

30E02-pm01

シリカモノリスカラムを用いたアミノ酸の高速分析

○角田 誠¹, 宋 彦廷¹, 多賀 淳², 船津 高志¹(¹東大院薬,²近畿大薬)

【目的】アミノ酸はタンパク質構成成分として生体内で重要な役割を果たしており、その分析は生化学研究、臨床診断、食品科学などの多くの分野において行われている。アミノ酸自体は弱いUV吸収しか持たないものが多いため、一般的に誘導体化が行われる。我々は、これまでにNBD-F(4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole)を蛍光誘導体化試薬として用いたアミノ酸の分析法を開発してきた。NBD-Fは、試薬自身が蛍光を發さず、励起・蛍光波長がそれぞれ470nm, 530nmと長波長であるため他の共存物質の妨害を受けにくく、また、反応生成物が安定であるという利点を有している。しかしながら、アミノ酸の分離に80分の時間を要していた。そこで、本研究においては、高速分離に適しているシリカモノリスカラムを用いて、アミノ酸の高速分析を試みた。

【方法】蛍光誘導体化は、アミノ酸溶液にホウ酸緩衝液(pH 8.5)を加え、60度において5分間NBD-Fと反応させることで行った。分離カラムには、Monoclad C18-HS(GLサイエンス, 3.0 mm I.D. × 250 mm)を用いた。検出は、励起波長470 nm、蛍光波長530 nmにて行った。

【結果】はじめに、流速0.4 ml/minにて19種アミノ酸の分離を検討したところ、2種の溶離液を用いたグラジエント溶離にて従来法と同様の分離が得られた。そこで、流速を上げて検討したところ、流速1.4 ml/minにおいてもカラム背圧23 MPa程度で、良好な分離が得られた。このときの分析時間は18分であり、従来法の約5分の1となった。検出限界は、14 - 180 fmolであり、従来法と変わらない感度を得ることができた。さらに、マウス血漿サンプル及び食品中アミノ酸の定量に成功した。シリカモノリスカラムを用いた本分析法は、汎用のHPLC装置でアミノ酸の高速分析を実現できることから、有用である。