

## 全自動アミノ酸分析計HLC-825AAの開発

林	秀	知	佳
松	下		昇
出	合	道	和
藤	井	計	全
中	村	互	志

## Development of Fully Automated Amino Acid Analyzer HLC-825AA

Hidechika HAYASHI  
Noboru MATSUSHITA  
Michikazu DEAI  
Kazumasa FUJII  
Hiroshi NAKAMURA

Amino acid analysis was first automated within the history of liquid chromatography. Separation of amino acids with ion exchange chromatography and detection with the ninhydrin reaction is widely used since then. But the large advances on resolution, analysis time and detection limit have been made.

HLC-825AA is the fully automated amino acid analyzer which has been designed by TOYO SODA. This is the system which has the newly developed autosampler, detector and so on, which has very improved data processing and error protection, and which is easy to operate. This has all units in one body, and needs no utilities except power source.

In the present paper, we first review the principle of amino acid analysis, and then describe the details of this analyzer and its application.

## 1. はじめに

アミノ酸は、生物体の中で、ペプチドや蛋白質の構成成分として存在するほか、フリーな形や他の物質に結合した形で存在する。アミノ酸分析は、ペプチドや蛋白質の一次構造の分析、食料や飼料に含まれる栄養素の分析、先天性代謝異常<sup>1)</sup>、腎疾患や肝疾患の診断<sup>1)</sup>、アミノ酸代謝の研究など、広範な適用分野を持っている。

アミノ酸の自動分析は1958年、Spackman, Moore と Stein のイオン交換法による分離分析システム<sup>2)</sup>に始まる。彼らは、スルホン化ポリスチレン樹脂 Amberlite IR-120 を充てんしたカラム2本（酸中性アミノ酸用と

塩基性アミノ酸用）でアミノ酸を分離し、溶出液にニンヒドリン反応液を混合し発色させ、吸光度で検出した。その後、カラム1本による全アミノ酸の分離<sup>3)</sup>、ケイ光法（O-フタルアルデヒド法<sup>4)</sup>やフロレサミン法<sup>5)</sup>）による高感度化などの試みが行われた。また分析時間も液体クロマトグラフィの高速化に伴い、大巾に短縮された。

東洋曹達では1979年に反応型液体クロマトグラフHLC-805<sup>6)</sup>を開発した。HLC-805は高速液体クロマトグラフと、溶出成分の誘導体化による高感度検出システムを組合せたシステムである。我々は高速液体クロマトグラフィ用イオン交換樹脂 IEX 215 を充てんしたカラムとニンヒドリン反応を用いてアミノ酸分析のソフトを

開発した。

アミノ酸分析は一般に、難しいものと思われている。それは溶離液の種類が多いこと、分離パターンに影響を与える要因が多いこと、設定しなくてはならないパラメータの種類が多いこと、装置が複雑であることなどに原因している。我々は、これらの点を考慮し、操作性の改善に重点をおき全自動アミノ酸分析計 HLC-825AA を開発した。本報では HLC-825AA の紹介と測定について述べる。

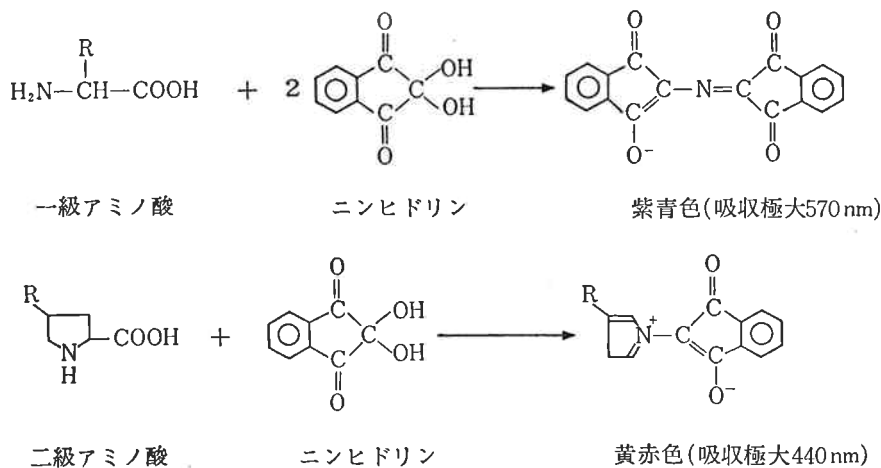
## 2. 分析原理

スルホン化ポリスチレン樹脂を充てんしたカラムとナトリウム (Na<sup>+</sup>) 型又はリチウム (Li<sup>+</sup>) 型の緩衝液の系がアミノ酸の分離に用いられる。アミノ酸は、その等電点と溶液の pH に依存して、荷電状態がプラス、ゼロおよびマイナスの3状態をとる。そこで、アミノ酸混合液を陽イオン交換樹脂に負荷すると、マイナスに帯電したアミノ酸は樹脂と反発し、より早く溶出する。逆にプラスに帯電したアミノ酸は樹脂に保持され、より遅く溶出する。溶離液の塩濃度を上昇させると、プラスに帯電したアミノ酸と塩の陽イオンが競合するため、保持力が弱められる。

Table 1 Separation of amino acids

Amino acid	Acidic	Neutral	Basic
Isoelectric point	low	←————→	high
Electric charge	minus	←————→	plus
Retention force	weak	←————→	strong
Retention time	short	←————→	long

アミノ酸の保持力は、さらに疎水的相互作用により影響を受け、水酸基を持つアミノ酸はより早く、環を持つアミノ酸はより遅く溶出する。全アミノ酸を分離よく、



短時間に溶出させるため、溶離液の組成 (pH, 塩濃度, アルコール濃度) を時間と共に変化させるグラジェント溶出が広く用いられる<sup>3)7)</sup>。また、カラム温度をプログラムすることにより、分離の改善を計っている。

カラムから溶出したアミノ酸はアミノ基の特異的な発色反応を利用して検出する。ニンヒドリン反応では、一級アミノ酸と二級アミノ酸を共に検出することが可能である。

## 3. 装置

HLC-825AA は陽イオン交換樹脂による分離とニンヒドリン発色反応による検出を採用した高速アミノ酸分析計である。Fig. 2 に HLC-825AA の系統図を示す。



Fig. 1 Appearance of HLC-825AA

本分析計は、試薬タンク、溶離液送液部、反応液送液部、オートサンプラ、分析カラム、反応器、可視検出器、コンピュータ、入出力機器から構成される。分析は次の手順で行われる。

- (1) 分析カラムを再生液Dで再生
- (2) 分析カラムを溶離液Aで初期平衡化
- (3) オートサンプラでサンプルを分析カラムに導入
- (4) 溶離液A, B, Cを用いたステップグラジェント溶出法で分析カラムからアミノ酸を分離して溶出
- (5) カラム溶出液と反応液E

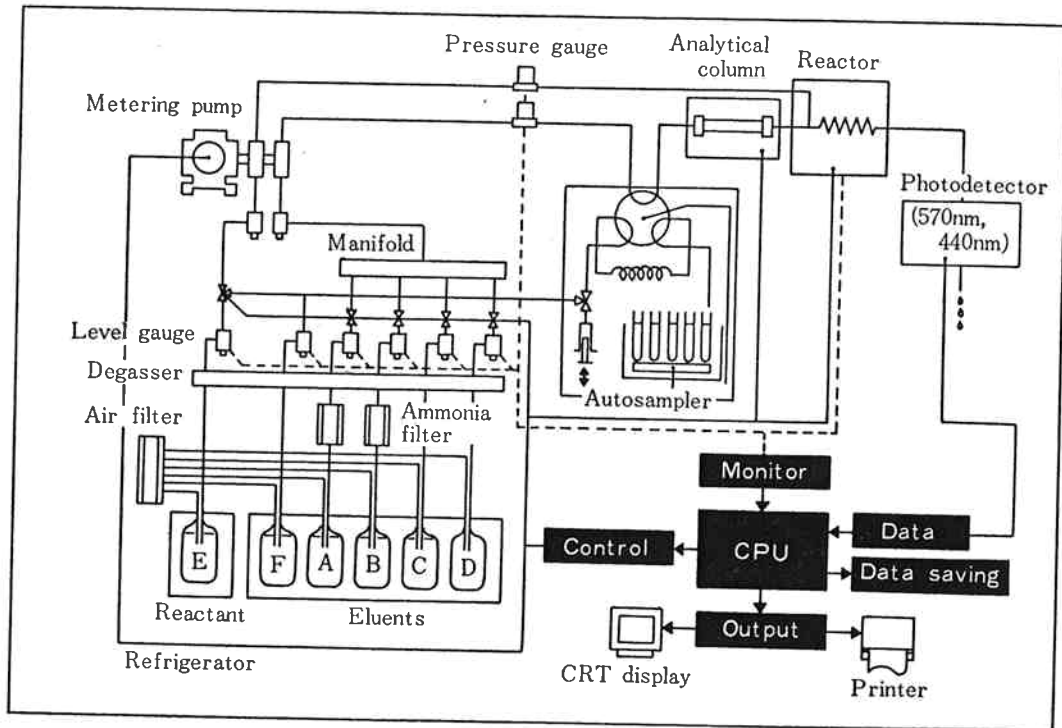


Fig. 2 Flow diagram of HLC-825AA

を混合し、100°C 前後で2～3分間発色反応

(6) 570 nm と440 nm の吸光度を測定

コンピュータは分析計のモニターとコントロールを行うと同時に、クロマトグラムを解析してピークを検出し、さらに同定定量計算を行い、分析レポートを作成する。

表2に HLC-825AA の主な仕様を示す。

〔1〕 試薬タンク

HLC-825AA は6種の試薬を用いる。溶離液A, B, Cはアミノ酸のステップグラジエント溶出に、再生液Dはカラムの再生に、反応液Eはニンヒドリン発色反応に、そして洗浄液Fは反応コイルとオートサンプラの洗浄にそれぞれ用いられる。反応液Eを保管するために、本体筐体の右下部に冷蔵庫が設置されている。各タンクの内容量は2ℓであり、約1週間、無補給で連続運転を行うことができる。

〔2〕 送液部

溶離液と反応液は1台のダブルプランジャタイプの定流量ポンプの一方ずつを用いて送られる。溶離液A, B, Cと再生液Dは、ポンプの吸引側につけられた電磁弁を切替えて、選択される。また反応液Eと洗浄液Fも同様に選択される。

試薬は、70°C 前後に加熱したデガッサーを通して発生させた気泡を、レベル計とエアトラップで二重に除去して脱気を行う。ポンプの直前につけられたエアトラップは、吸引時の負圧を緩和し、ポンプの吸引側に気泡が発生することを除く効果をもつ。このようにして、試薬

を長時間、極めて安定に送ることが可能になった。

試薬の液切れは、光の屈折を利用したレベル計で検出する。液切れが生じると、エラーブザーとエラーメッセージで異常を知らせ、分析を中止する。

圧力計は歪ゲージを用いた電子式で500 kg/cm<sup>2</sup>まで測定可能である。ポンプは圧力が約200 kg/cm<sup>2</sup>を超過すると、保護回路が働き、停止する。一方コンピュータは圧力を絶えずモニターしており、圧力の上限定値以上あるいは下限定値以下に圧力がなると、ポンプを停止させる。圧力チェックを二重に行うことにより、異常圧力によるカラムや機器の破損を防止している。

〔3〕 オートサンプラ

サンプルを自動的に分析カラムに導入するために、オートサンプラが組込まれている。オートサンプラは48検体と緊急検体をセットすることができ、サンプル冷却機能を標準装備している。

サンプル冷却はサーモモジュールで行うため、冷却水等が不要である。周囲温度が25°Cの時、10°C以下にサンプルを冷却することが可能である。

サンプル注入はループ吸入方式で行う。ループを交換し、スイッチで注入量を設定することにより、10 μℓ～1,500 μℓの範囲で8段階の注入量を選択することができる。HLC-825AAでは通常50 μℓ, 100 μℓおよび200 μℓを用いる。

オートサンプラに組込まれたマイクロプロセッサは、ローカルにオートサンプラの動作を制御する。すなわ

Table 2 Specifications of HLC-825AA

Functional components	Contents	Specifications
Column	Analytical column Temperature control	TSK-GEL IEX-215SC 7.5 mm I.D. × 75 mm (Li <sup>+</sup> type and Na <sup>+</sup> type) 30°C-70°C
Solvent delivery system	Metering pump	Double plunger pump Eluent 0.2 ml/min-2.5 ml/min Reactant 0.2 ml/min-2.5 ml/min Pressure below 200 kg/cm <sup>2</sup> With pressure limiter
Reservoir	Eluents A-D Reactant E Cleaner F	2ℓ each 2ℓ in build-in refrigerator 2ℓ
Reactor	Method Temperature Reactor coil	Heating of Al block 100°C-130°C SUS 316 tube
Autosampler	Method Sample capacity Sample size Cooling	Loop filling 48 and one for urgent sample 10 μℓ-1,500 μℓ, selectable Electric cooling, below 10°C when ambient temperature is 25°C
Detector	Visible photodetector	Light source: tungsten lamp Wave length: 440 nm and 570 nm
Micro-computer	Data processing  Sequence control	Maximum number of peaks: 100 Automatic calculation of calibration factors by standart sample Thermal graphic printer, paper width: 234 mm Chromatogram: header, peak marker, retention time Report of analysis: header, identification, quantitative evaluation Solvent delivery system, temperature control of column and reactor, autosampler, detector Input device: cassette tape recorder and key board Key board: full key board with functional key and operational key Display: CRT
Others	Size Weight Electricals	1,200 mm (W) × 700 mm (D) × 960 mm (H) 250 kg AC 100 V, 50/60 Hz, 1.0 KVA

ち、外部からサンプルカップ番号とスタート番号を受けると、針の移動、サンプルの吸引、ループバルブの切替え、および洗浄を順次行う。サンプルを吸引する前に 10 μℓ の空気を吸い、吸引した後に 75 μℓ の空気を吸う。前者の空気は洗浄液とサンプルとの混合を減少させ、後者の空気は針および配管内に残って無駄となるサ

ンプル量を減らす効果がある。サンプル吸入量はループ容量 + 50 μℓ であり、サンプル必要量はループ容量 + 100 μℓ である。

サンプルを吸引する毎に針や配管がサンプルで汚染されるため、サンプリング後、針をドレンポートに移動し、余分なサンプルを捨て、次に針をオーバーフローポート

Table 3 Specifications of autosampler

Items	Specifications
Sample table	Sample capacity: 48 and one for urgent sample Arrangement: XY Material: Al block
Sample vial	Volume: 1.5 ml Material: polyethylene
Sample size	Metering: filling loop Charge volume: loop size plus 50 $\mu\text{l}$ Necessary volume: loop size plus 100 $\mu\text{l}$
Loop size	Selectable from 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000, 1,500 $\mu\text{l}$
Cooling	Method: two pieces of thermo-module (Komatsu KSM-0671) Temperature: below 10°C when ambient temperature is 25°C
Others	Size: 400 mm (W)×300 mm (D)×170 mm (H) Weight: 18 kg

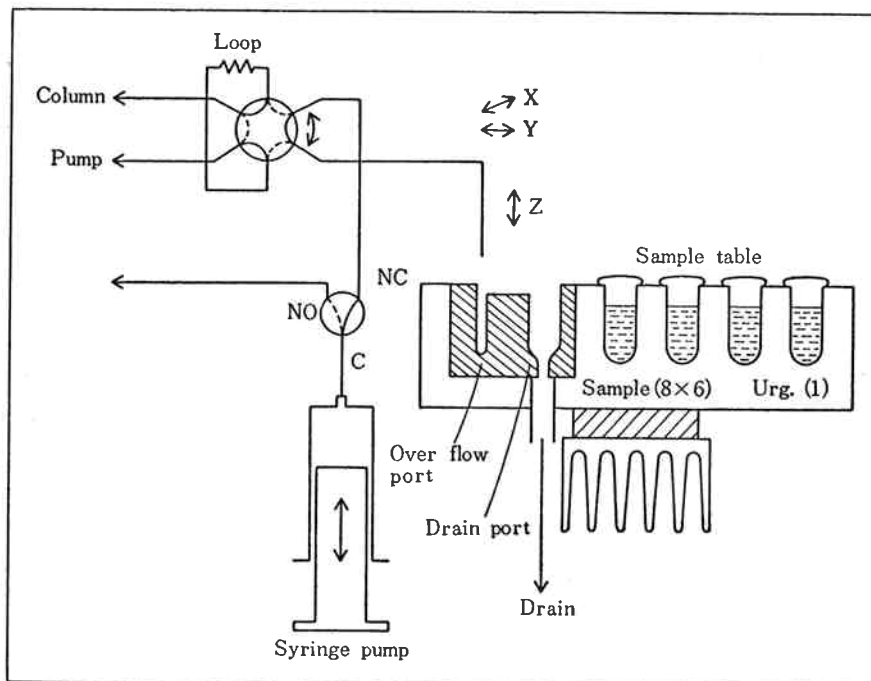


Fig. 3 Block diagram of autosampler

に移動し洗浄水で針の内外を洗浄する。これにより、過去のサンプルによる汚染が防がれる。

Fig. 4 に注入量の再現性テストの結果を示す。変動係数は0.53%である。Fig. 5 に汚染度テストの結果を示す。チャート上では汚染が認められない。

〔4〕 カラム

HLC-825AA では酸性アミノ酸、中性アミノ酸、塩基性アミノ酸を同一のカラムで分離する一カラム法を採用した。充てん剤は強酸性陽イオン交換樹脂すなわちスルホン化ポリスチレン・ジビニルベンゼン共重合体（ジビニルベンゼン8～9%）であり、粒径は約5 $\mu$ である。

カラムは内径 7.5 mm 長さ 75 mm のステンレス製のカラムである。

イオン交換クロマトグラフィーではカラム温度を上昇させるとピークがシャープになると共に溶出パターンも多少変化する。アミノ酸分析では、ピークの分離を最適化するため、カラム温度を切換えて分析する。HLC-825AAのカラムは温度制御されたアルミブロックの中に保持される。

アルミブロックの温度はコンピュータによって制御される。测温抵抗体で検出した温度と設定値とから比例ON/OFF方式で加熱/冷却を切換えて温度制御が行わ

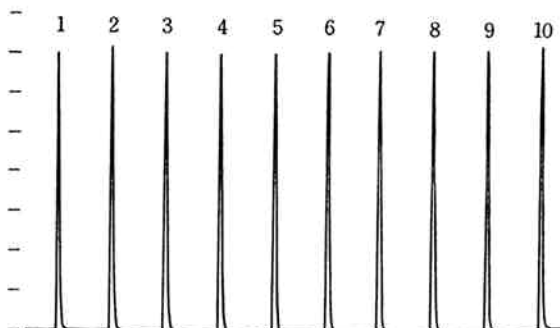


Fig. 4 Reproducibility test of autosampler

Sample: red pigment No. 2  
 Pump: Altex 110A  
 Detector: VS-8 visible photometer  
 Wave length: 520nm

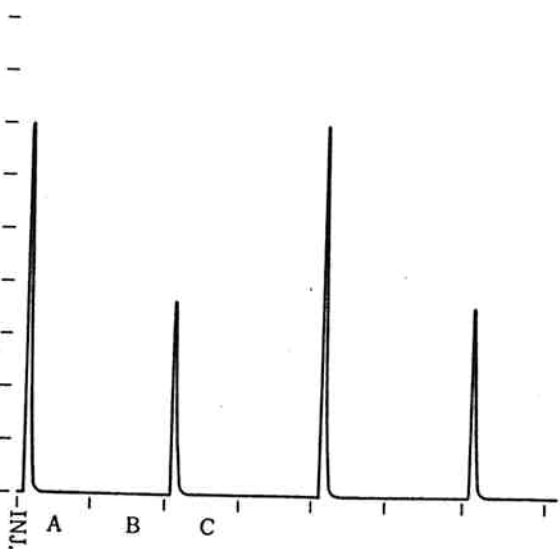


Fig. 5 Contamination test of autosampler

Sample: red pigment No. 2  
 conc. A : B : C = 1 : 0 : 0.5  
 Pump: Altex 110A  
 Detector: VS-8 visible photometer  
 Wave length: 520nm

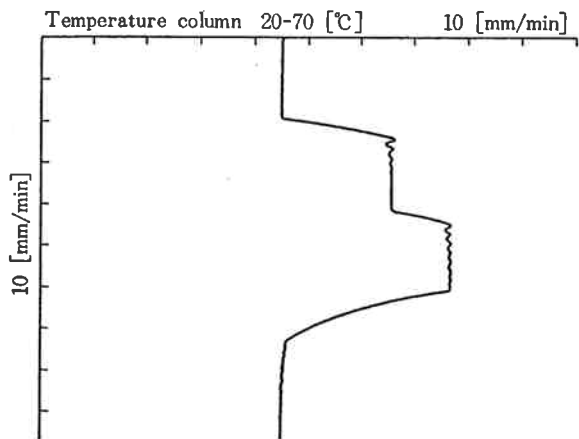


Fig. 6 Temperature control of column

Set point of temperature: 42.5°C-53°C-42.5°C

れる。加熱/冷却源にはサーモモジュールを用いており、Fig. 6 にアルミブロックの温度変化を示す。

#### [5] 反応器

通常、ニンヒドリン反応は 90°C 以上で行う。HLC-825AA ではヒーターと測温抵抗体を挿入した加熱ブロックと SUS チューブを巻きつけた反応コイルブロックとから構成されるドライタイプの反応器が採用されている。反応器の温度も、カラム温度と同様にコンピュータで制御される。

反応コイルは内径 0.4 mm 長さ20mのステンレスチューブである。溶離液と反応液の流量の和を 1 ml/分と設定すれば、反応時間は 2.5 分である。全分析終了後、反応液を洗浄液に切換えることによって反応コイル内の塩濃度を下げ、反応コイル内で塩が析出してつまる事故を防止している。

#### [6] 可視二波長検出器

アミノ酸はニンヒドリン反応で発色し、一級アミノ酸は 570 nm に、二級アミノ酸は 440 nm に極大吸収を持つ。本検出器では、内容量 8  $\mu$ l、光路長 10 mm のフローセルを用いている。セルには白色光が照射される。セルを通過した光は、ミラーとフィルターにより 440 nm, 570 nm および 690 nm に分けられ、フォトダイオードで検出される。溶媒の切換えによる屈折率の変化は三波長にほぼ等しい効果を与えるので、440 nm と 570 nm の吸光度を 690 nm を基準にして求めることによって、切換えノイズが打消される。本検出器はマイクロプロセッサを組込んでおり、ゲインとバランスの自動調整機能をもっている。

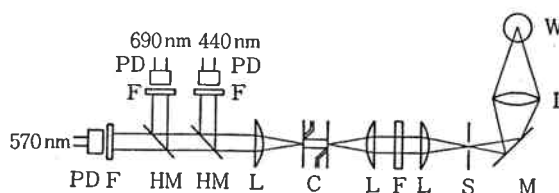


Fig. 7 Optical arrangement of dual wave-length photodetector

W: Tungsten lamp, L: Lens, M: Mirror,  
 S: Slit, F: Filter, C: Flow cell,  
 HM: Half mirror, PD: Photodiode

#### [7] データ処理

コンピュータは、分析時に、570 nm と 440 nm の吸光度の入力値からピークを検出し、中間データを作成する。中間データは、ピークのスタート、トップ、エンドの時間および高さ、ピーク面積値(未補正)とから構成される。一検体の分析が終了すると、中間データと同定用ファイルをつき合わせ、同定定量計算を行い、図 8

Table 4 Specifications of visible dual-wavelength photodetector

Items	Specifications
Opticals	Method: interference filter Sample light: 440 nm, 570 nm Reference light: 690 nm
Light source	Tungsten lamp
Flow cell	Volume: 8 $\mu$ l Light pass length: 10 mm
Electricals	Output signals: absorbances of 440 nm and 570 nm Automatic adjustment of gain and balance
Performance	Noise: below $2 \times 10^{-4}$ Abs Drift: below $10 \times 10^{-4}$ Abs/h
Others	Size: 350 mm (W) $\times$ 350 mm (D) $\times$ 150 mm (H) Weight: 12 kg

に示すような分析レポートを打出す。分析レポートには、アミノ酸の成分毎に保持時間、ピーク面積、同定に用いた波長、ピーク高さ、モル濃度、重量濃度および診断マークがプリントされる。また、濃度の代わりに、基準重量に対する百分率、全アミノ酸成分に対するモル百分率と重量百分率を選択することもできる。定量法は内部標準法と絶対検量線法のいずれを用いることも可能である。HLC-825AA では、N-ロイシンを内部標準物質

として加えることができる。未知サンプルに含まれるアミノ酸を定量するためには、あらかじめ、アミノ酸含量のわかった標準サンプルを分析し、補正係数を自動的に求めておくことが必要である。

HLC-825AA では、中間データをカセットテープに保存したり、再生することが可能である。コンピュータは、メモリに存在する中間データを用いて、くり返し、同定定量計算を行い、分析レポートを打出すことができる。

#### [8] 操作

HLC-825AA は操作パネルと CRT ディスプレイを持っている。操作パネルにはファンクションキー付フルキーボード、CPU キーと表示、分析計キーと表示、およびカセット装置が付属している。CRT ディスプレイには通常ステータスが表示される。パラメータの変更は CRT ディスプレイ上にプログラムファイルを表示し、画面の内容をキーボードにより変更することで行うことができる。

CPU キーは CPU の全リセットと割込要求を行い、分析計キーは分析のスタート、マニュアルホールド、リセット、ストップを指示する。

HLC-825AA は分析と保守に利するため、拡張機能を備えている。代表的な拡張機能を Table 6 に示す。

### 5. アミノ酸分析

HLC-825AA では、IEX 215 カラムを用い、3種の溶離液でステップグラジェント溶出する。アミノ酸の保持時間は、溶離液の種類、pH、塩濃度、アルコール濃度、溶離液切替時間、カラム温度とその切替時間により影響を受ける。特に pH には敏感であり、0.01 pH ユニットの精度で pH を調整する必要がある。各ピーク

#### HLC 825-AA Amino Acid Analyzer

82/10/14 11:40 HLC825 1982/07/12 11:00:00

Sample no. 4 Name: S-3(Beer)

Method: 1

Dilut: 8.00 Weight: 1.0

NO.	NAME	TIME	AREA-570	AREA-440	IDT HEIGHT	UG/ML	NM/ML	DIAG NO.	
1	ASP	11:40	0.3543E+03		14.1	2.105	15.94	1	
2	THR	13:30	0.1494E+05		6.9	0.255	7.19	2	
3	SER	14:34	0.2041E+05		8.4	1.060	10.00	3	
4	GLU	17:10	0.9169E+05	0.1579E+05	28.6	6.900	39.65	4	
5	PRO	18:20	0.5039E+05	0.6143E+04	440	173.6	151.735	1517.95	5
6	GLY	24:14	0.2035E+04	0.1286E+03	63.4	9.995	133.15	6	
7	ALH	25:54	0.7014E+04	0.4572E+03	174.1	33.986	300.32	7	
8	CYS							8	
9	VAL	32:52	0.2944E+04	0.1164E+03	52.5	17.438	132.99	9	
10	MET	38:00	0.0895E+03		12.9	5.678	38.05	10	
11	ILE	41:06	0.5364E+03		21.6	3.209	24.46	11	
12	LEU	42:44	0.1009E+04		32.2	6.008	45.01	12	
13	N-LEU	44:24	0.6659E+04	0.4271E+03	107.3	52.472	400.00	13	
14	TYR	47:30	0.2490E+04	0.1064E+03	49.0	20.007	114.33	14	
15	PHE	50:46	0.1606E+04		35.9	12.962	70.47	15	
16	HIS	54:52	0.2131E+04		111.4	15.654	100.89	16	
17	LYS	61:00	0.7509E+03		30.1	5.006	34.24	17	
18	ARG	64:04	0.1400E+05		184.3	0.902	522.76	18	
19	ARG	76:10	0.1252E+04		25.3	10.556	60.59	19	

Fig. 8 Example of analytical report

1st line: title

2nd line: year/month/day and time, comment

3rd line: sample number, sample name or comment

4th line: method for quantitative evaluation

1, 2, 3...internal standard method

4, 5, 6...absolute calibration method

5th line: dilution, weight factor

6th line: peak name, retention time, area of 570 nm, area of 440 nm, wave length which was used for quantitative evaluation, peak height,  $\mu$ g/ml, nmol/ml, diagnostic mark

Table 5 Files and their contents

File names	Contents
JOB	Comment, method of quantitative evaluation, scales of plotter, etc.
PDA	Parameters related to data processing
TBD	Switch of parameters related to data processing during analysis
PRM	Set points of temperature and pressure limit
CTL	Switching times of eluents A-D and temperature set points
NAM	Peak name, retention time, concentration in standard sample
SMP	Sample name, identification between standard sample and unknown sample

Table 6 Extended functions of HLC-825AA

Items	Contents
Manual operation	Individual operation of functional components through CPU
Graphic printer	Hard copy of CRT display Plot of analog input signals (temperature, pressure, detector)
Cassette recorder	Saving and loading of program, NAM file, intermediate data Autosaving of intermediate data after analysis
Data processing	Capable of calculating on intermediate data many times

が分離して溶出するようにこれらのパラメーターが決められる。

蛋白質構成アミノ酸を分析する場合、Na<sup>+</sup>型の溶離液を用いる。Table 5 に標準的な溶離液組成を Fig. 9 に溶離液と温度の切替時間を示す。

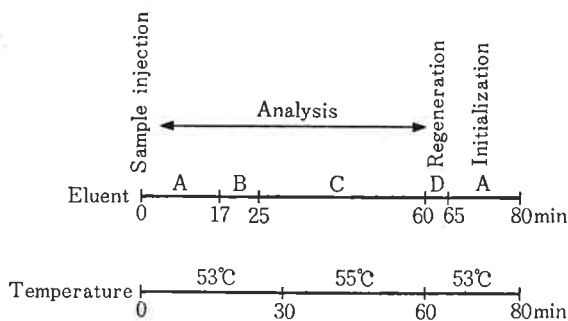


Fig. 9 Analysis condition for protein-constituent amino acids

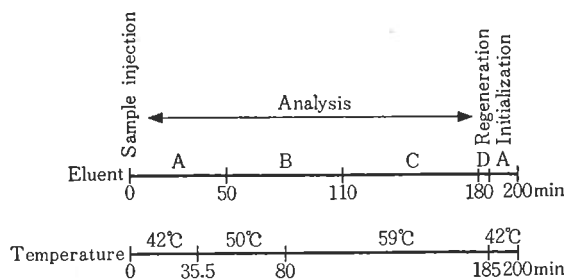


Fig. 10 Analysis condition for amino acids in body fluid

血液や尿などの生体液には40種近くのアミノ酸が含まれている。これらのサンプルを Na<sup>+</sup>型の溶離液で分析するとアスパラギンとグルタミンを分離することができない。そこで生体アミノ酸の分析には Na<sup>+</sup>より選択係数が小さい Li<sup>+</sup>を使用する。陽イオン交換樹脂は、Na<sup>+</sup>型と Li<sup>+</sup>型とで同一であるが、それぞれの溶離液でカ

Table 7 Compositions of eluents for analysis protein-constituent amino acids (Na<sup>+</sup> type eluents)

Eluents	A	B	C	D
Na <sup>+</sup> (N)	0.2	0.2	0.8	0.2
pH	3.30	4.28	8.80	—
Sodium citrate (g)	19.6	19.6	14.7	
Sodium chloride (g)			35.1	
Sodium borate (g)			9.5	
Citric acid (g)	28.0	14.0		
Ethanol (ml)	80.0			
β-Thiodiglycol (ml)	5.0	5.0		
n-Capric acid (ml)	0.1	0.1	0.1	
20% Brij 35 (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0
Sodium hydrate (g)				8.0
Total volume (ℓ)	1.0	1.0	1.0	1.0

Sodium citrate: Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> · 2H<sub>2</sub>O

Sodium borate: Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O



ラム充てんを行う。Table 7に Li<sup>+</sup> 型の標準的な溶離液組成を Fig. 10 に溶離液と温度の切替時間を示す。

1本のカラムで全アミノ酸を分析する場合、溶離液Aと溶離液Bに溶けていたアンモニアがカラム内に蓄積さ

Table 8 Composition of eluents for analysis of amino acids in body fluid (Li<sup>+</sup> type eluents)

Eluents	A	B	C	D
Li <sup>+</sup> (N)	0.3	0.3	1.3	0.2
pH	2.28	3.45	3.50	—
Lithium citrate (g)	18.8	28.2	28.2	
Lithium chloride (g)			42.4	
Ethanol (ml)	40			
β-Thiodiglycol (ml)	5.0	5.0		
n-Capric acid (ml)	0.1	0.1	0.1	
20% Brij 35 (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0
Lithium hydrate (g)				8.4
Total volume (l)	1.0	1.0	1.0	1.0

Lithium citrate: Li<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> · 4H<sub>2</sub>O

Lithium hydrate: Li OH · H<sub>2</sub>O

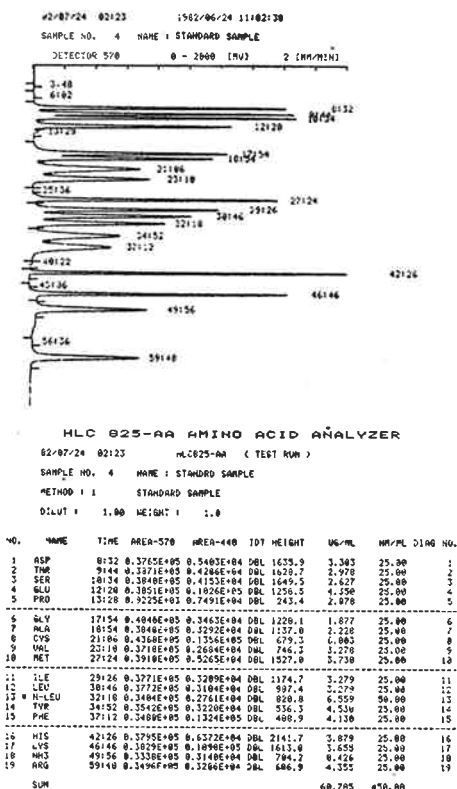


Fig. 11 Example of analysis of amino acid mixture

Apparatus: HLC-825AA  
 Column: IEX-215SC, 7.5 mm I.D. × 75 mm  
 Eluents: Na<sup>+</sup>type eluents

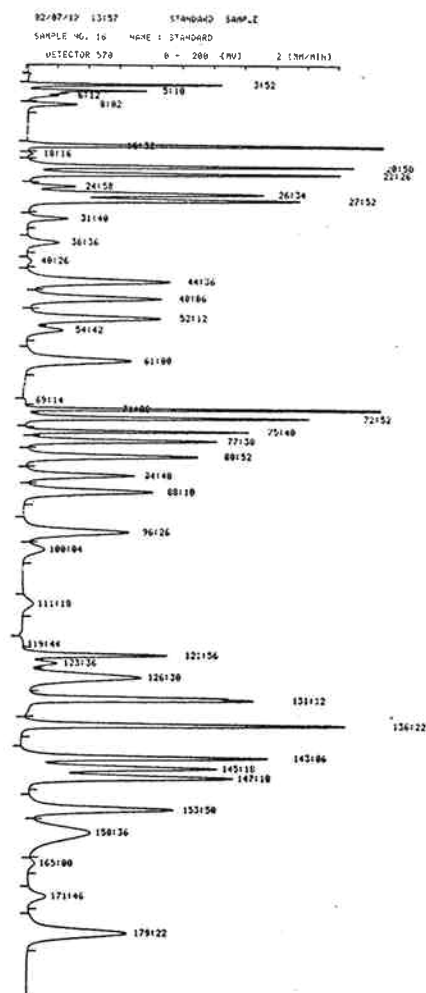


Fig. 12 Example of analysis of amino acid mixture

Apparatus: HLC-825AA  
 Column: IEX-215SC, 7.5 mm I.D. × 75 mm  
 Eluents: Li<sup>+</sup>type eluents

れる。溶離液Cに切換えるとそのアンモニアが溶出し、クロマトグラムに台形状のピーク（アンモニアプラト）を与える。アンモニアプラトを小さくするために溶離液A, Bをアンモニアフィルタに通してアンモニアを除去して用いるが、アンモニアを含まない雰囲気、アンモニアを含まない水と試薬を用いて溶離液を調整するべきである。

#### 〔1〕 測定例

タンパク質を酸あるいは塩基で加水分解すると、アミノ酸に分解する。グルタミンはグルタミン酸に、アスパラギンはアスパラギン酸に分解されるので、加水分解物には通常18種のアミノ酸が含まれる。Fig. 11に各アミノ酸を50 nmol/mlずつ含んだ標準アミノ酸溶液のクロマトグラムと分析レポートの例を示す。スレオニン・セリン、グリシン・アラニンの分離は満足のいくレベルである。

生体液には40種近くのアミノ酸が含まれる。Fig. 12に標準アミノ酸溶液のクロマトグラムと分析レポートの例を示す。3時間で全アミノ酸が溶出された。

#### 5. おわりに

HLC-825AAを用いて、アミノ酸を連続自動分析することが可能となった。しかし、アミノ酸分析にはいぜ

んとして経験を要する所が残っていることも事実である。今後は、システムの完全な脱保守化、人工知能による分析条件の最適化の実現をめざし、さらに追求を続けたい。

本開発を行うにあたり、多大の協力を頂いたことに対し、旭計器工業㈱と当社科学計測開発部の諸氏に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 金井 晃, 植木真琴; “アミノ酸分画定量 学術資料(2)生化学”, 三菱油化メディカル, (1981).
- 2) D. H. Spackman, W. H. Stein and S. Moore; *Anal. Chem.*, **30**, 1190 (1958).
- 3) K. A. Piez and Morris; *Anal. Biochem.*, **1**, 187 (1960).
- 4) A. G. Georgiadis and J. W. Coffey; *Anal. Biochem.*, **56**, 121 (1973).
- 5) E. Lund, J. Thomson and K. Brunfeldt; *J. Chromatog.*, **130**, 51 (1977).
- 6) 中村瓦志, 他; “東洋曹達研究報告”, **23**, 130 (1979).
- 7) “全自動アミノ酸分析計 HLC-825AA アミノ酸技術資料 No. 1” 東洋曹達工業 (1982).