



Agilent 1260 Infinity II LC と Poroshell HPH-C18 カラムを用いた自動プレカラム誘導体化法によるアミノ酸分析



＜要旨＞

アミノ酸分析は食品分析において重要な分析で、様々な分析法が利用されています。その中でもプレカラム誘導体化 - 逆相分離による分析法はシステム構成が単純で取扱いやすく、一般的なHPLCで分析が可能です。分離にはコアシェル形充填剤で、高いpHでの耐久性が高く、高効率カラムであるPoroshell HPH-C18 カラムを用いて、従来のプレカラム誘導体化アミノ酸分析メソッドをAgilent 1260 Infinity II シリーズ用に改良しました。

今回の全自動プレカラム誘導体化法は、検量線の直線性や再現性が良好であり、耐久性も向上し、食品試料への適用も可能となりました。

Key Words : HPLC、プレカラム誘導体化、アミノ酸、コアシェル、OPA、FMOC

1. はじめに

プレカラム誘導体化でのアミノ酸分析では、誘導体化試薬に OPA (O-フタルアルデヒド) と FMOC (9-フルオレニルメチルクロロギ酸) を用いることで、手作業での誘導体化のような煩雑さが無く、迅速な分析が可能となります。1 級アミノ酸はまず OPA で誘導体化されます。2 級アミノ酸は OPA とは反応しないため、OPA の後に加えられる FMOC で誘導体化されます。また、OPA 誘導体化物の疎水性は FMOC 誘導体化物より小さくなるため、FMOC 誘導体化物の前に溶出します。過剰な FMOC やその分解物は 2 級アミノ酸の後に溶出します。

アジレントのオートサンプリングには「インジェクタプログラム」と呼ばれるプログラム機能が搭載されており、本機能を利用することでニードルループ内での誘導体化反応が可能となり、誘導体化を自動化することが可能となります。ここでは、インジェクタプログラムを利用した全自動プレカラム誘導体化によるアミノ酸分析について紹介します。分離カラムは、移動相の高い pH で耐久性のある、コアシェル形カラムの Agilent Poroshell HPH-C18 カラムを用いました。また、サブ 2 ミクロンのカラムに匹敵する分離効率を得ることが可能です。

2. 実験条件

アミノ酸 (20 成分) の標準品は、0.1 mol/L の HCl にて適宜希釈し調製しました。また、食品試料への適用例として、市販の日本酒を 10 倍希釈後、フィルター濾過したものについて測定を行いました。

Table 1: 分析条件

機器	Agilent 1260 Infinity II LC System G1312B Binary pump G7129A Vialsampler G7130A Integrated Column Compartment G4212B Diode array detector (10 mm cell)
カラム	Poroshell HPH-C18 (3.0 × 100 mm, 2.7 μm) 製品番号: 695975-502
移動相 A	20 mM Na ₂ HPO ₄ (pH8.2)
移動相 B	ACN/MeOH/H ₂ O = 45/45/10
注入	「Table 2: インジェクタプログラム」参照
温度	40°C
流速	0.65 mL/min
DAD A	338/10 nm, reference 390/20 nm
DAD B	262/16 nm, reference 324/8 nm
ポストタイム	5 min



Agilent Technologies

Table 1(続き): グラジエント設定

Time / min	0	0.35	13.4	13.5	15.7	15.8
B %	4	4	57	100	100	4

Table 2: インジェクタプログラム

操作	詳細
洗浄	ウォッシュポートで 3 秒
吸引	ほう酸緩衝液 (pH 10.4) から 2.5 μ L
吸引	サンプルから 1.0 μ L
混合	3.5 μ L の移動で 5 回混合
待機	0.2 min
吸引	OPA 試薬から 0.5 μ L
混合	4.0 μ L の移動で 10 回混合
吸引	FMOC 試薬から 0.4 μ L
混合	4.4 μ L の移動で 10 回混合
吸引	希釈液から 16.0 μ L
混合	40 μ L の移動で 8 回混合
注入	注入

ほう酸緩衝液: 製品番号 :5061-3339

OPA 試薬: 製品番号 :5061-3335

FMOC 試薬: 製品番号 :5061-3337

希釈液: 移動相 A 10 mL にリン酸を 100 μ L 添加

3. 結果

アミノ酸標準溶液および日本酒のクロマトグラムを Fig. 2, 3 に示しました。いずれも各アミノ酸を良好に分離、検出することができました。

また、50 ~ 1000 pmol/ μ L の範囲で検量線を作成したところ、いずれの成分も良好な直線性(相関係数: 0.997 ~ 0.999)を示しました。

さらに標準品 90 pmol/ μ L における各成分の繰り返し再現性を n=6 で確認したところ、保持時間では RSD < 1%、面積値では RSD < 5%という良好な再現性を確認することができました。

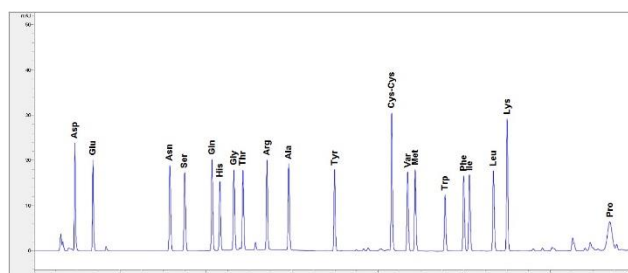
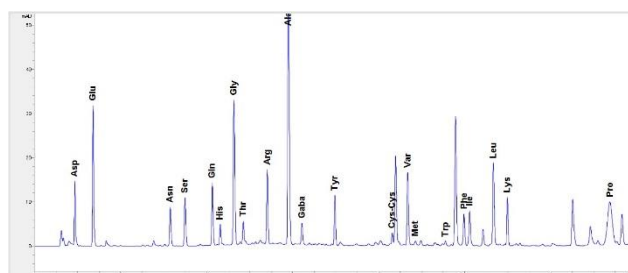
Fig. 2 アミノ酸標準品 (90 pmol/ μ L) のクロマトグラム

Fig. 3: 日本酒 (10 倍希釈) のクロマトグラム

4. まとめ

前処理にインジェクタプログラムを用いることにより、手作業での誘導体化に比べ大幅な時間短縮ができ、手作業の煩雑さが無くなりました。また汎用カラムに比べ、高い pH でのカラム寿命と分離効率が向上した、コアシェル形カラムの Agilent Poroshell HPH-C18 を使用することにより、高再現性と高分離が可能になりました。また、インジェクタプログラムを用いた全自動プレカラム誘導体化法による検量線の直線性や、繰り返し再現性は、結果に示したとおり良好であり、食品試料への適用も可能となりました。

【LC-201611MI-001】

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる障害について一切免責とさせていただきます。
また、本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1
www.agilent.com/chem/jp



Agilent Technologies