

# 自動前処理機能を用いたプレカラム誘導体化 アミノ酸の短時間一斉分析

大城 真愛

## ユーザーベネフィット

- ◆ タンパク質構成アミノ酸20成分の分析が1サイクル24分で行えます。
- ◆ Nexera XR搭載の自動前処理機能を用いることで、プレカラム誘導体化アミノ酸分析を簡便に行えます。
- ◆ Nexera XRはアミノ酸以外の分析も行えるため、装置の稼働率を高めることができます。

## ■はじめに

アミノ酸分析は、食品や製薬の開発など幅広い分野で必要とされています。HPLCを用いたアミノ酸分析で一般的に用いられている手法はポストカラム誘導体化法です。当社もアミノ酸分析システムとしてポストカラム誘導体化法を採用しています。しかしながら、ポストカラム誘導体化法は使用するカラムの特性上、分析の高速化が難しい点が課題です。一方で、予め誘導体化したアミノ酸を分析するプレカラム誘導体化法は、誘導体化を自動化することで、ポストカラム誘導体化法と比較して迅速かつ簡便に分析を行うことが可能です。

本稿では、高速液体クロマトグラフNexera XRを用いた自動プレカラム誘導体化によるアミノ酸分析の分析条件を最適化した例をご紹介します。

## ■自動プレカラム誘導体化

Nexera XRは標準で自動前処理機能が搭載されています。オートサンプラーによる試料の希釈や試薬添加など、標準の注入動作以外にも様々な動作を行う事が可能です。誘導体化試薬としてはo-フタルアルデヒド (OPA) や9-クロロギ酸フルオレニルメチル (FMOC) などがよく知られており、これらは試料添加後室温で速やかにアミノ酸と反応します。そのため、自動前処理機能を用いてプレカラム誘導体化処理を自動的に行うことができ、前処理にかかる手間を削減できます。

さらに本稿の手法では、誘導体化反応をオートサンプラーのニードル内で行うため、従来のように反応用のバイアルを別途セットする必要もなく、試料および試薬の消費量を最小限に抑えられます。

図1にプレカラム誘導体化アミノ酸の誘導体化反応の略図を、図2に本システムを用いてタンパク質構成アミノ酸20成分を分析したクロマトグラムを示します。

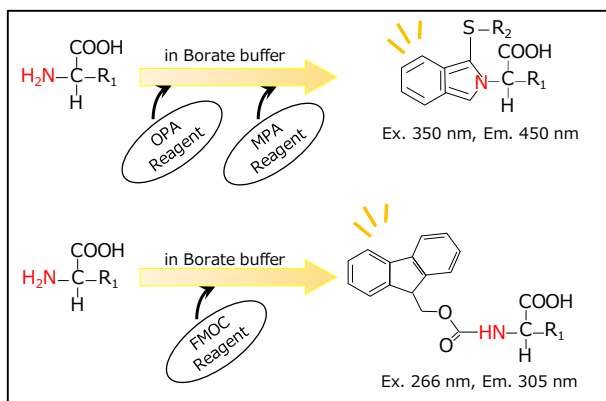
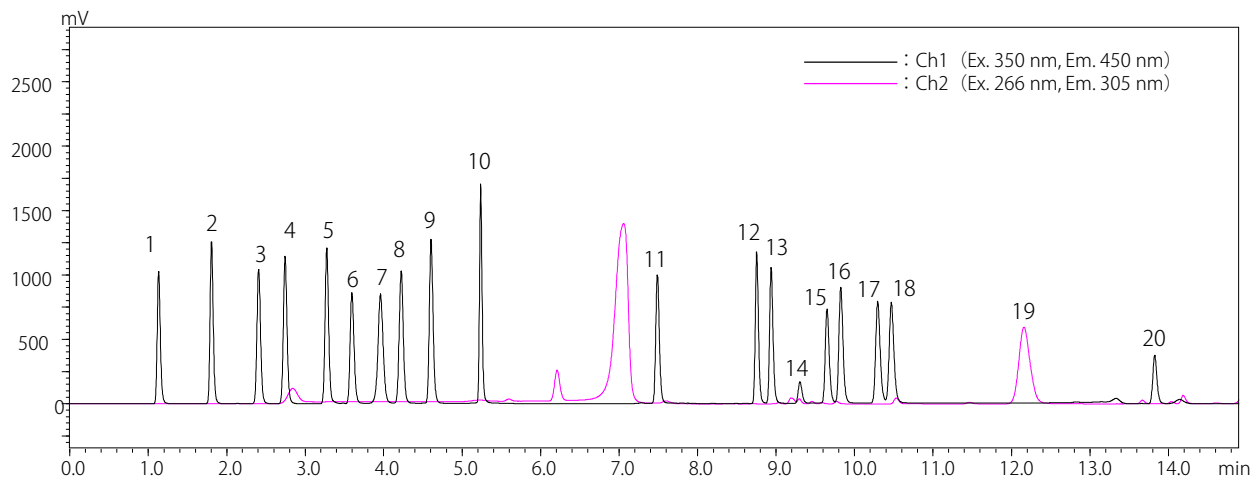


図1 プレカラム誘導体化アミノ酸誘導体化反応  
上：OPA試薬での反応  
下：FMOC試薬での反応（本稿ではプロリンの誘導体化に使用）



1, Aspartic Acid 2, Glutamic Acid 3, Asparagine 4, Serine 5, Glutamine 6, Histidine 7, Glycine 8, Threonine 9, Arginine 10, Alanine 11, Tyrosine 12, Methionine 13, Valine 14, Cystine 15, Tryptophan 16, Phenylalanine 17, Isoleucine 18, Leucine 19, Proline 20, Lysine

図2 タンパク質構成アミノ酸20成分の一斉分析（各25 μmol/L）

## ■ 分析条件

表1に分析条件を、表2にタイムプログラムを示します。

表 1-1 分析条件

Column	: Shim-pack™ XR-ODSII*1 100 mm×3.0 mm I.D., 2.2 μm
Mode	: Low pressure gradient
Mobile phase	: A) 20 mmol/L (Sodium) acetate buffer (pH 6) B) Water/Acetonitrile=100:900 C) 20 mmol/L (Sodium) acetate buffer (pH 5) containing 0.5 mmol/L EDTA-2Na
Flow rate	: 1.0 mL/min
Column temp.	: 35 °C
Injection volume	: 1 μL
Sample cooler	: 4 °C
Detection	: Fluorescence detector (Cell temp. 35 °C) Ch1) Ex. 350 nm, Em. 450 nm Ch2) Ex. 266 nm, Em. 305 nm

\*1 : P/N 228-41624-92

表 1-2 分析条件 (移動相調製方法)

- Mobile Phase A  
Add 2.67 g of sodium acetate trihydrate and 41 μL of acetic acid into 1000 mL of pure water.
- Mobile Phase C  
Add 0.19 g of EDTA-2Na, 2.03 g of sodium acetate trihydrate and 308 μL of acetic acid into 1000 mL of pure water.

表 2 タイムプログラム

Time (min)	A.conc	B.conc	C.conc
0	95	5	0
0.2	93	7	0
1	93	7	0
4	87	13	0
5	0	15	85
7.5	0	30	70
12	0	35	65
14	0	45	55
14.01	0	95	5
16.99	0	95	5
17	5	95	0
18	5	95	0

## ■ 検量線範囲

各成分のアミノ酸について1, 5, 12.5, 25, 100 (μmol/L) の濃度範囲における直線性 (r<sup>2</sup>, 寄与率) はいずれも0.999以上と良好でした。また、25 μmol/Lにおける繰り返し分析 (n=10) の面積再現性について評価しました。この結果を表3に示します。

表 3 面積再現性

	Area (%RSD)		Area (%RSD)
Asp	1.66	Tyr	1.86
Glu	1.66	Met	1.68
Asn	1.70	Val	1.61
Ser	1.79	Cystine	1.64
Gln	1.76	Trp	1.69
His	1.50	Phe	1.63
Gly	1.77	Ile	1.61
Thr	1.67	Leu	1.66
Arg	1.49	Pro	5.12
Ala	1.75	Lys	1.89

## ■ 実試料の分析

図3にビールの分析例を示します。試料を純水で10倍もしくは100倍に希釈し、0.22 μmのフィルターでろ過後に分析へ供しました。なお、分析条件は表1および表2の通りです。

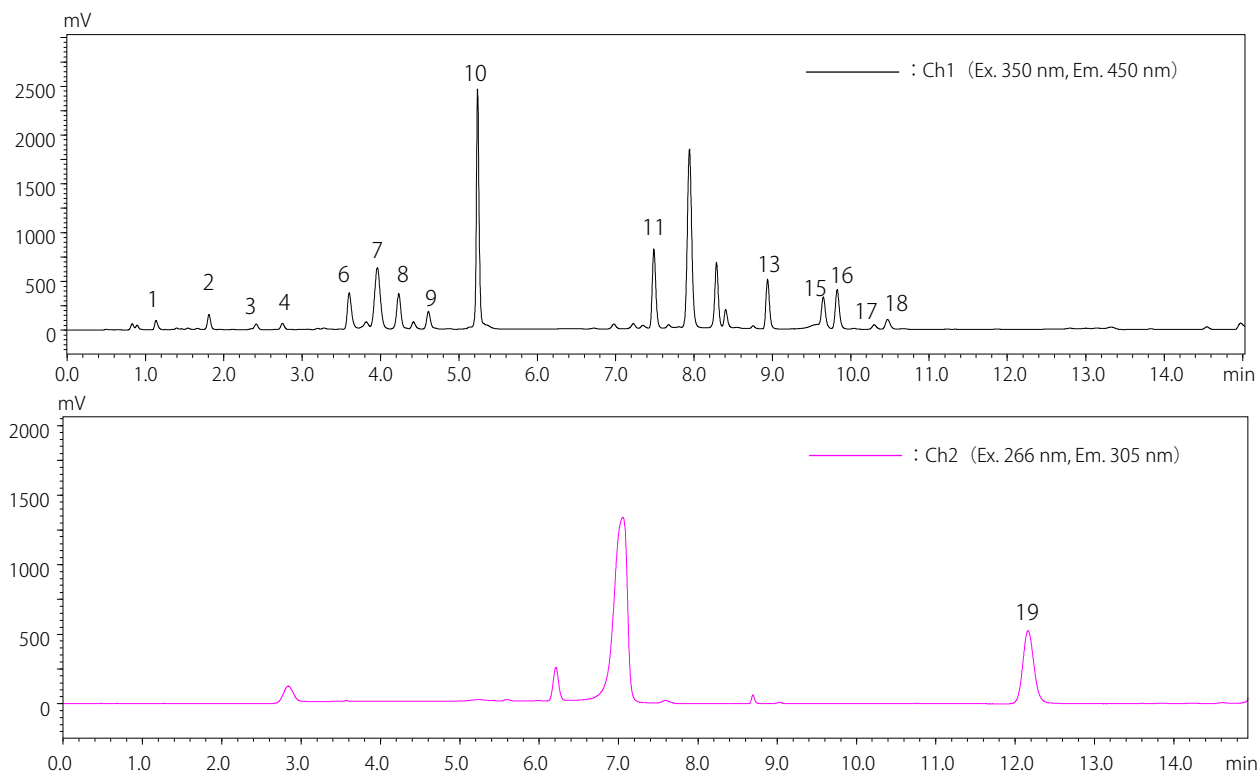


図3 ビールのクロマトグラム  
(上段: 10倍希釈試料のCh1での測定結果、下段: 100倍希釈試料のCh2での測定結果 ピーク番号は図2を参照)

## ■ 自動プレカラム誘導体化の設定

本分析で用いる誘導体化試薬の調製方法を表4に示します。また、調製後の各誘導体化試薬のオートサンプラー内の設置個所例を図4に示します。

表4 誘導体化試薬調製方法

- Mercaptopropionic acid Reagent(MPA Reagent)  
Add 10 µL of 3-mercaptopropionic acid into 10 mL of 0.1 mol/L borate buffer.
- OPA Reagent  
Add 0.3 mL of ethanol into 10 mg of *o*-phthalaldehyde and dissolve completely. Then add 0.7 mL of 0.1 mol/L borate buffer and 4 mL of ultrapure water.
- MPA / OPA Solution  
Mix 600 µL of MPA Reagent and 300 µL OPA Reagent.
- FMOC Reagent  
Dissolve 10 mg of 9-fluorenylmethyl chloroformate into 100 mL of acetonitrile.
- Phosphoric acid aqueous solution  
Add 0.5 mL of phosphoric acid into 100 mL of pure water.

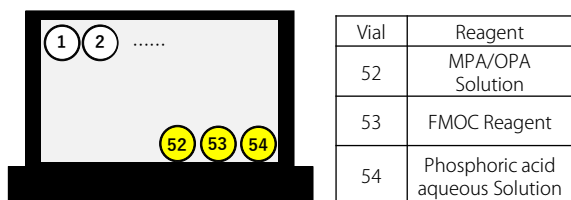


図4 誘導体化試薬の設置個所 (例: 1.5 mL用サンプルプレート)

本分析で用いる自動プレカラム誘導体化の流れを図5に示します。これらの動作を実行するために、オートサンプラーに標準搭載されている自動前処理機能のうち「前処理プログラム」モードにおいて、表5の通りプログラムを設定します。なお、このプログラムでは、各誘導体化試薬を図4の通りに設置した場合を想定しています。

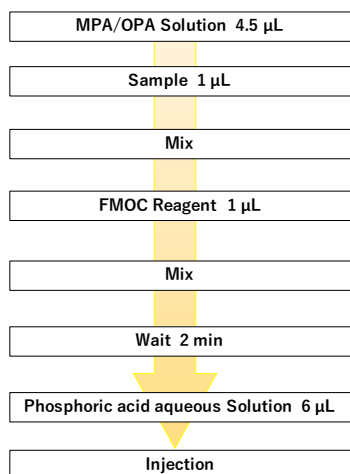


図5 自動プレカラム誘導体化の流れ

表5 前処理プログラム詳細

Page1		Page2	
1	a1=4.5	1	vial.n 1,54
2	a2=1	2	n.strk ns
3	a3=1	3	aspir 6.0,ss
4	a4=5.0	4	n.drain
5	vial.n 1,52	5	d.rinse
6	air.a 5.5,ss	6	inj.p
7	n.strk ns	7	s.inj
8	aspir a1,ss	8	purge.ml mv,rs
9	d.rinse	9	purge.rp rv,rs
10	vial.n rn,sn	10	end
11	n.strk ns		
12	aspir a2,ss		
13	air.a 1.0,ss		
14	d.rinse		
15	n.drain		
16	for a5=1,10		
17	aspir a4,5.0		
18	disp a4,5.0		
19	next a5		
20	d.rinse		
21	wait 0.5		
22	vial.n 1,53		
23	n.strk ns		
24	aspir a3,ss		
25	air.a 2.0,ss		
26	d.rinse		
27	n.drain		
28	for a5=1,40		
29	aspir a4,5.0		
30	disp a4,5.0		
31	next a5		
32	wait 2.0		
33	goto f2		
34	end		

## ■ まとめ

本稿では、自動前処理機能を用いたプレカラム誘導体化によるタンパク質構成アミノ酸20成分の高速分析例をご紹介しました。Nexera XR用に最適化したこの分析条件や前処理プログラムをご使用いただくことで、プレカラム誘導体化アミノ酸分析を簡便に行っていただけます。さらに自動前処理により、反応時間もほぼ一定に保つことができるため、より安定した分析が可能となります。本分析に用いたNexera XRは汎用性が高く、アミノ酸分析以外にもご使用いただけます。そのため装置の稼働率の向上やアミノ酸分析の導入が容易になることが期待できます。

本アプリケーションニュース作成にあたっての分析条件構築では、九州大学 生体防御医学研究所附属トランスオミクスセンター メタボロミクス分野 馬場研究室にご指導、ご協力頂きました。

NexeraおよびShim-packは、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

**株式会社 島津製作所** 分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

01-00007-JP 初版発行: 2021年2月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

改訂版は会員制サイト Solutions Navigator で閲覧できます。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>  
閲覧には、会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録ください。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

© Shimadzu Corporation, 2021