

LC/MS による非誘導体化アミノ酸分析

食品、ライフサイエンス、メタボロミクスアプリケーション

著者

Andrew Kennedy and
Adam Bivens

概要

このアプリケーションノートでは、非誘導体化アミノ酸の分析用に最適化されたメソッドについて説明します。

アミノ酸には極性があるため、逆相 LC による分析は困難です。反対に、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) は、複雑なアミノ酸混合物を保持して分離することが可能であると同時に、従来の逆相クロマトグラフィーと類似したワークフローを提供します。HILIC と質量分析を組み合わせることにより、アミノ酸分析用のシンプルかつ強力なソリューションが実現します。

はじめに

非誘導体化アミノ酸の分離全体にわたって、きわめて高い感度とクロマトグラフィー性能を達成するために、低 pH での親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) とポジティブモード LC/MS 検出を組み合わせて使用しました。Agilent InfinityLab Poroshell 120 2.7 μm HILIC-Z と HILIC-OH5 カラムは、LC/MS によるアミノ酸の分析において 2 つの優れたオプションを提供します。いずれも、分析が困難なロイシン/イソロイシン同重体に加えてさまざまなアミノ酸を完全に分離しています。

実験方法

試薬および薬品

試薬はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。超高純度 LC/MS グレードのアセトニトリルは J.T.Baker (センターバレー、ペンシルバニア州、米国) から購入しました。純水は、EMD Millipore Milli-Q Integral System (ダルムシュタット、ドイツ) を使用しました。ギ酸 (FA、p/n G2453-85060) は Agilent Technologies から入手しました。ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、水酸化アンモニウム、およびアミノ酸標準は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。アミノ酸は使用日まで -70 °C で保管しました。

実験器具と材料

- Agilent InfinityLab フィッティング
 - カラム前: InfinityLab クイックコネクタ LC フィッティング (p/n 5067-5965)
 - カラム後: InfinityLab クイックターン LC フィッティング (p/n 5067-5966)
- バイアル、スクリュートップ、茶色、ラベル付、認定、2 mL (p/n 5182-0716)
- Agilent 圧着スクリュキャップ、PTFE/赤シリコンセブタム (p/n 5190-7024)
- Agilent バイアルインサート、250 μL、不活性ガラス、樹脂足付 (p/n 5181-8872)

- エッペンドルフピペットおよびリピーター
- Vortexer および Multi-Tube Vortexer (VWR、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)
- HDPE 溶媒ボトル (VWR、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)

装置構成

- Agilent 1290 Infinity II バイナリポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II バイアルサンブラ (G7129B)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity LC シリーズ用超低分散キット (5067-5189)
- Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェア
- Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS
- Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオンソース

分析条件

パラメータ	設定値
HPLC	
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z、2.1 × 100 mm Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5、2.1 × 100 mm
移動相 A	10 % 200 mM のギ酸アンモニウム水溶液 (pH = 3)、90 % 水
移動相 B	10 % 200 mM のギ酸アンモニウム水溶液 (pH = 3)、90 % アセトニトリル
流量	0.80 mL/min
カラム温度	30 °C
注入量	0.25 μL
合計分析時間	16 分
グラジエント	時間 (分) %B 0 100 10 70 11 100
MS	
イオン化モード	ESI ポジティブ
ガス温度	300 °C
ガス流量	7.0 L/min
ネプライザ	45 psi
シースガス温度	400 °C
シースガス流量	11 L/min
キャピラリー電圧	3,500 V
ノズル電圧	0 V

サンプル前処理

アミノ酸標準は表 1 に示した濃度になるよう水と混合し、それ以上のサンプル前処理は行わずに分析しました。

移動相前処理

200 mM ギ酸アンモニウムの原液を水で調製し、ギ酸で pH 3 に調整しました。移動相 A は原液を水で 9:1 に希釈して調製しました。移動相 B は原液を ACN で 9:1 に希釈して調製しました。両方の移動相の最終濃度は 20 mM のギ酸アンモニウムでした。

移動相をガラス容器に長時間曝露することにより、MS 検出に干渉して抑制するイオン種を取り込むことが判明しました。ガラスボトルに保管されている移動相は定期的に交換するか、またはガラスボトルを HDPE ボトルと交換する必要があります。

表 1. アミノ酸標準の濃度、リテンションタイム、および dMRM の値

分析対象物	濃度 (mM)	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z RT (min)	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 RT (min)	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	フラグメンタ (V)	コリジョン エネルギー (V)	ドウェルタイム (ms)
フェニルアラニン	0.25	2.12	2.47	166.1	120.1	25	5	10
ロイシン	0.25	2.34	2.74	132.1	86.1	25	8	10
イソロイシン	0.25	2.50	2.93	132.1	86.1	25	8	10
メチオニン	0.25	2.71	3.09	150.0	104.0	75	8	10
チロシン	0.25	3.07	3.27	182.1	136.1	25	12	10
バリン	0.25	3.11	3.54	118.1	72.1	25	8	10
プロリン	0.25	3.16	3.75	116.1	70.1	50	16	10
アラニン	0.25	3.73	4.13	90.1	44.1	25	8	10
トレオニン	0.25	3.82	4.16	120.0	74.1	25	10	10
グリシン	0.25	4.08	4.51	76.0	30.1	25	5	10
セリン	0.25	4.27	4.56	106.1	60.1	25	8	10
グルタミン酸	0.25	4.71	5.43	148.1	84.1	75	16	10
アスパラギン酸	0.25	5.25	6.14	134.0	74.0	50	15	10
ヒスチジン	0.25	5.59	5.87	156.1	110.0	25	12	10
アルギニン	0.25	6.09	5.91	175.1	70.1	75	28	10
リジン	0.25	6.54	6.63	147.1	84.1	50	16	10

注: すべてのトランジションで、セル加速電圧 = 4 を使用しました。

結果

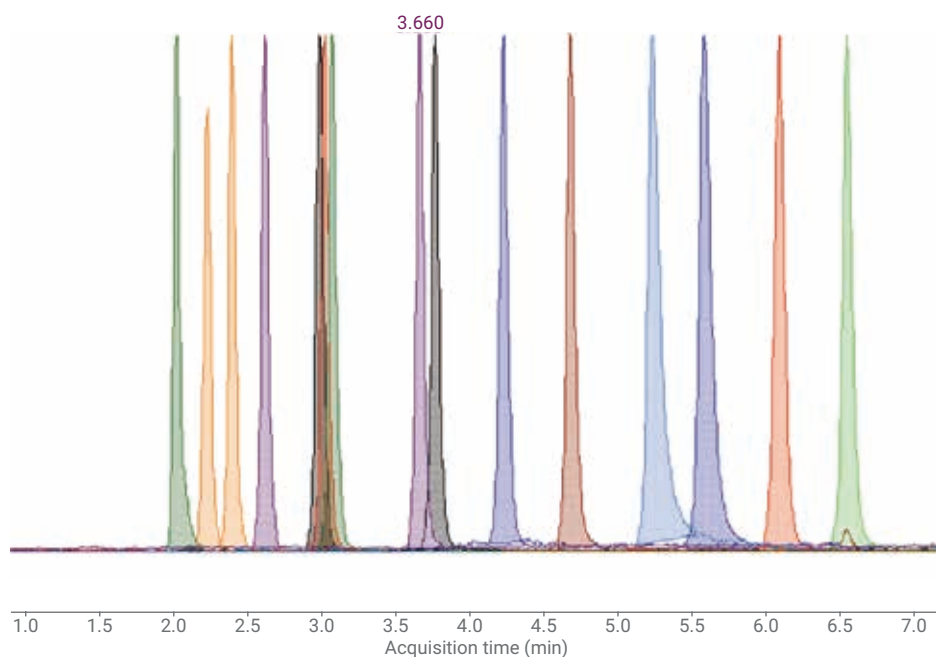


図 1. Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムによるアミノ酸の分離。

ロイシン/イソロイシンの選択性 = 1.08

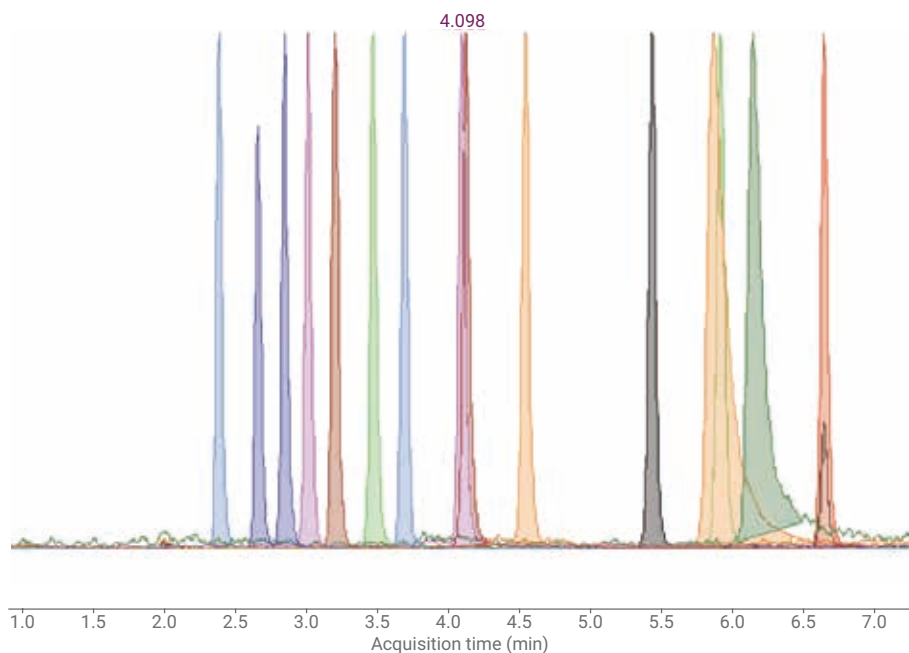


図 2. Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 カラムによるアミノ酸の分離。
ロイシン/イソロイシンの選択性 - 1.08

結論

- ポジティブモード LC/MS と HILIC を使用することにより、アミノ酸を適切に分析しました。
- Agilent InfinityLab Poroshell HILIC-Z カラムは、全体的に良好なピーク形状を示しましたが、特にアスパラギン酸やヒスチジンのような塩基性化合物において顕著でした。
- Agilent InfinityLab Poroshell HILIC-OH5 カラムは、チロシン、バリン、プロリンなどの早期に溶出するピークに対して良好な分離能を示しました。
- 通常分析が困難なロイシン/イソロイシン同重体は、両方のカラムでベースライン分離されました。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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. 2017
Printed in December 1, 2017
5991-8582JAJP