

Agilent AdvanceBio AAA カラムによる オンライン誘導体化アミノ酸の分析

著者

Lu Yufei
Agilent Technologies, Inc.

概要

アミノ酸を高い分析感度で高速に定量分析するための液体クロマトグラフィー (LC) メソッドを開発しました。このメソッドで用いた自動オンラインプレカラムアミノ酸誘導体化は、アジレントのオートサンプラと、表面多孔質粒子を充填した Agilent AdvanceBio AAA カラムを組み合わせ実行しました。このメソッドを用いて、3 つの異なるサンプルマトリックス中の 23 種類のアミノ酸の LC 分離および高精度測定を行いました。

はじめに

アミノ酸分析は、食品業界、医薬品業界、生物業界で幅広いアプリケーションがあり、常にクロマトグラフィーの困難な領域となっています。さまざまなタイプのアミノ酸を高い効率で分析する方法は、多くの分析化学者にとっての問題です。多くの市販のメソッドが、例えば、高い pH での短いカラム寿命、低い分析効率、簡単に入手できない希少試薬などの欠点を当然のように伴っています。

高速かつ高分析感度でアミノ酸を定量分析するための LC メソッドが開発しました。このメソッドでは、信頼性の高いオンラインプレカラムアミノ酸誘導体化と、表面多孔質粒子を充填した Agilent AdvanceBio AAA C18 カラムを組み合わせ使用しています。オンライン誘導体化の自動化は、アジレントのオートサンブラを使用することで容易に実現できます。第一級アミノ酸は o-フタルアルデヒド (OPA) によって、第二級アミノ酸はクロロギ酸 9-フルオレニルメチル (FMOC) によって誘導体化しました。今回の分析に必要な試薬およびアミノ酸標準はすべて、AdvanceBio アミノ酸分析試薬キットに含まれています。

分析方法

装置および試薬

Agilent 1260 Infinity LC の構成は次のとおりです。

- G1312B バイナリポンプ
- G1367D 液体オートサンブラ
- G1316A カラムコンパートメント
- G4212B ダイオードアレイ検出器

今回の実験で使用するカラムとして、Agilent AdvanceBio AAA C18、4.6 × 100 mm、2.7 μm (p/n 655950-802) を選択しました。

メタノールとアセトニトリルはクロマトグラフィーグレードのものを Dikma Technologies Inc. 社から購入しました。塩酸、リン酸水素ナトリウム、ホウ酸ナトリウムは AR グレードのものを J&K Scientific Ltd. 社から購入しました。超高純度脱イオン水は Millipore 社の Milli-Q 超純水システムを使用して調製しました。23 種類のアミノ酸リファレンス標準 (表 1)、OPA、FMOC、ホウ酸塩緩衝液は、アジレントの AdvanceBio アミノ酸キットのものを使用しました。混合アミノ酸注射液、混合アミノ酸錠、山羊の乳を含むサンプルは、地域の薬局およびスーパーマーケットで購入しました。

アミノ酸標準溶液の調製

1 mL アンプル容器の 250 pmol/μL アミノ酸標準溶液を 10 等分 (各 100 μL) します。各 100 μL をバイアルインサート付きバイアルに入れます。バイアルにカバーをして 4 °C で保管します。

アミノ酸補助キットから、59.45 mg のアスパラギン、59.0 mg のヒドロキシプロリン、65.77 mg のグルタミン、91.95 mg のトリプトファンを正確に計量します。次に、これらのアミノ酸を 25 mL 計量フラスコに加えた後、12.5 mL の 0.1 M 塩酸を加え、アミノ酸が溶解するまで超音波処理します。次に、マーク位置まで水で希釈して、十分に振とうし、アミノ酸補助原液 1 として 4 °C で保存します。

アミノ酸補助キットから、58.58 mg のノルバリン、44.54 mg のサルコシンを正確に計量して、50 mL 計量フラスコに加えます。その後、25 mL の 0.1 M 塩酸をこのフラスコに加え、アミノ酸が溶解するまで超音波処理します。次に、マーク位置まで水で希釈して、十分に振とうし、アミノ酸補助原液 2 として 4 °C で保存します。この溶液は、内部標準溶液として使用することが可能です。

適切な量のアミノ酸補助原液 1 および 2 を取り、各 100 μL のアミノ酸標準に加え、ボルテックスミキサーを使用して十分に混合し、後で使用できるようにアミノ酸標準溶液としてラベルを付けます。

誘導体化試薬の調製

FMOC 試薬: 1 mL アンプル容器の FMOC を 10 等分 (各 100 μ L) します。各 100 μ L をバイアルインサート付きバイアルに入れます。バイアルにカバーをして 4 °C で保管します。この保管条件の下で、分割した各 100 μ L 溶液は 7 ~ 10 日間安定します。

OPA 試薬: 1 mL アンプル容器の OPA を 10 等分 (各 100 μ L) します。各 100 μ L をバイアルインサート付きバイアルに入れます。バイアルにキャップを付けて 4 °C で保管します。この保管条件の下で、分割した各 100 μ L 溶液は 7 ~ 10 日間安定します。

希釈液: 100 mL 移動相 A (1.2 mL リン酸を含む) を 4 °C で保管します。

サンプル前処理

混合アミノ酸注射液: 1 mL のサンプル溶液を取り、50 mL 計量フラスコに入れます。次に、25 mL の 0.1 M 塩酸を加えて、十分に振とうして、マーク位置まで水で希釈し、再度よく振とうします。混合溶液を 0.2 μ m ろ過メンブレンに通し、後で使用するためにろ液を保管します。

混合アミノ酸錠: サンプルから 5 錠取り、十分にすりつぶして、微粉体となったものから 1 錠分と同じ重さを正確に計量します。この 1 錠分の微粉体を 15 mL 遠心分離チューブに入れ、0.1 M 塩酸を加えて、微粉体が溶解するまで超音波処理します。その後、この溶液を 0.2 μ m ろ過メンブレンに通します。1 mL のろ液を取り、50 mL 計量フラスコに入れ、マークまで水で希釈し、十分に振とうして後で使用するために保管します。

山羊の乳: 乳製品についての GB/T 5009.124-2003 に従って調製します。簡単に説明すると、山羊の乳中のタンパク質を HCl で変性し、高温でアミノ酸に加水分解し、フィルタでろ過して、乾燥させた後、クエン酸ナトリウムバッファで再懸濁します。

オートサンブラの手順

- ホウ酸バイアルから 2.5 μ L 吸引します。
- サンプルバイアルから 1.0 μ L 吸引します。
- 3.5 μ L を洗浄ポートで 5 回混合します。
- 0.2 分待った後、0.5 μ L の OPA を吸引します。
- 4 μ L を洗浄ポートで 10 回混合します。
- 0.4 μ L の FMOC を吸引します。
- 4.4 μ L を洗浄ポートで 10 回混合します。
- 希釈液バイアルから 32 μ L 吸引します。
- 20 μ L を洗浄ポートで 8 回混合します。
- サンプルを注入します。
- 0.1 分間待ちます。
- パルプをバイパスします。

LC 条件

パラメータ	設定
カラム	AdvanceBio AAA C18, 4.6 \times 100 mm, 2.7 μ m
流量	1.5 mL/min
カラム温度	40 °C
移動相	A) 10 mM リン酸水素ナトリウムと 10 mM ホウ酸ナトリウム、pH を塩酸で 8.2 に調製 B) メタノール:アセトニトリル:水、45:45:10 (v:v:v)
グラジエントプログラム	時間 (分) % B 0.02 0.35 2 13.4 57 13.5 100 15.7 100 15.8 2 18.0 2
検出器	338 nm、10 nm バンド幅、およびリファレンス波長 390 nm、20 nm バンド幅 (第一級アミノ酸) 262 nm、16 nm バンド幅、およびリファレンス波長 324 nm、8 nm バンド幅 (第二級アミノ酸) 波長はリジンのピークが現れた後に切り替え。 実験での設定値: 338 nm と 262 nm、10.0 分

結果と考察

本文書に記載したサンプル注入プログラムに従って、オンラインアミノ酸誘導体化サンプルを注入了。Agilent 1260 Infinity LC システムと AdvanceBio AAA カラムを使用して 23 種類のアミノ酸のベースライン分離を 18 分で実行しました。図 1 と表 1 は、アミノ酸標準溶液のクロマトグラムと含まれている 23 種類のアミノ酸のリストを示しています。本文書に記載した分析メソッドは、以前のメソッ

ド^{1,2} をベースとして AdvanceBio AAA C18 カラムを用いて開発したメソッドです。カラム選択性は変更されていないため、アミノ酸のピークの順は同じです。リジンのピークとヒドロキシプロリンのピークの間隔は 0.1 分あるため、化合物の分析は波長の切り替え時間に影響を受けることはありません。

図 2 ~ 4 に示すように、本文書に記載したメソッドを使用して、実際のサンプルに含まれる各アミノ酸の存在を確認しました。実際のサンプルのアミノ酸で、完全なベースライン分離を実現できました。これにより、混合アミノ酸注射液中の 18 種類のアミノ酸、混合アミノ酸錠中の 17 種類のアミノ酸、乳製品中の 16 種類のアミノ酸を適切に測定することができました。

表 1. 23 種類のアミノ酸標準のリスト

ピーク番号	アミノ酸	ピーク番号	アミノ酸
1.	アスパラギン酸	13.	バリン
2.	グルタミン酸	14.	メチオニン
3.	アスパラギン	15.	ノルバリン
4.	セリン	16.	トリプトファン
5.	グルタミン	17.	フェニルアラニン
6.	ヒスチジン	18.	イソロイシン
7.	グリシン	19.	ロイシン
8.	トレオニン	20.	リジン
9.	アルギニン	21.	ヒドロキシプロリン
10.	アラニン	22.	サルコシン
11.	チロシン	23.	プロリン
12.	シスチン		

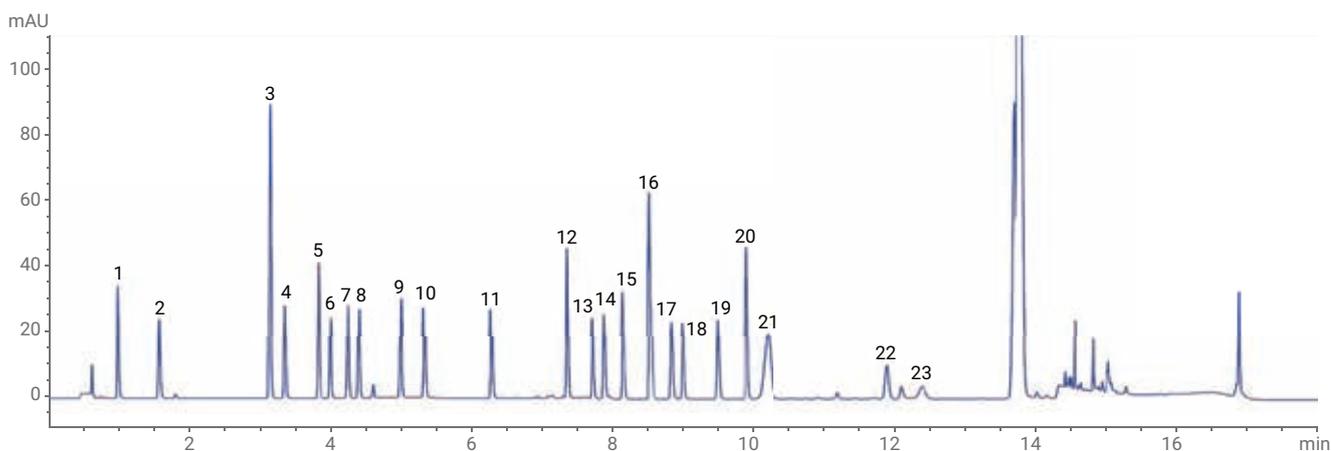


図 1. 23 種類のアミノ酸標準の分離

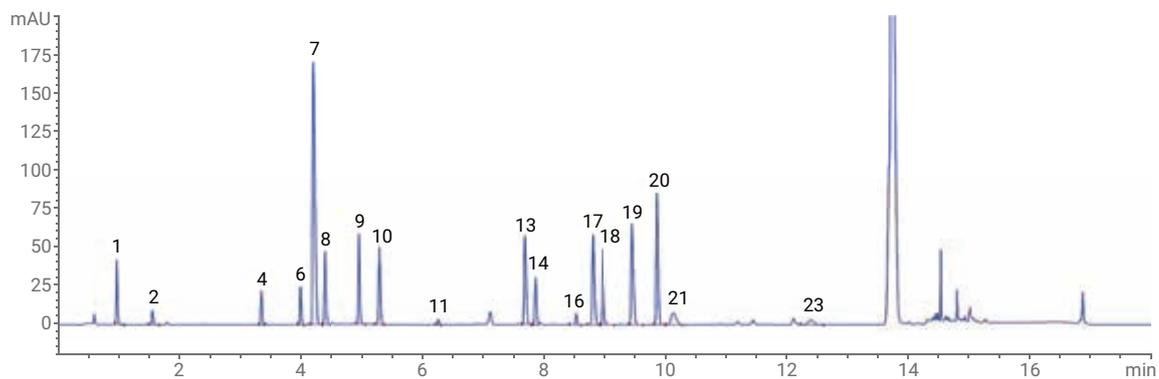


図 2. 混合アミノ酸注射液の分離

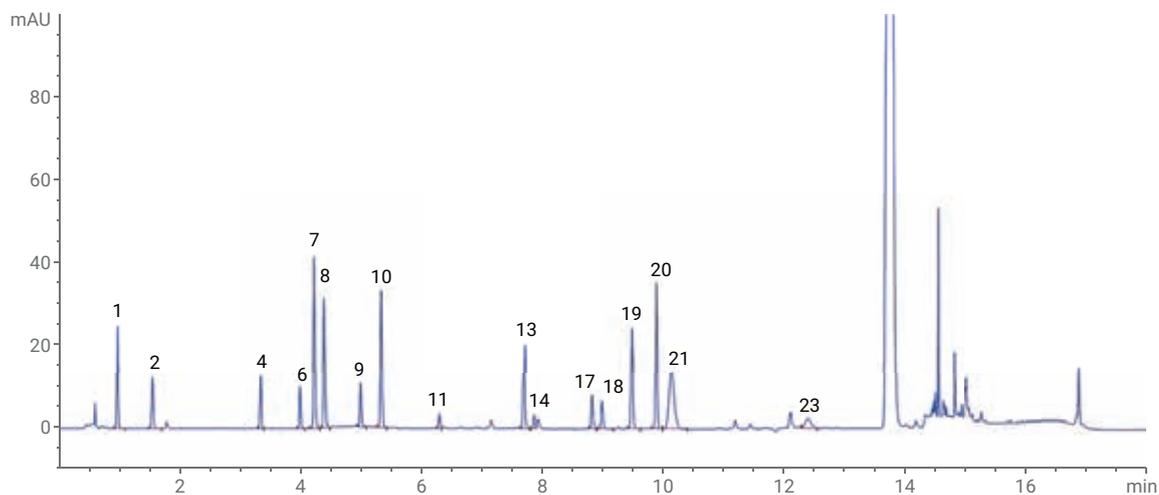


図 3. 混合アミノ酸錠サンプルの分離

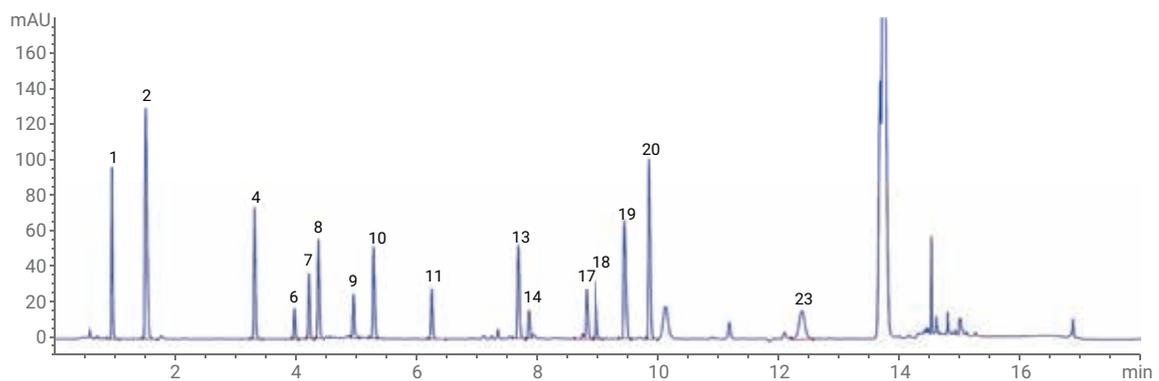


図 4. 乳製品、山羊の乳中のアミノ酸の分離

結論

今回の実験では、Agilent AdvanceBio AAA C18 カラムを使用した、正確かつ迅速で再現性のあるアミノ酸分析メソッドを開発しました。このメソッドは以前のアミノ酸分析メソッドをベースとしたもので、23 種類のアミノ酸の定性分析と定量分析が可能です。今回の実験では、化学薬品および食品の 3 つの異なるマトリックスに含まれるアミノ酸を適切な分離能で分析し、正確な定量を実現できました。オンライン誘導体化により、分析プロセス中のサンプル前処理に必要な時間が短縮しました。したがって、このメソッドは医薬品業界や食品業界などにおける大量のサンプルのアミノ酸分析に最適です。表面多孔質粒子を充填した AdvanceBio AAA C18 カラムはサブ 2 μm 粒子を充填したカラムよりも高効率で、カラム圧はサブ 2 μm 粒子のカラム圧の約 50 % です。実験での最大グラジエント圧力は 220 bar だったため、従来の LC システムで十分に対応できます。今回のアミノ酸分析メソッドで使用した移動相システムはアルカリ性のため、シリカベースのカラムの堅牢性が重要です。AdvanceBio AAA C18 カラムは pH 耐性試験においてアルカリ性の条件下での安定が確認されており、アミノ酸分析での優れた再現性が保証されていると言えます^{3, 4}。実際のサンプルの分析では、AdvanceBio AAA C18 ガードカラムの使用を推奨します。

参考文献

1. Henderson, J. W.; et al. Rapid, Accurate, Sensitive and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids. Agilent Technologies Application Note, publication number 5980-1193E, **2000**.
2. Henderson Jr., J. W.; Brooks, A. Improved Amino Acid Methods using Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns for a Variety of Agilent LC Instrumentation and Separation Goals. Agilent Technologies Application Note, publication number 5990-4547EN, **2010**.
3. Extending Column Lifetime in Pharmaceutical Methods with High pH-Stable Poroshell HPH Chemistries. Agilent Technologies Technical Overview, publication number 5991-5022EN, **2014**. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.
4. Long, W. Agilent Poroshell HPH-C18 カラムを用いた自動アミノ酸分析. Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-5571JAJ, **2015**.

製品情報

部品番号	製品
655950-802	AdvanceBio AAA, C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm カラム
820750-931	AdvanceBio AAA ガードカラム, 4.6 × 5 mm
5190-9426	Agilent AdvanceBio AAA 標準および試薬キット、次のものを含みます。
5061-3339	ホウ酸塩緩衝液、0.4 M 水溶液、pH 10.2、100 mL
5061-3337	FMOC 試薬、2.5 mg/mL ACN 溶液、10 × 1 mL
5061-3335	OPA 試薬、10 mg/mL 0.4 M ホウ酸塩緩衝液および 3-メルカプトプロピオン酸、6 × 1 mL アンプル
5062-2479	ジチオジプロピオン酸 (DTDPA) 試薬、5 g
5061-3330	アミノ酸標準溶液、1 nmol/ μL 、10 × 1 mL
5061-3331	アミノ酸標準溶液、250 pmol、10 個
5061-3332	アミノ酸標準溶液、100 pmol/ μL 、10 × 1 mL
5061-3333	アミノ酸標準溶液、25 pmol/ μL 、10 × 1 mL
5061-3334	アミノ酸標準溶液、10 pmol/ μL 、10 × 1 mL
5062-2478	アミノ酸補助キット、ノルバリン、サルコシン、アスパラギン、グルタミン、トリプトファン、4-ヒドロキシプロリンが各 1 g
各製品は単品での注文もできます。	

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. 2017

Printed in Japan, September 21, 2017

5991-6572JAJ