

7

呈味成分

7-1 遊離アミノ酸・ジペプチド量

本マニュアルでは家畜改良センターで行っているUV検出器を用いた液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析（定量）手法を紹介する。当センターのアミノ酸組成分析は、「Pico・Tagアミノ酸分析法」を採用している。この方法は、Waters社が開発した高感度・迅速アミノ酸分析法で、ラベル化試薬としてPITC（フェニルイソチオシアネート）を用いてPTCアミノ酸（フェニルチオカルバミルアミノ酸）に誘導体化した後、専用カラムPico・Tagカラムで分離する方法である。

食肉における遊離アミノ酸は、サンプルに水を加えて、混和することで抽出することが可能であるが、分析の妨げとなる脂肪とタンパク質を除去しなければならない（ここまでの処理を前処理と定義）。また、抽出した遊離アミノ酸水溶液は、このままではUV検出できないので、プレカラム誘導体化法を用いて、検出できるようにラベル化する必要がある。ここでは、「サンプルの前処理」、「移動相の作製」、「誘導体化」および「HPLCの分析条件」に分けて分析例を紹介する。

①前処理の手順

(1) 【サンプル調製】

分析するサンプルはミンチ状に均一化した食肉約10gを秤量し※、分析まで真空状態で冷凍保存しておく。当センターでは50mLの遠沈管に窒素封入後、 -30°C で冷凍保存している。



写真1 サンプル秤量

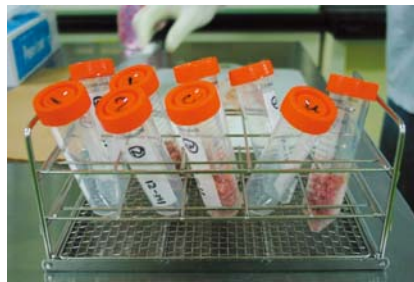


写真2 秤量後のサンプル

※サンプルは正確に10gでなくても良いが、重量をきちんとメモしておく。

(2) 【サンプルの解凍】

遠沈管を冷凍庫から取り出し、 2°C ・2時間かけて解凍する（熟成による遊離アミノ酸の変動を極力なくするため、同条件での解凍方法が望ましい）。遠沈管に食肉には含まれないアミノ酸であるノルロイシン液※を内部標準物質として1 mL添加する。（前処理終了時に得られるアミノ酸水溶液濃度が $0.15\mu\text{mol/L}$ となるように、ノルロイシン・1/10規定NaOH溶液 $15\mu\text{mol/L}$ を1.0mL添加）

※100mlメスフラスコにノルロイシン0.1967gを入れ、N/10規定水酸化ナトリウム溶液でメスアップして作成

(3) 【遊離アミノ酸抽出と除脂肪】

超純水10mLをサンプル管に加え、約 1 分間タンパク質の変性を防ぐよう（熱をもたないように）ホモジナイズ（15000rpm）する。その後、遠沈管に n-ヘキサンを10mL加えて、ボルテックスおよび（粘性があるので）手でも遠沈管を振って攪拌し、遠心分離（2500rpm、3min）を実施する。脂肪が溶けている上澄み液（ヘキサン層）を除去する。これを再度繰り返す。



写真3 ホモジナイズ



写真4 ホモジナイズ後のサンプル

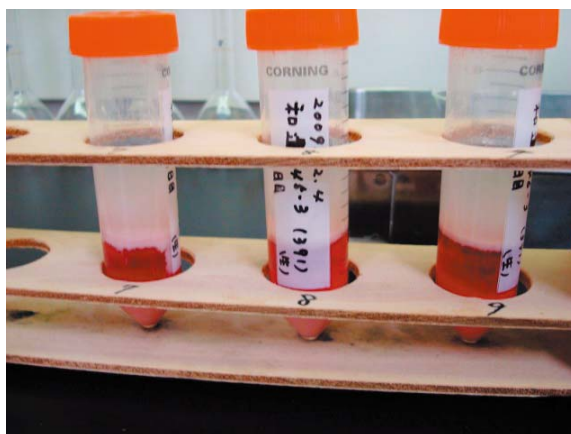


写真5 遠心分離後のサンプル(上層:エーテル+脂肪層)

(4) 【除タンパク】

脱脂されたサンプルにアセトニトリル30mL加えて※、ボルテックス等で攪拌する。攪拌されたサンプルを遠心分離（3000rpm、15min）し、肉片以外の液体部分をろ過しつつ回収する。



写真6 ろ過

※メタノール、エタノール、アセトニトリル等の有機溶媒をタンパク質水溶液に適量添加することにより、タンパク質の変性を促し、その後の遠心分離によってタンパク質を沈殿させることで、タンパク質を除くことが可能。

(5) 【遊離アミノ酸分析サンプル作製】

沈殿しているタンパク質内に遊離アミノ酸の抽出漏れを防ぐため、沈殿している肉塊に超純水5 mL、アセトニトリル15mL (75%アセトニトリル溶液20mL) を加えて、(4)と同様に攪拌後、遠心分離し、液体すべてをろ過（ろ紙：ADVANTEC 5A 90mm）しつつ回収する。回収したろ液を超純水で100mLまでメスアップし、遊離アミノ酸抽出液とする。作製した抽出液は、2 mL程度のサンプルチューブに2本以上（遊離アミノ酸分析用：1本、核酸関連物質分析用：1本）をフィルター（MILLIPORE Millex 0.45 μ m）でろ過しながら小分けにし、 -30°C で誘導体化実施日まで冷凍保存する。



写真7 サンプル作成

②移動相作製の手順

目的とするアミノ酸を省力的に分析するには、移動相を変更しつつ多種のアミノ酸を同時に分析する必要がある。当センターでは以下の移動相A,Bを混合し、分析している。なお、移動相は用事調製とする。

【移動相 A の作成】

- (1)Ca EDTA 0.1mgを超純水100mLでメスアップする。(100mLメスフラスコ使用)
- (2)氷酢酸（酢酸99.9%） 5 mLを超純水で50mlにメスアップし、10%酢酸を作る。(50mLメスフラスコ使用 冷蔵庫で3ヵ月間保存可能)
- (3)酢酸ナトリウム三水和物19gに超純水90mlで溶かす。(100mLビーカー使用)
- (4)50mlシリンジにフィルター（MILLIPORE Millex 0.45 μ m）を付けて、(3)液をろ過する。
（2Lビーカー使用）
- (5)(3)と(4)で利用したビーカーとシリンジを超純水10mlで洗うようにろ過する。さらに超純水1850mLを加えて1950mLとする。
- (6)(5)液にCa EDTAを400 μ L加える。
- (7)10%酢酸を1.04mL（1040 μ L）加えた後、氷酢酸を少しずつ追加してpH 6.45に合わせる。
- (8)最後にアセトニトリル50mLを加えて、よく攪拌する。



写真8 ④のろ過



写真9 ⑦のpH調整

【移動相 B の作成】

- (1)ジチオレイトール（DTT） 0.1g をメタノール100mLでメスアップする。(100mlメスフラスコ使用)（冷蔵庫で3ヵ月間保存可能）
- (2)超純水400mL、アセトニトリル450mL、メタノール150mLを混合する。
- (3)(2)液にジチオレイトール（酸化防止用）を1 mL加えて、よく攪拌する。

③誘導体化の手順

(1) 【標準試料の準備】

当センターでは24種のアミノ酸と2種のジペプチドを測定している。市販の混合標準試料（H型アミノ酸混合標準溶液：和光純薬）に17種入っており、さらに単品をジペプチドを含めて9種追加すると便利である。追加アミノ酸の調製は以下の通り。

(2) 【標準試料の調製】

最終的に26種すべてのアミノ酸を10、50および100pmol/ μ Lの標準試料を作製し、検量

線を作成する。まず、追加アミノ酸の調製について説明する。

ア 以下の試薬を0.1N NaOH 1 mLでそれぞれ溶解する。褐色バイアルの利用が望ましい。

- ・ グルタミン : 0.0146g
- ・ アスパラギン : 0.0150g
- ・ トリプトファン : 0.0204g

※アミノ酸の重量は、分子量に基づいて算出

イ 以下の試薬を0.1N HCL 1 mLでそれぞれ溶解する。

- ・ β -アラニン : 0.0089g
- ・ タウリン : 0.0125g
- ・ ヒドロキシプロリン : 0.0131g
- ・ ノルロイシン : 0.0131g
- ・ アンセリン : 0.0303g
- ・ カルノシン : 0.0226g

ウ 2 mLのマイクロチューブを利用し、アで作成した液10 μ Lを0.1N NaOH 990 μ Lで希釈する。2 mLのマイクロチューブを利用し、イで作成した液10 μ Lを0.1N HCL 990 μ Lで希釈する。

エ H型標準液40 μ Lを0.1N HCL 60 μ Lで希釈する。

オ ウおよびエで作製した液をそれぞれ10 μ L取り、計100 μ Lとし、よく攪拌する。このようにH型標準液と追加アミノ酸の混合液を調製したものを100 pmol/ μ Lの標準液とする。この標準液を20 mM NaOHで2倍（50/50）、10倍（10/90）希釈したものをそれぞれ50、10 pmol/ μ Lの標準液とする。



写真10 標準試料作製

※20 mM NaOHで希釈（グルタミン、アスパラギン、トリプトファンの酸化を防ぐため）
20 mM NaOH…市販の 0.1N NaOH (=100 mM NaOH) を 5 倍希釈（20/80）

(3) 【試料の乾固】

前処理で作製した試料溶液、標準溶液、ブランク（希釈に利用した0.1N HClと0.1N NaOH）をそれぞれ20 μ Lずつマイクロチューブに取り、減圧乾固する。なお、乾固は充分

に行うこと。どうしても一旦中断する必要がある場合はこの時点で保存、ただしグルタミン、アスパラギンが分解する恐れがあるため出来る限り最後まで続けて処理する。



写真11 減圧乾固用遠心エバポレータ



写真12 遠心エバポレータ内部

(4) 【中和】

ア 1 M酢酸ナトリウム（分子量は82.03なので、82.03mgを純水1 mLに溶解したもの）100 μ L、メタノール100 μ Lとトリエチルアミン50 μ L※を混合する。

イ 乾固した試料に、アを10 μ L加える。

ウ ボルテックスミキサーで約10秒間攪拌、減圧乾固する。

※トリエチルアミンは冷凍庫に保管（理想的には3 ヶ月毎に更新）、使用時は室温になってから開栓

(5) 【誘導体化】

ア メタノール700 μ L、純水100 μ L、トリエチルアミン100 μ L、イソチオシアン酸フェニル※100 μ Lをボルテックスミキサーで十分に混合し、反応試薬とする。

※イソチオシアン酸フェニルのアンプル管は一回につき1本使いきりとする。

★反応試薬調製時には充分攪拌して透明で均一な溶液にし、調製後2時間以内に使用すること

イ 中和後乾固した試料に、アを20 μ L加える。

ウ ボルテックスミキサーで約10秒間攪拌した後、サンプルチューブのフタを閉め（密閉）、室温（約25℃）で20分間反応させる。

エ 反応終了後、減圧乾固する。

オ Pico-Tag希釈液100 μ Lに溶解する。

カ エをキャピラリーチップ等で1 mLシリンジに移し、0.45 μ mメンブレンフィルター（Millex-LH）でろ過し、HPLC注入試料とする。

★誘導体化後は直ぐに分析すること



写真13 HPLCへの試料導入

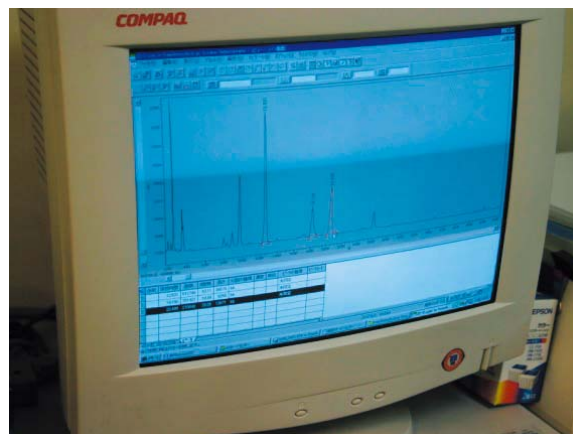


写真14 分析中のPC画面

④HPLC分析条件

目的とする遊離アミノ酸・ジペプチドは、すべて同時に分析すると時間的なロスが少なく効率的である。しかしながら、カラムのロットにより、グルタミン酸の分離が悪い例が見受けられる。そこで以下にアミノ酸・ジペプチドの同時分析の条件とともに遊離グルタミン酸だけを対象とした分析条件例を示す。

【遊離アミノ酸・ジペプチド】

装置 : 2695セパレーションモジュール、カラムヒーター
2487UV/Vis検出器、Empowerソフトウェア

移動相 A : 70mM NaOAc (pH6.45 with 10% Acetic acid) / MeCN = 975 / 25

移動相 B : H₂O / MeCN / MeOH = 40 / 45 / 15

カラム : Pico.Tag アミノ酸分析カラム (生体アミノ酸) 3.9×300mm

カラム温度 : 46.0℃

サンプル温度 : 5.0℃

注入量 : 5 μl

検出 : 254nm

分析時間 : 91.0min

グラジエント条件：

	時間(分)	流量(ml/分)	%A	%B	曲線
1	0.0	1.0	100.0	0.0	*
2	17.0	1.0	97.0	3.0	11
3	28.0	1.0	94.0	6.0	8
4	34.0	1.0	91.0	9.0	5
5	54.0	1.0	60.0	40.0	6
6	66.0	1.0	0.0	100.0	11
7	70.0	1.0	100.0	0.0	11
8	91.0	1.0	100.0	0.0	6

【グルタミン酸分析】

装置	: 2695セパレーションモジュール、カラムヒーター 2487UV/Vis 検出器、Empower ソフトウェア
移動相 A	: 70mM NaOAc (pH6.45 with 10% Acetic acid) / MeCN = 975 / 25
移動相 B	: H ₂ O / MeCN / MeOH = 40 / 45 / 15
カラム	: Pico.Tag アミノ酸分析カラム (生体アミノ酸) 3.9×300mm
カラム温度	: 50.0℃
サンプル温度	: 5.0℃
注入量	: 5 μl
検出	: 254nm
分析時間	: 91.0min
グラジエント条件:	

	時間(分)	流量(ml/分)	%A	%B	曲線
1	0.0	0.8	100.0	0.0	*
2	17.0	0.8	97.0	3.0	11
3	28.0	0.8	94.0	6.0	8
4	34.0	0.8	91.0	9.0	5
5	54.0	0.8	60.0	40.0	6
6	66.0	0.8	0.0	100.0	11
7	70.0	0.8	100.0	0.0	11
8	91.0	0.8	100.0	0.0	6

【参考：データ換算】

HPLC定量結果を検量線にあてはめることで $A \text{ pmol}/\mu\text{L}$ ($= A \text{ nmol/mL}$) と算出される。牛肉Cg前処理の最終抽出液量100mL中には、 $(A \text{ nmol/mL} \times 100\text{mL}) = 100A \text{ nmol} = 0.1A \mu\text{mol}$ 含まれることになる。つまり、牛肉 1 gあたりの含有量は、 $0.1A \mu\text{mol} / \text{Cg}$ となる。論文などでは、肉 1 g に含まれる遊離アミノ酸量 (molもしくはmg) でデータを示すことが一般的である。

7-2 核酸関連物質量

食肉の呈味に大きな影響を及ぼすと考えられているイノシン酸は、呈味性ヌクレオチドであり、これは食肉に含まれるATPが分解されることで生成される。ATP(アデノシン三リン酸)は、酵素の作用により大まかにADP(アデノシン二リン酸)、AMP(アデノシン一リン酸)、IMP(イノシン酸)、HxR(イノシン)の順に分解され、最終的にはHx(ヒポキサンチン)となる。ここではHPLCを用いたこれらの核酸関連物質の分析手法を紹介する。

①分析の手順

(1)【移動相の準備】

核酸関連物質は、シンプルなアイソクラティックで分析が可能である。移動相は、2Lビーカーにリン酸二水素カリウムを27.2g入れ、超純水2Lで溶解し(0.1M KH_2PO_4)、溶液のpHが、4.00~3.95となるようにリン酸を加えて調製する。目的とする物質の分離は、移動相のpHに大きく影響されるので、pH3.94以下になったら作り直すこととする。作成した移動相は、標準試料調製用に100mL程度ビーカーに分注しておく(以下A液と略す)。なお、移動相は、用事調製とする。



写真1 移動相作成準備

(2)【標準試料の準備】

核酸関連物質6種について、100, 10, 1pmol/ μL の検量線を作成するために、それぞれ以下のとおり操作する。

ア 市販の標準品をそれぞれ以下の通り秤量し、10mL褐色試験管の中に入れる。

・ ATP (分子量: 588.4 ※)	: 0.0588g (参考値)
・ ADP (分子量: 529.4 ※)	: 0.0529g (参考値)
・ AMP (分子量: 428.1 ※)	: 0.0428g (参考値)
・ IMP (分子量: 348.2)	: 0.0348g
・ HxR (分子量: 268.2)	: 0.0268g
・ Hx (分子量: 136.1)	: 0.0136g



写真2 標準試料の作製準備

※ただし、ATP、ADP、AMP は、純度が低いため、純粋な分子量から純度を換算する必要があります。そのため、ロット毎に換算を行い、換算後の分子量から試薬の量を決定する。

→換算例：ADP（付属の成分表を参考）

427.2 (as anhydrous free acid)

ADP contents 80.7%

$427.2 / 0.807 = 529.4$ ←この値を標準試料調製時に使用する分子量とする。

イ アで秤量したそれぞれの試薬を、以下の量の A 液で溶解する。

- ・ ATP、ADP、IMP、AMP : A 液 1 mL (濃度 0.1mol/L)
- ・ HxR : A 液 10mL (濃度 0.01mol/L)
- ・ HX : A 液 50mL (濃度 0.002mol/L)

ウ イで作成した各溶液を、以下の割合に再び A 液でそれぞれ希釈し、濃度が1000pmol/ μ Lになるように調製する。

- ・ ATP、ADP、AMP、IMP 各種 10 μ L : A液 990 μ L
- ・ HxR 100 μ L : A液 900 μ L
- ・ HX 500 μ L : A液 500 μ L

エ 100pmol/ μ Lの標準試料は、核酸関連物質ごとに③で作成した溶液50 μ Lと450 μ LをA液で希釈し作製する。本手法はpHの若干の変化で各核酸関連物質のリテンションタイムが大きく異なることから、100pmol/ μ Lの標準試料については、単品で分析する方が望ましい。

10pmol/ μ Lの標準試料は、作製した100pmol/ μ Lの標準試料から20 μ L採取・混合（20 $\times$ 6=120 μ l）し、A液80 μ Lで希釈し作製する。

1 pmol/ μ Lの標準試料は、100pmol/ μ Lの標準試料からそれぞれ10 μ l採取・混合（10 $\times$ 6=60 μ L）し、A液 940 μ Lで希釈し作製する。

(3) 【サンプル調製】

遊離アミノ酸・ジペプチド分析と共通の前処理済みサンプル（遊離アミノ酸・ジペプチドの章を参照のこと）を、 $0.45\mu\text{m}$ メンブレンフィルターを付けた1mlシリンジにてろ過する。ろ過したサンプル $20\mu\text{L}$ とA液 $180\mu\text{L}$ を混合し、分析用試料とする。



写真3 サンプル調製風景

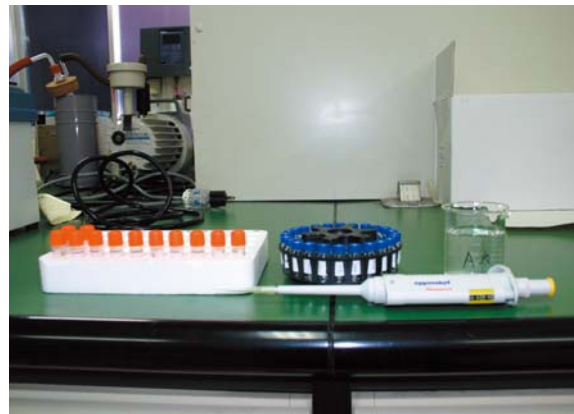


写真4 HPLC注入準備

HPLC分析条件

装置	: 2695セパレーションモジュール、カラムヒーター 2487UV/Vis 検出器、Millennium32 ソフトウェア
移動相 A	: $0.1\text{M KH}_2\text{PO}_4$ (pH4.00~3.95)
カラム	: Atlantis dC18 $5\mu\text{m}$ 、 $4.6\times 150\text{mm}$
カラム温度	: 40.0°C
サンプル温度	: 25.0°C
注入量	: $10\mu\text{L}$
検出	: 254nm
分析時間	: 26.0min
グラジエント条件	: なし
流量	: 1.0mL/min

【参考：データ換算】

HPLC定量結果を検量線にあてはめることで $A\text{ pmol}/\mu\text{L}$ ($=A\text{ nmol/mL}$) と算出される。牛肉Cg前処理の最終抽出液量 100mL 中には、 $(A\text{ nmol/mL} \times 100\text{mL}) = 100A\text{ nmol} = 0.1A\text{ }\mu\text{mol}$ 含まれることになる。ここまでは、遊離アミノ酸のデータ換算時と同様です。ただし、HPLCにインジェクションする際に3で10倍希釈を行っているので、牛肉1gあたりの含有量は、 $10\times 0.1A\text{ }\mu\text{mol} / \text{Cg}$ となる。