

# Application News

## No. L529B

高速液体クロマトグラフィー

### 一体型 LC システム Prominence™-i の自動前処理機能を用いたアミノ酸の一斉分析

アミノ酸分析は食品分野や製薬分野など、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、高速化が難しいのが現状です。

UHPLC システムを用いた迅速なプレカラム誘導体化法によるアミノ酸の分析については L432A でご紹介しました。ここでは、より簡便に、かつ一体型 HPLC システムでも可能な自動プレカラム誘導体化法によるアミノ酸分析をご紹介します。

Y. Osaka

#### ■ 自動プレカラム誘導体化

Prominence-i (LC-2030C) は標準でオートサンプラの自動前処理機能が搭載されており、「共注入」機能を使えば複数のバイアルから溶液を順次吸引し、ニードル内で混合させることが可能です。よく知られているアミノ酸の誘導体化反応試薬として *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) がありますが、これらはアミノ酸と室温で速やかに反応が進みます。本機能を用いることで、自動的にニードル内でラベル化反応を行うことが可能です。

図 1 に設定内容を示し、図 2 にその動作を示します。このように、試薬を順次吸引するような動作であっても、簡単に設定できます。

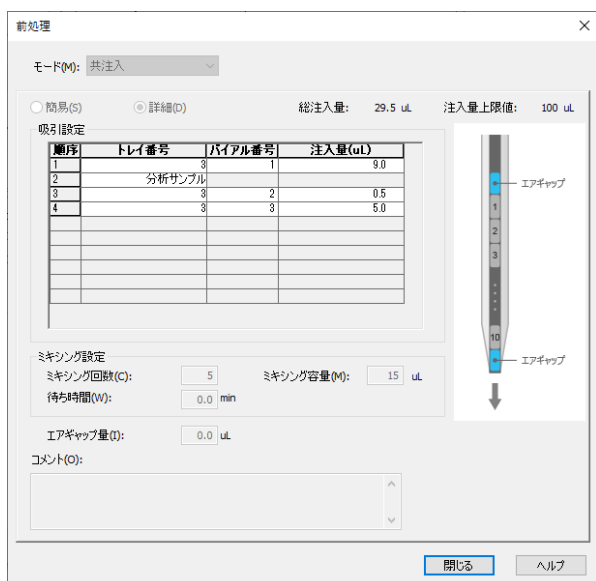


図 1 Prominence-i (LC-2030C) の前処理 (共注入) 設定画面

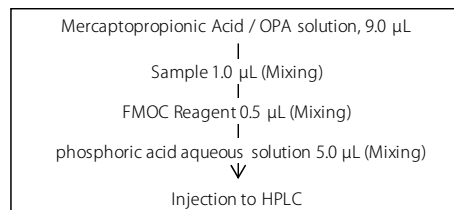


図 2 Prominence-i による自動プレカラム誘導体化の流れ

表 1 誘導体化試薬および移動相

- Mercaptopropionic Acid 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 pure water.
- Mercaptopropionic Acid / OPA solution  
Mix 300 µL of Mercaptopropionic Acid Reagent and 600 µL OPA Reagent.
- FMOC Reagent  
Add 10 mg of 9-fluorenylmethyl chloroformate into 50 mL of acetonitrile.
- Mobile phase A : 20 mmol/L Sodium acetate buffer (pH6)  
Add 2.67 g of sodium acetate trihydrate and 41 µL of acetic acid into 1000 mL of pure water.
- Mobile phase B : Water/Acetonitrile = 100/900
- Mobile phase C : 20 mmol/mL Sodium acetate buffer (pH5) containing 0.5 mmol/L EDTA-2Na  
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.
- phosphoric acid aqueous solution  
Add 0.5 mL of phosphoric acid into 100 mL of pure water.

#### ■ 分析結果

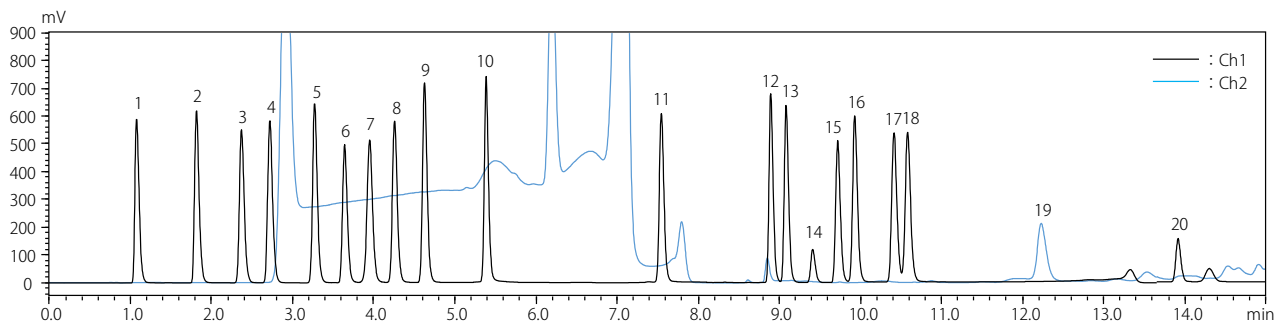
表 2 および表 3 に分析条件を示します。図 3 にタンパク質構成アミノ酸 20 成分を分析したクロマトグラムを示します。

表 2 分析条件

|                  |   |
|------------------|---|
| Column           | : Shim-pack™ XR-ODSII<br>100 mmL. × 3.0 mmI.D., 2.2 µm                                |
| Mode             | : Low pressure gradient   |
| Mobile phase     | : See the table 1   |
| Flow rate        | : 1.0 mL/min  |
| Column temp.     | : 40 °C   |
| Injection volume | : 1 µL  |
| Detection        | : Fluorescence detector<br>Ch1) Ex. 350 nm, Em. 450 nm<br>Ch2) Ex. 266 nm, Em. 305 nm |

表 3 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      |
| 17         | 0      | 95     | 5      |



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3 タンパク質構成アミノ酸 20 成分の一斉分析 (各 12.5 pmol/μL)

## ■ 直線性と再現性

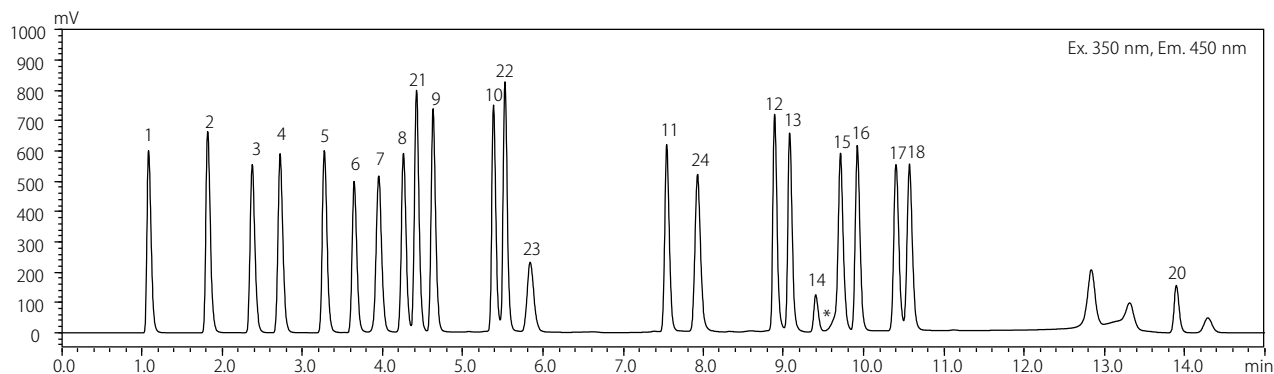
各成分のアミノ酸について 0.25、1.25、2.5、12.5、25 (Pro は 2.5、12.5、25、62.5、125) (pmol/μL) の濃度範囲における直線性 ( $r^2$ 、寄与率) と、12.5 pmol/μL における繰り返し分析 (n=6) の面積再現性について評価しました。これらの結果を表 4 に示します。

表 4 直線性と面積再現性

|     | Linearity ( $r^2$ ) | Area (%RSD) |         | Linearity ( $r^2$ ) | Area (%RSD) |
|-----|---------------------|-------------|---------|---------------------|-------------|
| Asp | 0.9999978           | 0.597       | Tyr     | 0.9999841           | 0.699       |
| Glu | 0.999984            | 0.567       | Met     | 0.9999028           | 0.660       |
| Asn | 0.9999949           | 0.537       | Val     | 0.9999785           | 0.627       |
| Ser | 0.9999009           | 0.522       | Cystine | 0.9999784           | 0.520       |
| Gln | 0.9999862           | 0.592       | Trp     | 0.9999718           | 0.607       |
| His | 0.9999564           | 0.706       | Phe     | 0.9999847           | 0.818       |
| Gly | 0.9999155           | 0.446       | Ile     | 0.9999703           | 0.633       |
| Thr | 0.9998575           | 0.660       | Leu     | 0.999986            | 0.902       |
| Arg | 0.9997389           | 0.660       | Pro     | 0.99935             | 4.768       |
| Ala | 0.9994783           | 0.470       | Lys     | 0.9994412           | 1.914       |

## ■ その他のアミノ酸の分析例

アミノ酸には、タンパク質構成アミノ酸 20 成分の他にも健康に役立つとされるさまざまなアミノ酸があります。ここでは、近年特に注目されているシトルリン、タウリン、テアニン、γ-アミノ酪酸 (GABA) を加えた分析例を示します (図 4)。



21, Citrulline, 22, Taurine 23, Theanine 24, GABA

図4 機能性成分を含むアミノ酸 23 成分の分析例 (各 12.5 pmol/μL)

\* GABA が含まれていると、Tryptophan の定量精度に影響がある場合があります。

## ■ 実試料の分析例

図 5 にはビールの分析例を示します。試料を 10 mmol/L の塩酸で 10 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 2 および表 3 の通りです。

以上のように、Prominence-i の自動前処理機能を使用することで、アミノ酸プレカラム誘導体化の分析が簡単にできます。ラベル化反応をニードル内で行うため、必要な試薬や試料を最小限にとどめ、さらに反応物をすべてカラムへ導入することから高感度な分析も可能です。バイアル内でラベル化を行う当社従来法と比べても、反応に使用する空バイアルを用意する必要がなくなりますので、分析にかかる準備も省力化できます。

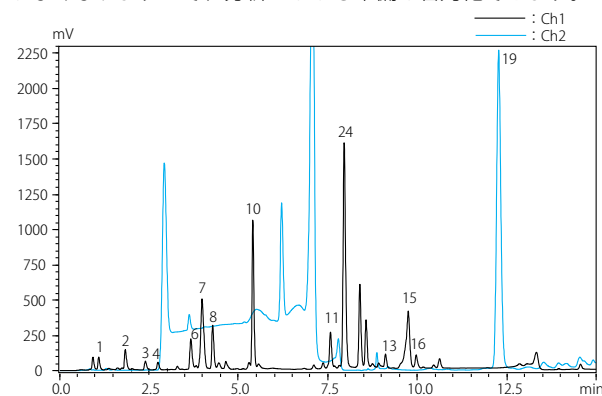


図5 ビールのクロマトグラム  
(ピーク番号は図3および図4を参照)

Prominence および Shim-pack は、株式会社 島津製作所の商標です。

**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

A 改訂発行：2018年10月  
B 改訂発行：2020年1月  
島津コールセンター ☎0120-131691  
(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。