

HPLC-蛍光検出器による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定量

大城 真愛

ユーザーベネフィット

- ◆ アミノ酸の定量を再現良く行うことができます。
- ◆ 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。
- ◆ アミノ酸21成分の分析が1サイクル24分で行えます。

■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。そのため、アミノ酸の分析にはHPLC-蛍光検出器、HPLC-UV検出器、LC/MS、GC/MSなど様々な手法が用いられ、それぞれに特色があります。

アプリケーションニュース01-00007A-JPではHPLC-蛍光検出器による自動前処理機能を用いたプレカラム誘導体化法のアミノ酸分析を紹介しました。

本稿では、その条件を用いた分析方法がアミノ酸の定量に適している例をご紹介します。

■分析条件

本分析では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を使用しています。さらにオートサンブラー搭載の自動前処理機能を用いることで、誘導体化反応を自動で行う事が可能となり、安定かつ簡便に分析を行なえます。

タンパク質構成アミノ酸を中心に計21成分のアミノ酸を分析したクロマトグラムを図1に、分析条件の概略を表1に示します。詳細は前出のアプリケーションニュース01-00007A-JPをご参照ください。

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 (v:v) 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

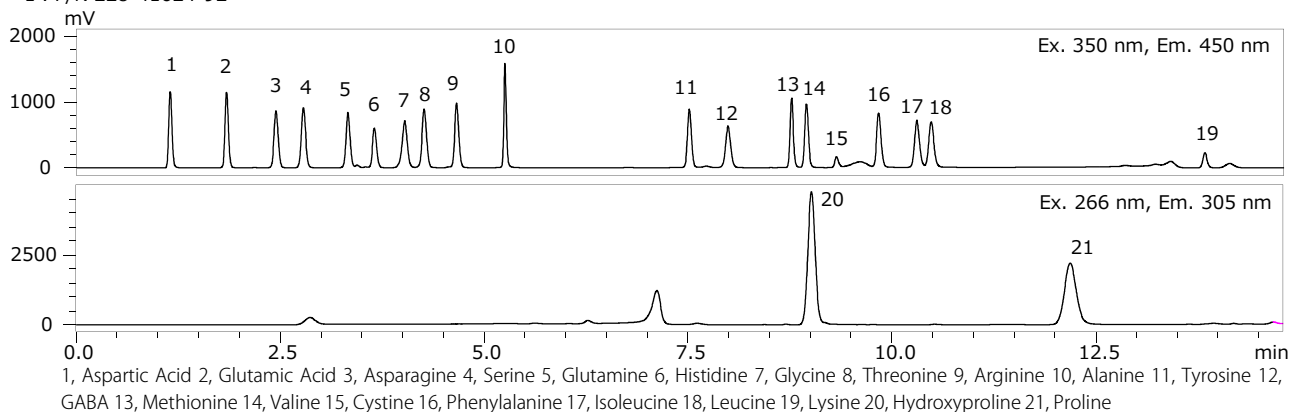


図1 アミノ酸21成分の一斉分析(各25 μmol/L) 上 : Ch1 (Ex. 350 nm, Em. 450 nm) 下 : Ch2 (Ex. 266 nm, Em. 305 nm)

表 1-2 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	95	5	0
18	95	5	0

■直線性と再現性

各アミノ酸について1-100 (μmol/L) の濃度範囲における直線性 (r², 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=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2に示します。

表 2 保持時間と面積再現性

	Retention Time	Area		Retention Time	Area
	(%RSD)	(%RSD)		(%RSD)	(%RSD)
Asp	0.46	0.55	GABA	0.07	0.73
Glu	0.14	0.57	Met	0.03	0.50
Asn	0.13	0.72	Val	0.04	0.52
Ser	0.11	0.53	Cys	0.03	0.84
Gln	0.08	0.72	Phe	0.03	0.50
His	0.07	2.49	Ile	0.04	0.44
Gly	0.08	0.75	Leu	0.05	0.43
Thr	0.08	0.68	Lys	0.03	3.85
Arg	0.10	3.07	Hy-Pro	0.03	3.13
Ala	0.05	0.77	Pro	0.04	5.09
Tyr	0.05	0.59			

■実試料の定量結果

アプリケーションニュースM310ではGCMS-TQ™ 8040 NX及びSmart Metabolites Database™を、C238ではLCMS-8060 NX及びLC/MS/MS メソッドパッケージ一次代謝物ver. 2を使用して、食品に含まれる成分を網羅的に分析した例を紹介しています。これらは、食品の差別化を行う上で特徴的な成分について探索することを目的としています。一方で、特徴的な成分が分かった後、その差異を定量値として算出するには、本稿で紹介する方法がより安定かつ簡便です。

それぞれのアプリケーションニュースと同じく、トマトジュース2種（使用トマトの品種記載あり/なし）、ワインとノンアルコールワインの定量を行った結果を表3、4及び図2、3に示します。トマトジュースは遠心分離後の上澄みを水で希釈、ワインとノンアルコールワインは水で希釈しました。

表3 トマトジュース2種の定量値 (mmol/L)

	使用品種の記載あり	使用品種の記載なし		使用品種の記載あり	使用品種の記載なし
Asp	11.06	11.74	GABA	12.93	9.97
Glu	17.77	16.66	Met	0.30	0.31
Asn	6.53	6.80	Val	0.64	0.56
Ser	2.55	2.04	Cys	-	-
Gln	0.06	0.13	Phe	1.80	1.90
His	0.95	0.90	Ile	0.71	0.61
Gly	0.89	0.85	Leu	0.75	0.67
Thr	1.97	1.80	Lys	0.90	0.77
Arg	0.83	0.68	Hy-Pro	-	-
Ala	7.01	6.91	Pro	0.73	0.47
Tyr	0.46	0.44			

表4 ワインとノンアルコールワインの定量値 (mmol/L)

	ワイン	ノンアルコールワイン		ワイン	ノンアルコールワイン
Asp	0.67	0.56	GABA	1.12	2.69
Glu	0.64	0.86	Met	0.15	0.12
Asn	0.25	0.22	Val	0.43	0.40
Ser	0.43	0.74	Cys	-	-
Gln	0.00	0.00	Phe	0.34	0.36
His	0.27	0.44	Ile	0.19	0.18
Gly	0.83	0.20	Leu	0.51	0.37
Thr	0.42	0.69	Lys	0.56	0.23
Arg	0.35	6.74	Hy-Pro	0.25	0.05
Ala	1.74	2.20	Pro	41.06	6.77
Tyr	0.18	0.22			

それぞれのアプリケーションニュースで特徴的とされた成分については、他の成分よりも定量値が大きく異なりました。

■まとめ

本稿では、HPLC-蛍光検出器による自動前処理機能を用いたプレカラムアミノ酸の分析方法がアミノ酸の定量に適している例をご紹介します。

本システムは保持時間、面積値ともに再現良く安定して使用していただくことができます。また、自動前処理機能によりアミノ酸の誘導体化を自動で行えるため、簡便に使用していただけます。これらの点から、他機種での網羅的な成分探索後に定量が必要な場合には、HPLC-蛍光検出器を用いて定量することをご提案します。

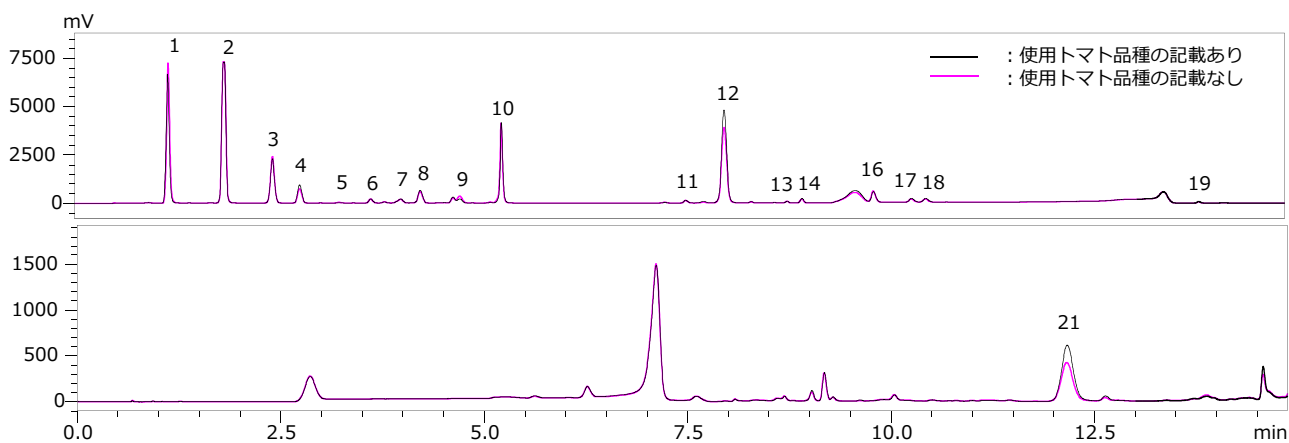


図2 トマトジュース2種のクロマトグラム
(上段：各100倍希釈試料のCh1での分析結果、下段：各100倍希釈試料のCh2での分析結果)

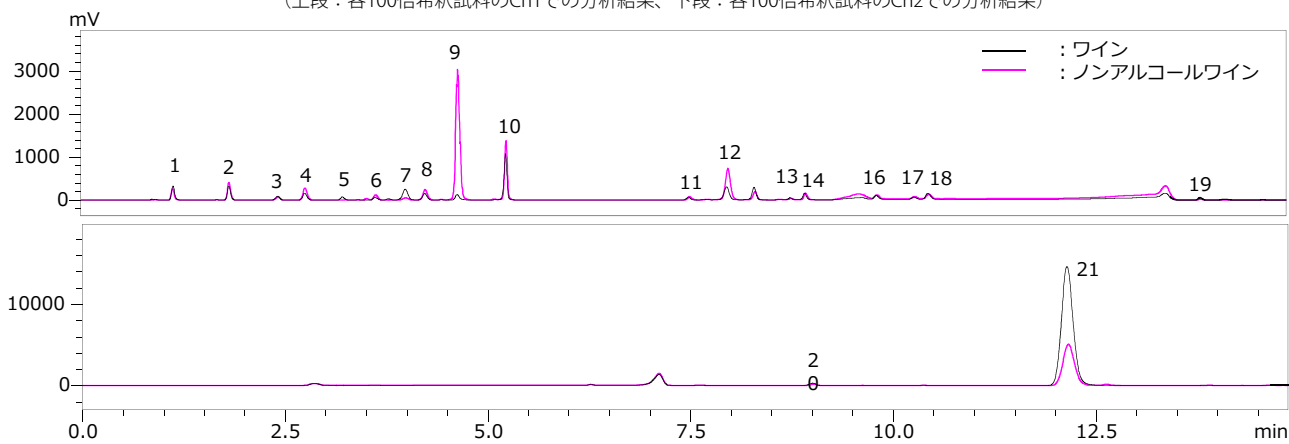


図3 ワインとノンアルコールワインのクロマトグラム
(上段：各100倍希釈試料のCh1での分析結果、下段：100倍及び200倍希釈試料のCh2での分析結果)

Nexera、Shim-pack、GCMS-TQおよびSmart Metabolites Database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

初版発行：2021年3月
01-00117A-JP A改訂版発行：2021年6月
島津コールセンター ☎ 0120-131691