

Ultivo トリプル四重極 LC/MS を用いた 細胞培地中のアミノ酸一斉分析



Authors

田中 誠也
澤田 浩和

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

本アプリケーションノートでは、Ultivo トリプル四重極 LC/MS を用いて細胞培地中のアミノ酸を一斉分析する手法をご紹介します。

極めて極性が高いアミノ酸は、逆相クロマトグラフィーにおける分析は困難です。そこで親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)を用いることで、誘導体化処理なしに直接アミノ酸を測定することが可能となります。さらに検出器には Ultivo トリプル四重極質量分析計を用いることで、高い感度と選択性を有する結果が得られます。

標準品により直線性・再現性を確認後、実試料として、研究開発や商品開発において広く使用されているダルベッコ変性イーグル培地 (DMEM 培地) 中のアミノ酸の定量分析結果を示します。さらに定量値確認のためマトリクス効果確認試験を行い、イオンサプレッションの有無を確認しています。

Key words: アミノ酸一斉分析、細胞培地

分析条件

システム

1260 Infinity II Prime pump (G7104C)

1260 Infinity II Vial Sampler (G7129A)

Ultivo Triple Quadrupole LC/MS (G6465AA)

MassHunter Data Acquisition C.01.00

試料

アミノ酸混合標準液は0.1Nの塩酸で混合した後、希釈液として0.02 N塩酸を含む50%アセトニトリル溶液を用いて各濃度に調製いたしました。DMEM培地は表1に記載したサンプル溶媒により10–1000倍希釈し、LC/MS/MSに供しました。

表1. 分析条件

LC	
移動相	ストック液: 200 mM ギ酸アンモニウム水溶液+2.5% ギ酸 (pH 3) A: 超純水+10% ストック液 B: アセトニトリル+10% ストック液
カラム	InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1x100 mm, 2.7 μm, (PN 685775-924)
流速	0.5 mL/min
カラム温度	40°C
注入量	0.5 μL
サンプル溶媒	50%アセトニトリル+0.02N塩酸
グラジエント	0-15 min: 100 - 50 %B 15-17 min: 50-100 %B 17-20 min: 100%B
分析時間	20.0 min
MS	
イオン源	Agilent Jet Stream (AJS-ESI)
測定モード	Dynamic MRM (dMRM)
ドライガス設定	250°C, 8 L/min
シースガス設定	350°C, 11 L/min
ネプライザ圧	45 psi
キャピラリ電圧	2500 V
ノズル電圧	0V

表2. 各化合物のMRM条件

Frag : Fragmentor
CE : Collision Energy

Compound	Frag	RT [min]	Quantifier		Qualifier	
			Transition	CE	Transition	CE
Gly	40	5.13	76.0->48.1	2	76.0->30.1	2
Ala	40	4.72	90.1->44.1	2	90.1->45.1	38
GABA	62	4.2	104.1->87.2	10	104.1->45.4	22
Ser	62	5.32	106.1->60.0	2	106.1->42.2	26
Pro	84	3.77	116.1->70.1	18	116.1->28.3	46
Val	62	3.71	118.1->72.2	10	118.1->55.2	22
Thr	84	4.81	120.1->74.0	2	120.1->56.0	10
Leu	84	2.87	132.1->86.1	10	132.1->69.2	18
Ile	84	3.05	132.1->86.1	10	132.1->30.3	18
Asn	84	5.36	133.1->74.0	6	133.1->87.1	2
Asp	62	6.29	134.0->74.1	14	134.0->88.1	6
Gln	84	5.31	147.1->84.0	18	147.1->130.0	10
Lys	84	7.6	147.1->84.1	18	147.1->130.1	6
Glu	84	5.75	148.1->84.1	18	148.1->130.0	6
Met	84	3.36	150.1->56.2	18	150.1->104.1	10
His	84	6.67	156.1->110.1	14	156.1->83.1	26
Phe	84	2.68	166.1->120.1	14	166.1->77.1	50
Arg	106	7.21	175.1->70.1	26	175.1->60.2	14
Tyr	84	3.84	182.1->91.1	34	182.1->136.0	14
Trp	84	2.95	205.1->146.0	18	205.1->188.0	10
(Cys)2	84	7.67	241.0->74.1	34	241.0->151.9	10

結果

標準液の測定結果を図1に示しました。位置異性体であるIleとLeu、同位体の分子量が重なるAsnとAsp、GlnとGluも良好に分離しました。

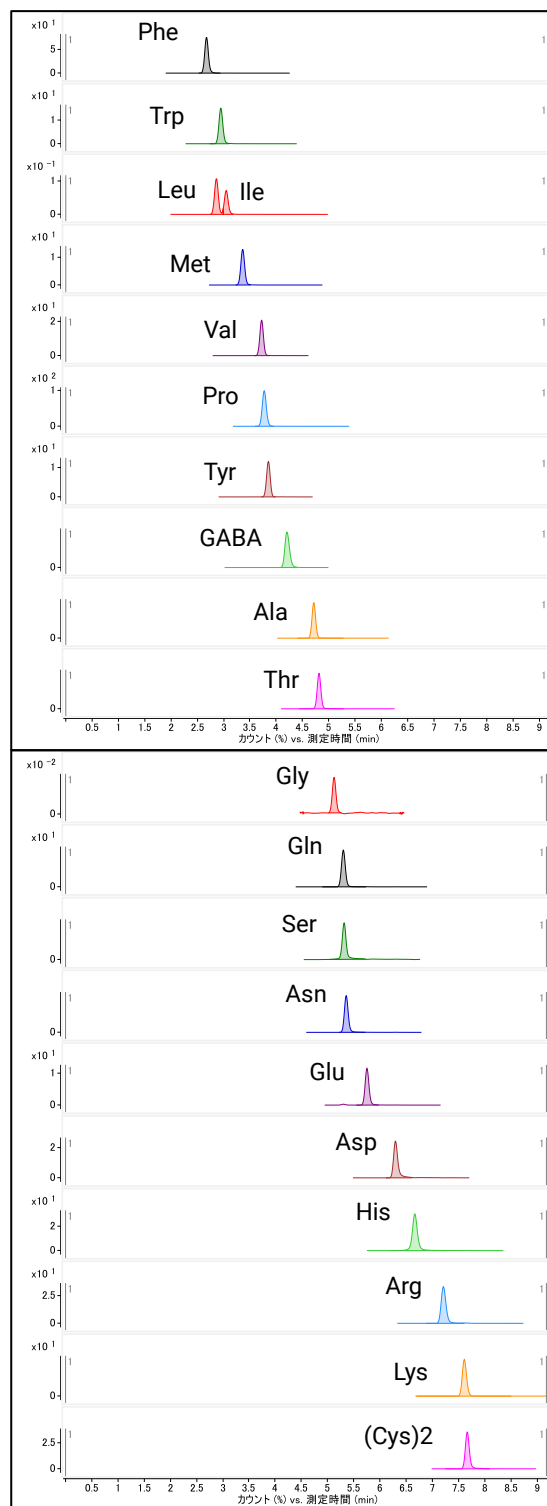


図1. 標準品MRMクロマトグラム (100 μmol/L)

標準液の測定結果を表3に示しました。表記の濃度範囲で良好な直線性が得られました。さらに標準液10, 100 $\mu\text{mol/L}$ それぞれで繰り返し再現性を確認し(n=6)、Area% RSDを算出しました。10 $\mu\text{mol/L}$ 標準液においてGlyを除く全成分のRSDは3%以内となりました。

表3 各化合物の検量線測定結果

化合物名	RT [min]	直線性範囲 [$\mu\text{mol/L}$]	R ²	10 $\mu\text{mol/L}$ STD Area %RSD	100 $\mu\text{mol/L}$ STD Area %RSD
Gly	5.12	2 - 200	0.9989	7.36	2.06
Ala	4.70	1 - 200	0.9982	0.50	0.75
GABA	4.12	0.1 - 10	0.9939	1.76	0.65
Ser	5.31	0.5 - 10	0.9989	1.17	1.05
Pro	3.75	0.1 - 10	0.9947	1.51	0.46
Val	3.70	0.1 - 10	0.9959	1.52	0.67
Thr	4.81	0.1 - 100	0.9981	1.51	1.32
Ile	3.03	0.1 - 20	0.9944	1.86	0.81
Leu	2.85	0.1 - 20	0.9947	1.92	4.16
Asn	5.35	0.1 - 10	0.9936	1.06	0.98
Asp	6.28	0.1 - 200	0.9996	1.67	1.49
Gln	5.29	0.1 - 20	0.9977	1.26	0.82
Lys	7.61	2 - 50	0.9989	1.71	0.47
Glu	5.72	0.5 - 20	0.9989	1.77	0.97
Met	3.35	0.1 - 5	0.9962	1.50	0.47
His	6.69	0.5 - 20	0.9988	1.07	0.67
Phe	2.67	2 - 50	0.9992	2.61	1.21
Arg	7.21	0.2 - 5	0.9976	1.05	0.37
Tyr	3.84	0.1 - 2	0.9987	2.42	1.04
Trp	2.95	0.1 - 2	0.9989	1.58	0.54
(Cys)2	7.66	2 - 50	0.9994	2.22	0.37

実試料として細胞培地の一種であるDMEM培地を分析しました。得られたMRMクロマトグラムを図2に示し、定量結果を表4に示しました。含有する化合物の濃度が異なるため、10-1000倍希釈で定量結果を算出しました。またDMEM培地の含有量と定量結果を比較したところ、概ね相違がないことが示されました。Serのみやや低値を示しました。

表4 DMEM培地の定量結果

化合物名	希釈倍率	含有量 [$\mu\text{mol/L}$]	定量結果 [$\mu\text{mol/L}$]	RSD [%] (n=6)
Gly	x10	399.6	400.8	4.0
Ser	x100	399.7	238.5	2.7
Val	x1000	802.4	868.6	3.5
Thr	x100	797.5	1020.2	1.2
Ile	x100	800.5	843.6	0.9
Leu	x100	800.5	856.6	0.8
Gln	x1000	3995.9	3851.1	1.8
Lys-HCl	x100	799.3	645.3	1.1
Met	x100	201.1	197.0	1.6
His	x100	200.4	208.8	3.1
Phe	x100	399.5	383.5	1.0
Arg-HCl	x100	398.7	403.0	1.7
Tyr	x1000	398.2	398.2	3.6
Trp	x100	78.3	76.3	1.2
(Cys)2	x100	199.9	195.7	1.5

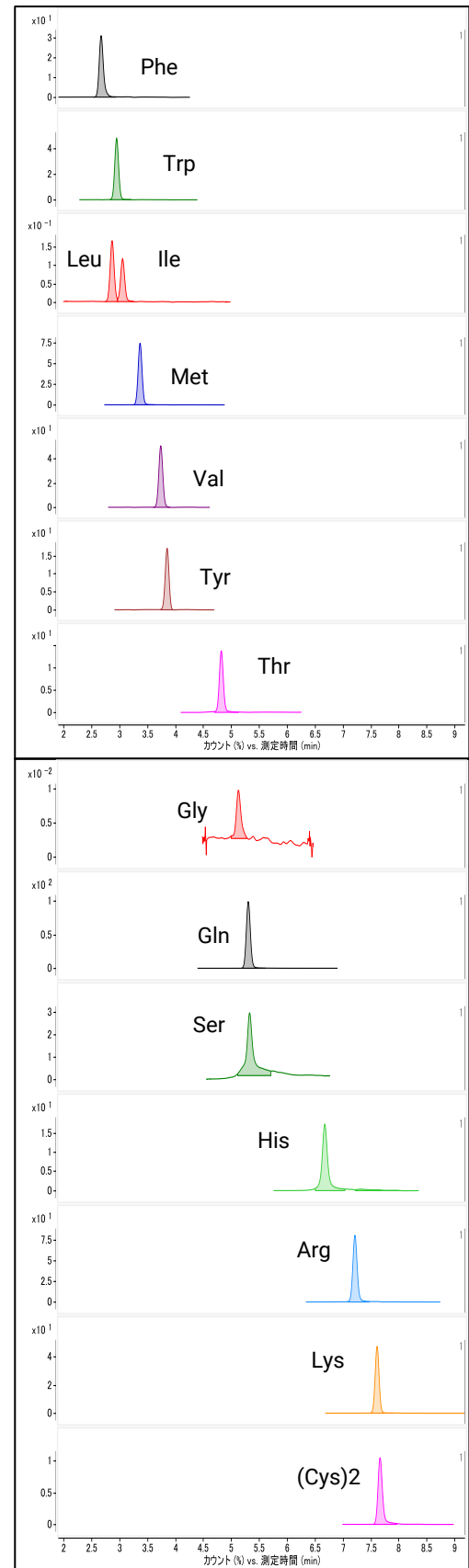


図2 DMEM培地のMRMクロマトグラム (100倍希釈)

次に細胞培地中においてLC/MSのイオンサプレッションの有無を確認するため、マトリクス効果確認試験を行いました。前処理を簡便化するため、オートサンプラのインジェクタプログラムを用いて、全自動のマトリクス効果確認試験を実施しました。インジェクタプログラムの設定内容を表5に記載しました。また参考として図3にMassHunterソフトウェア上の設定画面を掲載しました。

表5 インジェクタプログラムの設定内容

	内容	詳細
1	吸引	0.5 µL sample or blank
2	洗浄	ニードル洗浄 (デフォルト設定)
3	吸引	0.2 µL STD or blank から
4	洗浄	ニードル洗浄 (デフォルト設定)
5	混合	1 µL 繰り返し5回
6	注入	

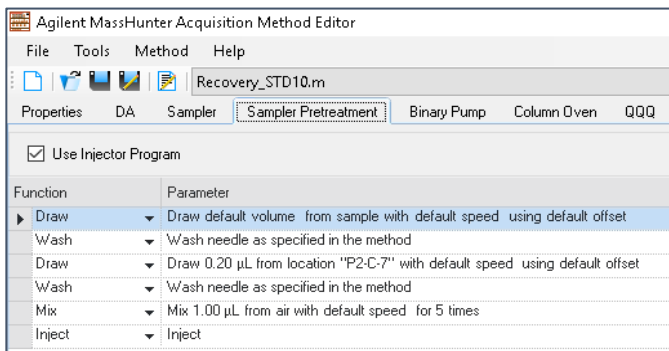


図3 MassHunter上のインジェクタプログラム設定画面

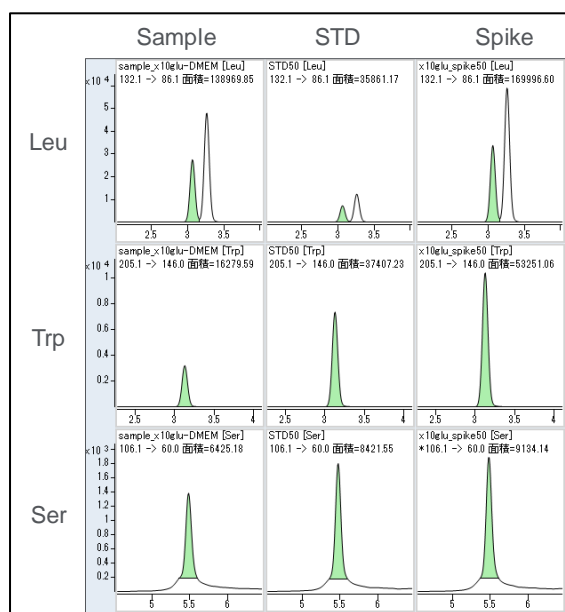


図4 マトリクス効果確認試験による Leu, Trp, SerのMRMクロマトグラム

図4にマトリクス効果確認試験により得られたLeu, Trp, SerのMRMクロマトグラムを、表6に各化合物の回収率を示しました。セリンを除く各化合物は回収率が90-110%以内と良好な回収率が得られました。セリンの含有量と定量値の違いは試料マトリクスによるイオンサプレッションが原因であると考えられます。

表6 マトリクス効果確認試験結果 (各化合物の回収率)

化合物名	回収率 [%] (n=3)
Gly	95.3
Ser	63.5
Val	98.5
Thr	101.3
Ile	96.5
Leu	97.1
Gln	97.6
Lys-HCl	99.7
Met	92.0
His	106.3
Phe	103.1
Arg-HCl	98.7
Tyr	96.6
Trp	99.2
(Cys)2	94.8

まとめ

HILIC-ZカラムとUltivoトリプル四重極LC/MSを用いることで、主要なアミノ酸21種類を誘導体化することなく一斉分析が可能となりました。また細胞培地中のアミノ酸の定量値と繰り返し再現性を確認したところ、概ね良好な結果が得られました。

Agilentのオートサンプラに標準搭載されているインジェクタプログラムにより、全自動マトリクス効果確認試験が実施可能であり、煩雑な調製作業を省略できます。また本条件は、食品中のアミノ酸一斉分析に応用可能です。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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. 2018

Printed in Japan, April 2018

LC-MS-201804TA-001

