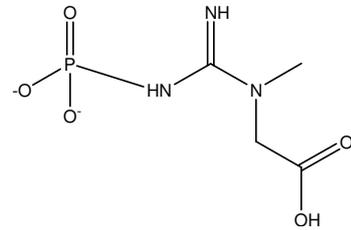




クレアチンリン酸の定量法

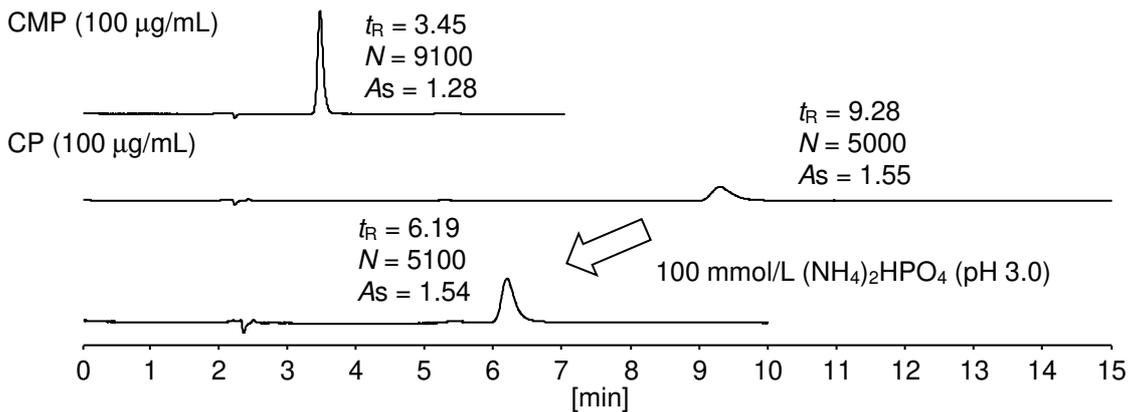
Keywords : クレアチンリン酸、定量法、魚の鮮度、マダイ、CAPCELL PAK NH<sub>2</sub> UG80、イオン交換

魚の鮮度測定には、魚の筋中に存在するATP関連物質またはATPの再合成源であるクレアチンリン酸(CP)の定量が使用されます。ATP関連物質の分析は、移動相として緩衝液(例えばリン酸緩衝液)を、カラムとして水系100%移動相条件下で安定して使用可能な C<sub>18</sub> (ODS)カラムを使用する方法が一般的です。今回、マダイ中のクレアチンリン酸の定量法を確立するにあたり、逆相分配及びイオン交換モードのカラムを用いて検討した結果、アニオン交換カラムであるCAPCELL PAK NH<sub>2</sub> UG80 を使用することで適度な保持及び良好なピーク形状が得られました。さらに実試料に応用したところ、夾雑成分を適切に分離した上で、クレアチンリン酸の定量が可能でしたので報告します。



クレアチンリン酸

まず、類似した構造をもつモノヌクレオチドの分析例 ([hlcga005.pdf](http://hlcga005.pdf) ([osaka-soda.co.jp](http://osaka-soda.co.jp))) で使用した条件を元に検討を始めました。得られたクロマトグラムを以下に示します。

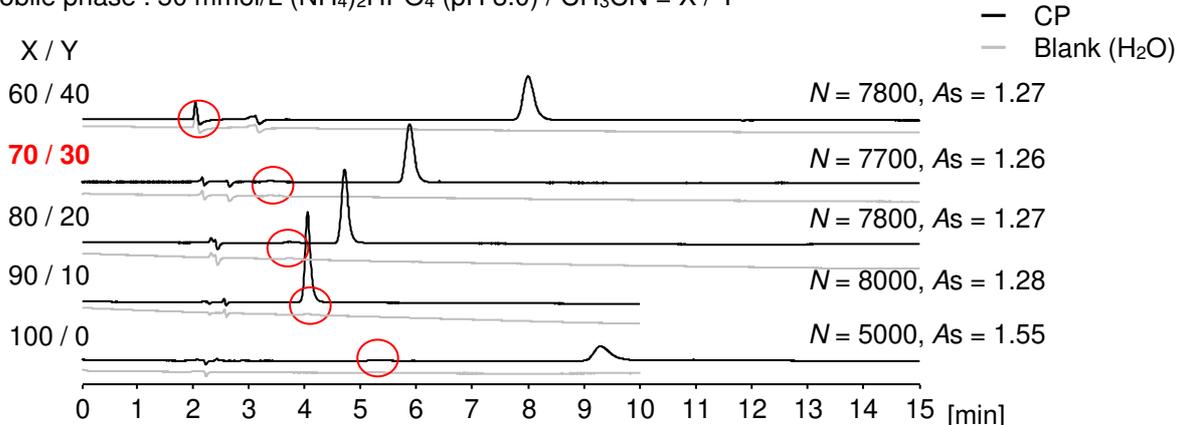


【HPLC Conditions】

Column : CAPCELL PAK NH<sub>2</sub> UG80 S5 ; 4.6 mm i.d. x 150 mm  
 Mobile phase : 50 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (adjusted at pH 3.0 with phosphoric acid)  
 Flow rate : 1 mL/min  
 Temperature : 40 °C  
 Detection : UV 210 nm  
 Inj. vol. : 5 µL

シチジナーリン酸(CMP) と比べて CP は保持時間が長く、ピークのテーリングが確認されました。そこで、ピーク形状の改善検討を行いました。塩濃度を増加してもほとんど変化はありませんでしたが、有機溶媒を追加することでピーク形状は大幅に改善されました。さらに、ブランク(水)由来の不純物(赤丸)を分離するために移動相の水系溶媒及び有機溶媒比率を 70 / 30 としました。

Mobile phase : 50 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 3.0) / CH<sub>3</sub>CN = X / Y



カラム長を 150 mm から 250 mm に変更し、濃度範囲 10~500  $\mu\text{g/mL}$  における 6 点検量線を求めたところ、決定係数  $R_2 = 0.9999$  の良好な直線性が得られました。続いてマダイ抽出液に含まれるクレアチンリン酸を定量したところ、抽出直後は 392.6  $\mu\text{g/mL}$  であったのに対して 24 時間後は 27.2  $\mu\text{g/mL}$  まで減少していたことが確認できました。有機溶媒をメタノールに変更する場合は、水系溶媒と有機溶媒の比率を 60 / 40 とすることで同様の定量結果が得られます。

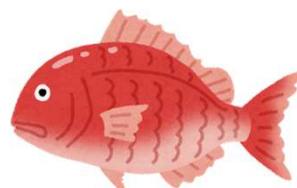
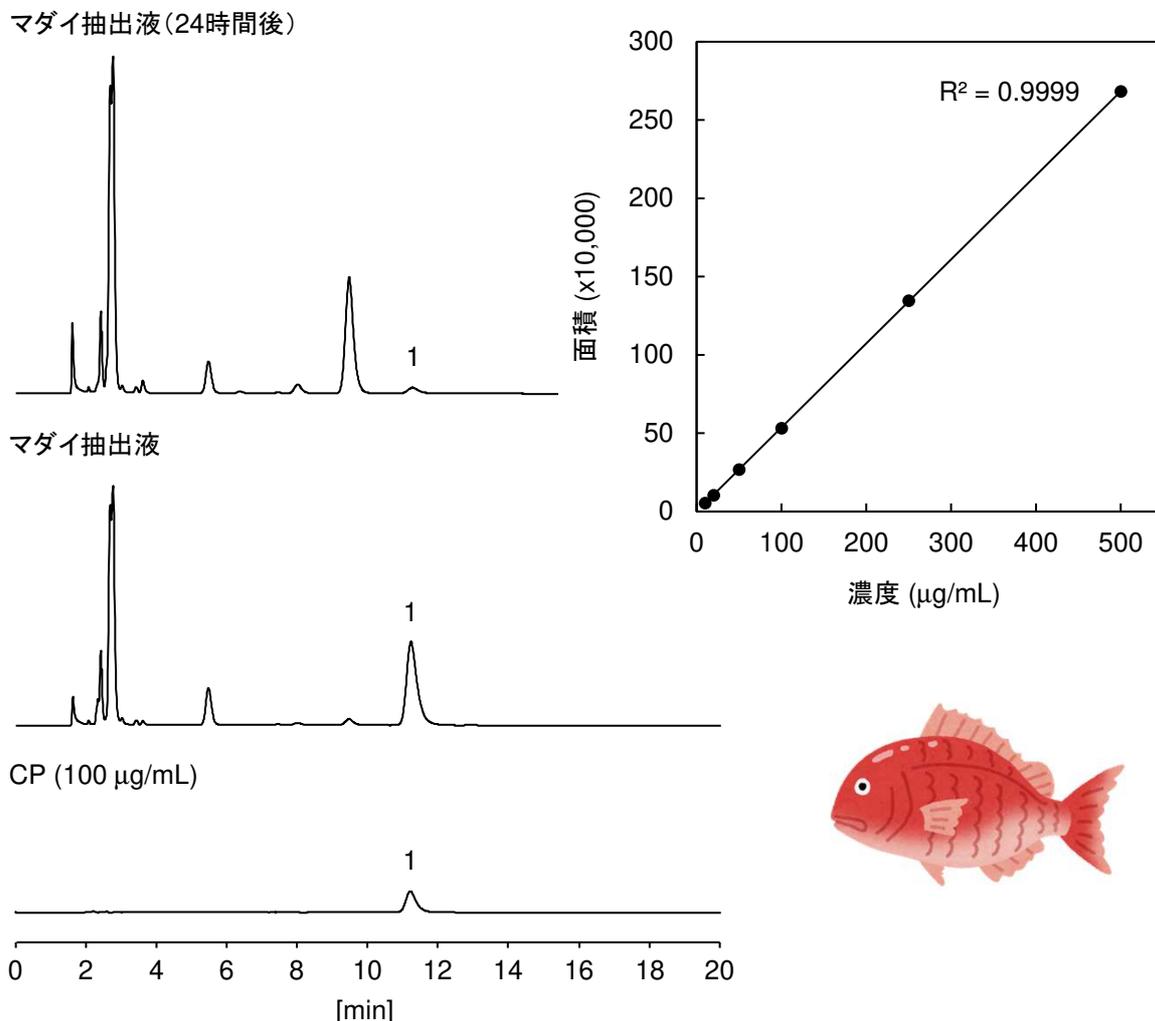


図 実試料を注入することで得られたクロマトグラム及び検量線

**【HPLC Conditions】**

Column : CAPCELL PAK  $\text{NH}_2$  UG80 S5 ; 4.6 mm i.d. x 250 mm  
 Mobile phase : 50 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (adjusted at pH 3.0 with phosphoric acid) /  $\text{CH}_3\text{CN} = 70 / 30$   
 Flow rate : 1 mL/min  
 Temperature : 40 °C  
 Detection : UV 210 nm  
 Inj. vol. : 10  $\mu\text{L}$   
 Sample : 1. Creatine phosphate

このように酸性条件下において弱アニオン交換作用が働く CAPCELL PAK  $\text{NH}_2$  UG80 は、逆相モードで分析が困難なイオン性化合物に対して有用なカラムであると考えられます。



株式会社大阪ソーダ  
 ヘルスケア事業部営業部  
 〒550-0011 大阪市西区阿波座一丁目12番18号  
 TEL: 06-6110-1598 FAX: 06-6110-1612  
 E-mail: [silica@osaka-soda.co.jp](mailto:silica@osaka-soda.co.jp)  
 HP: <https://sub.osaka-soda.co.jp/HPLC/>



アプリケーションの検索はこちら。

<https://sub.osaka-soda.co.jp/HPLC/sys/app/>