

## 親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) と LC/MS による植物マトリックス中の 非誘導体化アミノ酸の定量分析

### 著者

Yuxiong Huang, Weiwei Li,  
and Arturo Keller  
University of California,  
Santa Barbara

Tarun Anumol and  
Adam Bivens  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

このアプリケーションノートでは、トリプル四重極 LC/MS を用いてさまざまな非誘導体化アミノ酸を定量分析するためのメソッドについて説明します。植物マトリックス (キュウリ植物組織抽出物) が大量に存在する場合においても、感度、直線性、回収率が優れていることが示されています。

高極性アミノ酸の分離には、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) と、LC/MS 分析にも適する優れた分離能とピーク形状を特長とする Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムを用いました。

## はじめに

植物中には、さまざまなアミノ酸が ppm および ppb レベルで存在しています。従来の研究<sup>1</sup>で示されているように、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) モードで低 pH 溶媒とポジティブモード MS 検出を使用することにより、非誘導体化アミノ酸を優れた分離能および感度で分析できます。このアプリケーションノートでは、植物中のアミノ酸の定量分析においてこれらの条件をさらに最適化しました。

## 実験器具および薬品

試薬はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。超 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、ペンシルベニア州、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  $-70^{\circ}\text{C}$  で保管しました。

- Agilent InfinityLab フィッティング
  - カラム前:** Agilent 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:** Agilent 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/赤シリコンセプタム (p/n 5190-7024)
- 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)
- Agilent InfinityLab 溶媒ボトル、茶色、1,000 mL (p/n 9301-6526)
- Agilent InfinityLab セーフティキャップ、GL45、3 ポート、ベントバルブ x 1 (p/n 5043-1219)
- 遠心分離 (VWR、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)
- 超音波洗浄器 (VWR、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)

## 装置構成

- Agilent 1260 Infinity バイナリポンプ (G1312B)
- Agilent 1260 Infinity オートサンブラ (G7129A)
- Agilent 1260 Infinity サーモスタット付カラムコンパートメント (G1316A)
- 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

## サンプル前処理

アミノ酸標準は規定の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。

次の重水素化および  $^{15}\text{N}$ -濃縮内部標準 (ISTD) を各サンプルに加え、最終濃度 1,500 ng/mL にしました。使用した内部標準は、イソロイシン- $^{15}\text{N}_1$ 、メチオニン- $\text{d}_8$ 、アラニン- $\text{d}_3$ 、グリシン- $\text{d}_2$ 、グルタミン酸- $^{15}\text{N}_1$ 、アスパラギン酸- $\text{d}_3$ 、およびリシン- $\text{d}_8$  です。

キュウリ植物組織抽出物は収穫したてのキュウリ葉から調製し、すぐに液体窒素で急速冷凍しました。冷凍したキュウリ組織を液体窒素内でホモジナイズし、乳鉢と乳棒で微粉体にしてから  $-85^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫に保管しました。抽出では、100 mg の冷凍キュウリ葉粉末を 2 mL エッペンドル

## 分析条件

HPLC	
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z、 2.1 mm × 100 mm、2.7 μm (p/n 685775-924)
移動相 A	20 mM ギ酸アンモニウム水溶液、pH = 3
移動相 B	20 mM 水性ギ酸アンモニウム、pH = 3、9:1 アセトニトリル/水
流量	0.50 mL/min
カラム温度	25 °C
注入量	1 μL
合計分析時間	15 分
グラジエント	時間 (分)    %B
	0            100
	11.5        70
12           100	
MS	
イオン化モード	ESI ポジティブ
ガス温度	330 °C
ガス流量	13.0 L/min
ネブライザ	35 psi
ソースガス温度	390 °C
ソースガス流量	12 L/min
キャピラリ電圧	1,500 V
ノズル電圧	0 V

フ小型遠心管チューブに計量し、1 mL の 0.5 M 水性 HCl を加えました。チューブは 8,000 rpm で 20 分間ボルテックスし、25 °C 水槽内で 20 分間超音波処理してから、20,000 g で 20 分間遠心分離しました。最後に、250 µL の抽出上澄みをすでに ISTD が加えられている LC バイアルに移し、混合物を 20 % ACN 水溶液で 1 mL に希釈しました。

添加回収率試験では、20 % ACN 水溶液で 1 mL に希釈する前の抽出上澄みと ISTD 混合液とともにアミノ酸標準混合物を LC バイアルに加

えました。希釈後のアミノ酸濃度の合計増加量は、500、1,000、および 2,000 ng/mL でした。

### 移動相前処理

200 mM ギ酸アンモニウム原液を水で調製し、ギ酸で pH 3 に調整しました。移動相 A (水性) は原液を水で 9:1 に希釈して調製し、移動相 B (有機) は原液をアセトニトリルで 9:1 に希釈して調製しました (両移動相の最終イオン強度 = 20 mM)。

### データ収集

インデックス	開始時間 (分)	スキャンタイプ	イオンモード	ダイバータバルブ	デルタ EMV	ストア
1	0	dMRM	ESI + Agilent Jet Stream	廃液へ	0	なし
3	2.5	dMRM	ESI + Agilent Jet Stream	MS へ	200	あり

### MS パラメータ

化合物	リテンションタイム (分)	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン				フラグメンタ (V)
			定量イオン (m/z)	コリジョンエネルギー (V)	定性イオン (m/z)	コリジョンエネルギー (V)	
<b>アミノ酸</b>							
フェニルアラニン	2.95	166.1	120.1	13	103	29	80
ロイシン	3.38	132.1	86.1	9	30.2	17	75
トリプトファン	3.41	205.1	188.0	8	146	20	80
イソロイシン	3.75	132.1	86.1	9	44.2	25	75
メチオニン	4.22	150.1	104.0	9	56.1	17	75
バリン	4.95	118.1	72.1	9	55.1	25	70
プロリン	4.96	116.1	70.1	17	43.2	37	75
チロシン	5.01	182.1	136.1	13	91.1	33	85
システイン	5.63	122.0	59.1	29	76	13	65
アラニン	6.61	90.1	44.2	9	45.3	40	40
トレオニン	6.72	120.1	74.1	9	56.1	17	75
ホモセリン	6.91	120.1	74.1	9	56.1	21	70
グリシン	7.00	76.0	30.3	12	NA	NA	35
グルタミン	7.23	147.1	84.1	17	130.1	9	80
セリン	7.26	106.1	88.1	8	42.2	24	67
アスパラギン	7.31	133.1	87.1	5	74	17	75
グルタミン酸	7.68	148.1	84.1	17	130	5	75
シトルリン	7.89	176.1	159.1	9	70.1	25	80
アスパラギン酸	8.38	134.0	88.1	9	74	13	70
ヒスチジン	9.06	156.1	110.1	13	83.1	29	90
アルギニン	9.54	175.1	70.1	24	60.1	12	100
リジン	10.16	147.1	84.1	17	130.1	9	75
<b>内部標準</b>							
イソロイシン- <sup>15</sup> N <sub>1</sub>	3.75	133.1	87.1	8	NA	NA	75
メチオニン-d <sub>3</sub>	4.26	158.1	112.1	8	NA	NA	75
アラニン-d <sub>3</sub>	6.61	93.1	47.2	12	NA	NA	40
グリシン-d <sub>2</sub>	7.00	78.1	32.2	12	NA	NA	40
グルタミン酸- <sup>15</sup> N <sub>1</sub>	7.68	149.1	85.1	16	NA	NA	75
アスパラギン酸-d <sub>3</sub>	8.37	137.1	75.0	16	NA	NA	60
リジン-d <sub>3</sub>	10.16	155.2	92.1	20	NA	NA	80

## 結果と考察

よびトレオニン/ホモセリン同重体の両方において、ベースライン分離が達成されました (図 3)。

### クロマトグラフィー

Agilent InfinityLab Poroshell 120 2.7  $\mu\text{m}$  HILIC-Z の優れたピーク形状と分解能を利用することにより、アミノ酸の複雑な混合物を 15 分未満で分離できました (図 1 および 2)。また、ロイシン/イソロイシン同重体お

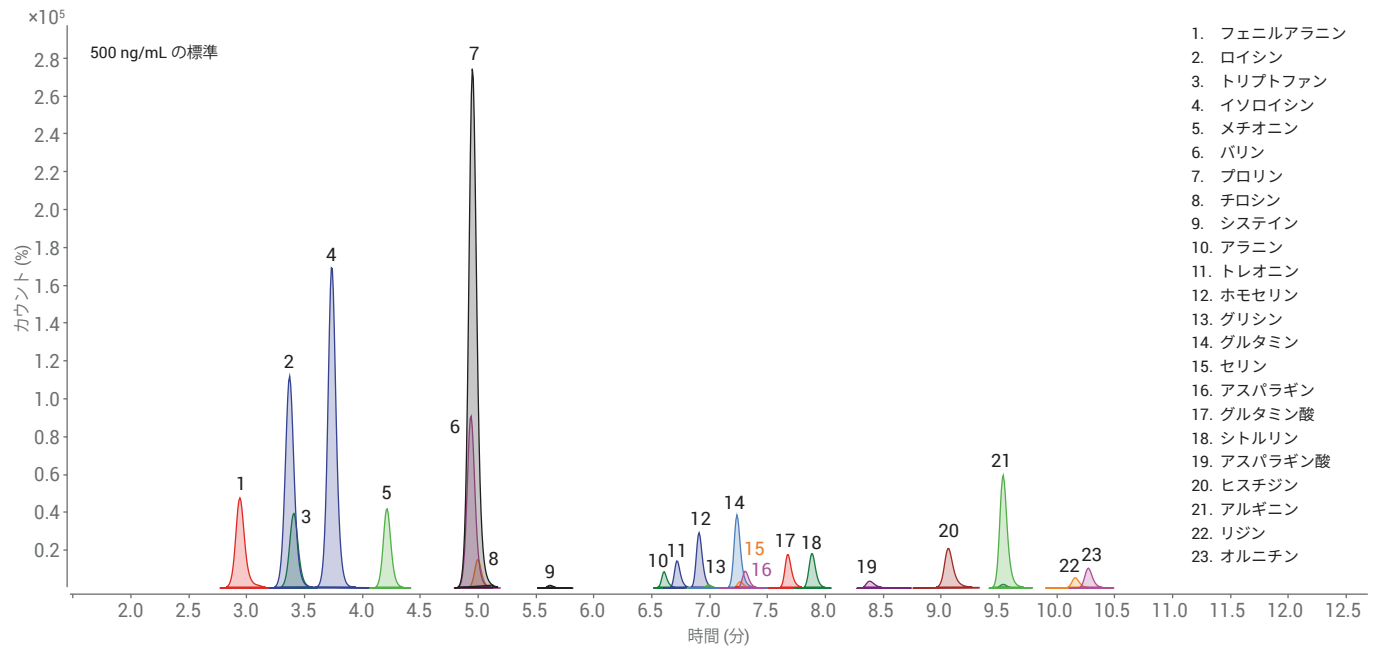


図 1. 濃度 500 ng/mL におけるアミノ酸標準

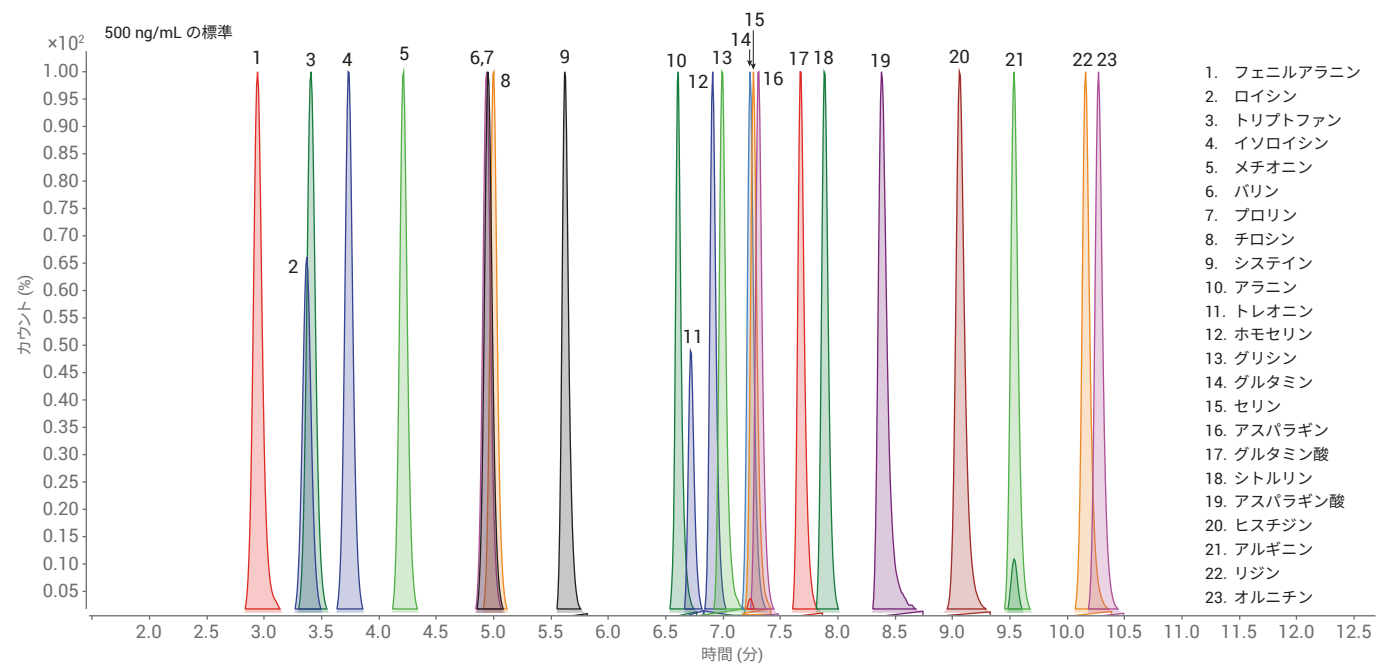


図 2. 図 1 のアミノ酸標準をピーク高により正規化

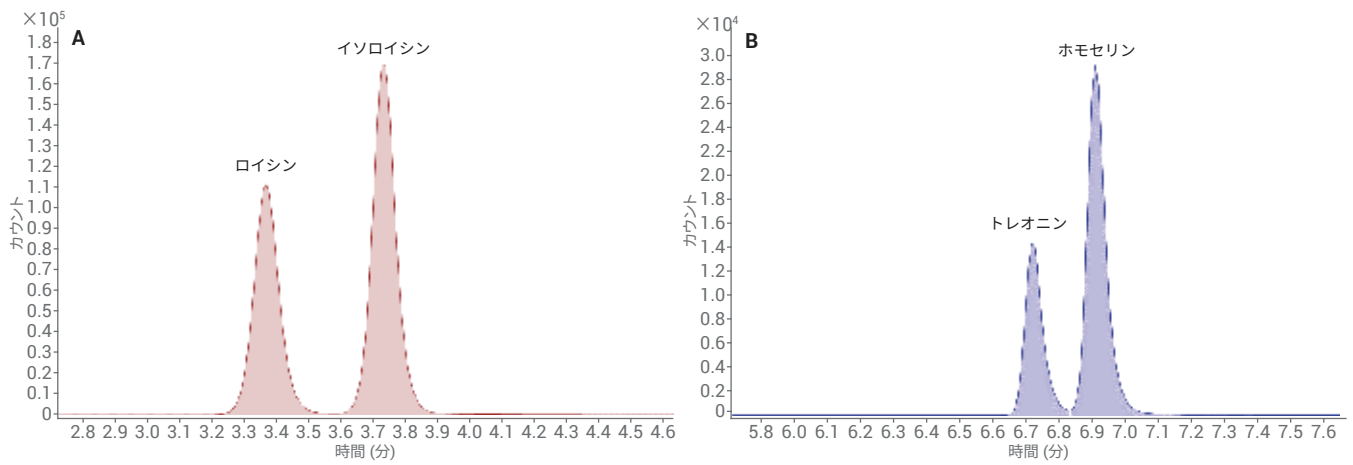


図 3. 同量体ロイシン/イソロイシン (A) トレオニン/ホモセリン (B) の分離

### 定量分析

各アミノ酸の定量は、50 ~ 10,000 ng/mL の 7 ポイント検量線と、近接して溶出する同位体標識内部標準との比較を組み合わせ実施しました (図 4)。レスポンスとリテンションタイムの相対標準偏差 (RSD) より、分析における良好な再現性が示されました (表 2)。

表 1. キャリブレーションとシグナル/ノイズ比 (S/N)

化合物	内部標準	検量線の R <sup>2</sup> (50~10,000 ng/mL)	50 ng/mL での S/N
フェニルアラニン	イソロイシン- <sup>15</sup> N <sub>1</sub>	0.9999	281.2
ロイシン	イソロイシン- <sup>15</sup> N <sub>1</sub>	0.9979	244.4
トリプトファン	イソロイシン- <sup>15</sup> N <sub>1</sub>	0.9999	748.7
イソロイシン	イソロイシン- <sup>15</sup> N <sub>1</sub>	0.9978	379.4
メチオニン	メチオニン-d <sub>3</sub>	0.9996	2315.6
バリン	アラニン-d <sub>3</sub>	0.9981	349.2
プロリン	アラニン-d <sub>3</sub>	0.9983	861.3
チロシン	アラニン-d <sub>3</sub>	0.9987	161.4
システイン	アラニン-d <sub>3</sub>	0.9999	121.8
アラニン	アラニン-d <sub>3</sub>	0.9994	94.6
トレオニン	アラニン-d <sub>3</sub>	0.9987	162.0
ホモセリン	アラニン-d <sub>3</sub>	0.9969	336.6
グリシン	グリシン-d <sub>2</sub>	0.9999	10.8
グルタミン	グリシン-d <sub>2</sub>	0.9993	30.8
セリン	グリシン-d <sub>2</sub>	0.9957	3.4
アスパラギン	グリシン-d <sub>2</sub>	0.9994	39.7
グルタミン酸	グルタミン酸- <sup>15</sup> N <sub>1</sub>	0.9978	53.9
シトルリン	アスパラギン酸-d <sub>3</sub>	0.9997	106.5
アスパラギン酸	アスパラギン酸-d <sub>3</sub>	0.9999	32.1
ヒスチジン	アスパラギン酸-d <sub>3</sub>	0.9961	35.6
アルギニン	アスパラギン酸-d <sub>3</sub>	0.9972	184.6
リジン	リジン-d <sub>3</sub>	0.9992	37.2

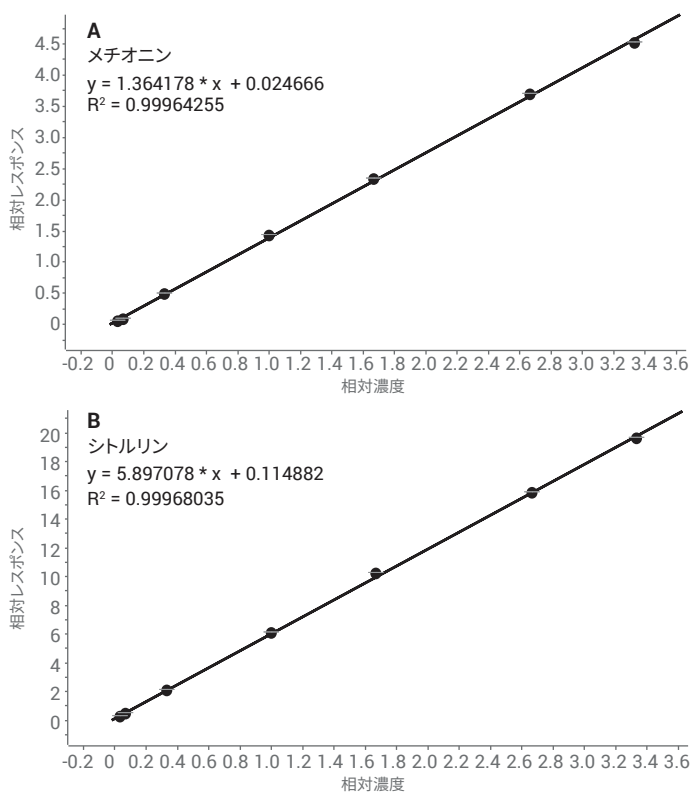


図 4. メチオニン (A) とシトルリン (B) の検量線の例

マトリックスの存在下での堅牢性を確認するために、添加回収率試験を実施しました。キュウリ組織のサンプルを分析した後、同じサンプルに500、1,000、および2,000 ng/mLのアミノ酸標準をスパイクしました。これらの異なるレベルでの回収率を、測定濃度値対理論値の割合で示します(表3)。

表 2. 2,500 ng/mL のアミノ酸をスパイクしたキュウリ植物組織抽出物サンプルの再現性 (n=15)

化合物 (2,500 ng/mL)	レスポンス RSD (%)	RT RSD (%)
フェニルアラニン	0.99	0.35
ロイシン	2.97	0.43
トリプトファン	0.65	0.24
イソロイシン	2.08	0.37
メチオニン	0.96	0.35
バリン	1.21	0.73
プロリン	1.04	0.58
チロシン	8.77	0.69
システイン	1.25	0.07
アラニン	3.76	0.00
トレオニン	1.51	0.10
ホモセリン	1.20	0.00
グリシン	1.82	0.06
グルタミン	0.73	0.06
セリン	1.08	0.08
アスパラギン	1.38	0.00
グルタミン酸	1.19	0.00
シトルリン	1.29	0.05
アスパラギン酸	2.77	0.13
ヒスチジン	0.70	0.06
アルギニン	0.68	0.09
リジン	1.02	0.06
オルニチン	0.63	0.08

表 3. アミノ酸標準混合物をスパイクしたキュウリ組織抽出物の回収率試験

アミノ酸	プレスパイク 濃度 (ng/mL)	% 回収率 (500 ng/mL スパイク)	% 回収率 (1,000 ng/mL スパイク)	% 回収率 (2,000 ng/mL スパイク)
フェニルアラニン	1078.36	102	103	102
ロイシン	2216.61	119	117	114
トリプトファン	1218.47	125	126	114
イソロイシン	493.07	100	99	96
メチオニン	223.24	77	81	77
バリン	1445.24	105	111	93
プロリン	524.56	91	102	98
チロシン	704.05	101	105	93
システイン	336.61	94	109	115
アラニン	5046.64	70	70	89
トレオニン	923.93	101	105	96
ホモセリン	157.02	92	105	103
グリシン	293.78	101	92	90
グルタミン	1861.98	139	120	124
セリン	1794.39	110	100	93
アスパラギン	1145.53	103	92	93
グルタミン酸	7358.15	114	79	92
シトルリン	<MDL	87	86	85
アスパラギン酸	6465.33	107	91	92
ヒスチジン	4130.88	118	103	127
アルギニン	1083.89	96	91	93
リジン	2380.70	92	92	94
オルニチン	<MDL	108	138	160

MDL - メソッド検出限界

## 結論

Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムの優れた分離能とピーク形状を、強力な Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS システムと組み合わせて、植物組織中の非誘導体化アミノ酸を微量濃度まで定量しました。このメソッドは、植物マトリックス中においても定量、再現性、堅牢性が達成されることが示されました。

## 参考文献

1. A. Kennedy, A. Bivens. Methods for the Analysis of Underivatized Amino Acids by LC/MS. Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-8582EN, **2017**.

ホームページ

**[www.agilent.com/chem/jp](http://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](mailto: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, January 23, 2018  
5991-8922JAJP

