

高速液体クロマトグラフィー No. L215

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

高速液体クロマトグラフィーによる アンモニアの高感度・高選択的検出法

High Sensitivity and High Selectivity Analysis for Ammonia with HPLC

アンモニアは、含窒素化合物の腐敗、分解によって発生し、また空気中遊離窒素固定に関する主成分として利用されており、自然界に広く存在する化合物です。工業的にも肥料、合成高分子、カーバイド、医薬品などさまざまな製造工程から発生し、品質管理、作業環境、大気環境から生化学の分野において広くアンモニア量が測定されています。

ここではアンモニアをこれまでになく高感度で選択的に検出する方法（特許出願中）と、この方法を海水、雨水や試薬中アンモニアなどの測定に応用した例について紹介いたします。

HPLCでアンモニアを特異的に測定するために、アミノ酸などと同様にポストカラム誘導体化法が一般的に利用されますが、従来のニンヒドリンやo-フタルアルデヒド(OPA)に代表される誘導体化試薬ではアンモニアは他のアミンに比べて低感度で、複雑な試料では共存成分の影響を受けやすくなります。そこでOPAの共存試薬として従来のメルカプタン以外に亜硫酸を用いれば、とくにアンモニアに対して、これまでにない選択的かつ高感度な検出ができることがわかりました。Table 1にこの両者の助色基を用いた際の各OPA化合物の蛍光強度の比較を示します。それぞれの最適励起および蛍光波長は多機能蛍光検出器RF-550の高速スキャン機能にて求めています。Fig.1には装置概略図を、Fig.2には標準アンモニアの分析結果を示します。

Table 1 亜硫酸と2-メルカプトエタノール(2-ME)を使用した際の各アミン-OPA化合物の蛍光強度の違い
Comparison of Fluorescence Intensity Between o-phthalaldehyde-sulfurous Acid and o-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol

Compounds	OPA-Na ₂ SO ₃	OPA-2-ME
Ammonia	100	30
Glycine	56	496
Arginine	13	249
Leucine	25	350
Ethanolamine	16	516
Methylamine	28	225

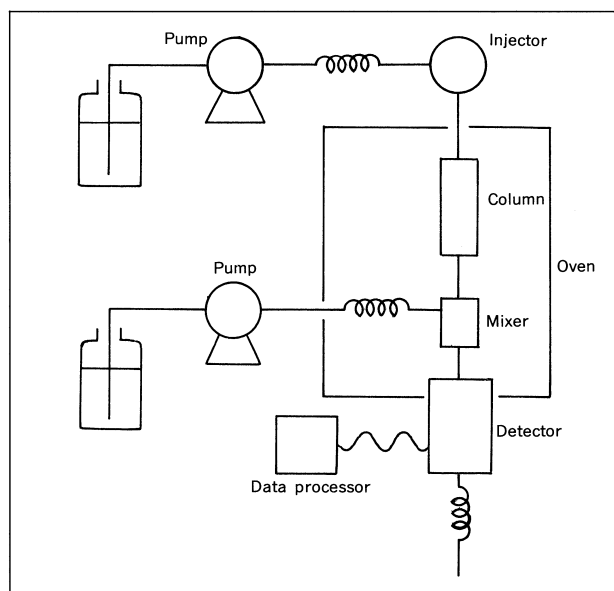


Fig.1 システム図
Flow Diagram of HPLC for Ammonia Analysis

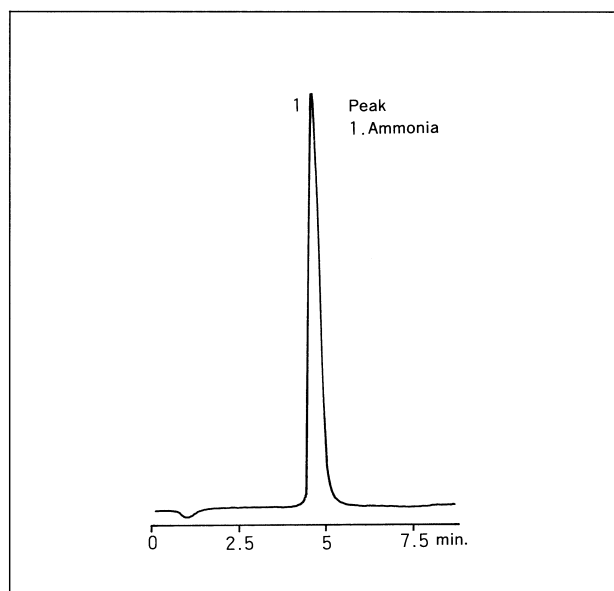


Fig.2 標準アンモニアの分析(100pmol注入)
Chromatogram of Ammonia Standard (100pmol)

Table 2に本システムの分析条件を, Fig. 3 にはアンモニアの検量線を示します。本システムでは絶対注入量で100pmol~10nmolの範囲で良好な直線性が得られました。

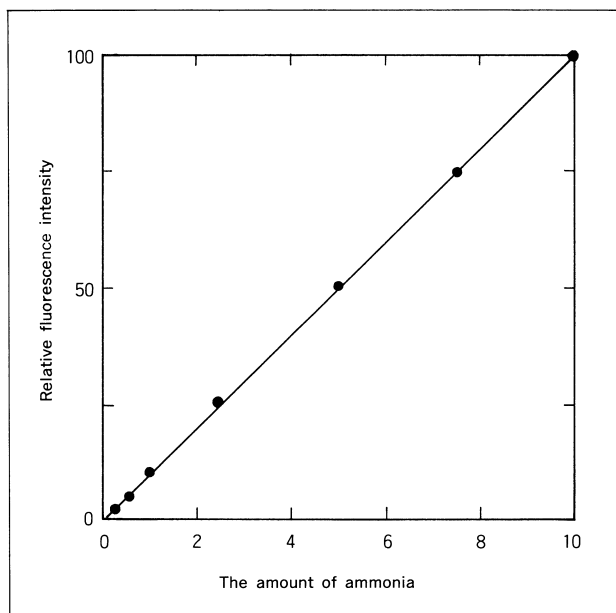


Fig.3 検量線
Relationship Between the Amount of Ammonia and Fluorescence Intensity

■実試料への応用

実試料として雨水(5 μ l), 海水(2 μ l)と市販グルタミン水溶液500 μ g/ml(2 μ l)の分析結果をそれぞれFig.4, 5, 6に紹介します。それぞれ共存成分の影響を受けずに高感度に検出されています。

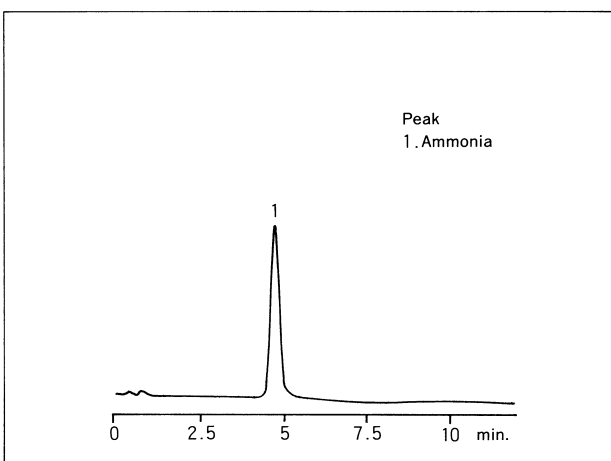


Fig.4 雨水(5 μ l)の分析
Chromatogram of Rain Water (5 μ l)

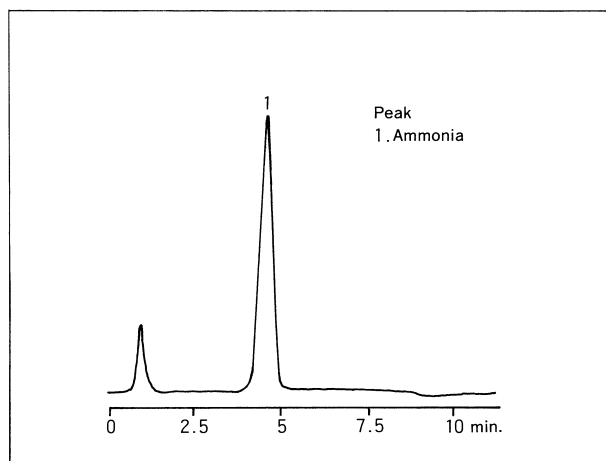


Fig.5 海水(2 μ l)の分析
Chromatogram of Sea Water (2 μ l)

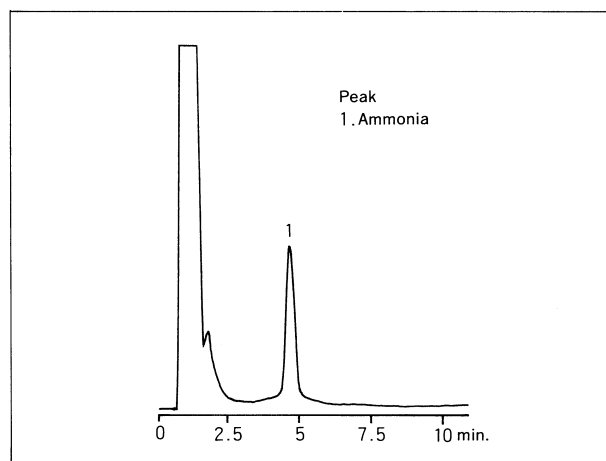


Fig.6 標準グルタミン水溶液(500 μ g/ml, 2 μ l)中のアンモニアの分析
Chromatogram of Glutamine Standard (500 μ g/ml, 2 μ l)

Table 2 分析条件
Analytical Conditions for Ammonia

[for separation]	
Column	: Shim-pack WCX-1 (4mm ϕ ×50mmL.)
Mobile Phase	: 5mM (sodium) citrate <pH=6.2>
Flow Rate	: 1.0ml/min.
Temperature	: 50°C
[for detection]	
Reagent	: 20mM o-phthalaldehyde (methanol solution) / 200mM (sodium) borate <pH=9.2> containing 2mM (sodium) sulfite = 1 : 4 (v/v)
Flow Rate	: 0.5ml/min.
Mixer	: piping part J
Temperature	: 50°C
Detector	: RF-550 at Ex=320nm Em=390nm

初版発行: 1991年1月

島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

☎ 0120-131691(携帯電話不可)
● 携帯電話専用番号(075)813-1691

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。改訂版は下記の会員制Web Solutions Navigatorで閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

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/>
会員制Webの閲覧だけでなくいろいろな情報サービスが受けられます。