

# タンパク質のアミノ酸分析

伊 藤 俊 一  
 斉 藤 正 七  
 荒 井 栄 子  
 中 西 泰 夫

## The Study of Amino Acid Analysis for Proteins

Shun-ichi ITOH  
 Shoshichi SAITOH  
 Eiko ARAI  
 Yasuo NAKANISHI

Methods for amino acid analysis have been examined to improve the sensitivity and rapidity. The ninhydrin and *o*-phthalaldehyde methods based on post-labelling followed by ion-exchange chromatography, and the dansyl chloride method using reversed phase chromatography coupled with fluorescence or chemiluminescence were evaluated.

Quantification limits determined with the standard amino acid solutions were 100 pmol for the ninhydrin method, 10 pmol for the *o*-phthalaldehyde method, 500 fmol for the dansyl chloride-fluorescence method, and 10 fmol for the dansyl chloride-chemiluminescence method, respectively. The last method was shown to be  $10^4$  times more sensitive than the conventional ninhydrin method, thus providing a good potential for the micro-scale amino acid analysis.

### 1. はじめに

アミノ酸分析は近年のタンパク質工学の発展により、ペプチド、タンパク質研究に必要不可欠な分析項目の一つになってきている。

アミノ酸の液体クロマトグラフィーによる分析は1941年にデンプンカラムを用いた分配クロマトグラフィーによるものが初めてで、以後分離能の良好なイオン交換クロマトグラフィーによるものが中心となり、現在では高分離能、短時間分析の可能な逆相クロマトグラフィーによる方法に変わりつつある。

現在、生化学分野におけるタンパク質、ペプチドのアミノ酸分析はほとんどが液体クロマトグラフィーによるものであり、取り扱う試料の微量化や貴重さを考えると

よりいっそうの分析の迅速化、高感度化が必要となってきている。

現在知られているアミノ酸分析法はニンヒドリンやフェニルイソチオシアネート<sup>1)2)3)4)</sup>に代表される吸光光度法やオルトフタルアルデヒド (OPA)<sup>5)6)</sup>やダンシルクロライド<sup>7)8)9)10)11)12)</sup>に代表される蛍光法等があり、この中でニンヒドリン法はアミノ酸をポストラベル化して定量する方法で最も古典的なアミノ酸分析法として広く普及している。

ポストラベル化はアミノ酸をイオン交換カラムで分離した後、ニンヒドリン等の発色試薬とアミノ酸を反応させて分析を行うもので分析精度が非常に高い利点があるが、感度が低い、分析時間が長いなどの欠点もあり最近では高感度で分析時間の短い方法の開発が進んでいる。

そのなかで蛍光試薬であるダンシルクロライド (DNS-Cl), ナフタレンジアルデヒド<sup>13)14)</sup> 等でアミノ酸をプレラベル化する方法は高感度で短時間測定が可能である。しかしラベル化をマニュアルで行うため分析精度がポストラベル法より若干劣る欠点がある。

近年, 化学発光物質が非常に高感度な分析試薬としてイムノアッセイ等の臨床診断分野で応用され始めている<sup>15)16)17)18)19)</sup>。アミノ酸分析への応用は化学発光試薬としてシュウ酸誘導体である TCPO (Bis (2,4,6, -trichlorophenyl) Oxalate) を用いた方法が今井ら<sup>20)21)22)23)24)</sup>, Smith ら<sup>25)</sup>, Mellbin ら<sup>26)</sup> によって報告されている。

この化学発光法は化学反応で蛍光物質を励起させるため, 光源からの迷光などがなくバックグラウンドが低くなり, 蛍光物質の検出範囲も広がる利点がある。シュウ酸誘導体を用いたアミノ酸分析は吸光度法, 蛍光法に比べて非常に高感度であると報告されている。

一方, アミノ酸分析をするにはタンパク質, ペプチド試料の加水分解が必要となる。この加水分解は塩酸によるものが主流であるが加水分解中に破壊されてしまうアミノ酸が比較的多いこと, また分析法の高感度化や試料の微量化に伴い加水分解中の汚染をできるだけ低く抑えなければならないこと, 加水分解時間が長いこと等まだ

問題点は多く, 加水分解法の見直しが必要となってくる。

今回著者らはタンパク質, ペプチド加水分解物のアミノ酸分析を行うため, すでに分析法の確立されているニンヒドリン法とオルトフタルアルデヒド法の比較, およびダンシルクロライド法, TCPO-過酸化水素系化学発光によるダンシルアミノ酸の検出法を検討し, また低汚染な加水分解法と酸加水分解で定量のできなくなるアミノ酸の分析法の検討を行ったので報告する。

## 2. 試薬及び装置

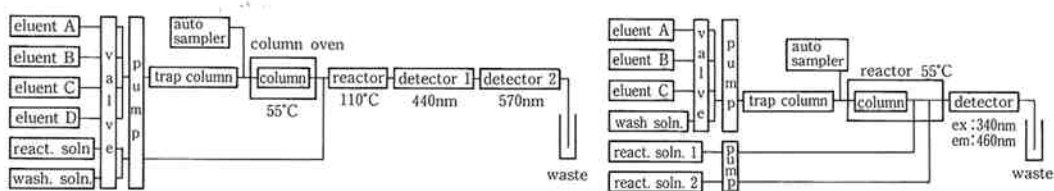
液体クロマトグラフは TOSOH CCP & 8010 シリーズを用いて行った。

ニンヒドリン, オルトフタルアルデヒド, ダンシルクロライドは和光純薬工業製, アミノ酸はナカライテスク製, TCPO は東京化成製, ダンシルアミノ酸はシグマ社製を使用した。その他試薬はすべて和光純薬工業製特級試薬を用いた。

## 3. 実験及び結果

### (1) ニンヒドリン法とオルトフタルアルデヒド法の比較

液体クロマトグラフシステムを Fig. 1 に示す。ニンヒドリン法では溶離液が 4 種類, 反応液と洗浄液が各 1



ninhydrin method		OPA method
column	: TSK gel Aminopak (4.6 mm × 120 mm)	TSK gel Aminopak (4.6 mm × 120 mm)
flow rate	: 0.4 ml/min	0.4 ml/min
column temp.	: 55°C	55°C
react. temp.	: 110°C	
react. coil	: 0.25 mm × 10 m	0.25 mm × 2 m (NaOCl) 0.5 mm × 2.5 m (OPA)
detector	: UV detector (570 nm) : UV detector (440 nm)	FL detector (ex: 340 nm, em: 460 nm)
eluent A	: citrate buffer pH 3.26	citrate buffer pH 3.26
eluent B	: citrate buffer pH 4.30	citrate buffer pH 4.30
eluent C	: citrate buffer pH 9.40	citrate buffer pH 9.40
eluent D	: 2N NaOH	2N NaOH + 0.01% n-capric acid
react. soln.	: ninhydrin solution	OPA solution
react. soln.	: 0.01% n-capric acid	NaOCl solution
inj. volume	: 100 μl	20 μl

Fig. 1 Flow diagram and analytical conditions of ninhydrin and OPA method

種類ずつであり計6種類の送液が必要となる。また Fig. 2 に示すとおり 570 nm ではプロリンの検出感度が低いことからプロリン用の 440 nm 検出器と、その他アミノ酸検出用の 570 nm 検出器の2台が必要で装置として非常に大がかりなものとなる。一方、オルトフタルアルデヒド法では溶離液、反応液が6種類でニンヒドリン法と同じであるが検出器が1台、カラムオープンとリアクタの温度が同じであるので装置を共有してお

り、ニンヒドリン法より装置的に単純で装置のメンテナンスは比較的容易である。

またニンヒドリン試薬は安定性が低く、Fig. 3 に示すとおり室温では調製直後から劣化が始まっており保存温度を低くする必要がある。

標準用アミノ酸を用いて両方法の比較を行った。結果を Table 1 に示す。検出感度はオルトフタルアルデヒド法がニンヒドリン法の約10倍高感度である。ピーク面積について両法の変動係数はニンヒドリン法が若干良好な結果が得られた。これはシステムに注入する試料の容量によるものと思われる。また両法はグルタミンとスレオニン、アスパラギンとセリンを分離することができない。

(2) ダンシルクロライド(蛍光・プレラベル)法

ダンシルクロライドを蛍光試薬としてプレラベル化後アミノ酸検出する方法は、イオン交換クロマトグラフィーであるニンヒドリン法やオルトフタルアルデヒド法と異なり、逆相クロマトグラフィーで分析するため分析時間の短縮や高感度化が期待できる。実際アミノ酸の分析時間はニンヒドリン、オルトフタルアルデヒド法で40分、カラム平衡時間を含めると70分になる。しかし逆相クロマトグラフィーで分析すると40分以内の分析が可能であり分析時間の短縮ができる。今回分析時間30分以内を目標としてアミノ酸の分離を検討した。そのシステムを Fig. 4 に示す。溶離液2種類で装置構成がニンヒドリン法、オルトフタルアルデヒド法に比べて簡潔であり装置メンテナンス等が容易な利点がある。

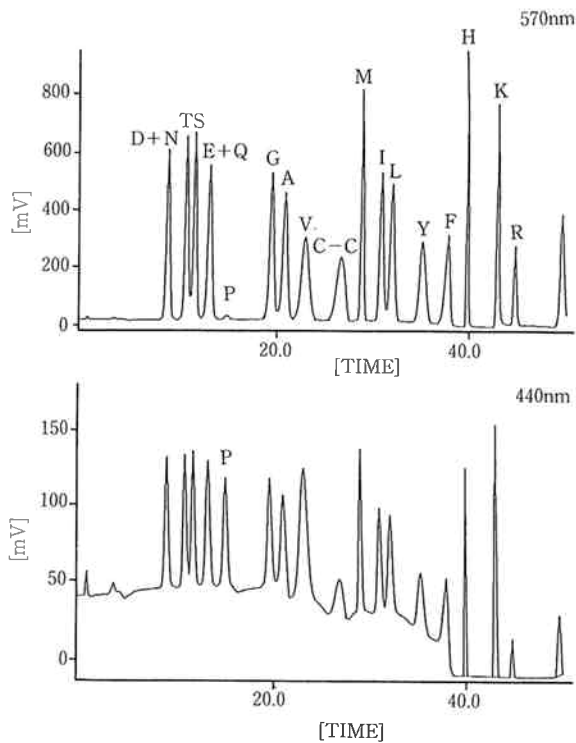


Fig. 2 Chromatogram of ninhydrin method

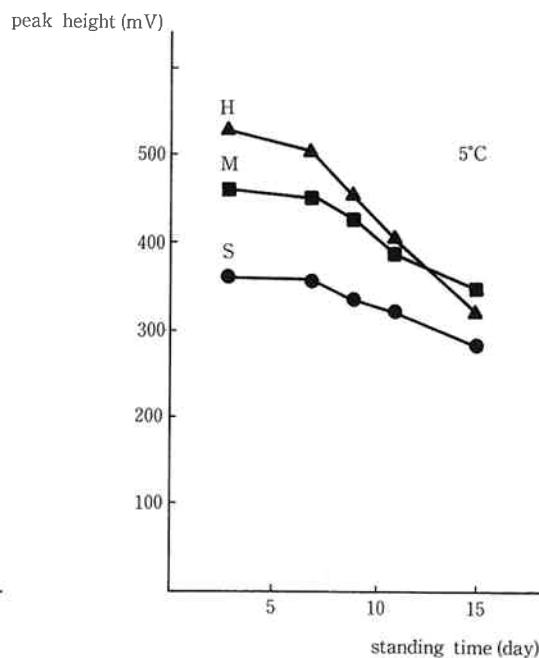
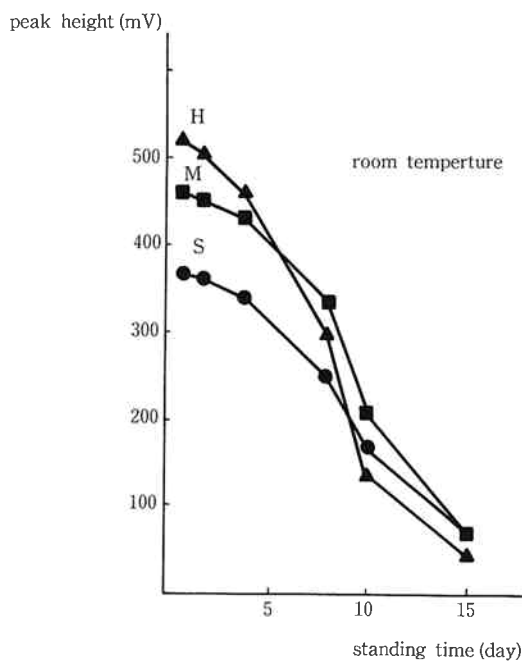


Fig. 3 Stability of ninhydrin solution

Table 1 Precision of ninhydrin and OPA method

amino acid	peak area	C. V. (%)
	ninhydrin	OPA
D+N	2.54	3.43
T	1.77	3.77
S	2.61	3.06
E+Q	2.91	3.31
P	1.53	5.96
G	4.64	3.79
A	4.19	5.15
C-C	2.05	4.77
V	1.34	5.21
M	4.19	3.75
I	0.96	4.17
L	0.82	7.37
Y	1.02	0.69
F	1.24	8.01
H	0.71	3.86
K	0.98	3.49
R	0.94	3.91

ninhydrin: n=7, 2.5 nmol/inj.

OPA: n=6, 0.25 nmol/inj.

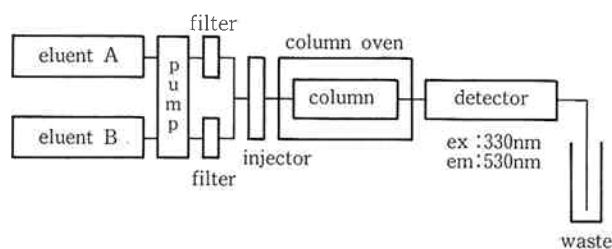


Fig. 4 Flow diagram of DNS-Cl system

## (1) アミノ酸の分離

Fig. 5 から明らかなように18種類の検討に用いたダンシルアミノ酸が20分以内に分離する条件を設定することができた。ニンヒドリンやオルトフタルアルデヒドのポストラベル法に比べて分析時間が約半分に短縮することができ、更にニンヒドリン法、オルトフタルアルデヒド法で分離できなかったグルタミンとスレオニン、アスパラギンとセリンも完全に分離できた。

## (2) プレラベル条件

プレラベル化は試料をアルカリ性条件下ダンシルクロライドと反応させるものである。

ダンシルクロライドの溶媒としてメタノール、アセトニトリル、アセトンの3種類でアミノ酸との反応率やベースラインに与える影響を検討したところメタノール、アセトンはベースラインの乱れが大きく、またダンシルクロライドの加水分解物でアミノ酸の分離に影響を及ぼすダンシル酸のピーク強度がアセトニトリルの時より相対的に強かったためダンシルクロライドの溶媒にはアセトニトリルを採用した。

ダンシルクロライドの濃度は Fig. 6 に示すとおり 30 mM 以上でピーク強度がほぼ一定値を示すことからダンシルクロライドの濃度は 30 mM と決定した。

また反応時間と反応温度はそれぞれ15分、室温と決定した。

これらの最適条件下で得られた代表的なアミノ酸の検量線を Fig. 7 に示す。

定量範囲は 1 pmol から 100 pmol であり、検出限界は 500 fmol であった。

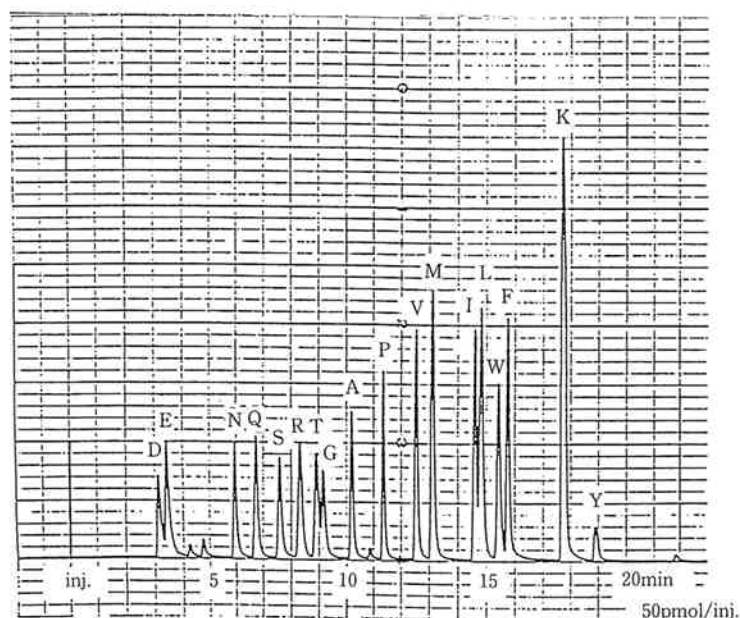


Fig. 5 Chromatogram of DNS-amino acid standards

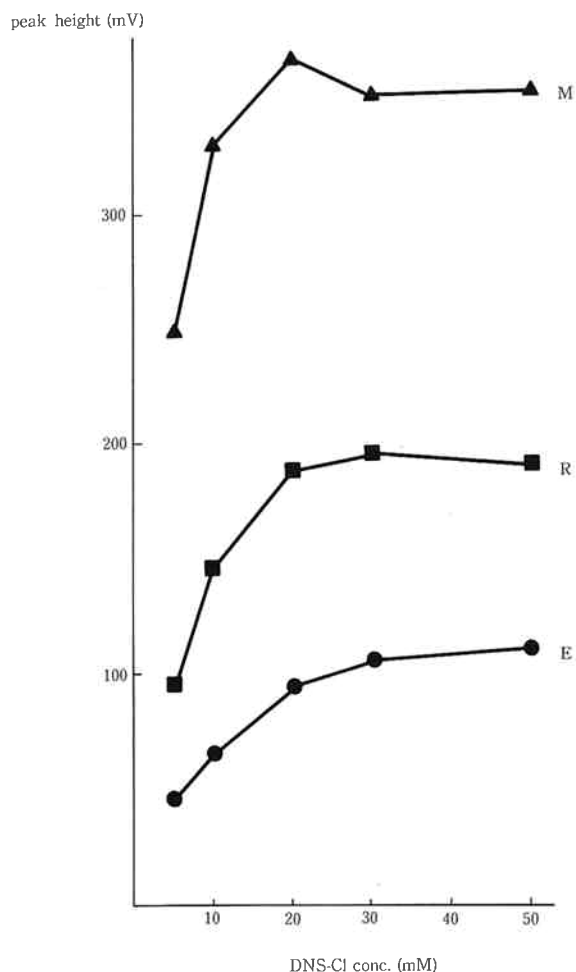


Fig. 6 Effect of dansylchloride concentration

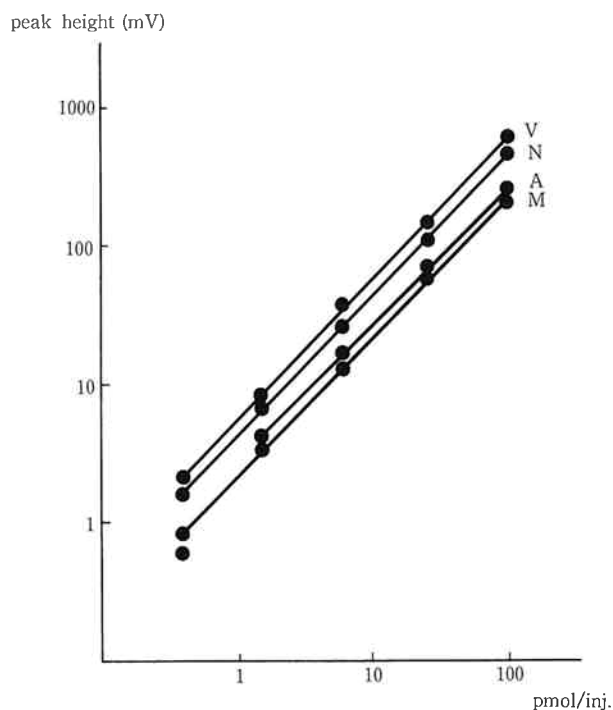


Fig. 7 Standard curves of DNS-Cl (fluorescence) method

Table 2 Reproducibility of DNS-amino acid by fluorescence detection

DNS-AA	C. V. (%) intra assay
D	3.0
E	5.2
N	2.9
Q	4.7
S	1.8
R	3.5
T	3.4
G	2.1
A	4.0
P	3.5
V	5.1
M	5.4
I	4.5
L	6.1
W	4.5
F	2.1
K	3.2
Y	8.1

n=5, 50 pmol/inj

ダンシルアミノ酸 50 pmol/inj. における再現性は、Table 2 に示すとおり変動係数はいずれも10%以下であり良好な結果が得られた。

〔3〕 ダンシルクロライド (化学発光・プレラベル) 法

TCPO を化学発光試薬として用い、ダンシルアミノ酸の蛍光法よりさらに高感度な方法の検討を行った。

Fig. 8 に TCPO-過酸化水素系化学発光の反応図を示す。TCPO は過酸化水素存在下、不安定な高エネルギー中間体の1,2-ジオキセタンジオンになり、これが蛍光物質にエネルギーをトランスファーして蛍光物質が基底状態から励起状態になり、再び基底状態に戻るときに発する光を検出するものである。

化学発光検出液体クロマトグラフシステムを Fig. 9 に示す。溶離液2種類、反応液2種類であり、装置構成は比較的簡潔である。

(1) TCPO, 過酸化水素溶媒の検討

TCPO, 過酸化水素は溶かす溶媒によってダンシルアミノ酸のピーク強度に影響があるため<sup>27)</sup>、溶媒の検討を行った。TCPO を溶かす溶媒に酢酸エチルとジオキサンを、過酸化水素の溶媒にアセトニトリルとアセトンを用いて行った。

結果を Fig. 10 に示す。アセトニトリル-酢酸エチルの組合せの時のピーク強度を1.0として他の組合せの

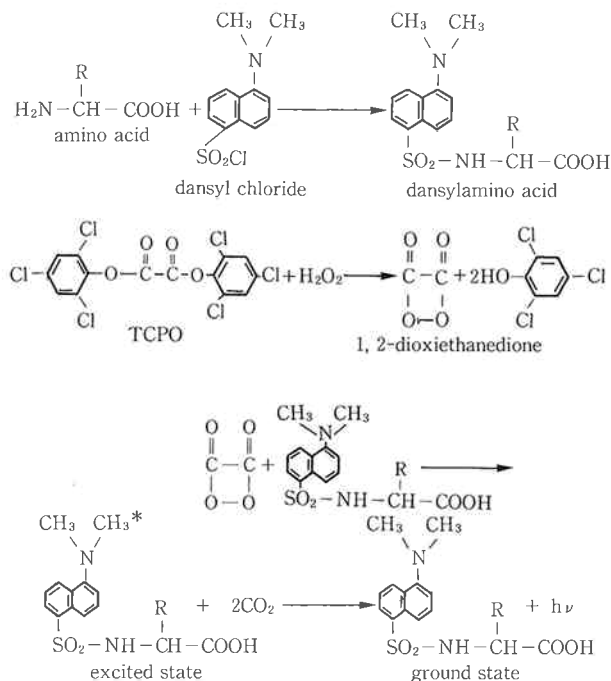


Fig. 8 Chemiluminescence reaction of TCPO with  $\text{H}_2\text{O}_2$  and dansylamino acid

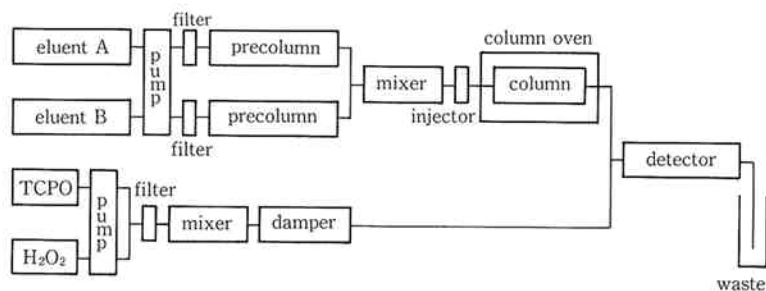


Fig. 9 Flow diagram for chemiluminescence detection by TCPO- $\text{H}_2\text{O}_2$

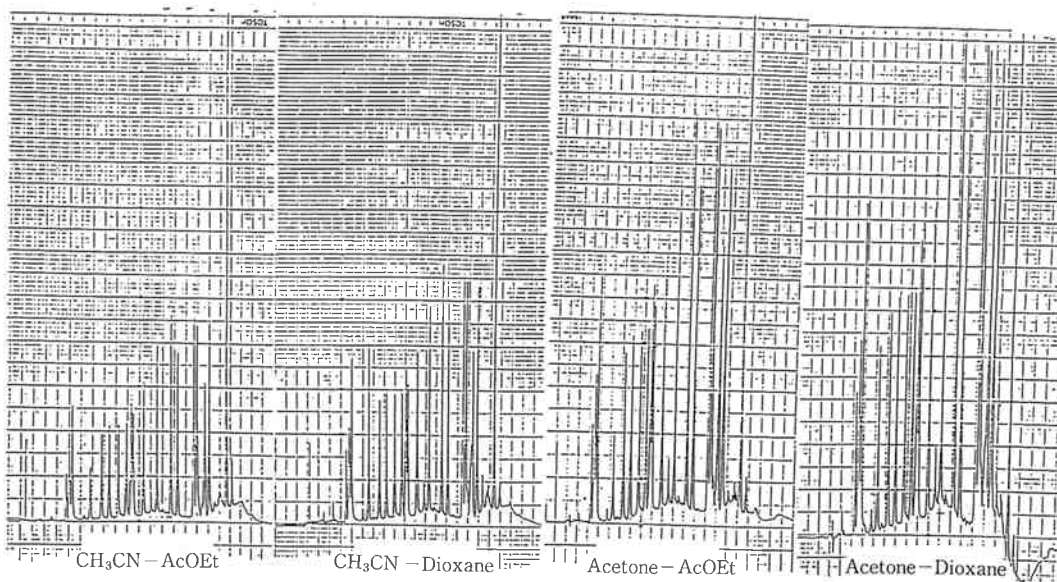


Fig. 10 Effect of solvent for TCPO and  $\text{H}_2\text{O}_2$

相対的強度を調べたところ、アセトニトリル-ジオキサンの組合せで1.5倍、アセトン-酢酸エチルの組合せで1.8倍、アセトン-ジオキサンの組合せで2.6倍ピーク強度が上昇した。しかしジオキサンを TCPO の溶媒にしたとき副生成物であるダンシル酸のピーク強度が酢酸エチルを溶媒としたときと比べて高いため、ダンシル酸付近のアミノ酸の分離に影響を及ぼす可能性があるので TCPO 溶媒には酢酸エチルを採用した。

過酸化水素溶媒はアセトンの方がピーク強度が強いがベースラインの安定性からアセトニトリルを採用した。

## (2) ガードカラムの効果

化学発光分析は非常に高感度なので溶離液中に存在する不純物によりバックグラウンドが上昇することがある。そこで ODS 系のガードカラムを分析カラムの前に設置して不純物の除去効果を見た。ガードカラムに TSK guardgel ODS-80T<sub>M</sub> を用いて行った。その結果を Fig. 11 に示す。溶離液のグラジエントによりアセトニトリル濃度が高くなるとカラムに付着していた汚れが溶出し

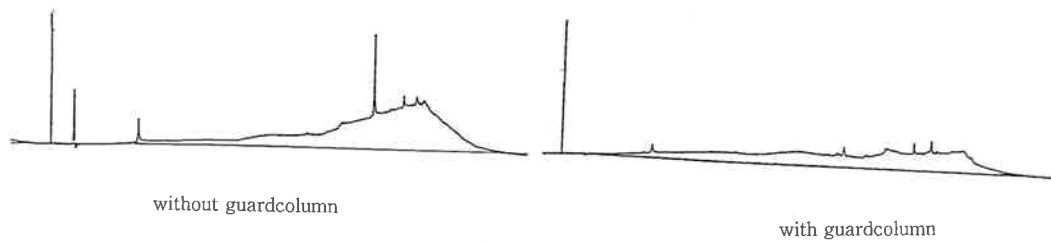


Fig. 11 Effect of guardcolumn

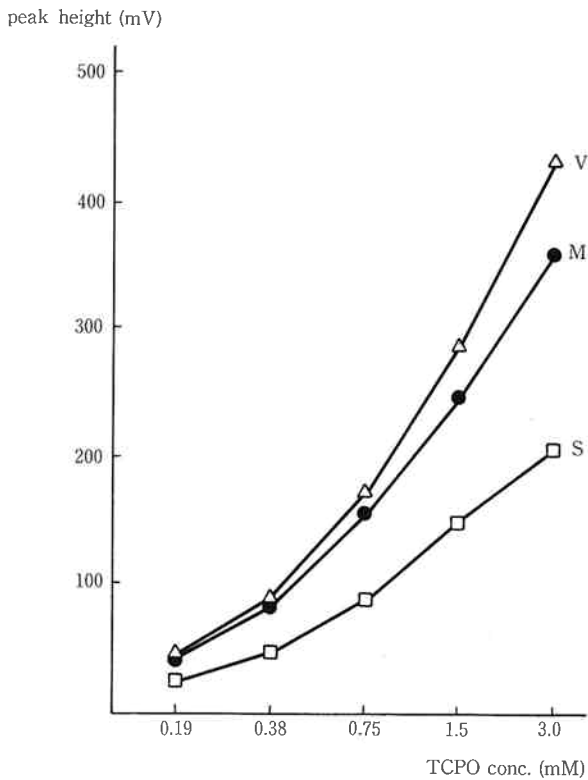


Fig. 12 Effect of TCPO concentration

てきてベースラインの上昇や未知ピークの出現があるが、ガードカラムを設置することによりかなり改善された。

(3) TCPO, 過酸化水素濃度の検討

TCPO の濃度によるピーク強度への影響を Fig. 12 に示す。TCPO 濃度が高くなるとピーク強度も高くなる傾向がある。しかし、TCPO は溶媒溶解性が低くアセトニトリルに対する最大溶解度は 5 mM であり、3 mM 以上の濃度では溶離液との混合後、TCPO が析出して配管つまりの原因になる可能性があるため TCPO 濃度は 3 mM とした。

また、過酸化水素濃度のピーク強度に与える影響は Fig. 13 に示すとおりであり、最大強度を得た 10 mM とした。

(4) ダンシルアミノ酸の分離, 検量線, 精度

Fig. 14 の左側にダンシルアミノ酸19種類を用いて

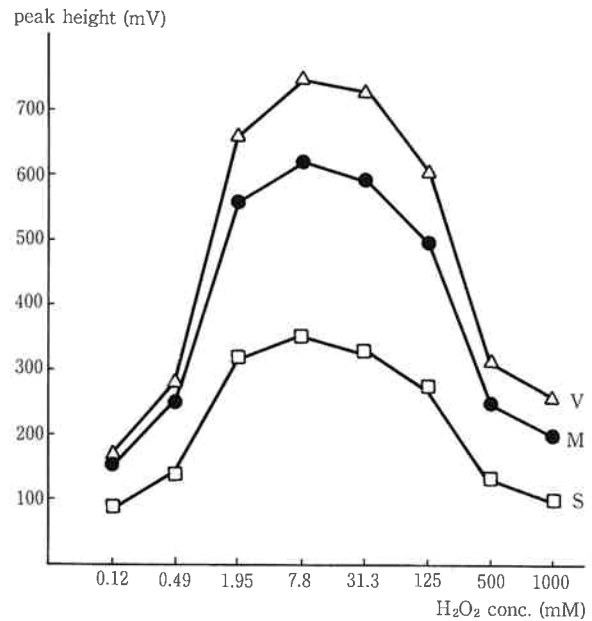


Fig. 13 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration

分離した結果を、右側にアミノ酸をプレラベル化後、分離したクロマトグラムを示す。アミノ酸をプレラベル化後、分離したものはダンシル酸のピーク強度が強クアスパラギン、グルタミンのピークに重なってきている。また未知のピークが数本出現しており、そのうちの1本がロイシンのピークと重なっているが溶離液のグラジェントを変えることにより分離可能である。

これら未知のピークはプレラベルに用いたダンシルクロライド由来の不純物、副生成物やプレラベル化中に起こる汚染が原因と思われる。

また現在市販されている化学発光検出器は受光部が全波長の光を検出するので、ダンシルアミノ酸の蛍光波長 (460 nm 付近) 以外の蛍光物質も検出したものと思われる。これは受光部の前にフィルターを挿入することにより特定波長のみを検出させれば、目的とする物質のみを検出でき未知ピークの妨害は防げられると思われる。

本方法の定量範囲は 50 fmol から 10 pmol であった。4 種のアミノ酸の検量線を Fig. 15 に示す。また、検出限界は 10 fmol であった。

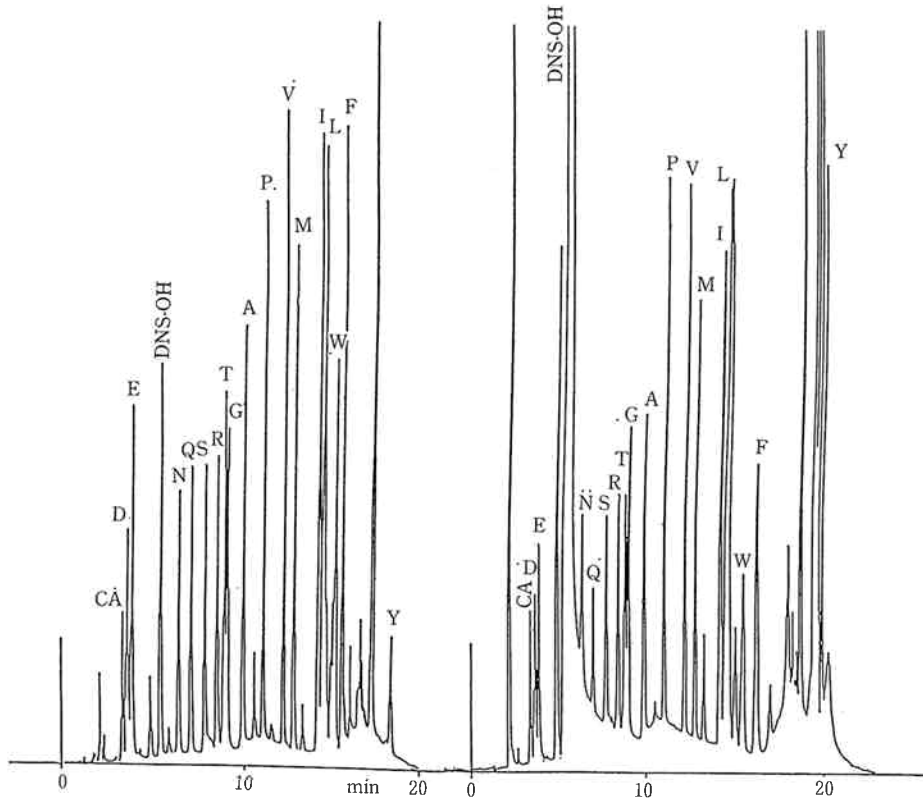


Fig. 14 Chromatogram of DNS-CL (chemiluminescence) method

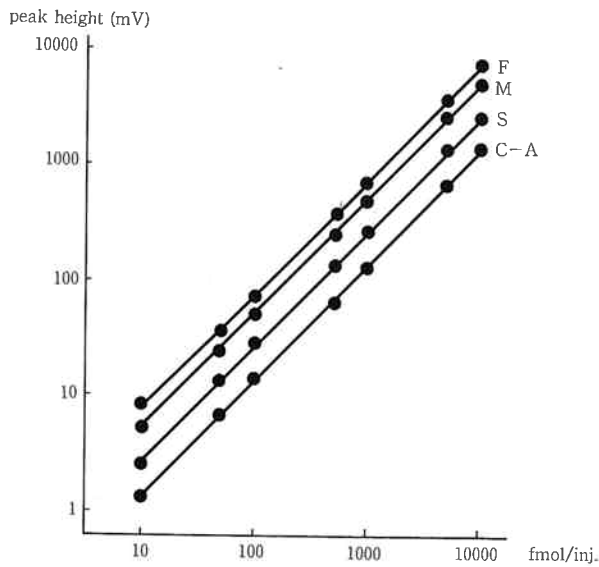


Fig. 15 Standard curves of DNS-CL (chemiluminescence) method

Table 3 Reproducibility of DNS-amino acid by chemiluminescence detection

DNS-AA	C. V. (%) intra assay
CA	1.6
D	2.5
E	0.7
N	3.7
Q	2.9
S	2.5
R	2.3
T	7.1
G	8.4
A	2.8
P	2.0
V	2.2
M	2.1
I	1.6
L	2.5
W	1.1
F	1.7
K	2.5
Y	18

n=5, 500 fmol/inj

再現性は Table 3 に示すとおり，ダンシルチロシンを除いてすべて変動係数が10%以内であり良好な結果が得られた。ダンシルチロシンはピークが低く保持時間が大きいいためベースラインの不安定さと重なり再現性が低かったものと思われる。

〔4〕 タンパク質・ペプチドの加水分解

タンパク質，ペプチドをアミノ酸分析するには加水分

解操作が必要となる。加水分解は塩酸加水分解，アルカリ加水分解，メタンスルホン酸加水分解等が知られてい



るが1種類の加水分解法でタンパク質構成アミノ酸をすべて定量できる方法はなく、上記の方法を組み合わせたリ、また特定のアミノ酸のみを定量する方法を行わなければならない。そこで加水分解操作の比較的容易で一般にも広く普及している塩酸加水分解法を採用し、蒸気加水分解法の検討を行った。またこの方法で定量できないアミノ酸(システイン・シスチン、トリプトファン)について個々に検討を行った。

アミノ酸分析はオルトフタルアルデヒド法を行った。

(1) 塩酸蒸気加水分解法の検討

プレラベルー逆相クロマトグラフィーによる蛍光、化学発光法の検討により、アミノ酸分析の感度はポストラベルーニンヒドリン法に比べて10000倍、オルトフタルアルデヒド法に比べても1000倍の感度上昇がみられた。これは加水分解に用いる試料が1/10000、1/1000で済むことになるが試料の微量化により加水分解中の汚染が大きな問題となってくる。

従来から使用してきた真空反応管は加水分解後、再使用のための洗浄処理を行っても、未知ピークの出現があり、微量試料には適用できなかった。そこで Fig. 16 に示す塩酸蒸気加水分解容器を作成した。

試料を入れる小試験管は使い捨てにし、容器底部に塩酸を加え加熱することによって発生する塩酸蒸気で加水分解を行うものである。

従来加水分解に用いてきた真空反応管と今回作成した

塩酸蒸気加水分解用容器によるブランクをアミノ酸分析計で調べた結果を Fig. 17 に示す。真空反応管による直接加水分解では矢印で示したところに未知ピークが現れているが塩酸蒸気分解ではほとんどピークが見られずベースラインが安定しており、加水分解中の汚染が防げた。

以上より塩酸蒸気加水分解容器は汚染が少なく、微量

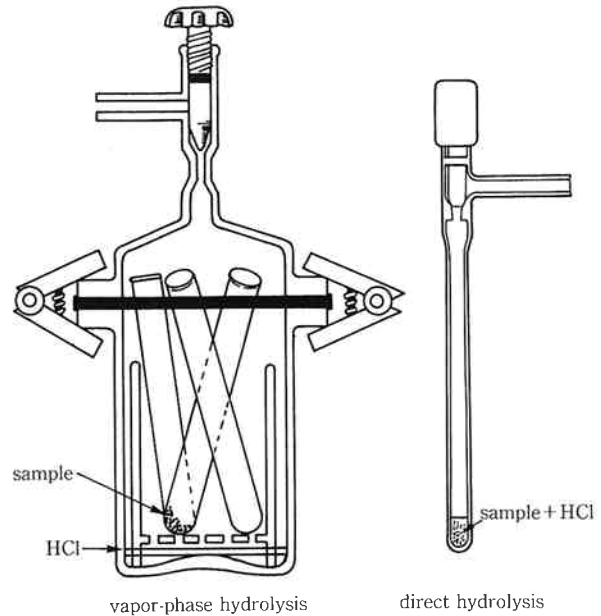


Fig. 16 Reaction tube for the hydrolysis of proteins and peptides

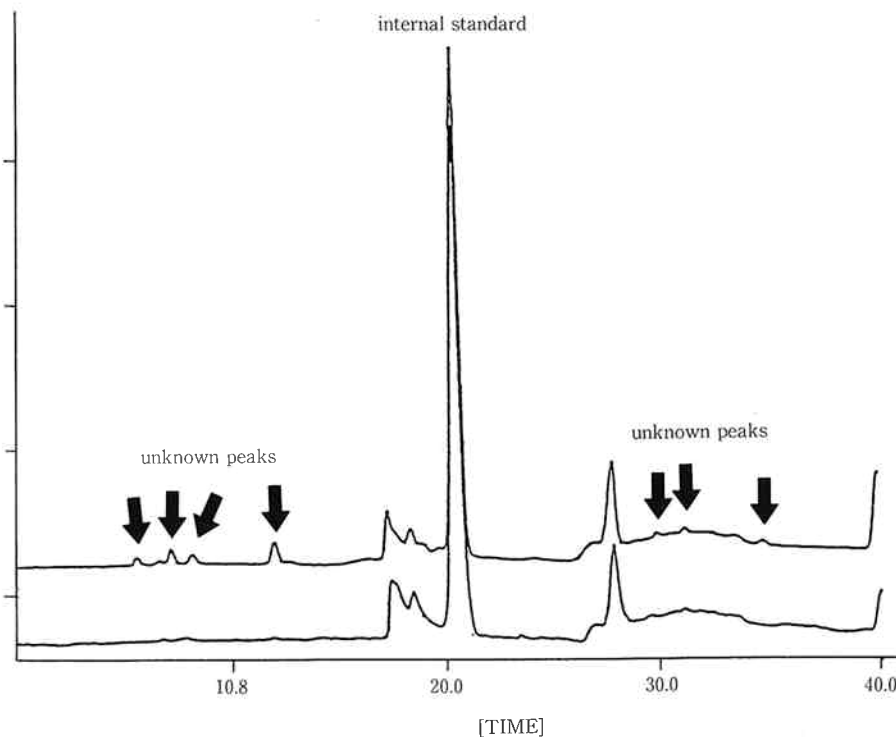


Fig. 17 Comparison of direct hydrolysis and vapor hydrolysis

試料のアミノ酸分析には適した方法である。

しかし塩酸蒸気加水分解は直接加水分解よりも加水分解力が低く、タンパク質内にバリン-バリン残基やバリン-イソロイシン残基、イソロイシン-イソロイシン残基の様に  $\alpha$  炭素付近に疎水性の側鎖を有するアミノ酸同士の結合は加水分解に抵抗性を示し、アミノ酸組成値が低めに出る傾向がみられた。プロウロキナーゼではこのような結合が5箇所あり、塩酸蒸気加水分解でのバリンの回収率は74%、イソロイシンの回収率は63%であった。直接加水分解による回収率はそれぞれ100%と95%であり、ここからも塩酸蒸気加水分解は直接加水分解に比べて加水分解力が低いことが判明した。そこでタンパク質分子内に上記のような結合を有する試料は分解中の汚染の可能性があるものの直接加水分解が必要である。

### (2) システイン、シスチンの定量

システイン、システインの2量体であるシスチンの定量は過ギ酸酸化-塩酸加水分解法、s-カルボキシメチルシステイン-塩酸加水分解法等が知られているが今回過ギ酸酸化-塩酸加水分解法の検討を行った。

過ギ酸酸化法の原理はシステインまたはシスチンを過ギ酸により加水分解に安定なシステイン酸に定量的に酸化させて、このシステイン酸を測定するものである。

過ギ酸は99%ギ酸と30%過酸化水素水を1:9の割合で混合し室温で1時間放置して調製したものを使用した。

試料を凍結乾燥後過ギ酸 100  $\mu$ l を加え、水中で4時間反応させる。ギ酸 50  $\mu$ l を加え攪拌後、減圧乾燥により過剰の過ギ酸を留去する。その後は通常の塩酸蒸気加水分解と同様の操作で行った。

試料の過ギ酸酸化するときの温度検討の結果を Fig 18に示す。0°C 時のシステインの回収率が95%以上で最も良好だったので過ギ酸酸化時の温度は0°C とした。

過ギ酸酸化による他のアミノ酸への影響を検討した。200 pmol のアミノ酸標準液を過ギ酸酸化後、アミノ酸分析計で定量した結果を Table 4 に示す。アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、アラニン、ヒスチジンの測定値が 200 pmol から大きく外れており、チロシンは全く検出されなかった。これは過ギ酸酸化によるアミノ酸の破壊などが考えられる。

過ギ酸酸化法ではこれらのアミノ酸の定量が不可能なため、全アミノ酸組成を求めるには別個に通常の塩酸加水分解をする必要がある。

### (3) トリプトファンの定量

トリプトファンの加水分解はチオグリコール酸-塩酸加水分解やアルカリ加水分解が知られている。今回チオ

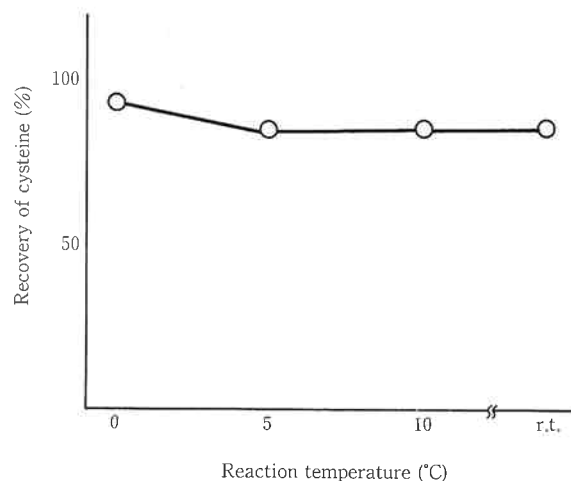


Fig. 18 Effect of temperature in performic acid oxidation

Table 4 Effect of the performic acid oxidation to amino acids

amino acid	sample conc. (pmol)	measurement value
D	200	226
T	200	200
S	200	203
E	200	211
P	200	197
G	200	215
A	200	220
C-C	200	N.D.
V	200	203
M	200	N.D.
I	200	198
L	200	198
Y	200	N.D.
F	200	201
H	200	264
K	200	201
W	200	N.D.
R	200	200

N. D.: not detected

グリコール酸-塩酸加水分解法を採用し、チオグリコール酸の濃度を検討した。

その結果を Fig. 19 に示す。3%以上でトリプトファンが80%以上回収できており、添加するチオグリコール酸の濃度は4%とした。

### (4) 分析系における塩の影響

タンパク質試料は通常適当な緩衝液中で取り扱い、保存を行うことが多いのでアミノ酸分析をする上で塩が分析中に及ぼす影響を検討した。

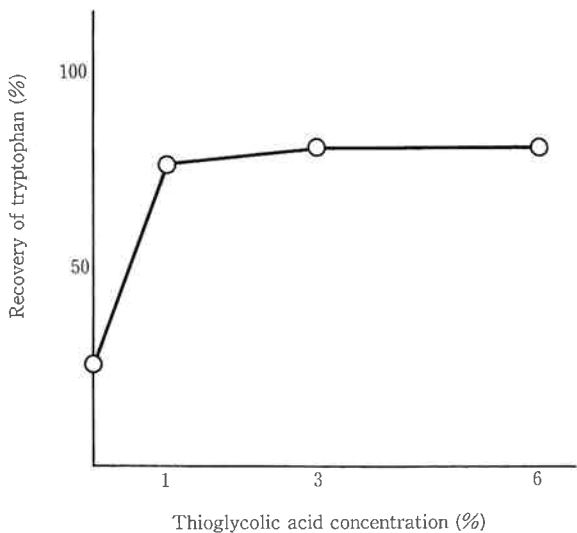


Fig. 19 Effect of thioglycolic acid concentration

検討したタンパク質は牛血清アルブミン、緩衝液はリン酸緩衝液、リン酸緩衝液-NaCl、トリス塩酸緩衝液の3種類について塩酸加水分解した結果を Fig. 20 に示す。リン酸緩衝液はクロマトグラムの前半が影響を受け、トリス塩酸緩衝液はヒスチジンの部分に大きなピークが出現している。

プロウロキナーゼについて加水分解前に脱塩した試料と 20 mM リン酸緩衝液 200 mM 塩化ナトリウムの存在する試料について、n=5 でアミノ酸組成分析の分析精度を求めた結果を Table 5 に示す。脱塩した試料では変動係数が 8% 以下であり、脱塩していない試料では

5% から 48% であった。

以上のことからアミノ酸分析に用いる試料は加水分解前に脱塩操作が効果があることが示された。

#### 4. ま と め

アミノ酸分析の高感度化・分析時間の短縮を目標として蛍光、化学発光法について検討を行ってきた。アミノ酸の検出範囲と分析時間について各法の比較を Fig. 21, 22 に示す。これよりダンシルクロライド (化学発光) 法はニンヒドリン法の 10000 倍、オルトフタルアルデヒド法の 1000 倍、ダンシルクロライド (蛍光) 法の 50 倍の感度の上昇が得られ、また検出範囲も他方に比べて広く、分析時間もニンヒドリン、オルトフタルアルデヒド法の半分以下となり、極微量な試料や多試料の分析に応用できると思われる。

しかし高感度化に伴う問題として汚染があり、分析に用いる試薬の高純度化や試料を取り扱う周りの環境の改善などを行わなければならない。その一環として塩酸蒸気加水分解法を検討することにより加水分解時における汚染を防ぐことができ、微量試料に対応することが可能となった。

#### 文 献

- 1) S. C. Meredith; *Analytical Biochem*, 136, 65-74 (1984)

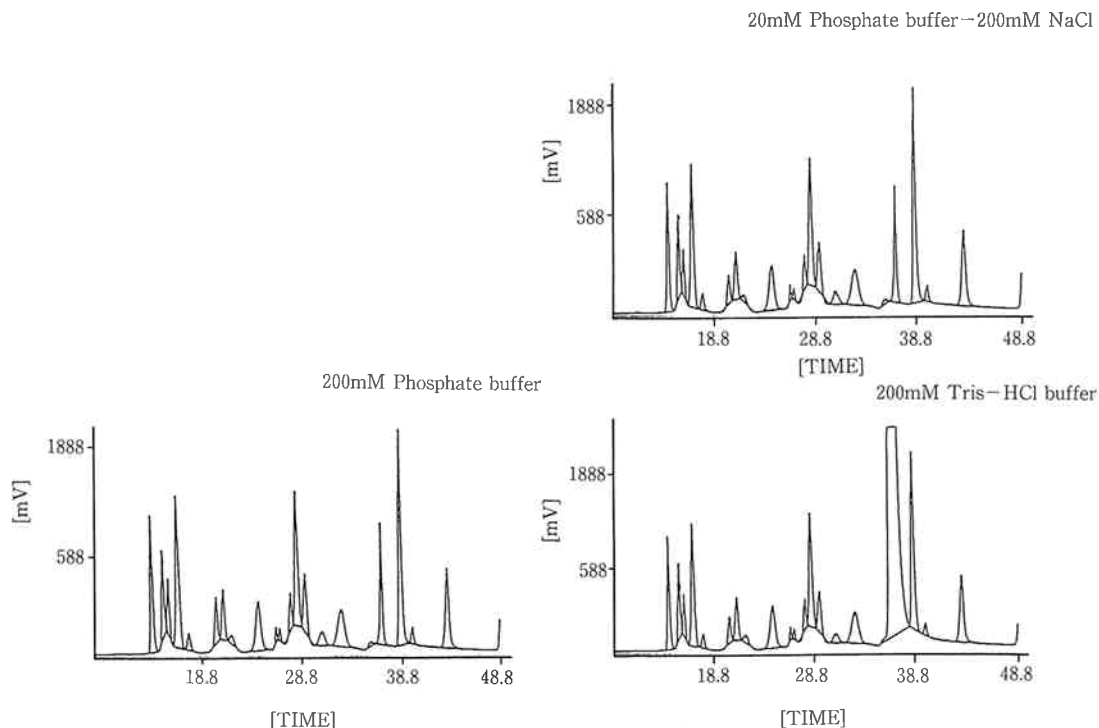


Fig. 20 Effect of salt

Table 5 Effect of desalting in amino acid analysis

amino acid	theoretical value	desalting		not desalting	
		measurement	C. V. (%)	measurement	C. V. (%)
D	38	38	0.26	47	36.7
T	26	25	0.81	29	40.6
S	30	27	0.85	31	48.6
E	41	43	0.94	59	21.9
P	23	22	0.62	32	22.6
G	35	38	0.67	52	19.8
A	16	19	0.99	21	20.9
V	19	18	0.55	26	12.5
M	7	7		7	
I	19	16	1.25	24	11.7
L	31	34	0.17	52	12.9
Y	18	17	1.18	22	5.1
F	11	11	1.03	16	13.0
H	17	17	0.91	35	34.0
K	26	25	0.40	36	14.4
R	22	22	1.59	31	13.4

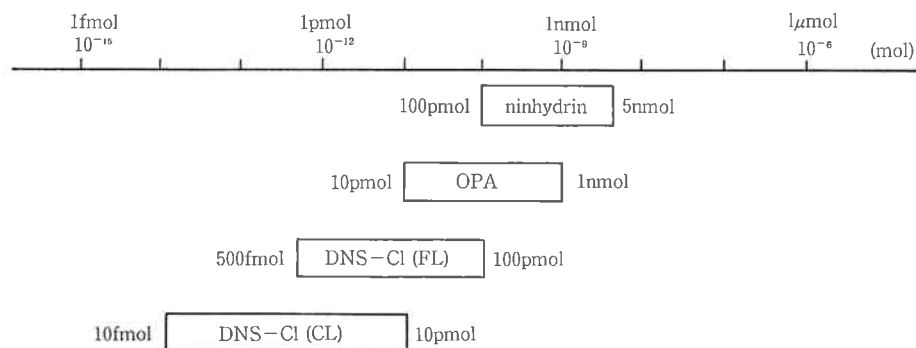


Fig. 21 Comparison of sensitivity

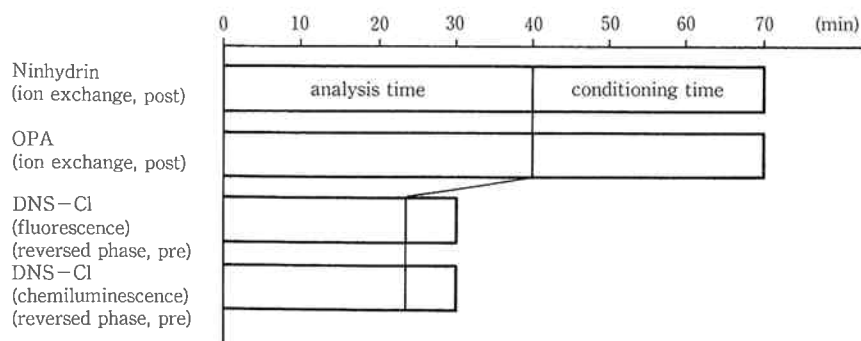


Fig. 22 Comparison of analysis time

- 2) R. F. Ebert; *Analytical Biochemistry*, **154**, 431-435 (1986)
- 3) T. W. Schwartz; *J. Chromatography*, **389**, 379-388 (1987)
- 4) S. A. Cohen; *Analytical Biochemistry*, **174**, 1-16 (1988)
- 5) P. Bohlen; *Analytical Biochemistry*, **126**, 144-152 (1982)
- 6) H. Konomi; *J. Chromatography Biomedical Application*, **311**, 375-379 (1984)
- 7) A. Tuji; *Chem. Pharm. Bull.*, **22**(10), 2413-2420 (1974)
- 8) E. Bayer; *Analytical Chemistry*, **48**(8), 1106-1109 (1976)
- 9) J. M. Wilkinson; *J. Chromatographic Science*, **16**, 547-552 (1978)
- 10) S. Weiner; *J. Chromatography*, **213**, 501-506 (1981)
- 11) N. Kaneda; *Analytical Biochemistry*, **127**, 49-54 (1982)
- 12) A. Negro; *Analytical Biochemistry*, **160**, 39-46 (1987)
- 13) A. Sano; *Talanta*, **34**(8), 743-744 (1985)
- 14) M. C. Roach; *Analytical Chemistry*, **59**, 411-415 (1987)
- 15) H. Arakawa; *Chem. Pharm. Bull.*, **30**(8), 3036-3039 (1982)
- 16) S. Takayasu; *J. Immunological Methods*, **83**, 317-325 (1985)
- 17) H. Arakawa; *Clinical Chemistry*, **31**(3), 430-434 (1985)
- 18) 辻 章夫; “日本電子ニュース”, **26**(5), 86-89 (1986)
- 19) A. Tsuji; *Analytical Science*, **5**, 497-506 (1989)
- 20) 今井一洋; “ぶんせき”, **12**, 888-893 (1984)
- 21) K. Imai; *J. Chromatography*, **303**, 173-176 (1984)
- 22) K. Imai; *Analytica Chimica Acta*, **177**, 103-110 (1985)
- 23) K. Imai; *J. Chromatography*, **400**, 169-176 (1987)
- 24) K. Imai; *J. Bioluminescence and Chemiluminescence*, **4**, 500-504 (1989)
- 25) B. E. F. Smith; *J. Chromatography*, **312**, 203-210 (1984)
- 26) G. Mellbin; *J. Liquid Chromatography*, **6**(9), 1603-1616 (1983)
- 27) R. Weinberger; *J. Chromatography*, **314**, 155-165 (1984)



著 者

氏名 伊藤 俊一  
Shun-ichi ITOH  
入社 昭和62年4月1日  
所属 東京研究センター  
解析研究部  
副主任研究員



著 者

氏名 斉藤 正七  
Shoshichi SAITOH  
入社 昭和35年3月21日  
所属 東京研究センター  
解析研究部  
副主任研究員



著 者

氏名 荒井 栄子  
Eiko ARAI  
入社 昭和58年3月16日  
所属 東京研究センター  
解析研究部



著 者

氏名 中西 泰夫  
Yasuo NAKANISHI  
入社 昭和40年4月1日  
所属 東京研究センター  
解析研究部  
部長