

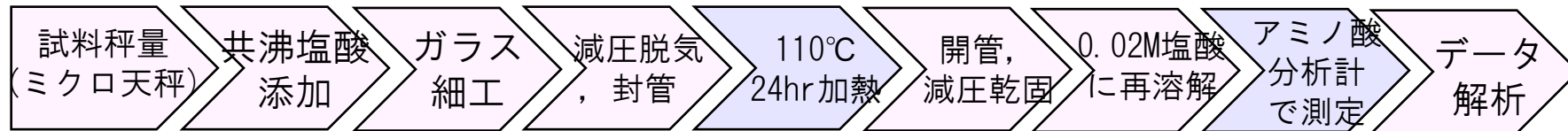
# アミノ酸組成分析をご依頼の方へ

- 当部門のアミノ酸組成分析
- 提出試料の調製及び提出上の注意点
- スムーズなご依頼のためのヒント
- データの読み方
- 分析申込上の注意点
- 分析スケジュール

2019年5月版

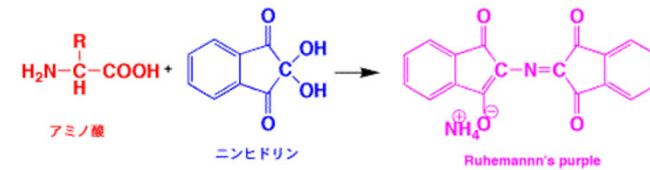
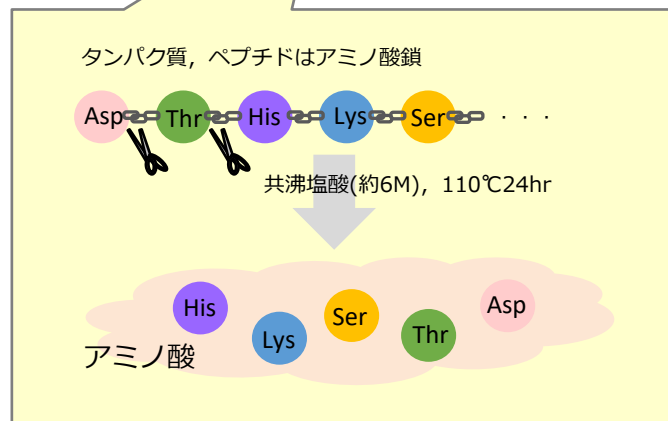
分析項目	標準分析	高感度分析	遊離アミノ酸分析
測定アミノ酸	17アミノ酸	17アミノ酸	40アミノ酸
測定方法	ニンヒドリン法	NBD-F法	ニンヒドリン法
使用機種	L-8900(日立)	LaChromUltra (日立)	L-8900(日立)
測定時間/1測定	2時間	10分間	5時間
定量範囲	0.2~20nmol (アミノ酸種により 異なります)	20pmol~	0.2~20nmol (アミノ酸種により 異なります)

## 分析方法 — 標準分析 —



加水分解

ニンヒドリン反応



キリヤ化学 <http://www.kiryachem.co.jp/q&a/q54.html>



L-8900  
(アミノ酸自動分析計)

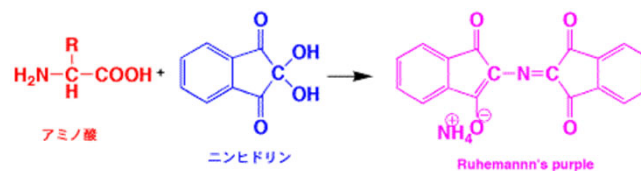
## 分析方法 — 遊離アミノ酸分析 —

必要に応じて  
、0.02M塩酸  
を加える

アミノ酸  
分析計  
で測定

データ  
解析

### ニンヒドリン反応



キリヤ化学 <http://www.kiriyachem.co.jp/q&a/q54.html>

L-8900  
(アミノ酸自動分析計)

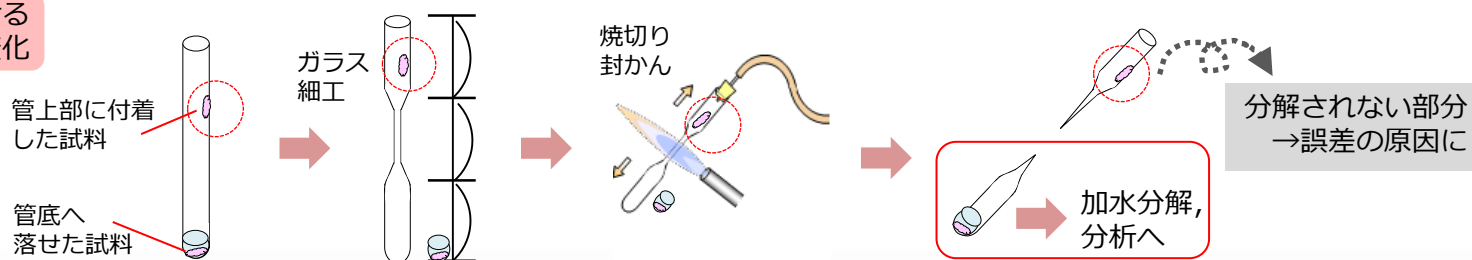


## 【標準分析，遊離アミノ酸分析共通事項】

- ・ 浮遊物の混入に注意して下さい。
- ・ 塩類は除いて下さい。  
測定の妨害または装置不調を招く場合があります。

## 【標準分析】

- ・ 試験管で提出される場合は $\Phi 12 \times 120$ mmの大きさのものを使用して下さい。  
(当分析室では耐久性，清浄性を確認したガラス試験管を水洗後， $500^\circ\text{C}$ で4時間以上加熱処理したものを使用しています)
- ・ 試験管でご提出の場合は，底にのみ溜まるようにして下さい。  
(管の真中より上部は切断するため加水分解されない場合があります。)

加水分解における  
試験管の形状変化

**共沸塩酸(約5.7M,0.1%フェノール含有)で110℃, 24時間加水分解**

- 一般的な加水分解法ですが、アミノ酸によっては分解してしまうものもあるため(Ser, Thrなど), 分解時間を変えると結果が変わります。継続実験は途中で分解条件を変えないことをお勧めします。
- Asn, Glnは酸化され, Asp, Gluとして検出します。
- Trp, Cystine, Cysteineは大部分が分解してしまうため, 定量が必要な場合, 別の方法を選択して下さい。
- 疎水性アミノ酸の完全加水分解は長時間を要します。この場合の定量は要相談です。
- 内標準物質の添加をご希望の場合, n-Leuを使用しますので, 申込の際に「n-Leu」もご選択下さい。

## トリプトファン

**New!!** 4Mメタンサルホン酸(0.2%トリプタミン含有)で110℃, 22時間加水分解

3Mメルカプトエタンサルホン酸に変わって, Trpが回収される方法として検討しました。

60kDaの純タンパクにおけるトリプトファン回収率は, 90%程度です。

試料特性による影響は未確認の部分もあることをご理解の上, ご利用ください。

## シスチン, システイン, メチオニン

「過ギ酸酸化法」または「還元法」で定量が可能になります

過ギ酸酸化法 - 加水分解前に過ギ酸酸化処理を行い, システイン酸及びメチオニンサルホンとして定量します。  
他のアミノ酸は分解される場合もあるため, 酸化処理をせずに加水分解し測定することをお勧めします。

申込の際, CysO<sub>3</sub>H, MetO<sub>2</sub>をご選択下さい。

還元法 - 加水分解前に2-メルカプトエタノール等の還元剤で還元処理を行い, S-カルボキシメチルシステインとして定量します。他のアミノ酸については過ギ酸酸化法と同様です。

申込の際, CM-Cysをご選択下さい。





## 遊離アミノ酸分析

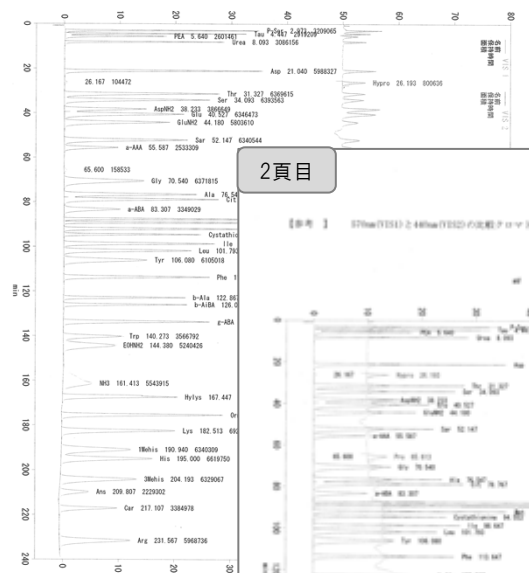
1 頁目

L-8900生体アミノ酸分析レポート

std ページ 1/3

解析日時: 2015/10/13 23:49:14 試料名: std 検体種別: 牛乳アレルギー、検量線をすべて削除(CCA)  
 注入量: 400 μL  
 カラム: C:VEZChrom EliteVEnterpriseProjectaDefaultVMethodV151005高分離生体 (80) -2.met  
 システム名: C:VEZChrom EliteVEnterpriseProjectaDefaultVSystemV2015年度V151005.smg  
 データファイル: C:VEZChrom EliteVEnterpriseProjectaDefaultVDataV2015年度V20151013151005-003.dat

【測定条件】  
 装置名: Amino Acid Analyzer 1-8900 (株式会社 日立ハイテクノロジーズ製)  
 カラム: K262235c-アミノ酸カラム(高分離用) φ4.6mm×100mm (株式会社 日立ハイテクノロジーズ製)  
 システムソフトウェア名: VEZ5000(高分離用) φ4.6mm×100mm (株式会社 日立ハイテクノロジーズ製)  
 分析液: 水相(体積分率) 0.5mol/L NaOH (関東化学株式会社製)、流動相: 0.5mol/L NaOH (関東化学株式会社製)  
 流速: 1.0 mL/min  
 検出器: 日立製(日立ハイテクノロジーズ製) 反応液濃度: 0.25mol/L NaOH 反応温度: 135℃  
 測定波長: 370nm(VIS), 440nm(VIS2) (Pico-Proの測定)、注入量: 400 μL、オートサンプラ: 武田商事、検量線表: 無し



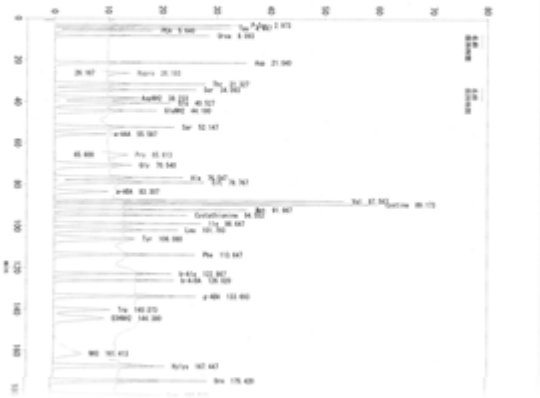
3 頁目

std ページ 3/3

VIS 1結果	保持時間	成分名	高さ	面積	アミノ酸 (nmol/40μL)
1	2.973	P-Ser	139145	3209065	1.000CAL
2	4.447	Tau	129987	2919209	1.000CAL
3	5.640	PEA	73071	2601461	1.000CAL
4	8.093	Urea	114658	3086156	40.000CAL
5	21.040	Asp	142545	5989327	2.000CAL
6	26.167		2137	104472	0.000
7	31.327	Thr	111427	6369615	2.000CAL
8	34.093	Ser	104679	6393563	2.000CAL
9	38.233	AspNH2	59160	3866649	2.259CAL
10	40.527	Glu	86033	6346473	2.000CAL
11	44.180	GluNH2	75873	5803610	1.971CAL
12	52.147	Sar	88776	6340544	5.000CAL
13	55.587	a-AAA	35763	2533309	1.000CAL
14	65.600		1876	158533	0.000
15	70.540	Gly	57537	6371815	2.000CAL
16	76.547	Ala	95437	6445958	2.000CAL
17	78.767	Cit	111069	6905714	2.000CAL
18	83.307	a-ABA	40492	3349029	1.000CAL
19	87.567	Val	214659	6459866	2.000CAL
20	89.173	Cystine	239534	6853683	2.000CAL
21	91.987	Met	143574	6444527	2.000CAL
22	94.553	Cystathionine	98540	3823252	1.000CAL
		Ile	108534	6437188	2.000CAL
		Leu	91657	6395176	2.000CAL
		Tyr	59978	6105018	2.000CAL
		Phe	104619	6140735	2.000CAL
		b-AIa	87562	3974349	2.000CAL
		b-AIb	88814	3930687	2.000CAL
		g-ABA	105136	6425141	2.000CAL
		Trp	42220	3568792	1.915CAL
		EOHNH2	37758	5240426	2.000CAL
		NH3	21146	5543915	2.000CAL
		NHys	82771	6273079	2.000CAL
		Orn	113974	7375513	2.000CAL
		Lys	81791	6928183	2.000CAL
		1Mehis	50037	6340309	2.000CAL
		His	65917	6619750	2.000CAL
		3Mehis	55397	6329067	2.000CAL
		Ans	21176	2229302	2.000CAL
		Car	41673	3384978	2.000CAL

2 頁目

【参考】 370nm(VIS)と440nm(VIS2)の比較クロマトグラム



定量範囲はアミノ酸により異なります。概ね、同封の標準溶液濃度の1/10~10倍です。この範囲から外れた値は**正しく定量されていないことがあります。**しかし、「Trace」でも良い場合があります。先行文献を参考に、再測定が必要かご判断下さい。

表示値は測定機に注入した溶液中(40μL)のアミノ酸量です。ご自分の欲しい単位量に換算して下さい。

「アミノ酸分析をご依頼の方へ」を同封していますので、データを読む際の参考にして下さい。


アミノ酸組成分析をご依頼の方へ (標準分析: L-8900(日立ハイテック))

当分析室のアミノ酸組成分析は、ご提出いただいた申請書の内容に基づき試料前処理を行い、レポート中に記載してあります。標準溶液濃度の1/10~10倍の範囲で測定を行います。

測定データについて

- 測定データレポートは1枚です。1頁目はクロマトグラムで、下部は波長370nmにおけるクロマトグラム、上部は波長440nmのクロマトグラムです。2頁目は、370nmと440nmの両方の測定結果を示した参考資料です。3頁目は、測定結果と検量線表(検量線表とは別ページ)の参考資料です。
- 本分析の検量線は、コンピュテラを用いたボトムアップ法による検量線に基づいて、検量線のアミノ酸濃度と検量線の面積比が一定であることを確認しております。
- 定量範囲は1~20nmol/Lです。この範囲から外れた数値は正確でない可能性があります。正確な数値を求めたい場合は、検量線から10%以内の範囲で再測定することをお勧めします。
- 各アミノ酸の検量線は、検量線に検量線の検量線(検量線)との検量線で行っていますが、試料中の検量線と検量線の検量線により、検量線と検量線の検量線が異なる場合があります。その場合は検量線と検量線とを比較し、検量線と検量線の検量線が異なる場合は、ご自身の検量線の検量線と検量線の検量線とを比較することをお勧めします。

<測定データレポート例>



## 申込方法

**ログイン**

**分析申込**

**分析項目選択**

**申込内容入力**

**申込内容入力**

機分析受託サービス IA SERVICE

サービス利用案内 分析申込、マイページ

Home 分析申込、マイページ 分析申込

分析項目選択 申込書作成 申込内容確認

分析項目選択  
ご希望の分析を選択してください。

分析項目  
アミノ酸組成分析  
タンパク質組成分析

必ず確認してください  
感染性・放射性のサンプルや、危険有害性のため、  
保管上の注意、運出時の措置を確認されたうえで、  
本サイトをご利用いただくにあたり、以下の環境を推奨いたします。  
Windows 7 (SP1) : IE11, Firefox 59, Chrome 66

機分析受託サービス  
管理担当：  
北海道大学 創成研究機構  
グローバルファシリティセンター 機分析受託部門  
〒001-0021 札幌市北区北21条西10丁目  
TEL: (011) 736-9235 (代表)

【アミノ酸組成分析】申込書作成

申込書作成で使用する情報について

1. 申込内容入力機能  
申込内容入力ボタンで機分析受託サービスに申込内容を入力し、必要事項を入力後に【申込内容一括転送】ボタンを押して内容を確認してください。
2. 確認内容入力機能  
過去の申込内容が履歴として保存されており、転送することができます。【データの転送先】ボタンを押して履歴の一覧を確認してください。ボタンより履歴、ご希望の履歴の【コピー】ボタンを押して申込内容を一括転送し、必要事項を入力してください。
3. 履歴検索機能  
申込内容入力機能で入力した履歴を確認し、【転送】ボタンを押して、申込内容を転送してください。
4. コピー機能  
申込内容入力機能で入力した履歴を確認し、【コピー】ボタンを押して、申込内容を転送してください。
5. 履歴検索機能  
申込内容入力機能で入力した履歴を確認し、【転送】ボタンを押して、申込内容を転送してください。
6. 申込内容入力機能  
申込内容入力機能で入力した履歴を確認し、【転送】ボタンを押して、申込内容を転送してください。

申込内容一覧

申込No.	分析項目	分析内容	分析日時	分析結果
Sample1	アミノ酸組成分析	アミノ酸組成分析		

試料名  
試料名\*  
半角英数字 10文字以内で記入してください。  
Sample1

アミノ酸組成分析 項目選択

標準分析 (17アミノ酸のみ)  アミノ酸 (Gln, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Thr, Val) または  $\beta$ -Ala 分析  標準分析 (追加アミノ酸あり)  遊離アミノ酸分析  高感度分析  分析不要

分析回数  
分析回数を指定してください。標準分析は1回、高感度分析は2回、遊離アミノ酸分析は1回、追加アミノ酸分析は1回です。

標準分析のみ追加アミノ酸選択  
 HyLys  HyPro  Trp  CysOH  CM-Cys  MetO<sub>2</sub>  n-Leu (内標準として)

標準分析 (17アミノ酸) のみ追加アミノ酸を選択して分析する場合は、標準分析の項目に追加アミノ酸を選択してください。

【標準分析】前処理

標準分析 (17アミノ酸) のみ追加アミノ酸を選択して分析する場合は、標準分析の項目に追加アミノ酸を選択してください。

加水分解  
 共通標準法、110°C、24hr  3M MESA 水相、110°C、22hr  60% 共通標準法、100°C、15hr  その他の条件  
 加水分解不要

加水分解 回数  
分析回数を指定してください。標準分析は1回、高感度分析は2回、遊離アミノ酸分析は1回、追加アミノ酸分析は1回です。

秤量  
加水分解時の試料秤量についてお答えください。秤量回数：  
 不要  要

秤量回数  
加水分解回数と一緒に指定してください。秤量回数：  
 不要  要

フィルター処理

## 申込入力内容

編集 申込1件目

**試料名**  
 試料名\* : [Sample1] × **試料名は英数字10文字以内**  
半角英数字10文字以内で記入してください。

**アミノ酸組成分析 項目選択**  
標準分析(17アミノ酸)及び高感度分析は主にタンパク質試料を対象とした分析で、遊離アミノ酸分析は主に溶液試料を対象とした分析です。

分析項目選択\* :  標準分析 (17アミノ酸のみ)  アミノ糖(GlcNH<sub>2</sub>, GalNH<sub>2</sub>)またはβ-Ala分析  標準分析 (追加アミノ酸あり)  遊離アミノ酸分析  高感度分析  分析不要

分析回数 : 1 **分析項目を選択。分析回数も必須です。**  
分析回数を数値でご指定ください。精度良く分析するためには、複数回分析をお勧めします。特に指定が無かった場合は1回とします。

<<標準分析のみ>>追加アミノ酸選択 :  HyLys  HyPro  Trp  CysO<sub>2</sub>H  CM-Cys  MetO<sub>2</sub>  n-Leu(内標準として)

標準分析(17アミノ酸)に追加して同時分析可能なアミノ酸です。対象アミノ酸がありましたら指定してください。

**【標準分析】前処理**  
標準分析(17アミノ酸)をご選択の場合、前処理としての加水分解方法について、下記をご指定ください。

加水分解 :  共沸塩酸, 110°C, 24hr  3M MESA水飴, 110°C, 22hr  50%共沸塩酸, 100°C, 15hr  その他の条件

加水分解回数 : 1  
分析回数を数値でご指定ください。試料の繰り返し精度や精度良く分析するためには、複数回分析をお勧めします。特に指定が無かった場合は1回とします。

秤量 :  不要  要  
加水分解時の試料秤量についてお答えください。秤量回数は、加水分解回数と同一とします。

秤量回数 : 1  
加水分解回数と同一にります。特に指定が無かった場合は、1回とします。

**フィルター処理**  
 フィルター処理 :  お任せ  要  
特に希望されなくても、処理が必要となる場合があります。

**データ加工等**  
 データ加工等 :  不要  要  
ご希望により、データをEメールに添付するための加工なども対象となります。

\* は、入力必須項目です。  
 入力漏れがあると、申込みを進められなくなっています。



## 申込入力内容

### 試料情報 - 1

試料の由来 :

※注意※データの精密性を考慮し、データベース上には保存いたしません。「届出からコピー」される時は、お手数ですが再度ご入力ください。申込内容を訂正して再度申込書を印刷される場合も同様です。

**分析の参考にご記入ください。「試料の由来」はデータベース上に保存しません。**

試料形態 :  乾燥粉末  液体試料  その他

均質な試料をご用意ください。提出された試料は、均質化された試料として取り扱います。

液体試料の組成 :

液体試料のとき記載してください。分析を助する物質もありますので、お知らせください。

「標準分析のみ」試料中のタンパク質含有率 (%) \* :  タンパク質含有率  該当しない(遊離アミノ酸分析依頼のため)

タンパク質の含有が少ないと検出できないことがあります。分析の組立てに必要な情報です。依頼または予想でも結構ですので、ご記入ください。

**入力必須項目。タンパク質含有率と提出試料量より、アミノ酸検出値を予測し、分析フローを作成します。**

試料量 (mg, μL) \* :

提出された試料量をお知らせください。[標準分析] 純タンパクの固体試料で1mg以上、[遊離アミノ酸分析] 500μL以上必要です。

不純物 :  塩 salt  糖 sugar  脂質 lipid  その他

測定妨害または装置故障を引き起こす物質もありますので、含有が考えられる物質をお知らせください。

試料の提出及び保管 \* :  室温 room temp. (-80°C)  冷蔵庫(5°C程度) low temp.  冷凍庫(-18°C程度) freezer  冷凍庫 freezer

分析されるまでの間の保管状態にもなります。

**適した保管条件をお知らせください。**

### 分析に関する希望調査

測定の目的 \* :  組成調査  定量  純度検定  その他

分析の組立てに必要な情報ですので、お知らせください。

「標準分析」目的のアミノ酸 :  17アミノ酸全て  Asp  Thr  Ser  Glu  Pro  Ala  Gly  Cystine  Val  Met  Ile  Leu  Tyr  Phe  Lys  His  Arg  HyPro  HyLys  Trp  β-Ala  Cysteic acid  Methionine sulfone  CM-Cys  GlcNH<sub>2</sub>  GalNH<sub>2</sub>  n-Leu  その他のアミノ酸 (入力欄に記載してください)

目的のアミノ酸をお知らせください。

「遊離アミノ酸分析」目的のアミノ酸 :  遊離アミノ酸分析項目全て  Asp  Gln  Thr  Asn  Ser  Glu  Pro  Ala  Gly  Cystine  Val  Met  Ile  Leu  Tyr  Phe  Lys  His  Trp  Arg  α-Phosphoserine  Taurine  o-Phosphoethanolamine  Urea  HyPro  Sarcosine  α-Aminoadipic acid  Citrulline  α-Amino-n-butyric acid  Cystathionine  β-Ala  β-Aminoisobutyric acid  γ-Aminobutyric acid  Ethanolamine  HyLys  Ornithine  1-MeHis  3-MeHis  Anserine  Carnosine

目的のアミノ酸をお知らせください。

再測定の希望 \* :  希望する  希望しない(大体の値で良い)  その他

目的のアミノ酸が定量範囲に入らなかった場合に、濃度を調整して再測定を行います。再測定は追加料金がかかります。

**入力必須項目。再測定の要不要を指示してください。**

### 分析に関する確認情報

担当者との打ち合わせ \* :  している  していない  これから希望する  過去の依頼で打ち合せ済み  その他

試料の分析履歴について \* :  初めて申し込む試料  再測定  類似試料  その他

測定条件などの機密のため、以前分析を申し込まれたことがありましたらお知らせください。

**適した分析を行うための調査です。**

以前申し込まれた受付No :

上記で再測定・類似試料などを選ばれたかたはご記入ください。

その他ご要望等 :

### 学内利用者向け確認情報

分析申込場所と結果の返却場所を選択してください

申込場所 :

サテライト受付をご希望の場合、回収予定をご確認ください。回収日前日までにご提出ください。

**ご自身でご選択、ご指定ください。函館キャンパスの方は、学内便をご利用いただけます。**

返却場所 :

サテライト受付をご希望の場合、返却予定をご確認ください。返却日曜日以降に取りお越してください。

申込内容一覧に転記する

閉じる

# 分析申込上の注意点

## 参考情報 — 標準分析における必要試料量試算とアミノ酸定量可否を試算するための計算例 —

タンパク質を構成するアミノ酸を20種、分子量は各アミノ酸で異なるため、平均分子量を100として試算例を示します。測定機の定量範囲は、0.2 ~ 20 nmol / 40μL、即ち5 ~ 500 nmol / 1mLとします。

【例1】タンパク質を含む固体試料 100μg を加水分解して、アミノ酸を定量分析

### ① タンパク質含有率が100%の試料の場合

アミノ酸の平均分子量100で割り、総アミノ酸モル数にします。

$$100\mu\text{g} \div 100 = 1\mu\text{mol} \text{ (総アミノ酸モル数)}$$

タンパク質が、20種のアミノ酸で平均的に構成されているとして、1種のアミノ酸モル数にします。

$$1\mu\text{mol} \div 20 = 0.05\mu\text{mol} \text{ (1アミノ酸当たりのモル数)}$$

加水分解後に塩酸を留去した後、0.02M塩酸で再溶解する溶液量を400 μLとします。

$$0.05\mu\text{mol} \div 400\mu\text{L} = 0.000125\mu\text{mol} / 1\mu\text{L} = 0.125\text{nmol} / 1\mu\text{L} \text{ (1アミノ酸当たりの濃度)}$$

測定機に注入する40 μL当たりの濃度にするため、分母及び分子に40を掛けます

$$0.125\text{nmol} / 1\mu\text{L} \times 40 / 40 = \mathbf{5\text{nmol} / 40\mu\text{L} > 0.2\text{nmol} / 40\mu\text{L}}$$

➡ ○ 定量範囲内。

試料量は100μgで可

### ② タンパク質含有率が1%の試料の場合

タンパク量を求める。

$$100\mu\text{g} \times 0.01 = 1\mu\text{g}$$

以下①と同様に求める。

$$1\mu\text{g} \div 100 = 0.01\mu\text{mol} \text{ (総アミノ酸モル数)}$$

$$0.01\mu\text{mol} \div 20 = 0.0005\mu\text{mol} \text{ (1アミノ酸当たりのモル数)}$$

$$0.0005\mu\text{mol} \div 400\mu\text{L} = 0.00000125\mu\text{mol} / 1\mu\text{L} = 0.00125\text{nmol} / 1\mu\text{L} \text{ (1アミノ酸当たりの濃度)}$$

$$0.00125\text{nmol} / 1\mu\text{L} \times 40 / 40 = \mathbf{0.05\text{nmol} / 40\mu\text{L} < 0.2\text{nmol} / 40\mu\text{L}}$$

➡ × 定量範囲外。試料量は400μg以上必要。

【例2】タンパク質を含む培地溶液試料 100μL を加水分解して、アミノ酸を定量分析。塩類を10%含み、タンパク質含有率は30%。

タンパク量を求める。

$$100\mu\text{L} \times 0.3 = 30\mu\text{g}$$

以下【例1】①と同様に求める。

$$30\mu\text{g} \div 100 = 0.3\mu\text{mol} \text{ (総アミノ酸モル数)}$$

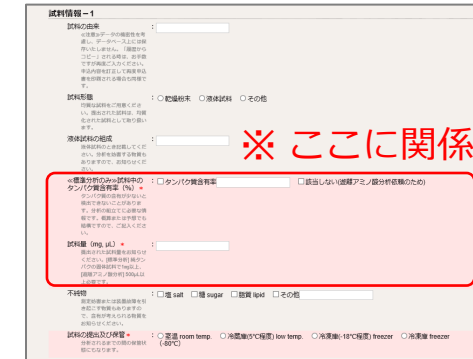
$$0.3\mu\text{mol} \div 20 = 0.015\mu\text{mol} \text{ (1アミノ酸当たりのモル数)}$$

$$0.015\mu\text{mol} \div 400\mu\text{L} = 0.0000375\mu\text{mol} / 1\mu\text{L} = 0.0375\text{nmol} / 1\mu\text{L} \text{ (1アミノ酸当たりの濃度)}$$

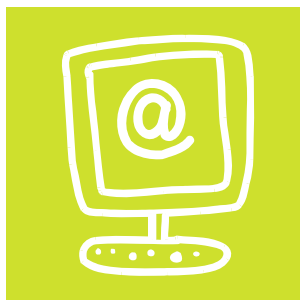
$$0.0375\text{nmol} / 1\mu\text{L} \times 40 / 40 = \mathbf{1.5\text{nmol} / 40\mu\text{L} < 0.2\text{nmol} / 40\mu\text{L}}$$

➡ × 定量範囲外。試料量は130μL以上必要。

## 【分析申込—申込入力内容—試料情報1】







参考資料があります。  
WEBサイトもご覧下さい。  
ご不明な点はお気軽にお問い合わせ下さい。  
内線9247  
E-mail [aaa@gfc.hokudai.ac.jp](mailto:aaa@gfc.hokudai.ac.jp)

【アミノ酸組成分析】

[https://www.gfc.hokudai.ac.jp/system/ias/doc/aaa\\_top](https://www.gfc.hokudai.ac.jp/system/ias/doc/aaa_top)