

# 粒径 3 μm イオン交換樹脂を用いる 高速アミノ酸分析計の開発

## High Performance Amino Acid Analyzer with 3 μm Ion Exchange Resin

アミノ酸分析計は、生化学の分野や医薬品、食品の品質管理などに広く用いられる。特に最近では、遺伝子工学などのバイオテクノロジーや臨床化学にも利用されるようになり、いっそうの分析時間の短縮と分析感度の向上が要望されている。

そこで、業界初の 3 μm という微粒子のイオン交換樹脂を用いたカラムを開発して分離を高速化し、タンパク構成アミノ酸30分分析、生体液アミノ酸2時間分析を実現した。また、自動脈流補正機構を備えた小容量ポンプの開発によってノイズの低減を図り、従来製品の 3 ~ 6 倍の高感度分析、すなわちニンヒドリン法で 10 pmol、蛍光法で 500 fmol の検出を可能にした。更に、16 種の分析条件の連結や成分同定ミス判定など、機能及び操作性を著しく向上させた。

高田芳矩\* Yoshinori Takata  
藤井芳雄\*\* Yoshio Fujii  
高橋秀夫\*\*\* Hideo Takahashi  
鴈野重威\*\*\*\* Shigetake Ganno

### 1 緒言

アミノ酸はタンパク質やペプチドを構成し、あるいは生体内に存在して重要な役割を果たしている。それゆえ、アミノ酸分析はタンパク質のアミノ酸組成や一次構造を決定する手段として生化学、生物学などの研究に欠くことができない。また、医薬品や食品の品質管理にも広く用いられている。特に、遺伝子工学などのバイオテクノロジーや臨床化学分野でもアミノ酸分析が利用されるようになり、分析時間の短縮と分析感度の向上が要求されている。これらのニーズに対応するため、新たに粒径 3 μm のイオン交換樹脂を開発して分析の迅速化を、また自動脈流補正機構を備えた小容量ポンプの開発によりノイズの低減を図り、高感度化を実現して従来製品に比べ更に高性能化されたアミノ酸分析計を製品化した。本稿では、イオン交換クロマトグラフィーによるアミノ酸の高速・高感度分析法と、それを達成するために開発した要素技術について述べる。

### 2 日立製作所のアミノ酸分析の歴史

イオン交換クロマトグラフィーによるアミノ酸の系統的分離と、その自動分析法が1958年 Spackman, Stein 及び Moore ら<sup>1)</sup>によって発表されて以来、日立製作所をはじめ分析機器メーカーによる分析計の高性能化の歴史が始まった。1962年に発売された KLA-2 形日立アミノ酸分析計では、タンパク構成アミノ酸は約 21 時間、生体液アミノ酸は 44 時間で分析していた。それが 1977 年に発表された 835 形では飛躍的に短縮され、それぞれ 50 分及び 4 時間に、更に今回開発した L-8500 形ではそれぞれ 30 分及び 2 時間と  $\frac{1}{40} \sim \frac{1}{20}$  にまで短縮されてきた。一

方、分離カラムの長さは 1,500 mm から 60 mm へと  $\frac{1}{25}$  に、また検出下限は 5 nmol から 10 pmol へと 500 倍の高感度化がなされている。ここで分析速度の向上の様子を、装置が発売された年代に対してプロットしてみた。その結果は図 1 に示すとおりである。縦軸には一成分当たりの分析時間の対数値をとって

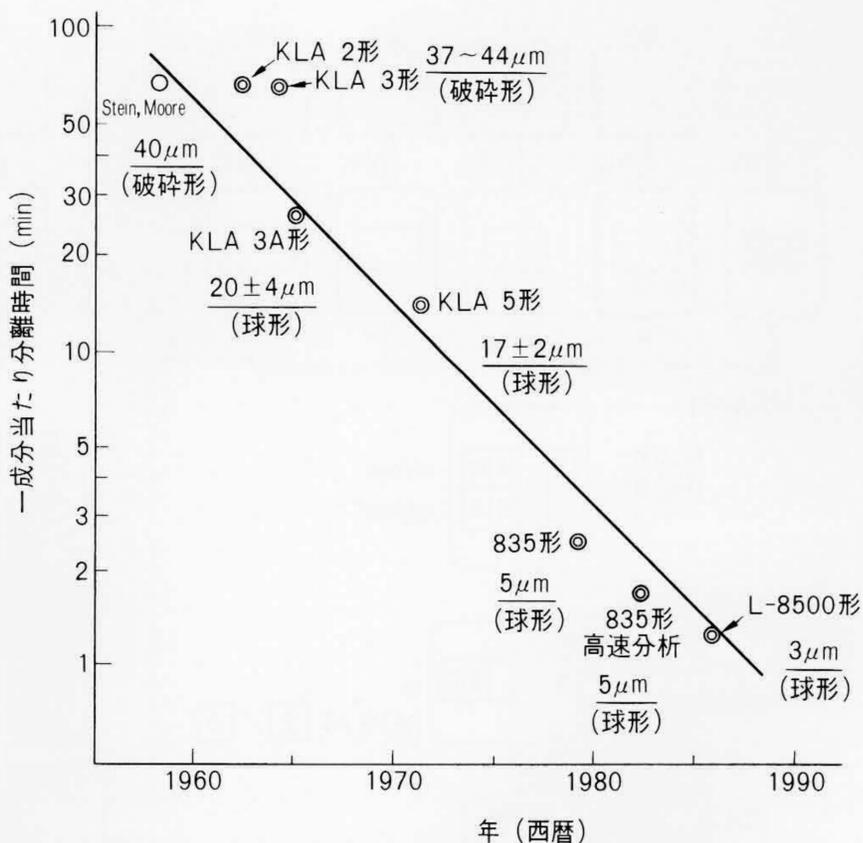


図 1 分析時間の短縮とイオン交換樹脂粒径 年代とともに、イオン交換樹脂粒径が微細化・均一化されて、分離時間も指数関数的に短縮されている。

\* 日立製作所那珂工場 工学博士 \*\* 日立製作所那珂工場 \*\*\* 日立製作所計測器事業部 \*\*\*\* 日立製作所那珂工場 理学博士

いるが、上記プロットはほぼ直線関係にあることが分かる。同図中にはカラム充てん剤の粒径も示したが、微粒子化され粒度分布が均一化されて高性能化が達成されている。特に835形では $5\mu\text{m}$ 、L-8500形では $3\mu\text{m}$ のイオン交換樹脂が業界で初めてアミノ酸分析計に採用されている。より微細な充てん剤を採用するに当たり、分離条件<sup>2),3)</sup>やカラムの充てん方法<sup>4)</sup>などの分析ソフト面や、カラム構造、ポンプの高圧下での安定性などハード面でも種々の改良が進められた。また、最近のエレクトロニクスの急激な進歩によって可能になった複雑なデータ処理や操作性向上の技術も取り入れられるようになった。

### 3 実験

#### 3.1 装置(L-8500形アミノ酸分析計)<sup>5)</sup>

装置の外観を図2に、また分析計の流路構成を図3に示す。溶離液、B-1~B5は高速で開閉作動する電磁弁V1~V5によって切り替えられ、開閉時間を制御することで各溶離液を一定の割合で混合し、時間とともに混合比を変えて送液ポンプ1に導くことができる。試料はオートサンプラによりその一定量が分離カラムに送られる。分離カラムはアルミブロックをペルチェ素子により30~70℃の範囲で加熱及び冷却して制御する。それぞれ6分及び4分以内に設定温度に到達する。カラム流出液にはポンプ2(及び3)により反応試薬Rが電磁弁V6~V8の開閉制御により混合され、分離溶出したアミノ酸と反応させる。ニンヒドリン発色法の場合には反応温度は110~

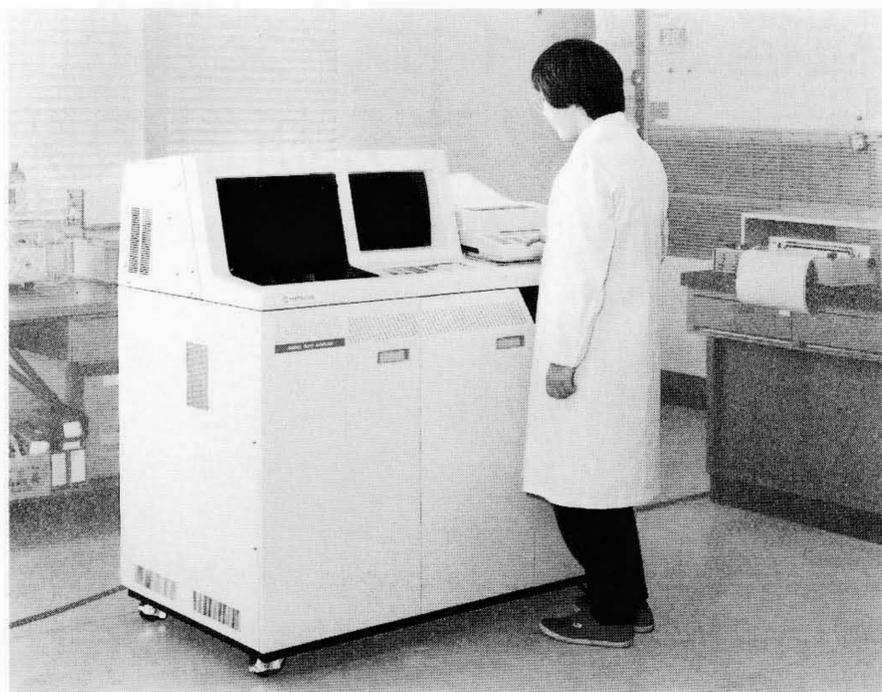


図2 L-8500形高速アミノ酸分析計の外観 本機は、数多くの納入実績と25年にわたる技術の積み重ねから誕生した最新鋭機である。

140℃、蛍光法の場合には50℃に設定する。反応生成物は440nm及び570nmの二波長分光光度計、又はF-1100形蛍光光度計でその濃度を測定する。

データ処理装置(D-2850形)はアミノ酸分析専用で、標準分析(タンパク質加水分解物)及び生体分析(生体液アミノ酸)法のコンポーネントテーブル、すなわち50成分のアミノ酸の名

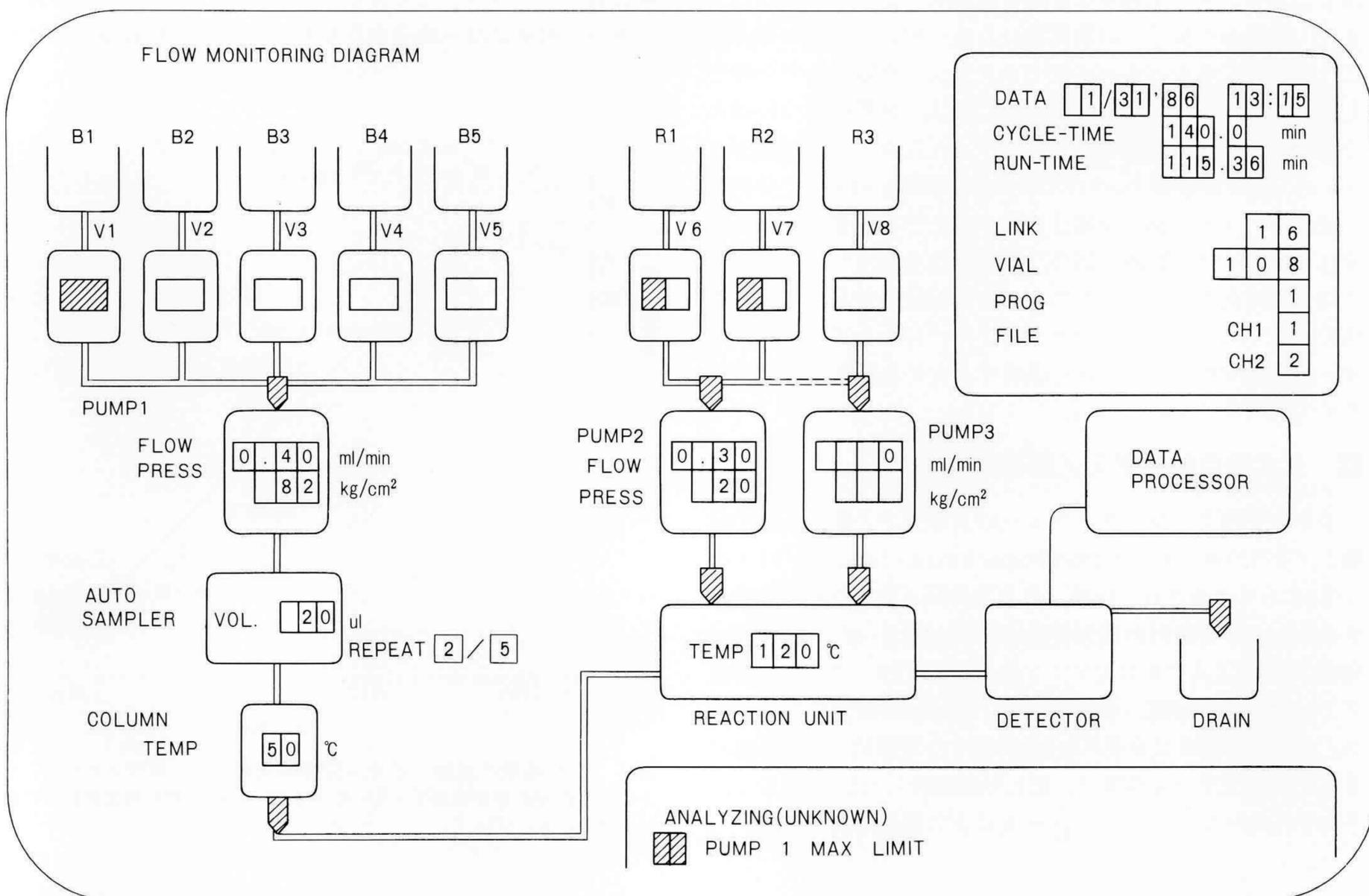


図3 流路構成 装置のCRT(Cathode Ray Tube)画面である。運転状態が一目で分かり、だれでもすぐに操作できる。

称と分子量及び分析パラメータを内蔵している。これらはユーザーにより呼び出され、修正、追加して使用することができる。また、ピーク同定ミスやデータ処理の不適切さ、ピークの重なりなどを判定する機能も備えている。

### 3.2 試薬及びカラム

#### (1) 溶離液

標準分析及び生体分析には三菱化成工業株式会社製のそれぞれL-8500形日立高速アミノ酸分析用緩衝液PHキット及びPFキットを使用した。それらの組成は取扱説明書に記載されているものと同一である。

#### (2) ニンヒドリン試薬溶液

和光純薬工業株式会社製L-8500形用ニンヒドリンキットをそのまま用いた。

#### (3) 蛍光分析用溶離液及び蛍光試薬

取扱説明書<sup>5)</sup>に記載されている組成の試薬を、半導体製造用の超純水を用いて調整し使用した。

#### (4) 分離カラム及びアンモニア除去カラム

標準分析及び生体分析用分離カラムには、それぞれ日立パックドカラム#2622SC-PH及びSC-PFを、またアンモニアフィルタカラムには#2650Lを用いた。分離カラムは内径4.6 mm、長さ60mm、またアンモニアフィルタカラムは内径4.6 mm、長さ40mmであるが、カラム及び充てん剤に特殊なものを使用する場合は別に充てんして使用した。

#### (5) アミノ酸標準液

味の素株式会社及び和光純薬工業株式会社製標準アミノ酸混合溶液を、所定の濃度に調整して用いた。

## 4 結果及び考察

### 4.1 ポンプの性能

従来の835形アミノ酸分析計に用いられていたシングルプランジャ方式の送液ポンプでは脈流があるので、ダンパを用いて流量の安定化を図っている。この場合、溶離液が変わるとカラムの負荷圧が変動する。ダンパを用いる送液ポンプでは、カラム負荷が変わると圧力はゆっくりと変化して、カラム流出液の流量は一時的に低下又は増大する。一方、それと混合する反応試薬の流量は一定であるので、混合比率が変わってクロマトグラムのベースラインの乱れとして表れる。したがって、30pmol以下の高感度分析が難しくなる。

そこで、L-8500形用ポンプには、655A形ポンプの倍速機構を持つダブルプランジャ方式を採用することとした。そのため、プランジャの外径4mmを3mmとし、またポンプヘッドを小容量化して脈流のないよう精度の高いポンプとした。その性能の一例を図4に示す。負荷圧が230kg/cm<sup>2</sup>まで変化したときの流量変化量の最大値と最小値を示している。変化率は±0.2%で仕様を十分満足している。一方、試薬を送るポンプは負荷変動があまりないので倍速機構を外し、代わりに脈流防止用ダンパ付きとした。また、倍速機構付きのポンプでは、小さい気泡が混入しても倍速で加圧、溶解してしまうので、一段のエアトラップを取り付けるだけで気泡によるトラブルもなくなることができた。

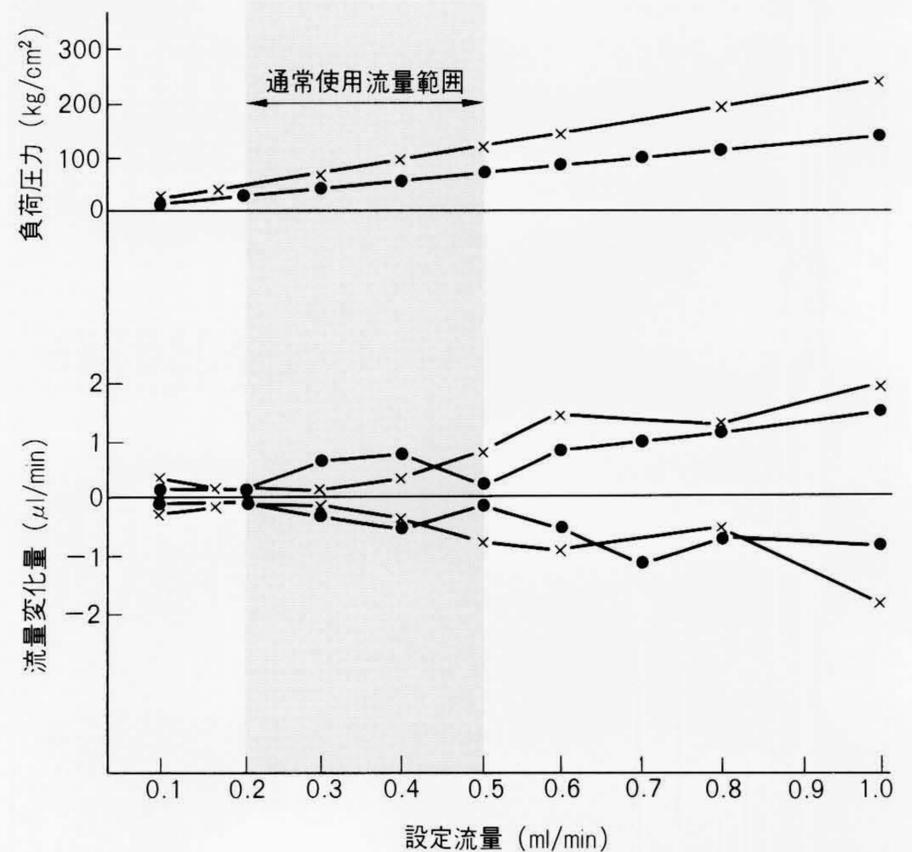


図4 ポンプの流量安定性 通常使用流量範囲内で±0.2%の安定性が得られる。

### 4.2 成分同定ミス判定機能

従来、カラムから溶出したアミノ酸はその溶出時間がある幅に入ったときに目的成分であると同定している。しかし、血清や尿などを測定すると、あらかじめ登録した目的成分以外にも同一保持時間帯に溶出する他の成分があって誤って同定する可能性がある。そこで、D-2850形データ処理装置では同定ミス判定機能を付けることとした。すなわち、これはアミノ酸を単一溶離液で分離したクロマトグラムの例を図5に示したように、先に溶出した成分が必ずしもシャープなピークを描くとは限らないという性質を利用したものである。特に芳香族アミノ酸のピークが、理論値に比べてはるかにブロードになる。ここで、標準試料 *s* と未知試料 *u* とでそれぞれのピーク面積 *A* とピーク高さ *h* の比をとって、その百分率を求める。

$$\text{RATIO} = \frac{Au/hu}{As/hs} \times 100$$

同一溶出時間帯に現れ同定した成分が標準試料成分と同一であれば、この値はほぼ100になる。このRATIOの値が100よりずれるケースを図6に示したが、同定誤りやピークの重なりがある場合と、データ処理の仕方が不適切であった場合の2種に大別される。種々のクロマトグラムから100±10の範囲に入るものは、ほぼ同一の成分であるとみなし得ることが分かった。

### 4.3 標準アミノ酸分析法<sup>5)</sup>

標準アミノ酸(タンパク質構成アミノ酸)のクロマトグラムの例を図7に示す。570nm及び440nmで測定した結果で、トリプトファンを含む19成分が正味30分で分析されている。

ピーク位置及び面積の再現性は、それぞれ変動係数(CV)

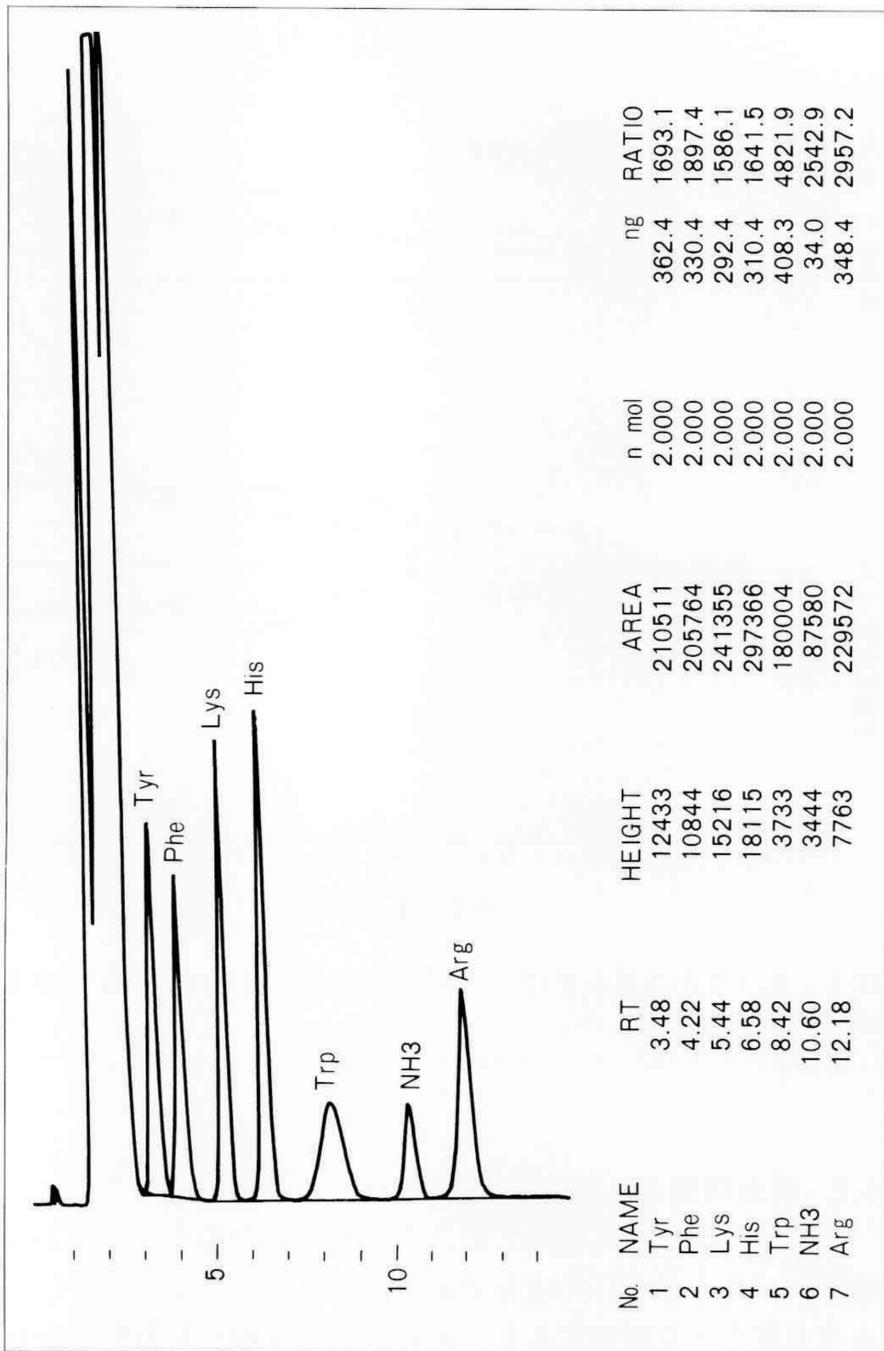


図5 アミノ酸の単一溶離液での分離例 理論的には先に溶出するものほどシャープになるはずであるが、アミノ酸の場合は特異的な挙動を示す。

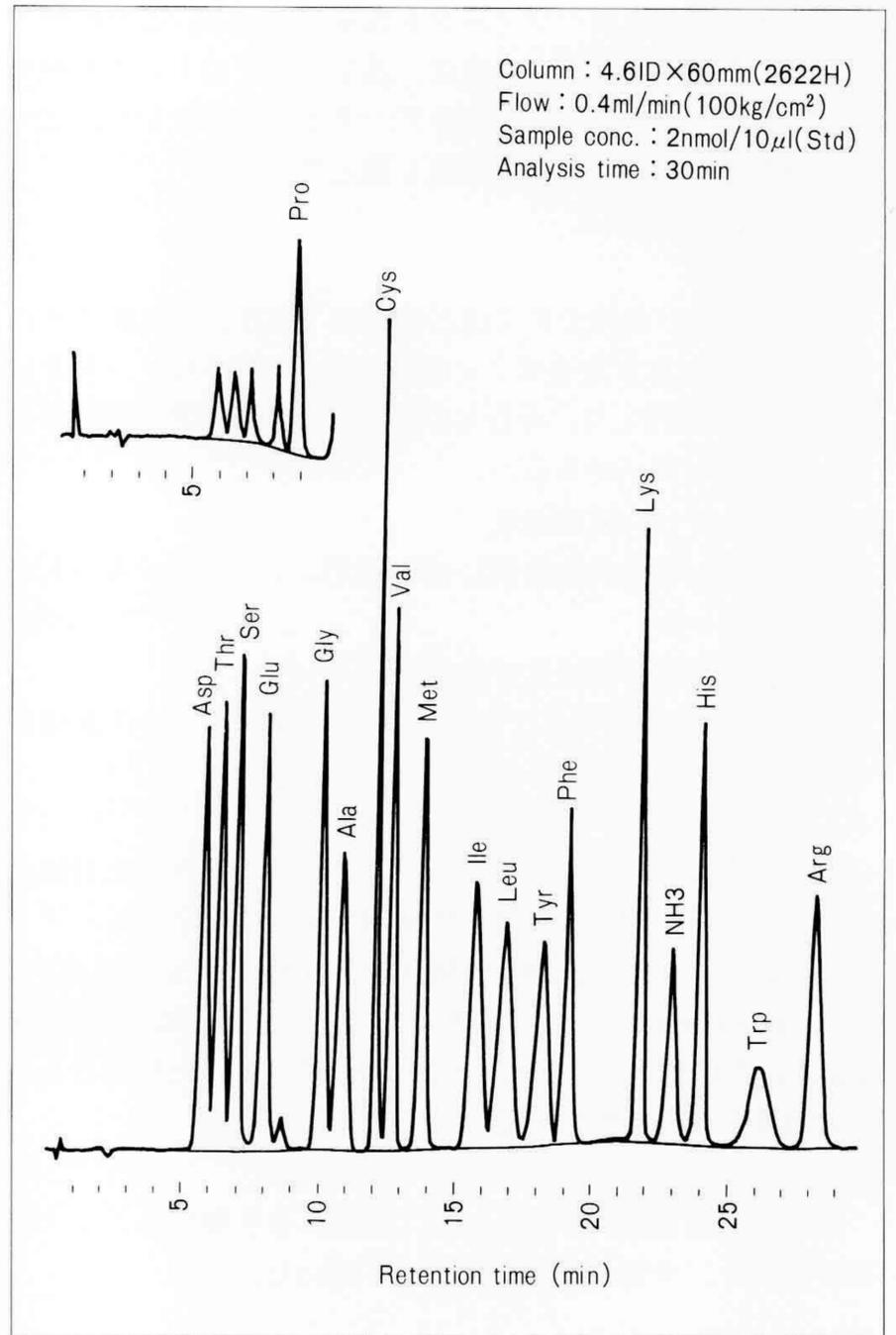


図7 標準アミノ酸分析例 タンパク質加水分解アミノ酸が、30分以内に分析できる。

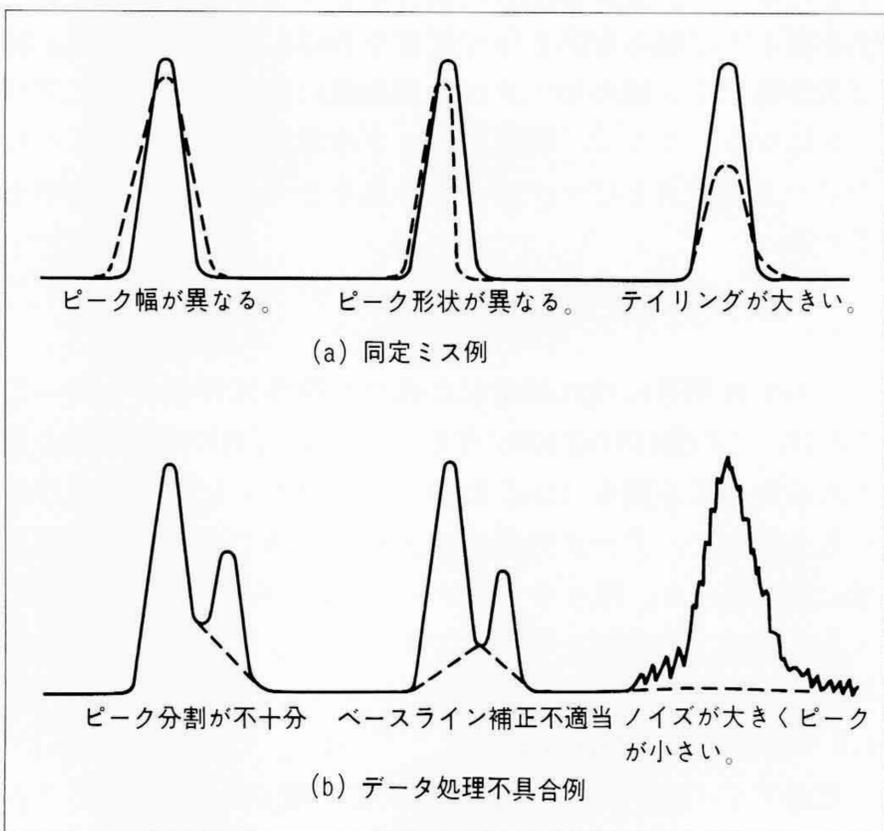


図6 ピーク同定ミス判定機能による不具合検出例 未知試料について“RATIO”の値が100±10の範囲を超えるのは、成分の同定ミス又はデータ処理の仕方が不適切であることを示す。

0.5%及び1.5%の保証値を満足していた。また、溶出時間の環境温度の変化による変動は室温5~35℃の変化で1%以内であった。更に、電源電圧も90~110Vに変化させて測定したが正常に作動した。一方、定量範囲については0.2~20nmolまで測定したが良好な直線性を示した。カラム寿命については1,300検体まで試験したが、1,000検体まで分離仕様を満足することが分かった。

グラジエント溶離法によっても、標準アミノ酸の分析は可能である。これにより溶離液の切換えショックも小さく、なだらかなベースラインが描けるので高感度分析に有利になる。また、グラジエント機能を利用し、再生液を第四緩衝液に混合溶離してアンモニアを4,000倍含む試料溶液中のアミノ酸分析を行うことも可能であった。

#### 4.4 生体液アミノ酸分析法

生体液に含まれるアミノ酸及び類縁化合物39成分の市販標準混合試料にGluNH<sub>2</sub>(グルタミン)、Trp(トリプトファン)を加え分離したクロマトグラムを、その分析プログラムとともに図8に示す。Arg(アルギニン)まで正味110分で分離された。特定成分に対するピーク位置の再現性はCV 0.5%以内、ピーク面積はCV 2.0%以内の仕様を十分満足していた。また、

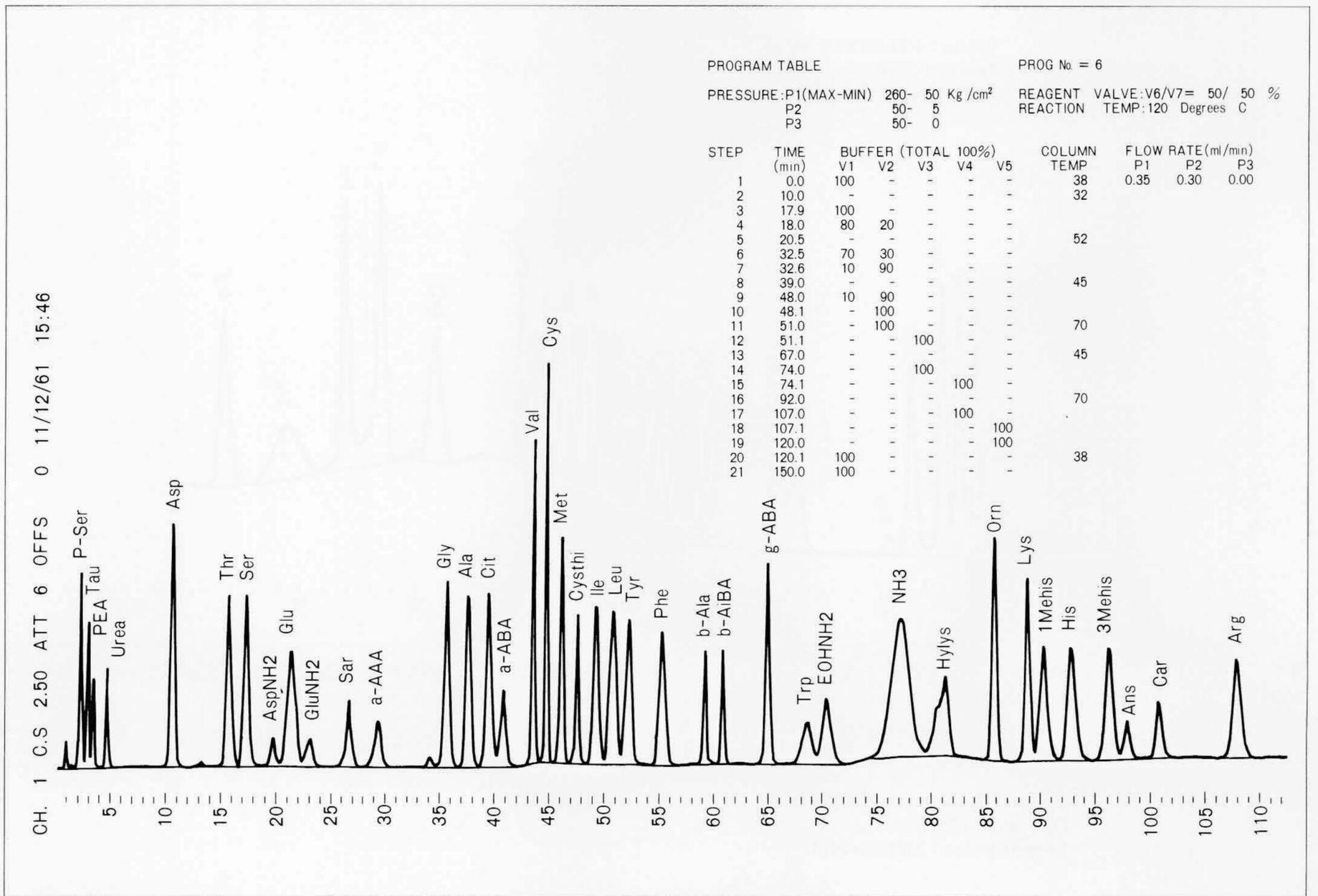


図8 生体アミノ酸分析例 生体液中に含まれるアミノ酸及びその類縁化合物が、110分で分析される。

寿命については管理血清を測定し、1,700検体まで分離仕様が満足することを確認した。

#### 4.5 蛍光検出法

蛍光検出法は、微量のアミノ酸を高感度に分析するのに適する。図9は20pmolの標準アミノ酸をグラジェント溶離法<sup>5)</sup>で分離したクロマトグラムを示す。緩衝液から混入する蛍光物質のため、ベースラインの浮き上がりが避けられないが、ステップワイズ溶離法に比べ、ベースラインがなだらかに変化するのでデータ処理には有利である。検出下限はSN比=3で200fmolであったが、500fmolを保証している。

生体液アミノ酸も蛍光検出法によって分析できる。分離プログラムはニンヒドリン法と同一で行える。尿素は検出されないが、蛍光試薬を混合する前に次亜塩素酸溶液により酸化してHyproやProの検出も行える。 $\beta$ -Ala,  $\beta$ -AiBA, Ans, Carはニンヒドリンに比べ相対感度が高い。

蛍光分析法の再現性は、グラジェント溶離法を採用する場合にはピーク位置の再現性はやや低下し、CV 0.6%であった。ピーク面積の再現性は835形ではCV 10%であったが、L-8500形ではGlyとHisについてCV 3%を保証することとした。

#### 4.6 特殊アミノ酸の分離

従来の835形アミノ酸分析計は、種々の特殊アミノ酸分析が可能であるなど、分析ソフトの豊富さがその特長であったので、その後継機のL-8500形でも原則として835形の分析ソフト

をそのまま採用できるハード構成とした。更に、架橋度10%の3 $\mu$ mイオン交換樹脂#2620を開発し、より短いカラムでの特殊アミノ酸分析も可能にした。その一例として図10にノルロイシン及びシステインを含む標準アミノ酸を分離し、蛍光検出した例を示した。長時間を要しているが、極めて良好な分離の得られることが分かる。

### 5 結 言

分析時間の短縮と感度向上を主目的にして、3 $\mu$ mのイオン交換樹脂及び高性能ポンプを開発することによってL-8500形高速アミノ酸分析計を製品化した。分析時間は標準分析30分、生体分析2時間で、従来製品の3~6倍の高感度分析を可能にした。本装置は昭和61年2月発売以来、食品や薬品の品質管理、生化学、生物学、医学などの幅広い分野での研究に便利に使用されている。

今後は3 $\mu$ mの特長を生かし、更に高速・高感度分析を可能とする一方、応用例の拡充を図り、より広く利用してもらえよう新分析ソフトの開発・改良に努めていきたい。

終わりに、本装置の開発に当たり、御指導いただいた味の素株式会社の村井朝夫氏ほか、835形アミノ酸分析計のユーザーの方々及びイオン交換樹脂の共同開発に御協力をいただいた三菱化成工業株式会社の梅沢義雄課長をはじめ、関係各位に対してお礼を申し上げます。

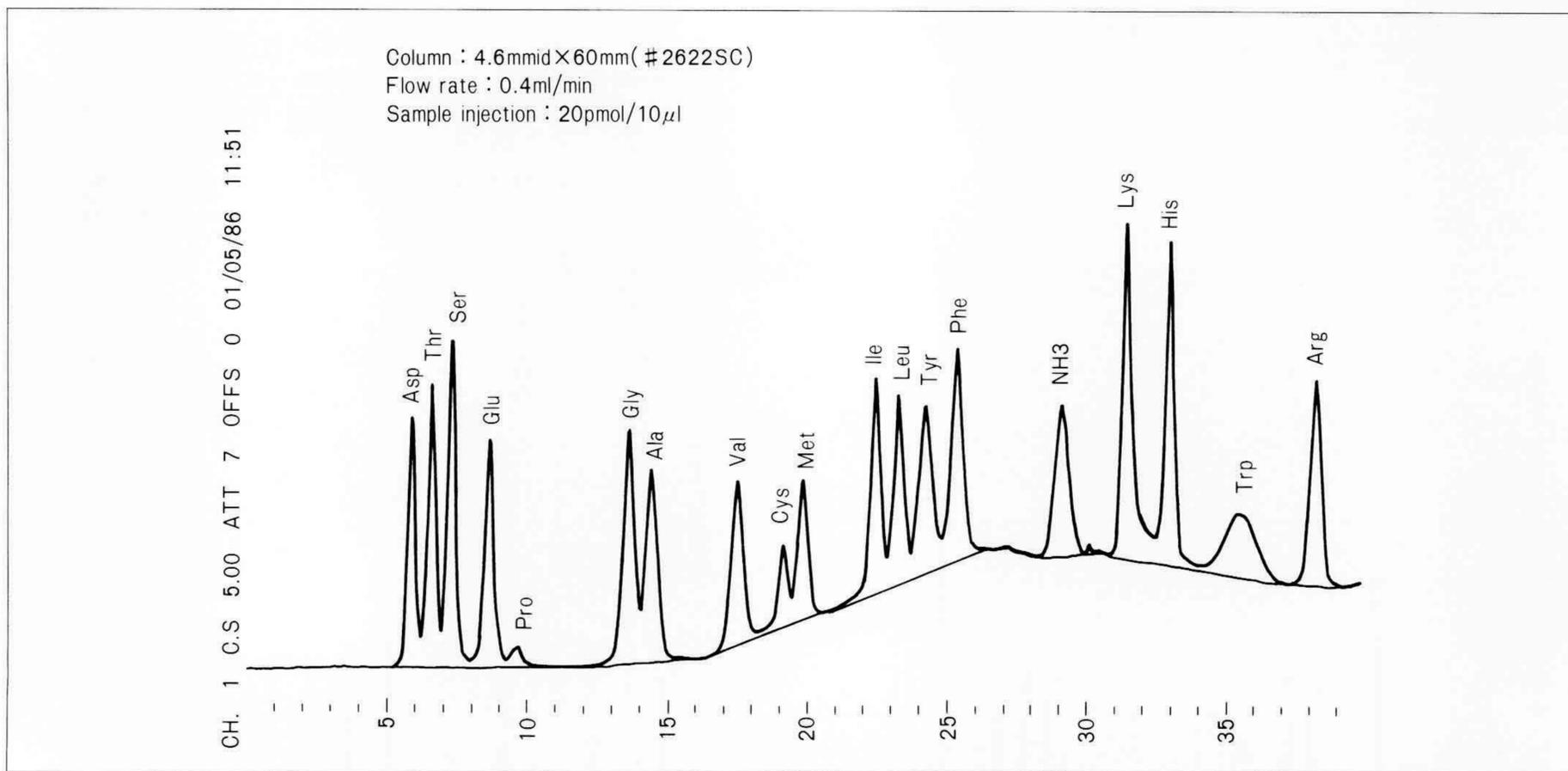


図9 蛍光分析法による20pmolアミノ酸のクロマトグラム例 グラジエント溶離法によっているので、溶離液中の不純物によるベースラインの浮き上がりも滑らかになる。

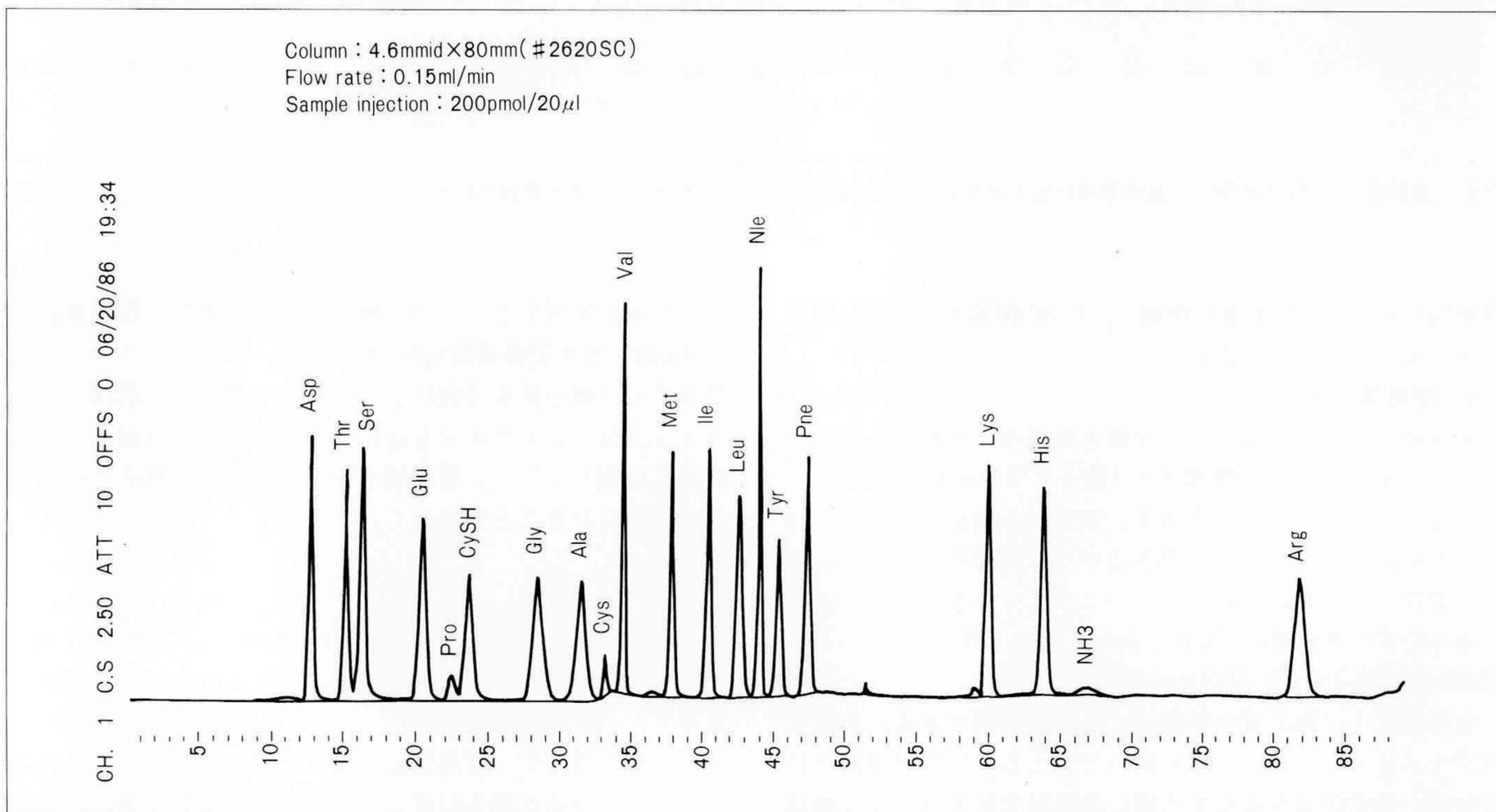


図10 ノルロイシン及びシステインを含む標準アミノ酸のクロマトグラム カラム長さを80mmと長くし、新しく開発したイオン交換樹脂#2620SCを用いて分析している。

参考文献

- 1) D.H.Spackman, et al.: Anal. Chem. **30**, 1190(1958)
- 2) 藤田, 外: 日本化学会誌, 623(1976)
- 3) 武内, 外: 日本化学会誌, 64(1978)
- 4) 武内, 外: 日本化学会誌, 1502(1979)
- 5) 「L-8500形高速アミノ酸分析計」取扱説明書, 日立製作所 (1986), 高田, 外: 日立SIニュース **29**, (4)18(1986)