

Agilent 1290 Infinity II LC システムを用いた全自動プレカラム誘導体法によるアミノ酸のキラル分離分析



Author

熊谷 浩樹

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

アミノ酸を発蛍光性のジアステレオマーに誘導することで、D体とL体を分離しました。蛍光性のジアステレオマーへの誘導体化は、オートサンブラのインジェクタプログラム機能を使うことで全自動化することができ、コアシェル充填剤の使用により良好な分離が得られました。この手法を食品中のアミノ酸の光学分割に適用し、アミノ酸のキラル分離を簡便かつ高感度に行えることがわかりました。

Key words : アミノ酸、キラル分離、プレカラム誘導体化、食品

システム

Agilent 1290 Infinity II システム

1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)

1290 Infinity II マルチサンプラ 40 μ L ループ、サンプルクーラー付 (G7167B Opt #100、150)

1290Infinity II カラムコンパートメント (G7116B)

1260Infinity II 蛍光検出器 (G7121B)

分析条件

カラム：Poroshell HPH-C18, 3.0 x 150 mm, 2.7 μ m (P/N; 693975-502)

移動相：A; 50mM 酢酸ナトリウム (pH 6)

B; アセトニトリル/メタノール/水 = 5/5/1

流速：0.7 mL/min

グラジエント：4% B (0 min) \rightarrow 4%B (2 min) \rightarrow 10%B (4 min) \rightarrow 20%B (15 min) \rightarrow 35%B (27 min) \rightarrow 50%B (35 min) \rightarrow 100%B (37 min)

カラム温度：30 $^{\circ}$ C

検出：FLD, Ex.; 230 nm、Em:460 nm

サンプル注入：インジェクタプログラム (表 1 参照)

ニードル洗浄液：水/アセトニトリル=1/1

表1 インジェクタプログラム

1	ニードルをウォッシュポートで洗浄
2	ホウ酸緩衝液 (pH 10) を 2.5 μ L 吸引
3	サンプルを 0.5 μ L 吸引
4	ニードルをウォッシュポートで洗浄
5	混合 (3.0 μ L x10 回)
6	0.5 分待機
7	誘導体化試薬を 0.25 μ L 吸引
8	混合 (3.25 μ L x 20 回)
9	0.5 分待機
10	0.1%酢酸を 15.0 μ L 吸引
11	混合 (20.0 μ L x 10 回)
12	0.1 分待機
13	注入
14	0.5 分待機
15	インジェクタバルブをバイパス

誘導体化

N-isobutyryl-L-cysteine は Merck から、OPA は富士フィルム和光純薬から購入しました。ホウ酸緩衝液 (pH10)はアジレント・テクノロジー製を用いました (P/N; 5061-3339)。誘導体化試薬：260 mM N-isobutyryl-L-cysteine + 170 mM OPA / ホウ酸緩衝液。

誘導体化の反応式を図 1 に示します。

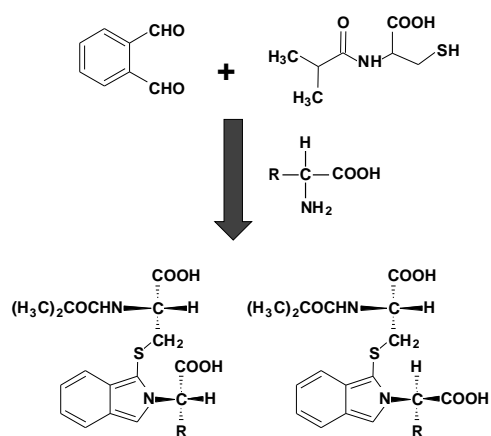


図 1 N-isobutyryl-L-cysteine と OPA による 1 級アミノ酸の誘導体化 (ジアステレオマー形成と蛍光誘導体化)

標準溶液

5 nmol/ μ L 溶液は Glu と Ile を除いてラセミ体から調製しました。Asn、Gln、Trp は水溶液として、それ以外のアミノ酸は 0.1 mol/L 塩酸溶液として調製しました。混合溶液は 5 nmol/ μ L 溶液を水で希釈して調製しました。

サンプル調製

食酢は精製水で 100 倍希釈し 0.22 μ m のメンブレンフィルターでろ過し、サンプルとしました。

結果

10 pmol/ μ L 標準溶液と食酢のクロマトグラムを、それぞれ図 2-4 に示します。

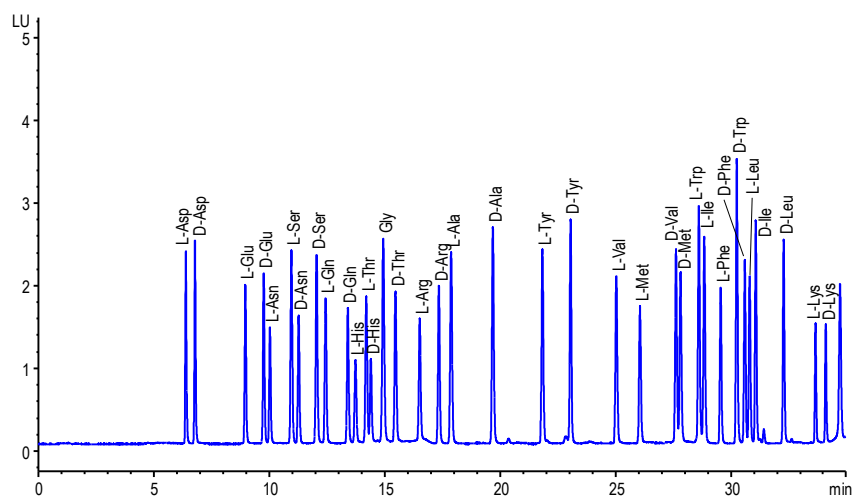


図1 標準溶液 (10 pmol/μL) のクロマトグラム

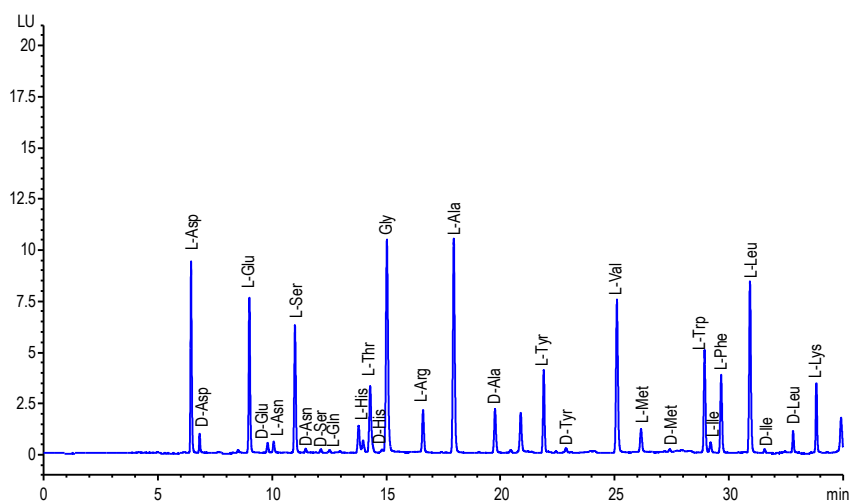


図2 黒酢 (100倍希釈) のクロマトグラム

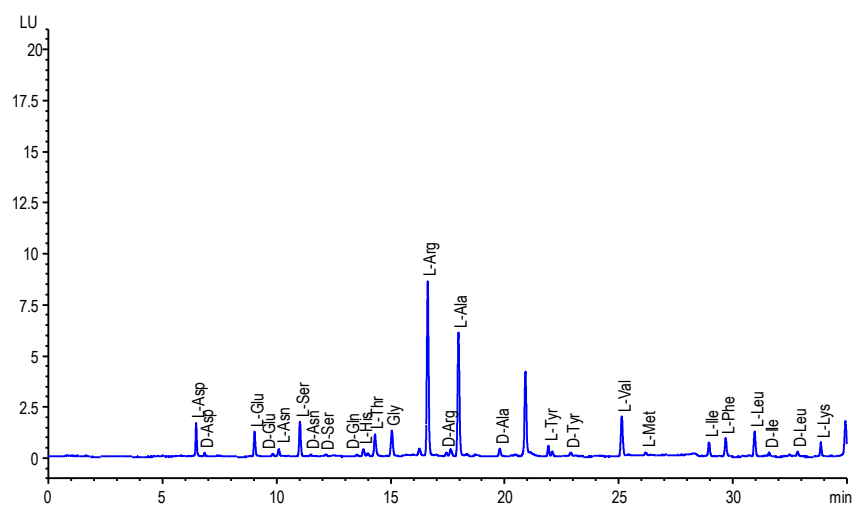


図3 バルサミコ酢 (100倍希釈) のクロマトグラム

まとめ

1290 Infinity II LCシステムを用いて、アミノ酸を蛍光検出可能なジアステレオマーに誘導体化しアミノ酸のキラル分離を行いました。

インジェクタプログラムの利用によって、ジアステレオマー形成と蛍光誘導体化を同時に全自動で簡便に精度良く行うことができました。また、コアシェル型充填剤のPoroshell HPHカラムの採用により、多数のピークを短時間で良好に分離することができました。

参考

- Y. Inoue, Y. Okabe, R. Suzuki, T. Onaka, T. Kida, *Trace Nutrients Research*, **31**, 5 (2013).
- Ilisz, A. Aranyi, Z. Pataj, A. Péter,, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **69**, 28 (2012).
- H. Brickner , M. Langer, M. Lfipke, T. Westhauser, H. Godel, *J. Chromatogra. A*, **697**, 229 (1995).
- Automated Precolumn Derivatization for the Enantioseparation of Amino Acids Using the Agilent 1290 Infinity II LC, *Agilent Technologies Application Note*, **5991-8329EN** (2017).

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2020

Printed in Japan, March 2020

DE44221.9793055556

LC-202003KG-002 (旧 LC-201707KG-001)