

Agilent 1260 Infinity II Prime LC システムによる 高速・高感度アミノ酸分析

—蛍光検出器による細胞培地中のアミノ酸分析—



Ready to use
reagents and
standards



1260 Infinity II LC
Everyday efficiency with
confidence



InfinityLab Poroshell
120 HPH-C18
Fast and rugged
amino acids separation



Application Support
including on-site training
and application set up

Authors

武部 静香
田中 誠也
内藤 厚子
林 慶子

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

アミノ酸分析は、バイオ医薬品業界にて、タンパク質の特性解析と細胞培地試験液のモニタリングのための重要なアプリケーションです。また、食品業界でも、栄養成分の分析、発酵プロセスモニタリング、および食品の原材料の同定に広く使用されています。本報では、最新のLC 機器技術の利点と実績あるプレカラム誘導体化法を組み合わせたソリューションを紹介します。

Key words: HPLC、プレカラム誘導体化、アミノ酸、蛍光検出器

システム

Agilent 1260 Infinity II HPLC システム
 1260 Infinity II Prime LC フレキシブルポンプ (G7104C)
 1260 Infinity II バイアルサンプラ (G7129C)
 1260 Infinity II 内蔵カラムコンパートメント (G7130A)
 1260 Infinity II 蛍光検出器 (FLD) (G7121B)

分析条件

カラム AdvanceBio AAA (3.0 x 100 mm 2.7 μm)
 (P/N 695975-322)
 移動相 A 20 mM Na₂HPO₄ (pH 8.2)
 B MeOH: ACN: H₂O= 45: 45: 10
 Table 1 グラジエント設定参照
 流速 0.65 mL/min
 カラム温度 40 °C
 測定波長 0.0 min Ex 230 nm Em 450 nm PMT 9
 11.1 min Ex 266 nm Em 305 nm PMT 7
 注入 Table 2 インジェクタプログラム設定参照

Table 1 グラジエント設定

min	0.00	0.35	13.40	13.50	15.70	15.80	18.00
B%	4	4	57	100	100	4	4

Table 2 インジェクタプログラム設定

操作	詳細
吸引	ホウ酸緩衝液 (pH 10.4) 2.5 μL
洗浄	フラッシュポート 10 sec
吸引	サンプル 1.0 μL
洗浄	フラッシュポート 10 sec
混合	3.5 μL エアー 5 回
待機	0.2 min
吸引	OPA 試薬 0.5 μL
洗浄	フラッシュポート 10 sec
混合	4.0 μL エアー 10 回
吸引	FMOC 試薬 0.4 μL
洗浄	フラッシュポート 10 sec
混合	4.4 μL エアー 10 回
吸引	希釈溶媒* 16.0 μL
洗浄	フラッシュポート 10 sec
混合	40 μL エアー 8 回
注入	注入

*希釈溶媒 (移動相A 10 mL にリン酸100 μL を添加)

アミノ酸反応試薬

ホウ酸緩衝液 P/N 5061-3339
 OPA 試薬 P/N 5061-3335
 FMOC 試薬 P/N 5061-3337

アミノ酸試料

アミノ酸標準試料

アミノ酸17種混合標準液 (Asp、Glp、Ser、His、Gly、The、Arg、Ala、Tyr、Cys、Val、Met、Phe、Ile、Leu、Lys、Pro) に、アミノ酸標準試料 (Asn、Gln、Trp) を添加し、50% ACN+ 0.02 mol/L 塩酸にて適宜希釈しました。

アミノ酸試料

バイオ医薬品への適用例として、ダルベッコ変性イーグル培地 (DMEM 培地) を同様に適宜希釈しました。

結果

アミノ酸混合標準品のクロマトグラムをFig. 1 に示しました。各アミノ酸を良好に分離、検出することができました。各成分の検量線の直線性範囲と決定係数をTable 3 に示しました。それぞれ決定係数> 0.998 の良好な直線性を示しました。

また、DMEM 培地中アミノ酸のクロマトグラムをFig. 2 に示しました。各成分の既知含有量、定量値、面積値繰り返し再現性、添加回収率をTable 4 に示しました。各成分の定量値は良好な結果が得られました。面積値繰り返し再現性をn=6 で確認したところ、RSD< 0.87% でした。各成分の回収率 (Area spike/ (Area STD+ Area sample) x 100) は92- 108% 以内でした。

Table 3 アミノ酸混合標準品の直線性範囲と決定係数

化合物	直線性範囲 (μmol/L)	決定係数
Gly	0.20 - 200	1.000
Ala	0.10 - 100	0.999
Ser	0.20 - 200	0.999
Pro	0.50 - 200	1.000
Val	0.05 - 200	0.999
Thr	0.10 - 200	1.000
Ile	0.05 - 100	0.999
Leu	0.05 - 100	0.999
Asn	0.10 - 200	0.999
Asp	0.05 - 500	0.998
Gln	0.10 - 200	1.000
Lys	2.00 - 500	1.000
Glu	0.10 - 500	0.999
Met	5.00 - 100	0.999
His	0.05 - 200	0.999
Phe	0.05 - 100	0.999
Arg	0.05 - 100	0.999
Tyr	0.05 - 100	0.999
Trp	0.05 - 100	1.000
(Cys) ₂	0.50 - 500	1.000

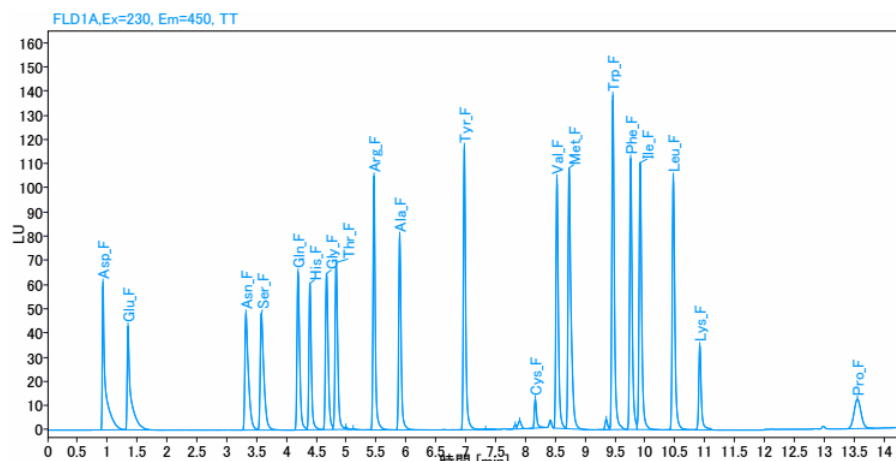


Fig. 1 アミノ酸混合標準品 (50 μmol/L) クロマトグラム

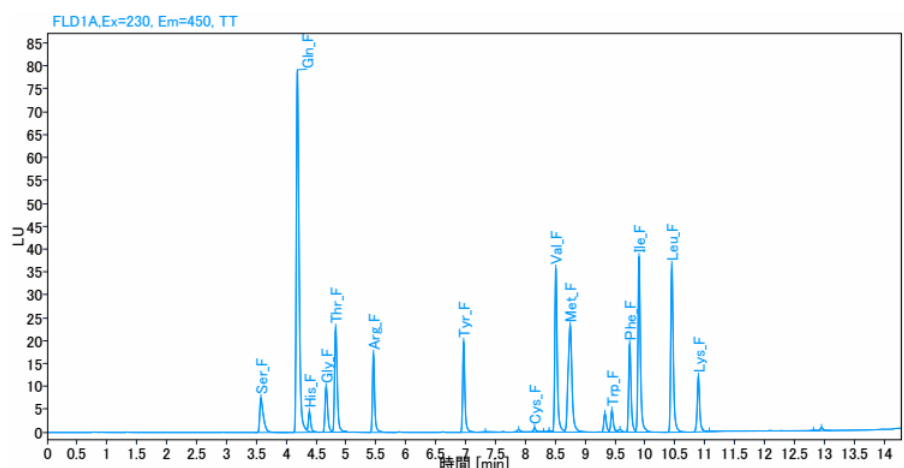


Fig. 2 DMEM 培地中アミノ酸 (50倍希釈) クロマトグラム

Table 4 DMEM 培地中アミノ酸の測定結果

化合物	含有量 (μmol/L)	希釈 倍率	定量値 (μmol/L)	面積値 RSD(%)	回収率 (%)
Gly	399.6	x50	406.5	0.65	106
Ser	399.7	x50	401.2	0.53	106
Val	802.4	x50	890.4	0.52	108
Thr	797.5	x50	849.0	0.55	108
Leu	800.5	x50	877.2	0.56	106
Ile	800.5	x50	843.9	0.55	104
Gln	3995.9	x50	3240.5	0.53	108
Lys	799.3	x50	771.6	0.41	98
Met	201.1	X10	211.9	0.76	109
His	200.4	x50	212.5	0.44	101
Phe	399.5	x50	423.2	0.55	105
Arg	398.7	x50	418.1	0.60	108
Tyr	398.2	x50	425.4	0.58	92
Trp	78.3	x10	77.5	0.87	107
(Cys) ₂	199.9	x10	192.2	0.82	106

まとめ

Agilent Poroshell HPH-C18 カラムと、Agilent 1260 Infinity II Prime LC システムによる全自動プレカラム誘導体化法を利用することで、必須アミノ酸20種の一斉分析が可能となりました。

また、DMEM 培地中のアミノ酸の定量値、面積値繰り返し再現性、添加回収率を確認したところ、良好な結果が得られました。

Agilent 1260 Infinity II オートサンプラによるインジェクタプログラムを使用することで、煩雑な誘導体化作業の自動化が実現し、さらにAgilent 1260 Infinity II 蛍光検出器と組み合わせることで、高感度な定量分析に応用可能となりました。

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いません。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. 2018

Printed in Japan, December 11, 2018

LC-201812TB-001