩酸グアニジン溶液、原液C: 10% 2-メルカプトエタノール溶液。

還元液 原液B/原液A混液(3:1)を調製し、6 mol/L塩酸グアニジンを含む0.25 mol/L トリス-塩酸緩衝液とする。

操作法 試料約10 μ gを還元液50 μ Lに溶かし、原液C約2.5 μ Lを加える。この液を窒素あるいはアルゴンの存在下で暗所に室温で2時間放置する。次に、この液に4-ビニルピリジン約2 μ Lを加え、更に2時間室温で暗所に放置してピリジルエチル化反応を行う。逆相HPLCを用いてたん白質あるいはペプチド画分を集め、脱塩する。脱塩した試料は酸加水分解する前に、真空遠心分離で乾燥させる。

方法9

システイン/シスチンの還元及びアルキル化は液相カルボキシメチル化反応で行われる。

原液 方法8に従って調製する。

カルボキシメチル化溶液 エタノール(95)1 mL当たりヨードアセタミド100 mgを含む液を調製する。

緩衝液 方法8で調製した還元液を用いる。

操作法 試料を緩衝液50 μ Lに溶かし、原液C約2.5 μ Lを加える。これを窒素あるいはアルゴンの存在下で暗所に室温で2時間放置する。次に、総チオール理論量の1.5倍量のカルボキシメチル化溶液を加え、暗所に室温で更に30分間放置する。(注:たん白質のチオール含量が不明の場合には、たん白質20 nmol当たり100 mmol/Lヨードアセタミド溶液5 μ Lを加える。)反応は過剰の2-メルカプトエタノールを加えて停止させる。たん白質あるいはペプチドの脱塩は逆相HPLCによる分離で行う。酸加水分解する前に、集めた試料は真空遠心分離で乾燥させる。生成したS-カルボキシアミドメチルシステインは酸加水分解の過程でS-カルボキシメチルシステインに変化する。

方法10

システイン/シスチンはジチオジグリコール酸あるいはジチオジプロピオン酸と反応して混合ジスルフィドを生成する。(注:ジチオジグリコール酸あるいはジチオジプロピオン酸のいずれを用いるかはアミノ酸分析からどのような結果を望むかによる。)

還元液 ジチオジグリコール酸(又はジチオジプロピオン酸)の0.2 mol/L水酸化ナトリウム溶液(1 → 100)を調製する。

操作法 試料約20 µgを加水分解管に入れ、還元液5 µLを加える。これに2-プロパノール10 µLを加え、真空遠心分離で水分を除去した後、方法1により加水分解する。この方法の利点は、他のアミノ酸残基が副反応によって誘導体化されず、また加水分解前の試料の脱塩が不必要な点である。

方法11

酸加水分解によってアスパラギンと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換され、アスパラギンとアスパラギン酸を合わせてAsxで表し、グルタミンとグルタミン酸を合わせてGlxで表す。たん白質あるいはペプチドはビス(1,1-トリフルオロアセトキシ)ヨードベンゼン(BTI)と反応し、加水分解によってアスパラギン及びグルタミンはそれぞれジアミノプロピオン酸及びジアミノ酪酸に変化する。この変化によりアスパラギン酸及びグルタミン酸を含むたん白質あるいはペプチド中のアスパラギン及びグルタミンの含量を測定することができる。

還元液 次の3種類の溶液を調製し、ろ過する。溶液A:10 mmol/Lトリフルオロ酢酸溶液、溶液B:5 mol/L塩酸グアニジン及び10 mmol/Lトリフルオロ酢酸を含む水溶液、溶液C:用時調製したビス(1,1-トリフルオロアセトキシ)ヨードベンゼンの*N,N*-ジメチルホルムアミド溶液(9 → 250)。

操作法 洗浄した加水分解管に試料約200 µgをとり、溶液A又は溶液B 2 mL及び溶液C 2 mLを加え、減圧下で加水分解管を密封する。これを暗所で60°C、4時間加熱する。次にこの試料を水に対して透析し、過剰の試薬を除く。透析した試料を同量の*n*-ブチル酢酸で3回抽出した後、凍結乾燥する。このたん白質試料を前述した方法で酸加水分解する。ジアミノプロピオン酸及びジアミノ酪酸はアミノ酸分析で用いるイオン交換クロマトグラフィーでは通常リジンとは分離しない。したがって、アミノ酸分離モードでイオン交換クロマトグラフィーを行ったときは、アスパラギン及びグルタミンの含有量は非誘導体化酸加水分解とBTI誘導体化酸加水分解で得られたアスパラギン酸及びグルタミン酸の量の差として求められる。

(注:スレオニン、メチオニン、システイン、チロシン及びヒスチジンの測定値はBTI誘導体化によって変動することがある。したがって、これらのアミノ酸の組成を求める場合は、BTIを用いない加水分解法を行う必要がある。)

アミノ酸分析の方法論とその基本原理

アミノ酸の分析には多くの方法があり、どの方法を選ぶかは測定に要求される感度に依存する。一般に、用いられているほぼ半数の方法はイオン交換クロマトグラフィーで遊離アミノ酸を分離した後に誘導体化(例えば、ニンヒドリンや*o*-フタルアルデヒドによる誘導体化)して検出するポストカラム法である。この方法は塩類や尿素などの少量の緩衝液成分を含む試料に利用することができ、1分析当たり通常5 ~ 10 µgのたん白質試料を必要とする。その他の方法は一般に遊離アミノ酸を誘導体化(例えば、フェニルイソチオシアネート、6-アミノキノイル-*N*-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメイト、*o*-フタルアルデヒド、(ジメチルアミノ)アゾベンゼンスルホニルクロリド、9-フルオレニルメチルクロロギ酸、7-フルオロ-4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾールなどによる誘導体化)した後に逆相HPLCで分離するプレカラム法である。この方法は感度が非常に高く、通常1分析当たり0.5 ~ 1.0 µgのたん白質試料でよいが、試料中の塩類の影響を受けやすい。更に、複数のアミノ酸誘導体を生じ、結果の解釈を複雑にする可能性がある。操作上の変動に対して、一般にポストカラム法の方がプレカラム法に比べて影響を受けにくい。

次に掲げる方法がアミノ酸の定量分析に利用できる。これらの方法に用いる装置及び試薬類は市販されている。これらの方法には、試液の調製法、反応の操作法、クロマトグラフィーのシステムなどが異なる多くの変法がある。特定のパラメータは実際に使用する装置や操作によって変わってくる。多くの実験室では各方法の持つ利点を利用するために一つ以上の分析方法を用いている。これらの各方法では、アナログ信号がデータ取り込み装置によって視覚化され、定量するためにピーク面積が計算される。

方法1 ニンヒドリンによるポストカラム検出法

ポストカラムでニンヒドリンにより検出するイオン交換クロマトグラフィーは定量的アミノ酸分析に利用される最も一般的な方法の一つである。通例、より複雑な生体試料の分析にはLi⁺を基本とした陽イオン交換系を利用し、Na⁺を基本とした陽イオン交換系はたん白質の加水分解で得られる単純なアミノ酸混合物(通常17種のアミノ酸成分を含む)の分析に用いられる。イオン交換カラム上でのアミノ酸の分離はpH及びイオン強度の変化を組み合わせて行われる。分離を良くするために温度の勾配変化もしばしば使用される。

アミノ酸がニンヒドリンと反応すると、特徴的な紫色又は黄色を呈する。イミノ酸以外のアミノ酸は紫色を呈し、波長570 nmに吸収の極大を示す。プロリンのようなイミノ酸は黄色を呈し、波長440 nmに吸

収の極大を示す。カラムから溶出したアミノ酸とニンヒドリンの反応は 440 nm と 570 nm の両波長で記録し、得られたクロマトグラムはアミノ酸組成の決定に利用される。

検出限界はほとんどのアミノ酸で約 10 pmol であるが、プロリンでは約 50 pmol である。20 pmol から 500 pmol の範囲で相関係数 0.999 以上の良好な直線性が得られる。良好な組成値を求めるには、加水分解前の量として 1 µg 以上のたん白質試料を用いるのがこの分析方法にとって最も適している。

方法2 OPA によるポストカラム蛍光検出法

o-フタルアルデヒド (OPA) はチオール化合物の存在下で一級アミンと反応し、強い蛍光を持つイソインドール化合物を生成する。この反応は、イオン交換クロマトグラフ法によるアミノ酸分析のポストカラム誘導体化法として利用される。アミノ酸の分離は方法 1 と同じ原理である。この方法を用いたアミノ酸分析装置とその試薬は市販されている。また、この方法には多くの変法がある。

OPA は二級アミン (プロリンなどのイミノ酸) とは反応しないので、OPA と反応するように二級アミンを次亜塩素酸ナトリウムで酸化し、蛍光誘導体を生成させる。強酸性陽イオン交換カラムを用いて遊離アミノ酸を分離し、続いて次亜塩素酸ナトリウムで酸化し、OPA 及び *N*-アセチル-L-システインや 2-メルカプトエタノールのようなチオール化合物を用いて誘導体化する。 α -アミノ酸の誘導体化は次亜塩素酸ナトリウムの影響をほとんど受けない。

イオン交換カラムでのアミノ酸の分離は pH 及びイオン強度の変化を組み合わせで行う。溶出したアミノ酸を OPA で誘導体化した後、反応物は蛍光検出器を通過させる。OPA-誘導体化アミノ酸の蛍光強度は励起波長 348 nm、蛍光波長 450 nm で測定する。

検出限界はほとんどのアミノ酸誘導体で数 10 pmol のレベルである。数 pmol から数 10 nmol の範囲で直線性が得られる。良好な組成値を求めるには、加水分解前の量として 500 ng 以上の試料で分析を始めるのがこの方法にとって最も適している。

方法3 PITC プレカラム誘導体化法

フェニルイソチオシアネート (PITC) はアミノ酸と反応してフェニルチオカルバミル (PTC) 誘導体を生成する。この誘導体は波長 245 nm で高感度に検出することができる。そのため、アミノ酸を PITC で誘導体化し、逆相 HPLC で分離した後に紫外吸光度計で検出し、アミノ酸組成を分析する。

誘導体化されたアミノ酸は、試薬を減圧下で除いた後、乾燥して凍結すれば数週間は安定に保存することができる。装置に注入するために溶解したものは、冷所に保存すれば、3 日間はクロマトグラフ上での目立った変化は起こらない。

ODS カラムを用いた逆相 HPLC での PTC-アミノ酸の分離はアセトニトリル濃度と緩衝液のイオン強度の変化を組み合わせで行う。カラムから溶出した PTC-アミノ酸は波長 254 nm で検出する。

検出限界はほとんどのアミノ酸誘導体で 1 pmol である。20 pmol から 500 pmol の範囲で相関係数 0.999 以上の良好な直線性が得られる。良好な組成値を求めるには、加水分解前の量として 500 ng 以上の試料を用いるのがこの分析方法にとって最も適している。

方法4 AQC プレカラム誘導体化法

カラムに掛ける前にアミノ酸を 6-アミノキノリル-*N*-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメイト (AQC) で誘導体化し、逆相 HPLC で分離した後に蛍光光度計で検出する方法である。

AQC はアミノ酸と反応して安定な蛍光性尿素誘導体 (AQC-アミノ酸) を生成する。AQC-アミノ酸は逆相 HPLC で容易に分析できる。したがって、AQC でアミノ酸を誘導体化し、逆相 HPLC で分離することによって、アミノ酸組成を分析することができる。

ODS カラムでの AQC-アミノ酸の分離はアセトニトリル濃度と塩濃度の変化を組み合わせで行う。この誘導体の蛍光は励起波長 250 nm、蛍光波長 395 nm で選択的に検出できるので、反応液を直接カラムに注入しても蛍光試薬の主要な副生成物である 6-アミノキノリンの妨害はほとんど受けない。過剰の試薬は直ちに 6-アミノキノリン、*N*-ヒドロキシスクシンイミド及び二酸化炭素に加水分解されるので ($t_{1/2} < 15$ 秒)、1 分後にはもはや誘導体化反応は起こらない。

AQC-アミノ酸のピーク面積は反応液を室温で放置しても少なくとも 1 週間は変化しない。この誘導体は非常に安定であるので、自動分析装置で一晩中分析することができる。

検出限界はシステイン以外のアミノ酸で約 40 ~ 320 fmol であり、システインの検出限界は約 800 fmol である。2.5 ~ 200 µmol/L の範囲で相関係数 0.999 以上の良好な直線性が得られる。良好なデータは、試料たん白質又はペプチド 30 ng に対応する加水分解物の分析で得られる。

方法5 OPA プレカラム誘導体化法

カラムに掛ける前にアミノ酸を *o*-フタルアルデヒド (OPA) で誘導体化し、逆相 HPLC で分離した後に蛍光光度計で検出する方法である。この方法では二級アミンのアミノ酸 (例えば、プロリン) は検出しない。

OPA はチオール試薬の共存下で一級アミンと反応し、強い蛍光を持つイソインドール化合物を生成する。2-メルカプトエタノールや 3-メルカプトプロピオン酸がチオール化合物として用いられる。OPA はそれ自

体が蛍光を持たないので、妨害ピークは現れない。更に、速やかに反応することに加えて、水によく溶け、水溶液での安定性が高いことから、誘導体化と分析を自動化しやすい。この自動化には試料と試薬を混合するためのオートサンプラーを使用する。しかし、二級アミンと反応しないことが大きな欠点であり、この方法では二級アミンとして存在するアミノ酸（例えば、プロリン）が検出できない。この欠点を補うために、方法7又は方法8の分析法を組み合わせて行う。

OPAでプレカラム誘導体化したアミノ酸は逆相HPLCで分離する。OPA-アミノ酸誘導体は不安定であるので、HPLCでの分離と分析は誘導体化した後直ちに行う。HPLCにはアミノ酸誘導体を検出するために蛍光検出器を取り付ける。OPA-アミノ酸誘導体の蛍光強度は励起波長348 nm、蛍光波長450 nmで測定する。

検出限界は50 fmol以下と言われているが、実際の分析における限界は1 pmolである。

方法6 DABS-Clプレカラム誘導体化法

アミノ酸を(ジメチルアミノ)アゾベンゼンスルホニルクロリド(DABS-Cl)で誘導体化し、逆相HPLCで分離して可視光で検出する方法である。

DABS-Clはアミノ酸の標識に用いる発色性試薬である。DABS-Clで標識したアミノ酸(DABS-アミノ酸)は非常に安定であり、波長436 nmに極大吸収を示す。

19種の天然にあるすべてのアミノ酸のDABS誘導体は、アセトニトリルと緩衝液からなるグラジエント溶出系を用いた逆相HPLCのODSカラムで分離することができる。カラムから分離して溶出したDABS-アミノ酸は可視領域の波長436 nmで検出する。

この方法はプロリンのようなイミノ酸も他のアミノ酸と同程度の感度で測定できる。また、「たん白質加水分解」の項の方法2に示した加水分解法、すなわちメルカプトエタンスルホン酸、*p*-トルエンスルホン酸又はメタンスルホン酸のようなスルホン酸類でたん白質又はペプチドを加水分解することによって、DABS-Cl誘導体化はトリプトファンも同時に定量できる。アスパラギンやグルタミンのような酸に不安定なアミノ酸も、「たん白質加水分解」の項の方法11に示したたん白質又はペプチドのBTI処理でそれぞれをジアミノプロピオン酸及びジアミノ酪酸に変換することによって分析することができる。

非たん白質性アミノ酸であるノルロイシンは、 α -アミノ酸のピークと重なって溶出するので、本法の内標準物質としては使用できない。ニトロチロシンはいずれのアミノ酸ピークとも重ならないので、内標準物質に使用できる。

DABS-アミノ酸の検出限界は約1 pmolである。2～5 pmolの各DABS-アミノ酸が信頼性を持って定量的に測定でき、1分析当たりDABS化したたん白質加水分解物10～30 ngが必要である。

方法7 FMOC-Clプレカラム誘導体化法

9-フルオレニルメチルクロロギ酸(FMOC-Cl)によりアミノ酸を誘導体化し、これを逆相HPLCで分離して蛍光で検出する方法である。

FMOC-Clは一級アミンと二級アミンの両方と反応し、強い蛍光を持つ物質を生成する。アミノ酸とFMOC-Clの反応は水溶液中、緩和な条件下で進行し、30秒で反応は完了する。この誘導体は安定であるが、ただヒスチジン誘導体だけは分解していく。FMOC-Clはそれ自体が蛍光をもっているが、過剰のこの試薬と蛍光性副生成物はFMOC-アミノ酸を消失させることなく除くことができる。

FMOC-アミノ酸はODSカラムを用いた逆相HPLCで分離される。この分離は、酢酸塩緩衝液/メタノール/アセトニトリル混液(5:4:1)から酢酸塩緩衝液/アセトニトリル混液(1:1)に直線的に変化させるグラジエント溶出で行われ、20種のアミノ酸誘導体は20分で分離される。カラムから溶出した各誘導体は励起波長を260 nm、蛍光波長を313 nmに設定した蛍光光度計で検出される。

検出限界は数 fmolである。0.1～50 μ mol/Lの範囲でほとんどのアミノ酸は直線性を示す。

方法8 NBD-Fプレカラム誘導体化法

7-フルオロ-4-ニトロベンゼン-2-オキサ-1,3-ジアゾール(NBD-F)によりアミノ酸を誘導体化し、これを逆相HPLCで分離して蛍光で検出する方法である。

NBD-Fは一級アミンと二級アミンの両方と反応し、強い蛍光を持つ物質を生成する。アミノ酸はNBD-Fと60℃で5分間加熱することによって誘導体化される。NBD-アミノ酸誘導体は、アセトニトリルと緩衝液の混液からなるグラジエント溶出系を用いることによって逆相HPLCのODSカラムで分離され、17種のアミノ酸誘導体は35分で分離される。 ϵ -アミノカプロン酸はクロマトグラム領域の平坦部に溶出するので、内標準物質として使用できる。カラムから溶出した各誘導体は励起波長を480 nm、蛍光波長を530 nmに設定した蛍光光度計で検出される。

この方法の感度は、OPAと反応しないプロリンを除いて、OPAプレカラム誘導体化法(方法5)の感度とほとんど同じであり、OPAと比べてNBD-Fの方が都合がよいかもしれない。各アミノ酸の検出限界は約10 fmolである。最終の標識反応溶液中に約1.5 μ gのたん白質加水分解物が含まれていれば、分析することができる。

データの計算と解析

たん白質あるいはペプチドの加水分解物中のアミノ酸含量を測定するときには、酸加水分解の段階でトリプトファンとシステインが分解されていることに注意する必要がある。セリンとスレオニンは酸加水分解により一部が分解され、イソロイシンとバリンは一部しか遊離されないことがある。メチオニンは酸加水分解中に酸化を受け、またあるアミノ酸（例えば、グリシンやセリン）は外部から混入しやすい。気相加水分解で反応容器中を適切な真空度（26.7 Pa 以下）にするか、あるいは不活性ガス（アルゴン）で置換すると酸化による破壊の程度を低くすることができる。したがって、たん白質あるいはペプチドの加水分解物中のシステイン、トリプトファン、スレオニン、イソロイシン、バリン、メチオニン、グリシン及びセリンの定量値は変動しやすく、その解析にはより一層の検討と考察が必要である。

計算

アミノ酸のモル% アミノ酸のモル%とは、たん白質中の 100 アミノ酸残基当たりの特定アミノ酸残基数である。この値は試験するたん白質の分子量が明らかでないときのアミノ酸分析データを評価するのに有用である。この情報はたん白質あるいはペプチドの同定やその他の目的に利用できる。それぞれの分析方法に従って得られたピークを注意深く同定し、面積を測定する。試料中の各アミノ酸のモル%を次式により計算する。

$$100r_U/r$$

r_U : 個々のアミノ酸のピーク面積から求めた量 (nmol)

r : 試料中の全アミノ酸のピーク面積から求めた量 (nmol) の合計

得られた各アミノ酸のモル%を既知たん白質のそれと比較することにより試料たん白質を同定することができる。

未知たん白質試料 このデータ解析法は、アミノ酸分析データを用いて未知たん白質試料のたん白質濃度を推定するのに利用できる。次式により回収された各アミノ酸の質量 (μg) を計算する。

$$mM_w/1000$$

m : 回収されたアミノ酸の量 (nmol)

M_w : ペプチド結合で除かれた水分子の質量を補正したアミノ酸の平均分子量

回収されたアミノ酸の質量の総計は、部分的あるいは完全に破壊されたアミノ酸を適切に補正した後のたん白質の総質量の推定値となる。未知たん白質の分子量が SDS-PAGE や質量分析で判れば、そのアミノ酸組成が予測できる。次式により各アミノ酸の残基数を計算する。

$$m/(1000M/M_{WT})$$

m : 回収されたアミノ酸の量 (nmol)

M : たん白質の総質量 (μg)

M_{WT} : 未知たん白質の分子量

既知たん白質試料 このデータ解析法は、分子量とアミノ酸組成が既知のたん白質試料のアミノ酸組成及びたん白質濃度をアミノ酸分析データを用いて調べるのに利用できる。分析しようとするたん白質のアミノ酸組成が明らかなきときは、あるアミノ酸の回収率は良好であるが、他のアミノ酸の回収率が完全又は部分的な破壊（例えば、トリプトファン、システイン、スレオニン、セリン、メチオニン）やペプチド結合の不完全開裂（すなわち、イソロイシンとバリンの開裂）あるいは遊離アミノ酸の外部からの混入（すなわち、グリシンやセリンの混入）のために必ずしもじゅうぶんでない場合にこの解析法を活用することができる。

回収率の最も良いアミノ酸はそのたん白質を代表しているため、そのアミノ酸がたん白質を定量するのに利用される。一般に回収率の良いアミノ酸にはアスパラギン酸/アスパラギン、グルタミン酸/グルタミン、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、リジン、アルギニンがある。これら回収率の良いアミノ酸の種類は各自の分析装置での経験によって変わる。回収率の良い各アミノ酸の量 (nmol 数) をそのアミノ酸の理論量で除し、回収率の良い各アミノ酸に基づいたたん白質量を求め、これらの値を平均する。回収率の良い各アミノ酸によって求めたたん白質量は平均値に対して均等に分布していなければならない。平均値から大きくはずれた値は除外する。通常、平均値からの偏差が 5% を超えるものは除外の対象と考えられる。残りの値から平均値を再計算して試料のたん白質量を求める。各アミノ酸の含量を計算で求めた平均たん白質量で除して試料のアミノ酸組成を求める。

相対組成誤差 (%) を次式により計算する。

$100m/m_s$

m : アミノ酸の実測値 (アミノ酸残基当たりの nmol)

m_s : 当該アミノ酸の理論量

平均相対組成誤差は各アミノ酸の相対組成誤差の絶対値の平均であり、通常、トリプトファン及びシステインはこの計算からは除かれる。この平均相対組成誤差はアミノ酸分析の全過程が適切に行われたかどうかについての重要な情報となる。たん白質試料のアミノ酸組成と既知組成との一致性は試料中のたん白質の同定と純度の保証に利用できる。