

第4章

アミノ酸

34 一般のアミノ酸^{*}、ヒドロキシプロリン及びアンモニア

^{*}イソロイシン、ロイシン、リシン（リジン）、フェニルアラニン、チロシン、トレオニン（スレオニン）、バリン、ヒスチジン、アルギニン、アラニン、アスパラギン酸（注1）、グルタミン酸（注1）、グリシン、プロリン、セリン

34-1. カラムクロマトグラフ法

適用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

アミノ酸自動分析計

恒温乾燥器

ガラス細工用バーナー

封管用試験管

真空ポンプ

(2) 試薬

アミノ酸混合標準溶液：アミノ酸混合標準液（和光純薬工業(株) Type H）及びヒドロキシプロリン標準原液をクエン酸ナトリウム緩衝液（0.067 mol/L, pH 2.2）で希釈して各アミノ酸濃度が 0.1 μmol/mL となるようにする。

ヒドロキシプロリン標準原液：ヒドロキシプロリン標準品（和光純薬工業(株)）81.95 mg を 0.01 mol/L 塩酸で250 mL に定容する。

12 mol/L 塩酸：アミノ酸自動分析用36 % 塩酸を使用する。

6 mol/L 塩酸：精密分析用20 % 塩酸を使用する。

2-メルカプトエタノール：1級

6 mol/L 塩酸（0.04 %（v/v）2-メルカプトエタノール含有）：20 % 塩酸（精密分析用）500 mL に 2-メルカプトエタノール0.2 mL を加えて混合する。

クエン酸ナトリウム緩衝液（0.067 mol/L, pH 2.2）：クエン酸三ナトリウム二水和物（アミノ酸自動分析用）980 g に水約3.5 L を加えて溶かし、12 mol/L 塩酸約700 mL 及びオクタン酸（アミノ酸自動分析用）5 mL を加え、6 mol/L 塩酸で pH 2.2 に調整した後、水で5 L に定容し、クエン酸ナトリウム緩衝液原液とする。

クエン酸ナトリウム緩衝液原液500 mL にチオジエチレングリコール（アミノ酸自動分析用）100 mL 及び水4 L を加え、6 mol/L 塩酸で pH 2.2 に調整した後、水で5 L に定容する。

3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム（特級）120 g を水に溶解し、1 L に定容する。

(3) 操作

1) 試料溶液の調製

試料0.2~1.5 g（W）を封管用試験管に正確にはかりとり、6 mol/L 塩酸（0.04 %（v/v）2-メルカプトエタノール含有）20 mL を加える。この試験管を減圧下（2.0 kPa（15 mmHg）以下）で15分間

脱気後、封管し、110℃（恒温乾燥器）で24時間加水分解を行う。加水分解後、冷却、開管し、加水分解液を容量100 mL 全量フラスコに移し水で定容（V）する。定容した加水分解液の適当量を取り、3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH を 2.2 に調整後、クエン酸ナトリウム緩衝液（0.067 mol/L, pH 2.2）で定容し 0.45 μm のフィルターでろ過したものを試料溶液（注2）とする。

2) 測定

試料溶液 30 μL をアミノ酸自動分析計に注入し、各アミノ酸のピーク面積又は高さを測定し、あらかじめ標準溶液 30 μL をアミノ酸自動分析計に注入して得られたピーク面積又は高さから、試料中の各アミノ酸含量及びアンモニア含量を求める。

[アミノ酸自動分析計（注3）の操作条件例]

カラム：強酸性陽イオン交換樹脂、内径 4 mm、長さ 120 mm、ステンレス製（注4）

移動相：クエン酸ナトリウム緩衝液（注5）

反応液：ニンヒドリン試薬（注6）

波長：570 nm 又は 440 nm

本条件によるアミノ酸混合標準溶液のクロマトグラム例を図 4-1 に示した。

(4) 計算

アミノ酸自動分析計によって得られたクロマトグラムから積分計でピーク面積又は高さを求め、以下の式により試料中のアミノ酸含量及びアンモニア含量を計算する。

$$\text{アミノ酸含量及びアンモニア含量 (mg/100 g)} = 0.1 \times MW \times \frac{A}{B} \times V \times N \times \frac{10^{-3}}{W} \times 100$$

0.1：標準溶液の濃度（μmol/mL）

MW：各アミノ酸及びアンモニアの分子量

A：試験溶液のピーク面積又は高さ

B：標準溶液のピーク面積又は高さ

V：定容量（mL）

N：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[計算に使用した各アミノ酸及びアンモニアの分子量]

アスパラギン酸 133.1, トレオニン（スレオニン） 119.1, セリン 105.1, グルタミン酸 147.1, プロリン 115.1, グリシン 75.1, アラニン 89.1, バリン 117.2, イソロイシン 131.2, ロイシン 131.2, チロシン 181.2, フェニルアラニン 165.2, ヒスチジン 155.2, リシン（リジン） 146.2, アルギニン 174.2, ヒドロキシプロリン 131.1, アンモニア 17.0

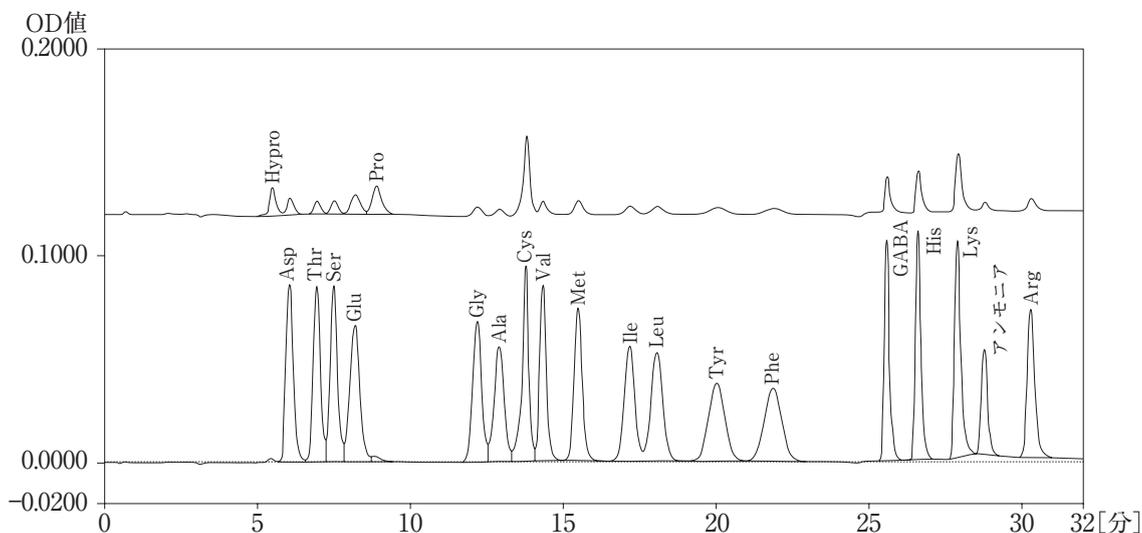


図 4-1 アミノ酸混合標準溶液のクロマトグラム例

Asp：アスパラギン酸， Thr：トレオニン（スレオニン）， Ser：セリン， Glu：グルタミン酸， Pro：プロリン， Gly：グリシン， Ala：アラニン， Cys：シスチン*， Val：バリン， Met：メチオニン， Ile：イソロイシン， Leu：ロイシン， Tyr：チロシン， Phe：フェニルアラニン， His：ヒスチジン， Lys：リシン（リジン）， Arg：アルギニン， Hypro：ヒドロキシプロリン， GABA： γ -アミノ酪酸*

* Cys, GABA は定量には使用せず。

注 解

(注 1) アスパラギン， グルタミンは加水分解の際にそれぞれアスパラギン酸， グルタミン酸となるため， アスパラギン酸はアスパラギンを， グルタミン酸はグルタミンを含んだ量となる。

(注 2) 標準溶液と比較してピークが小さい場合は， 濃縮してもよい。加水分解液の適当量を取り， 減圧濃縮乾固後， 内容物をクエン酸ナトリウム緩衝液（0.067 mol/L， pH 2.2）で溶解する。

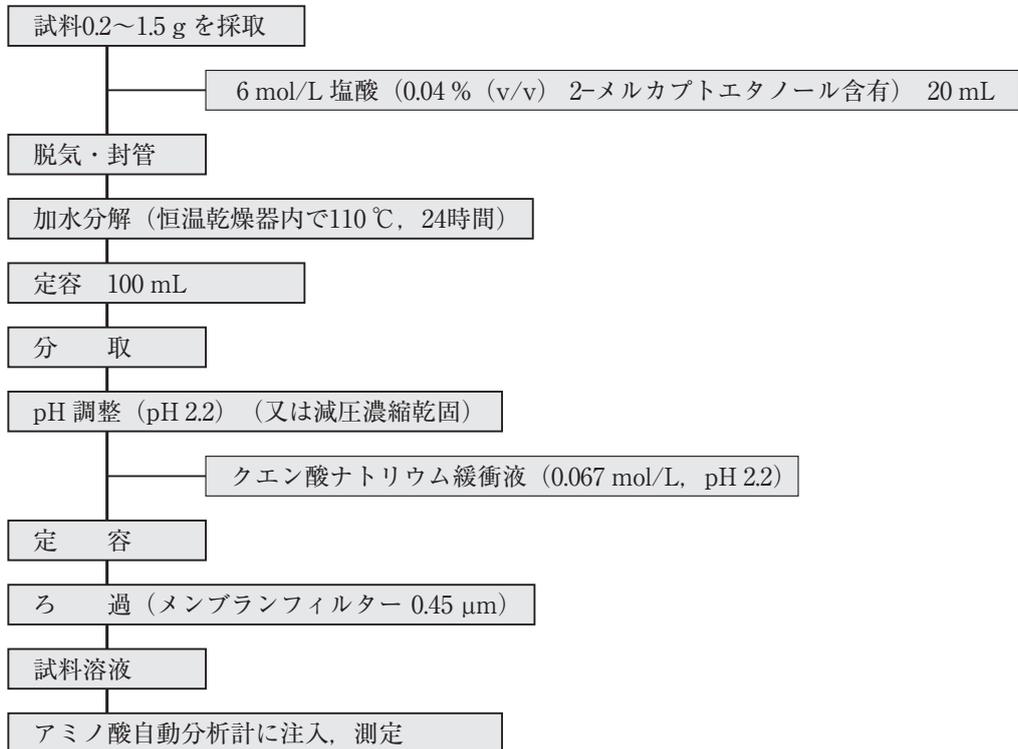
(注 3) アミノ酸自動分析計は JLC-500/V（日本電子（株））， L-8800（（株）日立製作所）又は相当品を用いる。

(注 4) LCR-6（日本電子（株））又は相当品を用いる。

(注 5) クエン酸ナトリウム緩衝液（H-01， H-02， H-03， H-04（日本電子（株））又は相当品を用いる。

(注 6) 日本電子用ニンヒドリン発色溶液キット-II（和光純薬工業（株））あるいは相当品を用いる。

一般のアミノ酸、ヒドロキシプロリン及びアンモニア定量法・フローチャート



35-1. カラムクロマトグラフ法（過ギ酸酸化法）

適用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

アミノ酸自動分析計

油浴

冷蔵庫

なす形フラスコ：容量200 mL

ロータリーエバポレーター

(2) 試 薬

標準溶液：L-システイン酸標準品84.58 mg 及び DL-メチオニンスルホン標準品90.60 mg を正確にはかりとる。0.01 mol/L 塩酸に溶解後、200 mL に定容し、クエン酸ナトリウム緩衝液（0.067 mol/L, pH 2.2）で25倍希釈する（シスチン0.05 $\mu\text{mol/mL}$ 、メチオニン0.1 $\mu\text{mol/mL}$ 相当）。

過ギ酸溶液：ギ酸（特級）と過酸化水素水（特級）を9：1の容量割合で混合し、室温で1時間放置後、使用する。

12 mol/L 塩酸：アミノ酸自動分析用36% 塩酸を使用する。

6 mol/L 塩酸：精密分析用20% 塩酸を使用する。

クエン酸ナトリウム緩衝液（0.067 mol/L, pH 2.2）：クエン酸三ナトリウム二水和物（アミノ酸自動分析用）980 g に水約3.5 L を加えて溶かし、12 mol/L 塩酸約700 mL 及びオクタン酸（アミノ酸自動分析用）5 mL を加え、6 mol/L 塩酸でpH 2.2に調整した後、水で5 L に定容し、クエン酸ナトリウム緩衝液原液とする。

クエン酸ナトリウム緩衝液原液500 mL にチオジエチレングリコール（アミノ酸自動分析用）100 mL 及び水4 L を加え、6 mol/L 塩酸でpH 2.2に調整した後、水で5 L に定容する。

(3) 操 作

1) 試料溶液の調製

試料0.3~1.5 g (*W*) を容量200 mL なす形フラスコに正確にはかりとり、過ギ酸溶液25 mL を加え、冷蔵庫で16時間過ギ酸酸化を行う（注1）。酸化処理後、減圧濃縮乾固し、6 mol/L 塩酸50 mL を加え、130~140 °C 油浴中で20時間加水分解する。冷却後、加水分解液を容量100 mL 全量フラスコに移し定容（*V*）する。定容した加水分解液の適量を取り、減圧濃縮乾固し、内容物をクエン酸ナトリウム緩衝液（0.067 mol/L, pH 2.2）で溶解し0.45 μm のフィルターでろ過したものを試料溶液とする。

2) 測 定

試料溶液100 μL をアミノ酸自動分析計に注入し、システイン酸及びメチオニンスルホンのピーク面積又は高さを測定し、あらかじめ標準溶液100 μL をアミノ酸自動分析計に注入して得られたピーク面積又は高さから、試料中のシスチン含量及びメチオニン含量を求める。

[アミノ酸自動分析計（注2）の操作条件例]

カラム：強酸性陽イオン交換樹脂、内径4 mm、長さ120 mm、ステンレス製（注3）

移動相：クエン酸リチウム緩衝液（注4）

反応液：ニンヒドリン試薬（注5）

波長：570 nm

本条件による混合標準溶液のクロマトグラム例を図4-2に示した。

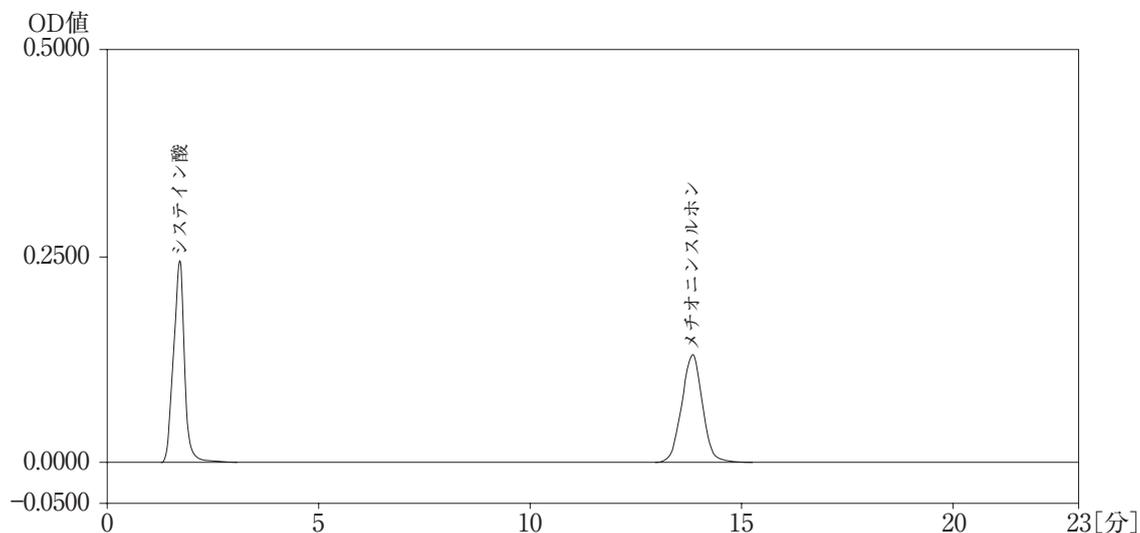


図4-2 混合標準溶液のクロマトグラム例

(4) 計 算

アミノ酸自動分析計によって得られたクロマトグラムから積分計でピーク面積又は高さを求め、以下の式により試料中のシスチン含量又はメチオニン含量を計算する。

$$\text{シスチン含量又はメチオニン含量 (mg/100 g)} = 0.1 \times MW \times \frac{A}{B} \times V \times N \times \frac{10^{-3}}{W} \times 100$$

0.1：標準溶液の濃度 (μmol/mL)

MW：各アミノ酸の分子量

A：試験溶液のピーク面積又は高さ

B：標準溶液のピーク面積又は高さ

V：定容量 (mL)

N：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

[計算に使用した各アミノ酸の分子量]

1/2 シスチン 240.3/2, メチオニン 149.2

注 解

(注1) シスチンはシステインが酸化されて2分子結合したもの。シスチン（システインを含む）及びメチオニンは塩酸による加水分解では破壊されるため、加水分解前に過ギ酸酸化を行い、それぞれ安定なシステイン酸及びメチオニンスルホンとする。

(注2) アミノ酸自動分析計はJLC-500/V（日本電子(株)）、L-8800（(株)日立製作所）又は相当品を用いる。

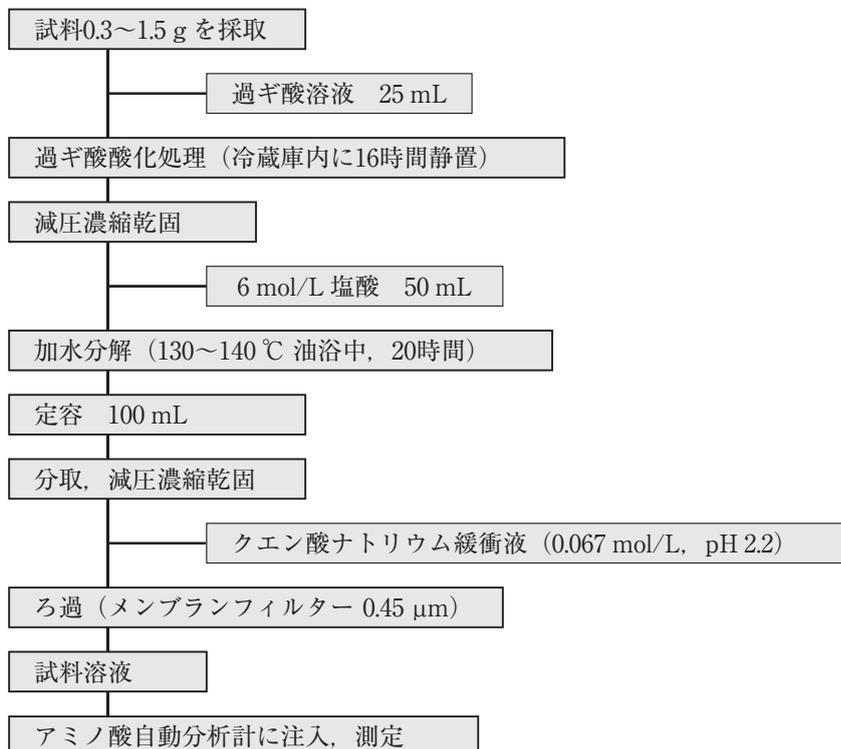
(注3) LCR-6 (日本電子(株)) 又は相当品を用いる。

(注4) クエン酸リチウム緩衝液 (P-21) (日本電子(株)) 又は相当品を用いる。

ただし、P-11は 6 mol/L 塩酸で pH を 2.83 に調整後使用する。

(注5) 日本電子用ニンヒドリン発色溶液キット-II (和光純薬工業(株)) 又は相当品を用いる。

シスチン及びメチオニン定量法・フローチャート



36 メチオニン

36-1. カラムクロマトグラフ法

適用

食品全般に用いる。ただし、35. シスチン及びメチオニンの方法に従って分析を行ったとき、メチオニンが妨害ピークの影響により分離できない場合に限る。

測定方法

(1) 装置及び器具

アミノ酸自動分析計

油浴

なす形フラスコ：容量100 mL

(2) 試 薬

アミノ酸混合標準溶液：アミノ酸混合標準液（和光純薬工業(株) Type H）をクエン酸ナトリウム緩衝液（0.067 mol/L, pH 2.2）で希釈して各アミノ酸濃度が $0.1 \mu\text{mol/mL}$ となるようにする。

12 mol/L 塩酸：アミノ酸自動分析用36 % 塩酸を使用する。

6 mol/L 塩酸：精密分析用20 % 塩酸を使用する。

2-メルカプトエタノール：1 級

6 mol/L 塩酸（0.1 %（v/v）2-メルカプトエタノール含有）：20 % 塩酸（精密分析用）500 mL に2-メルカプトエタノール0.5 mL を加えて混合する。

クエン酸ナトリウム緩衝液（0.067 mol/L, pH 2.2）：クエン酸三ナトリウム二水和物（アミノ酸自動分析用）980 g に水約3.5 L を加えて溶かし、12 mol/L 塩酸約700 mL 及びオクタン酸（アミノ酸自動分析用）5 mL を加え、6 mol/L 塩酸でpH 2.2に調整した後、水で5 L に定容し、クエン酸ナトリウム緩衝液原液とする。

クエン酸ナトリウム緩衝液原液500 mL にチオジエチレングリコール（アミノ酸自動分析用）100 mL 及び水4 L を加え、6 mol/L 塩酸でpH 2.2に調整した後、水で5 L に定容する。

3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム（特級）120 g を水に溶解し、1 L に定容する。

(3) 操 作

1) 試料溶液の調製

試料0.2~2.5 g (*W*) を容量100 mL なす形フラスコに正確にはかりとり、6 mol/L 塩酸（0.1 %（v/v）2-メルカプトエタノール含有）50 mL を加え、窒素ガスを吹き込みながら、130~140 °C 油浴中で20~24時間加水分解する。冷却後、加水分解液を容量100 mL 全量フラスコに移し定容（*V*）する。定容した加水分解液の適量を取り、3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液でpH を2.2に調整後、クエン酸ナトリウム緩衝液（0.067 mol/L, pH 2.2）で定容し0.45 μm のフィルターでろ過したものを試料溶液（注1）とする。

2) 測 定

試料溶液30 μL をアミノ酸自動分析計に注入し、メチオニンのピーク面積又は高さを測定し、あらかじめ標準溶液30 μL をアミノ酸自動分析計に注入して得られたピーク面積又は高さから、試料中のメチオニン含量を求める。

[アミノ酸自動分析計（注2）の操作条件例]

カラム：強酸性陽イオン交換樹脂，内径4 mm，長さ120 mm，ステンレス製（注3）

移動相：クエン酸ナトリウム緩衝液（注4）

反応液：ニンヒドリン試薬（注5）

波長：570 nm

本条件による標準溶液のクロマトグラム例は図4-1を参照。

（4）計 算

アミノ酸自動分析計によって得られたクロマトグラムから積分計でピーク面積又は高さを求め，以下の式により試料中のメチオニン含量を計算する。

$$\text{メチオニン含量 (mg/100 g)} = 0.1 \times MW \times \frac{A}{B} \times V \times N \times \frac{10^{-3}}{W} \times 100$$

0.1：標準溶液の濃度（ $\mu\text{mol/L}$ ）

MW ：メチオニンの分子量（149.2）

A ：試料溶液のピーク面積又は高さ

B ：標準溶液のピーク面積又は高さ

V ：定容量（mL）

N ：希釈倍数

W ：試料採取量（g）

注 解

（注1）標準溶液と比較してピークが小さい場合は，濃縮してもよい。加水分解液の適当量を取り，減圧濃縮乾固後，内容物をクエン酸ナトリウム緩衝液（0.067 mol/L，pH 2.2）で溶解する。

（注2）アミノ酸自動分析計はJLC-500/V（日本電子（株）），L-8800（（株）日立製作所）又は相当品を用いる。

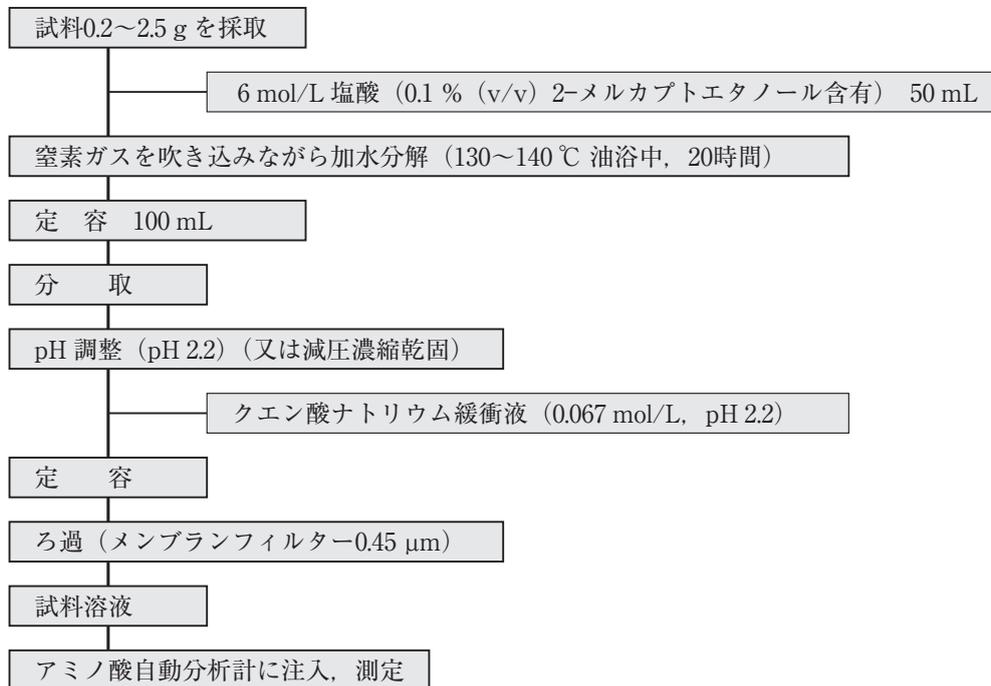
（注3）LCR-6（日本電子（株））又は相当品を用いる。

（注4）クエン酸ナトリウム緩衝液（H-01，H-02，H-03，H-04（日本電子（株））又は相当品を用いる。

ただし，P-11は6 mol/L塩酸でpHを2.83に調整後使用する。

（注5）日本電子用ニンヒドリン発色溶液キット-II（和光純薬工業（株））又は相当品を用いる。

メチオニン定量法・フローチャート



37 トリプトファン

37-1. 高速液体クロマトグラフ法

適用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ（蛍光検出器付き）

恒温乾燥器

水浴

ガラス細工用バーナー

封管用試験管

真空ポンプ

(2) 試薬

標準溶液：トリプトファン標準品50 mgを正確にはかりとる。0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液に溶解後、100 mLに定容し、水で50倍希釈する（10 µg/mL）。

水酸化バリウム八水和物：特級

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム（特級）40 gを水に溶解し、1 Lに定容する。これを100 mL分取し、水で1 Lに定容する。

6 mol/L 塩酸：精密分析用20%塩酸を使用する。

60% (v/v) チオジエチレングリコール：チオジエチレングリコール（アミノ酸自動分析用）120 mLに水80 mLを加えて混合する。

3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム（特級）120 gを水に溶解し、1 Lに定容する。

1% (w/v) フェノールフタレイン：フェノールフタレイン（特級）1 gをエタノール（特級）に溶解する。

過塩素酸（60%）：特級

メタノール：高速液体クロマトグラフ用

(3) 操作

1) 試料溶液の調製

試料0.2～2 g (W) 及び水酸化バリウム八水和物7.8 gを封管用試験管に正確にはかりとり、水4.5 mL及び60% (v/v) チオジエチレングリコール0.5 mLを加え、沸とう水浴中で水酸化バリウム八水和物を加熱溶解する（注1）。溶解後、減圧下（5.0 kPa（38 mmHg）以下）で脱気し、封管後、110℃（恒温乾燥器）で12時間加水分解する。冷却後、開管し、加水分解液を50 mL、容量100 mL又は200 mL全量フラスコ（1% (w/v) フェノールフタレイン溶液を数滴加えておく）に移した後、6 mol/L塩酸で中和し、3 mol/L水酸化ナトリウム溶液で微アルカリに調整後、定容（V）し、0.45 µmのフィルターでろ過したものを試料溶液とする。

2) 測定

試料溶液20 µLを高速液体クロマトグラフに注入し、トリプトファンのピーク面積又は高さを測定し、あらかじめ高速液体クロマトグラフ用標準溶液20 µLを高速液体クロマトグラフに注入して得られ

たピーク面積又は高さから、試料中のトリプトファン含量を求める。

[高速液体クロマトグラフ操作条件例]

カラム：内径4.6 mm, 長さ250 mm, ステンレス製 (注2)

移動相：20 mol/L 過塩素酸-メタノール (80：20 v/v)

検出器：蛍光分光光度計

測定波長：励起波長285 nm, 蛍光波長348 nm

流量：0.7 mL/分

温度：40℃

本条件による標準溶液のクロマトグラム例を図4-3に示した。

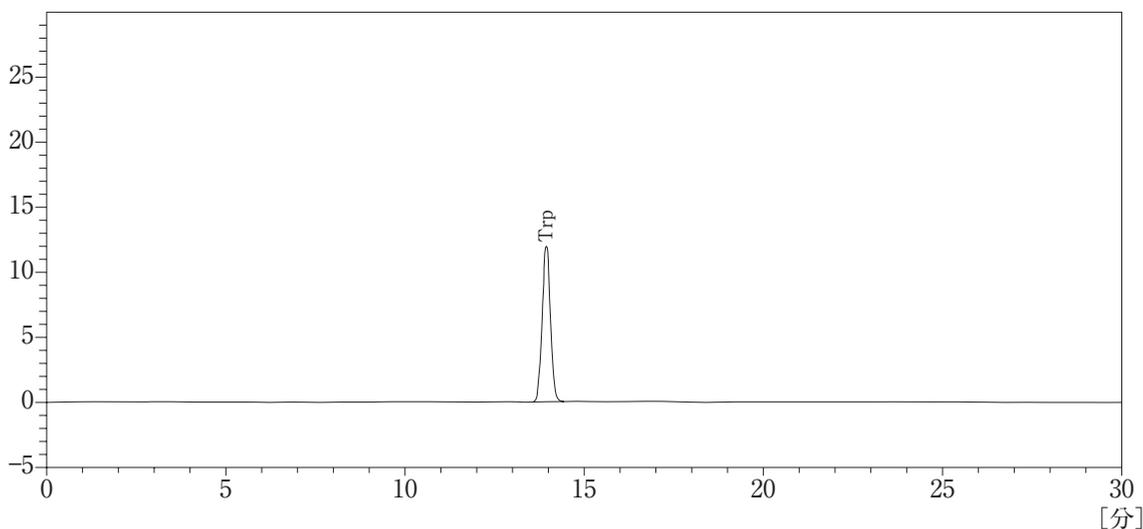


図4-3 標準溶液のクロマトグラム例

Trp：トリプトファン

(4) 計算

高速液体クロマトグラフによって得られたクロマトグラムから積分計でピーク面積又は高さを求め、以下の式により試料中のトリプトファン含量を計算する。

$$\text{トリプトファン含量 (mg/100 g)} = 10 \times \frac{A}{B} \times V \times N \times \frac{10^{-3}}{W} \times 100$$

10：標準溶液の濃度 (μg/mL)

A：試料溶液のピーク面積又は高さ

B：標準溶液のピーク面積又は高さ

V：定容量 (mL)

N：希釈倍数

W：試料採取量 (g)

注 解

(注1) トリプトファンは塩酸加水分解では破壊されるため、アルカリを用いた加水分解を行う。

(注2) CAPCELL PAK C18 AQ ((株)資生堂) あるいは相当品を用いる。

トリプトファン定量法・フローチャート

