



Title	高速液体クロマトグラフィーによる海水中の溶存アミノ酸の蛍光分析
Author(s)	多田, 邦尚; TADA, Kuninao; 米田, 義昭 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 39(2), 151-159
Issue Date	1988-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23998
Type	departmental bulletin paper
File Information	39(2)_P151-159.pdf



高速液体クロマトグラフィーによる海水中の溶存アミノ酸の蛍光分析†

多田 邦尚*・米田 義昭*

Fluorometric Determination Using HPLC of Dissolved
Amino Acids in Seawater†

Kuninao TADA* and Yoshiaki MATTA*

Abstract

A fluorometric method using HPLC was tested for the analysis of dissolved total amino acids (DTAA) and free amino acids (DFAA) in untreated seawater. Analytical procedures for testing amino acids at nano mole levels are described in detail, taking into consideration artificial contaminants. Duplicate analyses provided reliable data with 14% or less coefficient of variation at concentration levels of less than 650 nM.

DFAA varied from 30 to 250 nM, and DTAA from 90 to 650 nM in North Pacific water taken from the surface to 3,000 m depth. The contribution of DTAA to dissolved organic nitrogen ranged from 5 to 26%.

Moreover, this fluorometric method was applied to the analysis of coastal surface water concentrated by ultrafiltration. Fractionation by ultrafiltration prior to HPLC analysis will provide information about the presence of dissolved proteinaceous substances in natural seawater.

結 言

海水中に存在する有機物は、そのほとんどが植物プランクトンによる光合成にその起源を求められることができる。特にその中でもアミノ酸は生物にとっては質的にも量的にも重要な構成成分であり、その環境中での挙動を明らかにすることは生物地球化学的に大きな意義がある。

海水中の溶存アミノ酸の測定は過去数多く行われてきたが(例えば Kawahara and Maita, 1971)¹⁾、特に近年機器分析技術の発達および OPA 試薬を用いる蛍光法の導入により微量分析が可能となった²⁾。

この蛍光法は従来のニンヒドリン法に比べて感度が数桁高いため、海水中に通常は微量にしか存在していない溶存アミノ酸、特に遊離アミノ酸 (Dissolved Free Amino Acid: DFAA) の分析に適している。1982年、Mopper and Lindroth³⁾は、船上で、脱塩や前段濃縮なしに試料を直接高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に注入して 20 数種の DFAA およびアンモニアを分離・定量した。これ以降、DFAA に関する研究が活発に行われ、その成果については既にまとめられているが⁴⁾、一方、結合型のアミノ酸 (Dissolved Combined Amino Acid: DCAA) に関する研究例

† 北海道大学水産学部附属北洋水産研究施設業績第 194 号
(Contribution No. 194 from the Research Institute of North Pacific Fisheries, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

* 北海道大学水産学部北洋水産研究施設
(Research Institute of North Pacific Fisheries, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

は非常に少ない。DCAA を測定するためには、加水分解などの前処理が必ず必要となる。ところが、市販のアミノ酸自動分析用試薬でさえ、ごく微量ながらアミノ酸を含有しており、検出感度を上げて操作を簡略化するだけでは分析上の問題は解決されない。一般に水柱内では、DFAA よりも DCAA の方がその濃度も高いが、DCAA が海水中でどのような形で存在しているのか、あるいはおよそどれ位の分子量で存在しているのかなどについては、ほとんど知られていない。したがって天然水中でのありのままの存在状態を推定するためには、限外濾過法などによるフラクショネーションの操作が必要となる。しかし、限外濾過法などによるフラクショネーションも、タンパク様物質について試みられた例はごくわずかである (例えば、Tuschall and Brezonik, 1980)⁹⁾。そこで本研究では、HPLC-OPA 法により、 $n \text{ mol/l}$ レベルの海水中の溶存アミノ酸を 100 ml 程度の試水で測定する方法についての基礎的検討を行うこと、この方法を外洋水のアミノ酸分析に適用すること、さらに限外濾過法に応用し、結合型アミノ酸の分子量とその組成をも明らかにすることを目的とした。

試薬・装置および試料

1. 試 薬

アミノ酸の標準溶液は、和光純薬工業の標品を用い調製した。その他の試薬もすべて、同社の特級のものを用いた。ただし、N-アセチルシステインは、同社の特級のを再結晶して使用した。また水酸化ナトリウム、クエン酸三ナトリウム二水和物、n-カプリル酸、塩酸およびホウ酸は同社のアミノ酸自動分析用のものを用いた。

2. 装 置

HPLC は、島津高速液体クロマトグラフ“アミノ酸分析システム”LC-5A を、検出器は島津分光蛍光光度計 RF-540 を、また定量には積分計、島津クロマトパック C-R3A を使用し、内部標準法で行った。

3. 試 料

アミノ酸を分析する試料として、外洋水と沿岸水の 2 種類の試料を準備した。外洋水として、東京大学海洋研究所所属研究船白鳳丸の KH-85-2 次航海において北太平洋西部の $42^{\circ}59'N$, $150^{\circ}14'E$ において、ニスキ採水器により採取した試水を用いた。また沿岸水として本学水産学部所属調査船うしお丸により北海道噴火湾の中央部の定点 ($42^{\circ}16'N$, $140^{\circ}36'E$) において、バンドン採水器により採取した試水を用いた。いずれの試水も採取後数時間以内に Whatman GF/C フィルターを用いて濾過し、得られた濾液を分析試料とした。試料は HgCl_2 (10^{-4} M) を添加し、分析時まで室温で保存した。

実 験

1. 測定法の概要

アミノ酸の測定は、イオン交換 HPLC-ポストカラム法で行った。また通常オルトフタルアルデヒド法 (以下 OPA 法) では検出されにくいとされているプロリン、シスチンなどを精度よく検出するために、カラム溶出液に次亜塩素酸を加えて上述のアミノ酸をあらかじめ酸化する OPA-次亜塩素酸法を採用した。さらに、特にプロリンの蛍光強度を増加させるために OPA 試薬中の SH 化合物として通常よく用いられる β -メルカプトエタノールに変えて N-アセチルシステイン (N-

Table 1. Components of buffer solutions.

		No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
	pH	3.25	4.25	9.00	
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O	(g)	39.21	19.60	29.4	—
NaOH	(g)	—	—	—	4
Et-OH	(ml)	140	—	—	—
H ₃ BO ₄	(g)	—	0	0.78	—
n-Caprylic Acid	(ml)	0.2	0.1	0.1	—
HClO ₄ (60%)	(ml)	30	10	—	—
Total volume	(ml)	2,000	1,000	1,000	500

Table 2. Components of reagent solutions.

Solution A		Solution B	
NaCl O	0.5 ml	OPA	0.8 g
Na ₂ CO ₃	20.4 g	30% Brij-35	0.7 ml
H ₃ BO ₄	6.8 g	N-Ac-Cys	1.0 g
K ₂ SO ₄	9.4 g	Et-OH	14 ml
	500 ml	Na ₂ CO ₃	20.4 g
		H ₃ BO ₄	6.8 g
		K ₂ SO ₄	9.4 g
			500 ml

Ac-Cys) を用いた。上記以外は、従来のアミノ酸自動分析システムと同様であり、測定の際には、試料 100 μ l を分析に供した。使用した移動相、反応液の組成を表 1, 2 に示す。

2. 天然試料の精製・濃縮

2.1 DFAA

操作の概要を図 1 に示す。HPLC の分離カラムの劣化を防ぐために除タンパクする方法とし

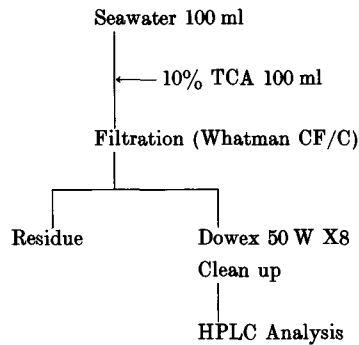


Fig. 1. Flow diagram for the determination of DFAA from seawater.

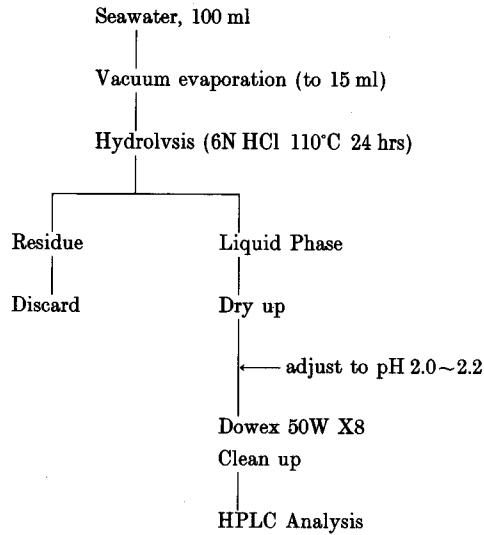


Fig. 2. Flow diagram for the determination of DTAA from seawater.

て、汚染を出来る限り避けしかも操作が容易である 10% トリクロロ酢酸溶液による沈殿除去法を用いることにした。試水 100 ml を除タンパク後、イオン交換樹脂 Dowex 50 W×8 (100-200 mesh, H⁺ 型) カラム (φ 1.8×18 cm) を用いて精製・濃縮した。

2.2 DTAA (溶存全アミノ酸)

操作の概要を図 2 に示す。試水 100 ml をロータリーエバポレーターを用いて減圧乾固の後、6 N HCl で 110°C, 24 時間加水分解し、これを DFAA 同様にイオン交換樹脂を用いて濃縮・精製した。

2.3 限外濾過法による天然試料の濃縮

結合型のアミノ酸を出来る限り汚染を避け、かつ簡単な操作で濃縮する方法として、限外濾過法を検討した。この方法は、2.2 で述べた DTAA の濃縮・精製の操作に加えて、DTAA の分子量分画を行うことを目的としている。

限外濾過法には、1~50 nm の孔径をもつ限外濾過膜により目的とする区分を膜上に濃縮する方法と、膜を通過してくる画分を集める方法の 2 種類が通常用いられている。ここでは、目的とする区分を濃縮しつつ脱塩も同時に行える前者の方法を採用した。実際の操作としては、アミコン社の限外濾過セル (モデル 202) を用いて、100 ml の試水を窒素加圧下 (約 3.8 kg/cm²) で約 10 ml まで濃縮した。その後 90 ml の再蒸留水を加え、再び約 10 ml まで濃縮する操作を 2 回繰り返した。この操作で、分画分子量の異なる何種類かの限外濾過膜を用いることにより、種々の分子量を持つ結合型アミノ酸を膜上に集めることができる。このようにして集めた区分を 6 N HCl で 110°C, 24 時間加水分解後、これを減圧濃縮乾固し、HPLC 分析に供した。

結 果

1. HPLC

HPLC のクロマトグラムの一例を図 3 に示す。図 3 は、注入量が各々 1 n mol になるように混合

したアミノ酸の標準溶液のクロマトグラムと、実際の海水試料を分析して得られたクロマトグラムである。17種のタンパク構成アミノ酸とその分解物5種、および内部標準として加えたノルロイシンとアンモニアの計24種のピークはよく分離しており、約75分で分析を終了した。

2. 繰り返し分析精度

各々のアミノ酸の標品1 n mol を5回 HPLC に注入し、その相対標準偏差を求めた。その結果を表3に示す。相対標準偏差値は、リジン(5.4%)を除いて、各アミノ酸とも5%以下の値が得られ、定量性に問題のないことがわかった。

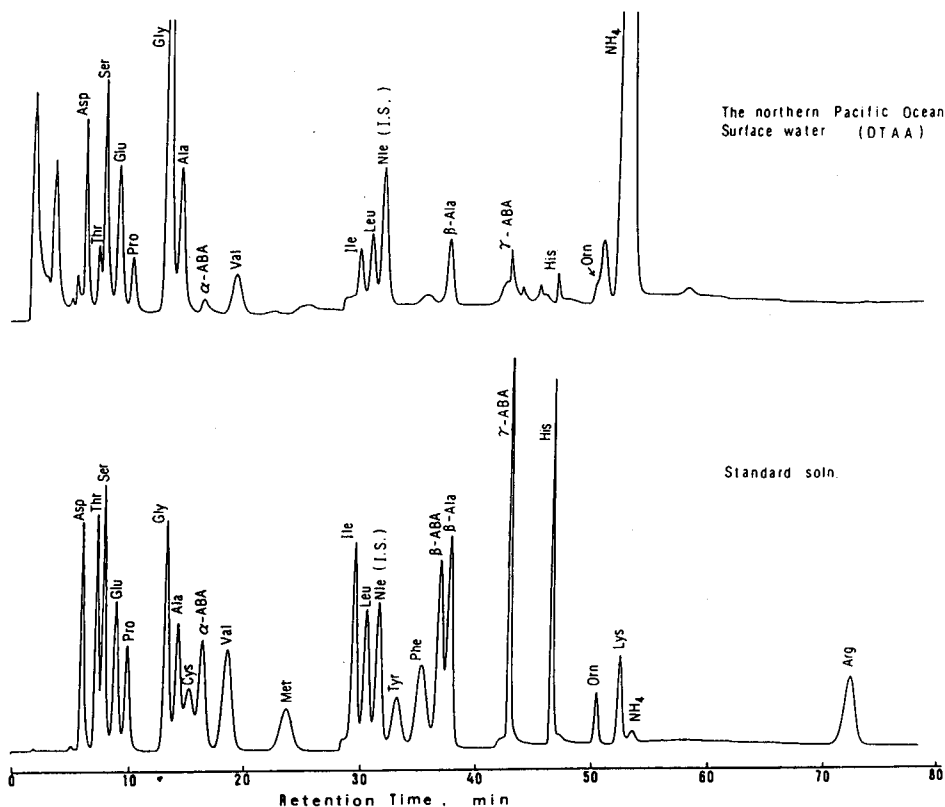


Fig. 3. High performance liquid chromatograms of amino acids in seawater sample and standard solution.

Amino acids in figure are abbreviated as follows;

Asp: aspartic acid, Thr: threonine, Ser: serine, Glu: glutamic acid, Pro: proline, Gly: glycine, Ala: alanine, Cys: cystine, α-ABA: α-aminobutyric acid, Val: valine, Met: methionine, Ile: isoleucine, Leu: leucine, Nle: norleucine, Tyr: tyrosine, Phe: phenylalanine, β-ABA: β-aminobutyric acid, β-Ala: β-alanine, γ-ABA: γ-aminobutyric acid, His: histidine, Orn: ornithine, Lys: lysine, NH₄: ammonium, Arg: arginine.

I.S.: Internal standard.

Table 3. Coefficient of variation in amino acids analysis.

C.V**%		C.V**%	
Asp	2.9	Leu	3.1
Thr	3.8	Nle	3.1
Ser	2.3	Tyr	3.7
Clu	2.9	Phe	2.7
Pro	2.4	β -ABA	2.3
Gly	2.9	β -Ala	3.1
Ala	3.7	γ -ABA	3.5
Cys	2.7	His	3.1
α -ABA	2.9	Orn	4.1
Val	3.0	Lys	5.4
Met	2.9	Arg	2.7
Ile	4.7	(Ave)	(3.2)

C.V*: Coefficient of variation calculated from five repeated runs.

The volume of individual amino acid is 1 nmol.

3. 天然試料の分析

北太平洋西部において得られた試料の分析結果の一例を、図4に示す。実際の海水試料の分析においては、すべての試料について脱塩・濃縮・加水分解などの操作上での汚染を完全に避けることは出来ない。そのため、現在の分析レベル（各々のアミノ酸のHPLC注入量が50-200 p mol/100 μ l）で同一試料について複数回の分析が必要である。そこで一試料に対し2回ずつ分析を行った結果、その平均偏差は約14%であった。水深10-3,000 mでDTAA濃度は、90-650 nMの間を変動しており、200 m以浅で高濃度を示した。これらの値は、1973年に米田⁶⁾が同海域においてガスクロマトグラフ法により測定し報告した値とほぼ一致する。一方、DFAAは30-250 nMの間を変動しており、DTAA同様200 m以浅で高濃度である。DTAA（溶存全アミノ酸）の組成に注目してみると、グリシン、セリン、グルタミン酸が主要成分となっており、グループ別にみると、中性アミノ酸が全体の50-60%を占めている。非タンパク構成アミノ酸としては β -アラニン、オルニチン、 α -、 γ -アミノ酪酸が検出されたが、それらの含有率はいずれも4%以下であった。また、今回定量されたアミノ酸量が、過硫酸カリウムによる酸化法⁷⁾によつて求めた溶存有機窒素(DON)量に占める割合を表4に示す。この値は5-26%で、75 m, 750 mでそれぞれ高い値、低い値を示すが、これらを平均すると15%程度である。

1987年7月に噴火湾で採取した海水（表層水）を限外濾過濃縮（YM2：分画分子量1,000）し、アミノ酸分析した例を表5に示す。限外濾過から加水分解までの操作についても2回分析を行った結果、この方法によつて集められたアミノ酸量は平均327 nMであり、その平均偏差は5.6%であった。また、この方法による全操作のブランク値は55 nM (n=4)で、表にはブランク値を差し引いた値を表示した。なお、限外濾過した試料では、メチオニンのピークにテーリングが認められ定量化できなかつた。これは、脱塩・濃縮・加水分解の操作の間にメチオニンの酸化物ができたためと思われる。

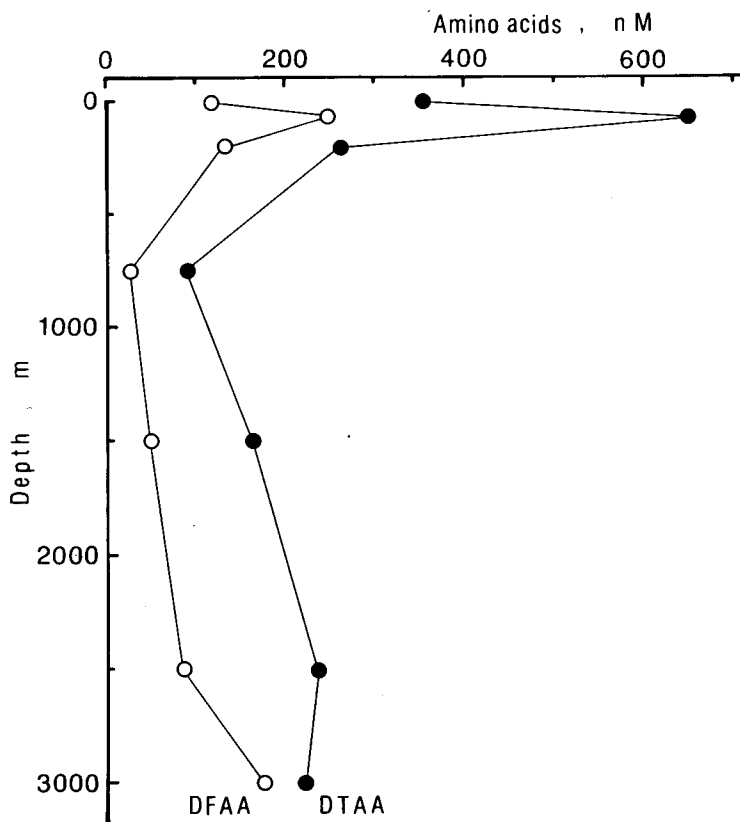


Fig. 4. Vertical profile of DFAA and DTAA in North Pacific seawater.

Table 4. Concentrations of total DFAA and DTAA, and the value of AA-N/DON.

Depth (m)	DFAA (nM)	DTAA (nM)	DON ($\mu\text{g-atN/l}$)	AA-N/DON (%)
10	118	355	2.6	13.7
75	244	652	2.5	26.1
200	133	262	1.8	14.6
750	28	92	1.7	5.4
1,500	51	163	1.2	13.6
2,500	86	236	1.6	14.8
3,000	177	220	1.5*	14.7

*: by dry combustion method (Sumigraph N-10)

Table 5. Concentration of dissolved amino acids having molecular weight larger than 1,000 in surface water of Funka Bay.

Amino acids		Concentration (n mol/l)
Acidic	Asp	9
	Glu	48
Hydroxy	Thr	17
	Ser	42
Neutral	Gly	71
	Ala	44
	Val	19
	Ile	10
	Leu	17
	GABA	4
	β -Ala	5
Aromatic	Tyr	tr.*
	Phe	tr.*
Sultur	Cys	n.d.**
	Met	n.c.***
Imino	Pro	17
Basic	His	5
	Lys	7
	Arg	12
Total		327

*: trace
 **: not detected
 ***: not calculated

摘 要

n mol/l のレベルで海水中に存在するアミノ酸を、100 ml 程度の試水でイオン交換 HPLC-OPA 法を用いて測定する方法について検討した。

1. 本研究における分析レベルでは、脱塩・濃縮・加水分解などの操作における汚染を完全に避けることは難しいが、同一海水試料について 2 回ずつの分析を行うことにより、650 nM レベル以下の濃度において $\pm 14\%$ 以下の信頼性の高い溶存アミノ酸の鉛直分布が得られた。

2. 本法で測定した北太平洋海水中の全アミノ酸濃度は 90-650 nM、遊離アミノ酸濃度は 30-250 nM で、これらの DON に占める割合は 5-26% 程度であった。

3. 限外濾過法により、結合型のアミノ酸を脱塩・濃縮し、そのアミノ酸組成を求めた。今後、分画分子量の異なる何種類かの限外濾過膜によって得られた結果を組み合わせることで、この限外濾過法が溶存タンパク様物質の存在状態を明らかにする手掛かりとなることが期待される。

謝 辞

本研究を行うにあたり、御助力頂いた堀井享氏（水産学士，北海道大学）に対し，厚く感謝致します。

また，試料採取の御協力を賜った東京大学海洋研究所・白鳳丸 KH-85-2 次航海主席研究員・服部明彦名誉教授ならびに研究員の方々に対し，また，うしお丸船長はじめ乗組員の方々に対して深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Kawahara, H. and Maita, Y. (1971). Gas-liquid chromatographic determination of amino acids and vertical distribution of proteinaceous substance in sea water. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **27**, 27-33.
- 2) Gardner, W.S. (1978). Sensitive fluorometric procedure to determine individual amino acids in marine waters. *Mar. Chem.*, **6**, 15-26.
- 3) Mopper, K. and Lindroth, P. (1982). Diel and depth variations in dissolved free amino acids and ammonium in the Baltic Sea determined by shipboard HPLC analysis. *Limnol. Oceanogr.*, **27**, 336-347.
- 4) Flynn, K.J. and Butler, I. (1986). Nitrogen sources for the growth of marine microalgae: role of dissolved free amino acids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **34**, 281-304.
- 5) Tuschall, J.R. and Brezonik, P.L. (1980). Characterization of organic nitrogen in natural waters: Its molecular size, protein content, and interactions with heavy metals. *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 495-504.
- 6) 米田義昭 (1973). 海洋水中の有機物質の現存量とその挙動に関する研究. 北海道大学大学院水産学研究科 博士論文, 209 p.
- 7) Parsons, T.R., Maita, Y. and Lalli, C.M. (1984). *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis.*, 173 p, Pergamon Press, Oxford.