

プレカラムアミノ酸分析における検出器の選択

アミノ酸は、一部の芳香族アミノ酸を除き短波長域（200 nm～210 nm）にしか紫外（UV）吸収がありません。一般的にHPLCによる分析時には誘導体化した後に検出する方法が以前より使われており、カラムの前で誘導体化を行うプレカラム誘導体化法とカラムの後ろで誘導体化を行うポストカラム誘導体化法があります。プレカラム誘導体化法ではHPLC逆相のカラムを使うことができ、高速化しやすいため、広く使われています。

また、誘導体化されたアミノ酸の検出方法は、主にUV検出と蛍光（RF）検出の二つです。蛍光検出は、蛍光物質から発せられる光エネルギーを直接検出する方法であるため、選択性が高く、高感度検出が期待できます。そのため、試料溶媒を標準液の溶媒に合わせやすい特長があります。

ここでは、プレカラムアミノ酸分析を行う際、UV検出器を用いた分析例、UV検出と蛍光検出の感度比較、および試料溶媒の影響についてご紹介します。L529Bでご紹介した、一体型HPLCシステムi-Series Plus（Prominence™-i）の共注入機能を用いて、自動的にプレカラム誘導体化を行いました。

Y. Zhou

■ 自動プレカラム誘導体化

Prominence-iには標準でオートサンプラーの自動前処理機能が搭載されており、共注入機能を使用して、アミノ酸の誘導体化反応を行いました。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誘導体化反応を行うことが可能です。図1にLabSolutions™上の設定内容を示します。表1に誘導体化試薬と移動相を示し、表2、表3に分析条件とタイムプログラムを示します。UV検出は蛍光検出の励起波長である350 nmと266 nmを使用しました。

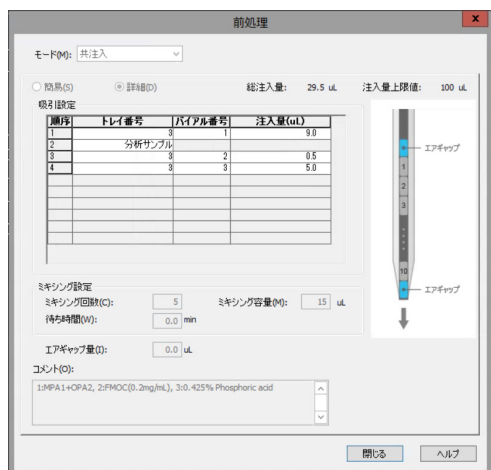


図1 Prominence-iの前処理（共注入）設定画面

表1 誘導体化試薬と移動相

● 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 of OPA Reagent.
● FMOC Reagent	Dissolve 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/L 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.

表2 分析条件

System	: Prominence-i
Column	: Shim-pack™ XR-ODS II (100 mm × 3.0 mm I.D., 2.2 µm)*1
Vial	: Shimadzu Vials, LC, Glass*2
Mobile phase	: See the table1
Flow rate	: 1.0 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 1 µL
Detection	: ① UV (Built-in) Ch1) 350 nm Ch2) 266 nm ② Fluorescence detector (RF-20Axs) Ch1) Ex. 350 nm, Em. 450 nm Ch2) Ex. 266 nm, Em. 305 nm

*1 : P/N 228-41624-92、*2 : P/N 227-34001-01

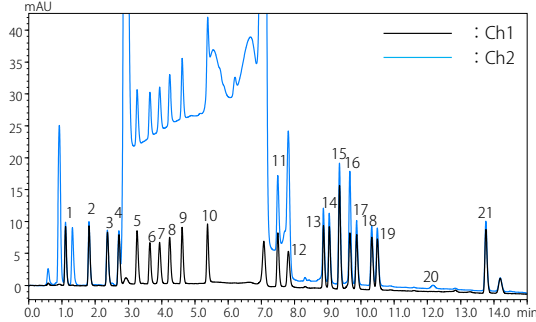
表3 タイムプログラム

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

■ UV 検出器を用いた分析例

タンパク質構成アミノ酸 20 成分と、機能性成分として γ -アミノ酪酸 (GABA) を加えた計 21 種類のアミノ酸混合標準液 (125 $\mu\text{mol/L}$) を UV 検出器で分析したクロマトグラムを図 2 に示します。

スポーツドリンクの UV 検出の分析例を図 3 に示します。このような目的成分の濃度の高い場合は、UV 検出器で十分検出できていることが分かります。



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

- 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, GABA 13, Methionine 14, Valine
15, Cystine 16, Tryptophan 17, Phenylalanine 18, Isoleucine
19, Leucine 20, Proline 21, Lysine

図 2 125 $\mu\text{mol/L}$ アミノ酸混合標準液のクロマトグラム (UV 検出)

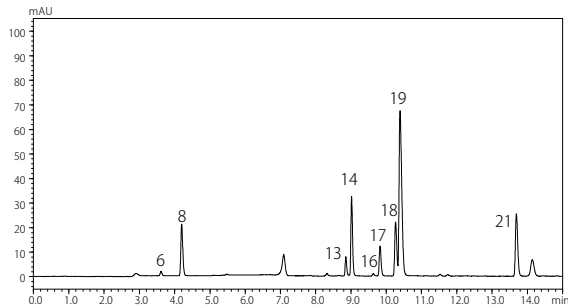


図 3 スポーツドリンクのクロマトグラム (UV 検出、Ch1)
(ピーク番号は図 2 を参照)

■ 蛍光検出器を用いた分析例

25 $\mu\text{mol/L}$ の 21 種類のアミノ酸混合標準液を蛍光検出器で分析した時のクロマトグラムを図 4 に示します。また、アミノ酸混合標準液の結果から、UV 検出の感度を 1 とした時の蛍光検出の感度を表 4 に示します。アミノ酸の種類にもよりますが、蛍光検出は UV 検出より感度がおおよそ 200 倍程度高いことが分かります。

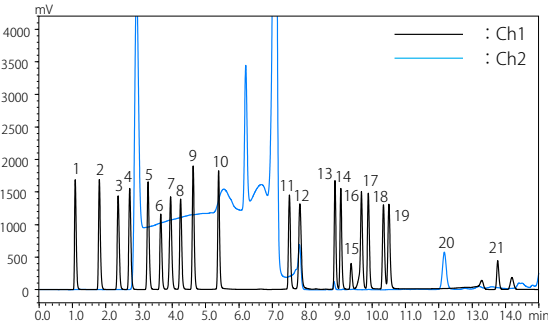


図 4 25 $\mu\text{mol/L}$ アミノ酸混合標準液のクロマトグラム (蛍光検出)
(ピーク番号は図 2 を参照)

表 4 蛍光検出の感度

化合物名	蛍光検出の感度	化合物名	蛍光検出の感度
Asp	225	Tyr	206
Glu	219	GABA	210
Asn	206	Met	199
Ser	222	Val	193
Gln	230	(Cys) ₂	28
His	199	Trp	200
Gly	236	Phe	208
Thr	219	Ile	189
Arg	240	Leu	201
Ala	226	Pro	35
		Lys	49

■ 試料溶媒の影響について

OPA によるアミノ酸の誘導体化は、反応溶液の pH によって反応効率が異なることが知られています。そのため、実試料の溶媒と標準液の溶媒 pH はできるだけ同等にすることが重要です。アミノ酸標準液の溶媒は 100 mmol/L の塩酸水溶液であることが多いです。

図 5 に異なる濃度の塩酸水溶液で 1000 倍希釈したトマトジュースの分析結果を示します。この図は 10 mmol/L 塩酸水溶液で希釈した試料中の各アミノ酸の面積値を 100% とした場合の、100 mmol/L 塩酸水溶液で希釈して得られた結果の相対値を示しています。同じ試料でも、試料溶媒の違いにより反応効率に差が生じた結果、アミノ酸の面積値が異なることが分かります。

高感度な蛍光検出器は実試料を十分に希釈することが可能なため、最終的な溶媒 pH を標準液と同等にすることが容易です。一方で、UV 検出器は感度の問題で実試料を希釈できない場合があるため、標準液と同じ pH にすることが難しい場合もあります。そのため、実試料の溶媒組成が標準液と大きく異なる場合は、標準液の溶媒に合わせやすい蛍光検出が有用と考えます。

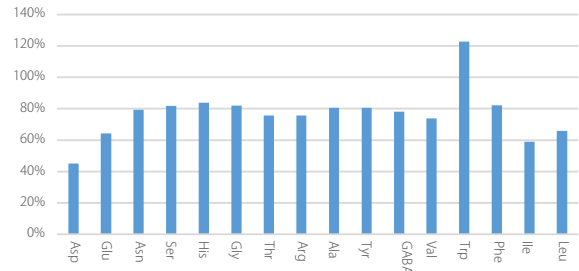


図 5 100 mmol/L 塩酸水溶液で希釈したトマトジュース中アミノ酸の相対面積値
(10 mmol/L 塩酸水溶液で希釈した際のアミノ酸の面積値を 100% とした)

■ まとめ

本稿では、はじめに UV 検出器を用いてプレカラムアミノ酸分析の例を示しました。目的成分の濃度が高い場合は、UV 検出器でも感度良く分析できることが分かります。

次に、UV 検出と蛍光検出の感度を比較しました。今回検討した 21 種類のアミノ酸では、蛍光検出は UV 検出よりも 200 倍程度感度が高いことが分かりました。高感度分析が必要な場合は蛍光検出器が望ましいです。

また、プレカラムアミノ酸分析では、試料溶媒と標準液の溶媒 pH を可能な限り同等にすることが重要です。蛍光検出は高感度であることから、実試料の溶媒は標準液の溶媒に合わせて希釈することが容易で、特に実試料の溶媒組成が標準液と大きく異なる場合は、蛍光検出が有用です。

i-Series Plus は標準で UV もしくは PDA 検出器を内蔵しており、そのままプレカラムアミノ酸分析を行うことが可能です。高感度分析が必要な場合は、蛍光検出器を増設し、対応が可能です。

Prominence、LabSolutions、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

初版発行：2020 年 9 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。