

LC/MSD iQ によるアミノ酸の分析



Authors

林 慶子
城代 航
澤田 浩和

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

食品中のアミノ酸分析には大量に含まれている成分と微量成分との濃度レンジの違いから、広いダイナミックレンジで測定できるメソッドが必要とされます。アミノ酸の LC/MS 分析では、誘導体化しないと逆相分配に保持しにくい、幅広い濃度範囲での検出が困難などの課題がありました。

本アプリケーションノートでは、既報 5994-3044EN を参考に Poroshell 120 HILIC-Z カラムを用いて、非誘導体化アミノ酸の良好な保持及び分離と、幅広い濃度範囲における良好な直線性を確認したので報告します。

Key words : アミノ酸、LC/MS 直接分析、ダイナミックレンジ

システム

1260 Infinity II Prime LCポンプ(G7104C)
1290 Infinity II Vialsampler+ICC (G7129C)
InfinityLab LC/MSD iQ (G6160AA)

試料調製

Amino acid standard mix (5061-3330)を0.1 N HClで希釈し試料としました。ダイナミックレンジ確認のため、希釈系列は 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 pmol/ μ Lの濃度の試料を作成しました。

分析条件

表1. HPLC条件

HPLC	
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.7 μ m, 2.1 \times 150 mm, PEEK-lined, (p/n 673775-924)
カラム温度	25 $^{\circ}$ C
注入量	1 μ L
分析時間	17 min
移動相A	10 mM ギ酸アンモニウム+ 0.1% ギ酸含有超純水
移動相B	10 mM ギ酸アンモニウム+ 0.1% ギ酸含有90%アセトニトリル
流速	0.4 mL/min

表2. グラジエント条件

min	%B
0	100
5	80
6	70
7	50
9	20
10	20
10.5	100
17	100

表3. LC/MS条件

LC/MS	
イオン源	ESI, Positive
ドライガス	12 L/min 330 $^{\circ}$ C
ネブライザ圧	35 psi
キャピラリ電圧	2000 V

TimeFilter : 0.04としました

表4. アミノ酸成分名とSIM設定

成分名	m/z	フラグメンタ/V	Dwell/msec
Alanine	90.1	40	15
Arginine	175.1	105	15
Aspartic Acid	134.1	75	15
Cystine	241.0	105	15
Glutamic Acid	148.1	85	15
Glycine	76.0	40	15
Histidine	156.1	95	15
Isoleucine	132.1	85	15
Leucine	132.1	85	15
Lysine	147.1	85	15
Methionine	150.1	75	15
Phenylalanine	166.1	85	15
Proline	116.1	85	15
Serine	106.1	65	15
Threonine	120.0	75	15
Tyrosine	182.1	95	15
Valine	118.1	75	15

結果

図1にクロマトグラムを示しました。表2に各成分の溶出時間を示しました。ロイシンとイソロイシンも良好に分離しました。

表5. 各成分の溶出時間

	RT/min
Phenylalanine	4.58
Leucine	4.86
Isoleucine	5.09
Methionine	5.31
Tyrosine	5.64
Valine	5.73
Proline	5.81
Alanine	6.72
Threonine	6.81
Glycine	7.09
Serine	7.24
Glutamic acid	7.61
Aspartic acid	8.06
Histidine	8.55
Arginine	8.74
Cystine	8.76
Lysine	8.91

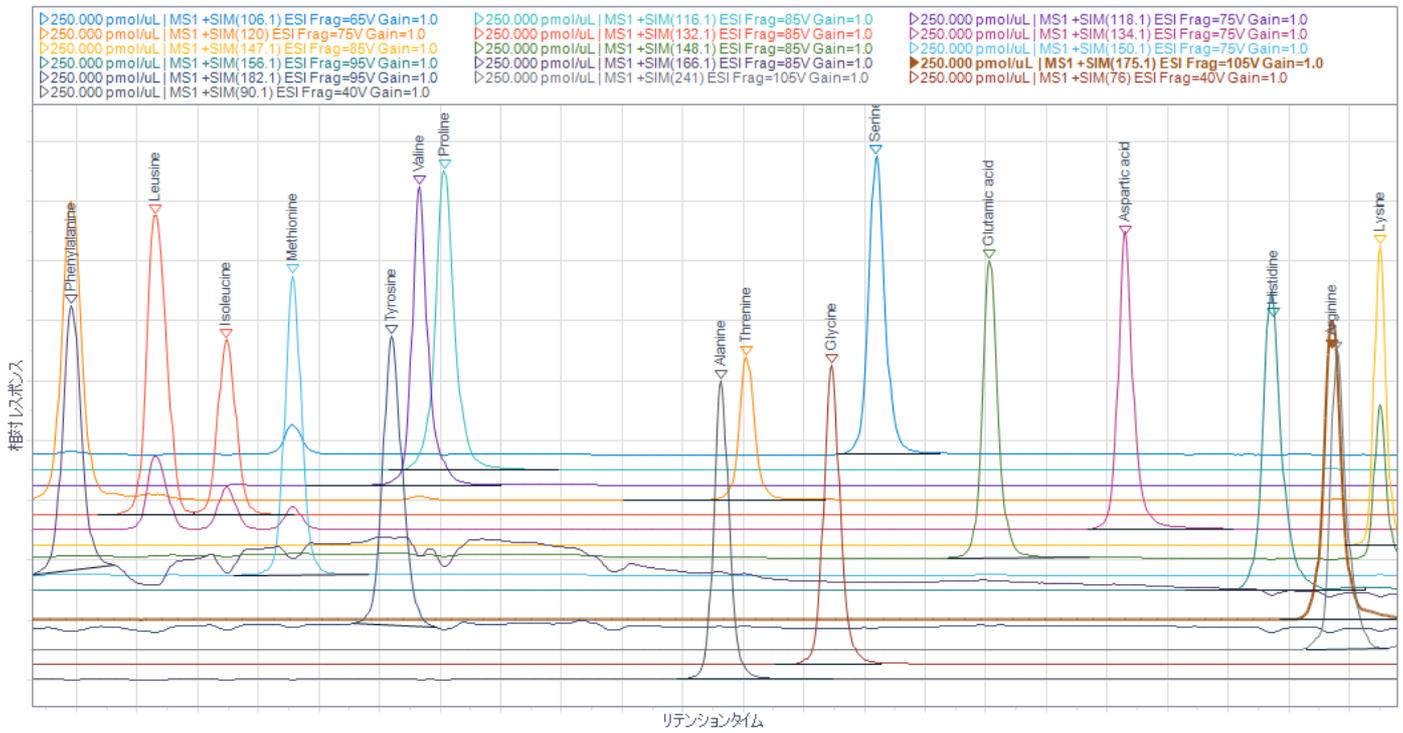


図1. 250 pmol/μLのクロマトグラム

次に直線性を確認しました。図2に例としてチロシンとグリシンの検量線を示しました、チロシンは 0.25 から 250 pmol/μL、グリシンは 0.5 から 250 pmol/μL の間で、 $R^2 > 0.999$ の良好な直線性を示しました。

表6に各アミノ酸の直線範囲と決定係数 R^2 を示しました。

表6. 各アミノ酸の直線範囲 (pmol/μL) と決定係数

	直線範囲	R2
Phenylalanine	2.5-250	0.993
Leucine	0.1-250	0.993
Isoleucine	0.05-250	0.997
Methionine	1-250	0.999
Tyrosine	0.05-250	0.999
Valine	0.1-250	0.999
Proline	0.05-250	0.991
Alanine	0.25-250	0.999
Threonine	0.5-250	0.997
Glycine	0.25-250	0.999
Serine	0.5-250	0.999
Glutamic acid	0.25-250	0.999
Aspartic acid	1-250	0.998
Histidine	0.5-25	0.997
Arginine	0.05-10	0.999
Cystine	0.5-10	0.97
Lysine	0.25-250	0.997

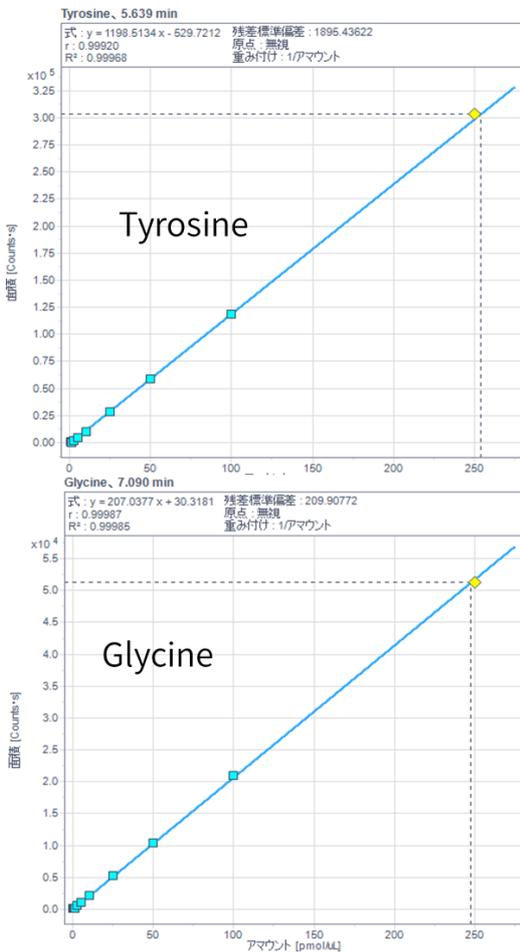


図2. チロシンとグリシンの検量線

まとめ

アミノ酸を誘導体化することなく、HILICモードで保持・分離しました。各アミノ酸の直線性を確認すると広いダイナミックレンジで良好な直線性を得ました。

Tips

・お持ちのHPLCシステムでアミノ酸分析を行う場合、システムボリュームの違いから、カラム再平衡化時間の追加が必要になる場合があります。十分カラムが再平衡化されてから分析が開始されるよう、グラジエント条件の10.5分以降の分析時間を調整してください。5994-3044ENでは4分でしたが、今回はHPLCシステムの違いから6.5分としました。

・安定した日間再現性を得るために、実験を始める前にイオン源内のチャンバーとスプレーシールドのふき取り洗浄などのメンテナンスを実施してください。

参考

Quantitation of Amino Acids in Soy Flour, Dried Cow's Milk Powder, and Corn Silage by Triple Quadrupole LC/MS/MS

Hui Zhao *et al.*, Agilent Technology, 5994-3044EN (2021)

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. 2021

Printed in Japan, Apr. 28, 2021

LC-MS-202104HK-001

DE44312.9916319444