2.04　アミノ酸分析法

アミノ酸分析法は，たん白質，ペプチド，その他の医薬品のアミノ酸組成やアミノ酸含量を測定する方法である．本法は，たん白質及びペプチドの定量，同定，構造解析，ペプチドマップ法におけるペプチド断片の評価，並びにたん白質及びペプチド中の異常アミノ酸の検出などに利用できる．たん白質及びペプチドは，アミノ酸分析を行う前に各構成アミノ酸に加水分解する必要があるが，加水分解の後に行うアミノ酸分析操作は遊離アミノ酸の分析方法と同じである．試料中の各構成アミノ酸は一般に誘導体化して分析する．

1．たん白質及びペプチドの加水分解

たん白質試料を加水分解する最も一般的な方法は，試料をそのままフェノール添加6 mol/L塩酸で110℃，24時間処理する方法（方法1）である．この加水分解法では化学変化するアミノ酸があり，定量的に回収されないため，分析結果の解析に留意が必要である．すなわち，トリプトファンは破壊され，セリンとトレオニンは一部破壊され，メチオニンは酸化され，システインは一般にシスチンとして回収される（ただし，シスチンの一部は破壊されたり，システインに還元されるため，通常その回収率は低い）．また，イソロイシンやバリンを含むペプチド結合は一部しか切断されず，アスパラギンとグルタミンは脱アミド化されてそれぞれアスパラギン酸とグルタミン酸となる．

これらの問題に対処するために，方法 2 ～ 11 の加水分解法を適宜用いることもある．方法 4 ～ 11 では，システイン，メチオニン，アスパラギン，グルタミンは他のアミノ酸に変換される．したがって，方法 1 以外の方法を採用するにあたっては，その方法の利点と問題点をよく比較検討しておく必要がある．

(i)　方法 1：フェノール添加塩酸加水分解（液相，気相）

トリプトファンの酸化防止

(ii)　方法 2：メルカプトエタンスルホン酸加水分解（気相）

(iii)　方法 3：チオグリコール酸添加塩酸加水分解（気相）

システイン/シスチン及びメチオニンの酸化

(iv)　方法 4：過ギ酸酸化後，方法 1 又は方法 2 による加水分解

システイン/シスチンの酸化

(v)　方法 5：アジ化ナトリウム添加塩酸加水分解（液相）

(vi)　方法 6：ジメチルスルホキシド添加塩酸加水分解（気相）

システイン/シスチンの還元及びアルキル化

(vii)　方法 7：気相ピリジルエチル化後に塩酸加水分解

(viii)　方法 8：液相ピリジルエチル化後に塩酸加水分解

(ix)　方法 9：液相カルボキシメチル化後に塩酸加水分解

システイン/シスチンの混合ジスルフィド化

(x)　方法 10：ジチオジグリコール酸又はジチオジプロピオン酸との反応後に塩酸加水分解

アスパラギン及びグルタミンの誘導体化

(xi)　方法 11：ビス（1,1-トリフルオロアセトキシ）ヨードベンゼンとの反応後に塩酸加水分解

一部が破壊されるアミノ酸やペプチド結合の開裂が遅いアミノ酸については，経時的な濃度変化を測定することでより正確な分析値が得られる．経時的濃度変化測定に代わる方法として，標準アミノ酸を試料と同一条件で加水分解する方法があり，破壊されるアミノ酸の量を測定することができる．

マイクロ波による酸加水分解は，迅速ではあるが特別な機器と注意が必要である．プロテアーゼ数種を用いた完全たん白質消化は，処理が複雑で，厳密な調節が必要であり，一般にはたん白質よりもペプチドに適用される．

2. アミノ酸分析方法

アミノ酸の分析方法には，イオン交換クロマトグラフィーで遊離アミノ酸を分離した後に以下に示す方法 1 ～ 2 で誘導体化して検出するポストカラム法，及び遊離アミノ酸を方法 2 ～ 7 で誘導体化した後に逆相液体クロマトグラフィーで分離するプレカラム法などがある．

(i)　方法 1：ニンヒドリン

(ii)　方法 2：*o*-フタルアルデヒド（OPA）

(iii)　方法 3：フェニルイソチオシアネート（PITC）

(iv)　方法 4：6-アミノキノリル-*N*-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメイト（AQC）

(v)　方法 5：（ジメチルアミノ）アゾベンゼンスルホニルクロリド（DABS-Cl）

(vi)　方法 6：9-フルオレニルメチルクロロギ酸（FMOC-Cl）

(vii)　方法 7：7-フルオロ-4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール（NBD-F）

51 これらの方法の中で，ポストカラムニンヒドリン誘導体化法は最も一般的な方法である．どの方法を選ぶかは試験
52 に要求される感度等に依存する．これらの方法に用いる全自動化された装置及び試薬類は市販されている．他にも試
53 液の調製法，反応の操作法，クロマトグラフィーのシステムなどが異なる多くの変法がある．また，個々のパラメー
54 タは実際に使用する装置や操作に依存する．
55