



Agilent 6420トリプル四重極 LC/MS を用いた 非誘導体化アミノ酸一斉分析法



<要旨>

質量分析計を用いて、煩雑な誘導体化処理をせずに直接アミノ酸を測定する手法を検討しました。装置は Agilent 6420 トリプル四重極 LC/MS を使用し、30 分以内に全 21 種類のアミノ酸の一斉分析が可能となりました。各化合物の分離も良好であり、さらに面積値再現性も概ね 3%以内、全成分 10%以内となりました。

Key Words: アミノ酸、LC/MS/MS、一斉分析、MRM

1. はじめに

アミノ酸は非常に極性が高く、かつ特異的な吸収波長をもたないという特徴があります。これまでのアミノ酸分析では、アミノ基を選択的に修飾することで逆相条件での分析を可能にし、蛍光や紫外吸収を測定する方法、いわゆる誘導体化 HPLC 分析が行われてきました。しかし誘導体化処理は煩雑であり、前処理による測定誤差にもつながります。本報では、誘導体化処理を実施せずに、質量分析計を用いて、アミノ酸を直接測定する方法をご紹介します。装置は Agilent 6420 トリプル四重極 LC/MS を使用しました。

2. 装置及び測定条件

装置および LC/MS/MS の測定条件を表 1 に記載しました。この条件により、アミノ酸を保持し分離することが可能です。各標準品と実試料は 0.02 N 塩酸を用いて調製しました。

検出にはトリプル四重極 LC/MS の利点である高感度・高選択性を持つ MRM モードを用いました。MRM トランジションと各 MS パラメータを表 2 に記載しました。各 MS パラメータはアミノ酸の標準液をもとに、最適化した数値を使用しています。

表1 LC/MS/MS分析条件

LC			
装置	: Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプシステム ポンプに 200 μ L ミキサー使用 (5067-1565)		
カラム	: Scherzo SS-C18 (Imtakt, 2.0 x 150 mm, 3 μ m)		
移動相 A	: 10 mM 酢酸アンモニウムおよび 0.1%ギ酸含有水溶液		
移動相 B	: 100 mM 酢酸アンモニウム含有 水/メタノール(20/80, v/v)		
注入量	: 2 μ L		
流速	: 0.25 mL/min		
カラム温度	: 40 $^{\circ}$ C		
平衡化時間	: 8 min		
グラジエント	: 右図		
	Time(min)	%A	%B
	0	100	0
	2.5	100	00
	12	65	35
	15	5	95
	20	5	95
MS			
装置	: Agilent 6420 トリプル四重極 LC/MS システム		
イオン化	: ESI (ポジティブ)		
ドライガス設定	: 350 $^{\circ}$ C, 12 L/min		
ネブライザ圧力	: 45 psi		
キャピラリー電圧	: 2500 V(+)		
測定モード	: dynamic MRM		

表2 MRM条件およびMSパラメータ

化合物名	Frag	保持時間	定量イオン		定性イオン	
			トランジション	CE	トランジション	CE
Gly	40	1.56	76.0 -> 30.3	14	76.0 -> 28.3	50
Ala	40	1.73	90.1 -> 44.2	10	90.1 -> 29.3	50
GABA	62	5.11	104.1 -> 87.2	10	104.1 -> 45.4	22
Ser	62	1.48	106.1 -> 60.1	10	106.1 -> 42.2	26
Pro	84	1.82	116.1 -> 70.1	18	116.1 -> 28.3	46
Val	62	4.00	118.1 -> 72.2	10	118.1 -> 55.2	22
Thr	62	1.57	120.1 -> 74.1	10	120.1 -> 56.2	18
Ile	84	7.46	132.1 -> 86.1	10	132.1 -> 69.2	18
Leu	84	7.76	132.1 -> 86.1	10	132.1 -> 69.2	18
Asn	84	1.46	133.1 -> 74.0	14	133.1 -> 87.1	6
Asp	62	1.72	134.0 -> 74.1	14	134.0 -> 88.1	6
Lys	84	8.19	147.1 -> 84.1	18	147.1 -> 130.1	6
Gln	84	1.56	147.1 -> 130.0	10	147.1 -> 84.0	18
Glu	84	1.74	148.1 -> 84.1	18	148.1 -> 130.0	6
Met	84	3.73	150.1 -> 56.2	18	150.1 -> 104.1	10
His	84	7.88	156.1 -> 110.1	14	156.1 -> 83.1	26
Phe	84	9.95	166.1 -> 120.1	14	166.1 -> 77.1	50
Arg	106	10.73	175.1 -> 70.1	26	175.1 -> 60.2	14
Tyr	84	8.07	182.1 -> 136.0	14	182.1 -> 91.1	34
Trp	84	12.89	205.1 -> 188.0	10	205.1 -> 146.0	18
(Cys)2	84	1.61	241.0 -> 151.9	10	241.0 -> 74.1	34

※ Frag=Fragmentor, CE=Collision energy



3. 結果および考察

図1に混合標準液 10 μmol/L における各化合物のMRMクロマトグラムを表示しました。

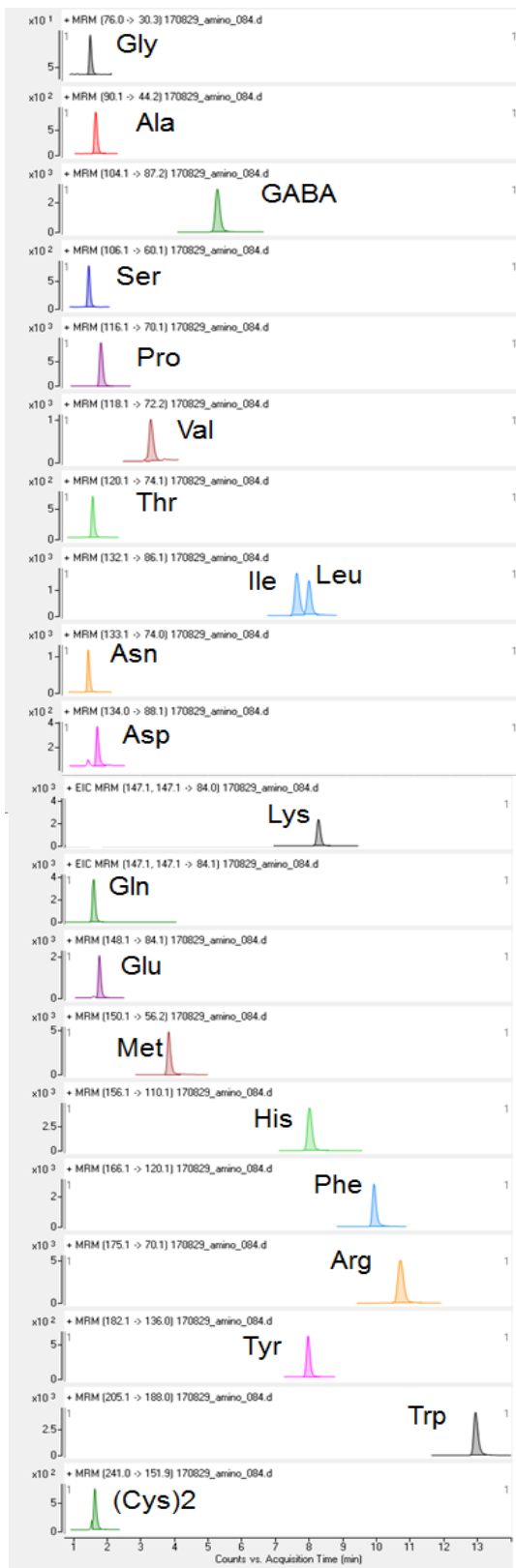


図1 標準液10 μmol/LのMRMクロマトグラム

本条件によりアミノ酸全21種類の一斉分析が可能です。同位体の *m/z* が重なるためにLCでの分離が必須である Asn と Asp、Gln と Glu の分離も良好でした。さらに位置異性体である Ile と Leu についても分離測定が可能です。各化合物の検量線（一部抜粋）を図2に示し、標準液の測定結果まとめを表3に記載しました。

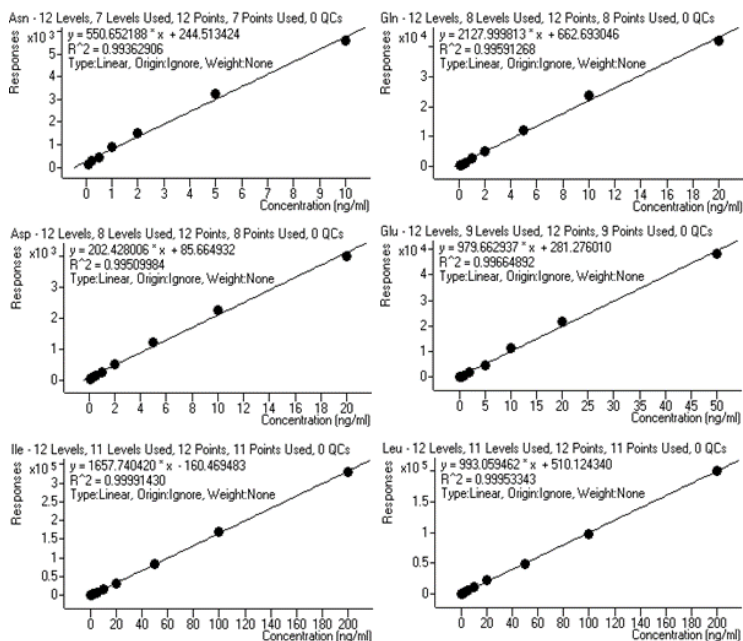


図2 各化合物検量線の抜粋(Asn, Asp, Gln, Glu, Ile, Leu)

表3 標準液測定結果まとめ

化合物	RT [min]	直線性範囲 [μmol/L]	決定係数	10 μmol/L 標準液 Area %RSD
Gly	1.56	10 - 50	0.9931	5.5
Ala	1.73	0.1 - 20	0.9983	1.3
GABA	5.11	0.1 - 10	0.9936	1.0
Ser	1.48	0.1 - 2	0.9991	1.1
Pro	1.82	0.1 - 50	0.9984	0.6
Val	3.40	0.1 - 100	0.9969	7.5
Thr	1.57	0.1 - 10	0.9960	1.3
Ile	7.46	0.1 - 200	0.9999	2.1
Leu	7.76	0.1 - 200	0.9995	1.7
Asn	1.51	0.1 - 10	0.9936	1.7
Asp	1.72	0.1 - 20	0.9950	1.2
Gln	8.19	0.1 - 20	0.9959	0.8
Lys	1.56	0.1 - 50	0.9990	1.1
Glu	1.74	0.1 - 50	0.9966	1.3
Met	3.73	0.1 - 50	0.9983	0.8
His	7.88	0.1 - 50	0.9961	2.3
Phe	9.95	0.1 - 100	0.9990	0.8
Arg	10.73	0.1 - 5	0.9905	1.5
Tyr	8.07	0.1 - 10	0.9983	2.2
Trp	12.89	0.1 - 20	0.9989	1.0
(Cys)2	1.61	0.1 - 100	0.9972	1.4

※ %RSD は Area 平均値より算出 (n=6)

実試料の分析例として、市販の黒酢を測定いたしました。黒酢は 0.2 μm でフィルター処理後に、0.02 N の塩酸で 50 倍希釈し、得られた MRM クロマトグラムを図 3 に示しました。

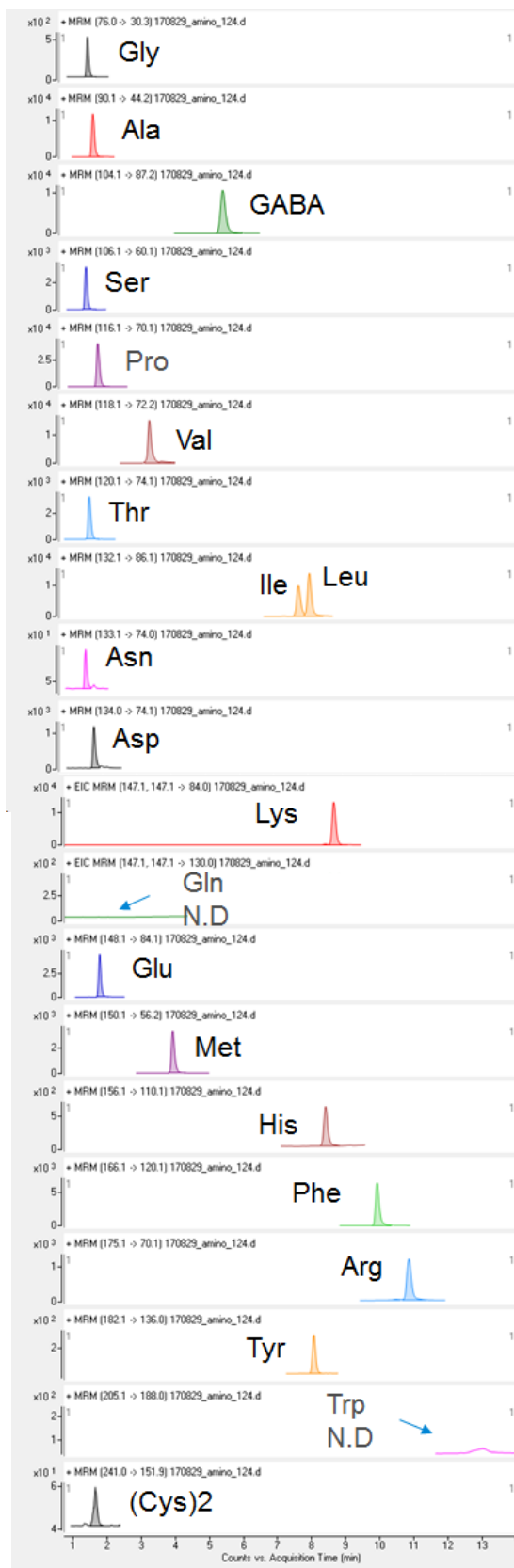


図3 黒酢50倍希釈液のMRMクロマトグラム

黒酢中には対象化合物のうち、Gln と Trp を除く 19 種類のアミノ酸が検出されました。LC/MS/MS は HPLC と比較すると非常に高感度であり、実試料を希釈して測定することが可能となります。今回は黒酢サンプルを 50 倍希釈して測定しており、希釈により LC/MS で問題となるマトリクスによるイオン化サプレッションの影響を低減できます。さらに LC/MS/MS の MRM モードは、極めて選択性が高いため、食品などの高マトリクス試料においても、図 3 のように夾雑物の影響を受けることなく分離・検出することが可能です。このことは解析時に夾雑物をアミノ酸と誤認識する（偽陽性）ことの防止にもつながります。

5. まとめ

本メソッドにより、煩雑な誘導体化処理をせずアミノ酸 21 成分を直接分析することが可能となりました。各成分の分離・再現性も良好であることから、本メソッドは、食品などのサンプル中のアミノ酸定量分析に応用可能です。

【LC-MS-201710TA-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