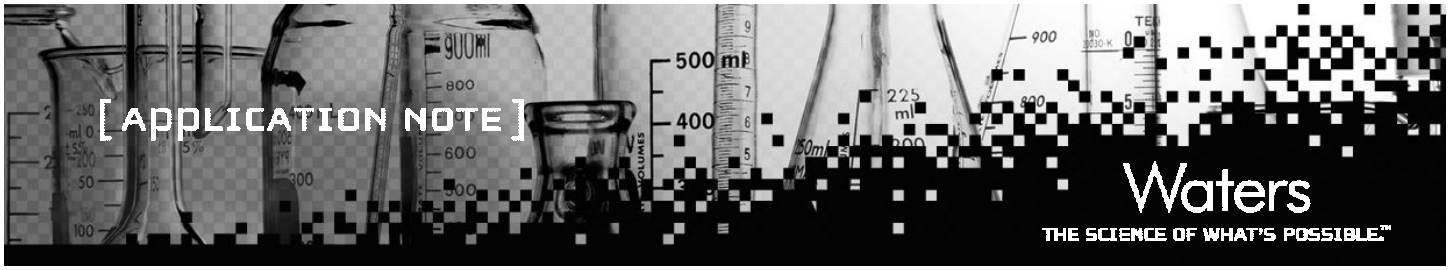


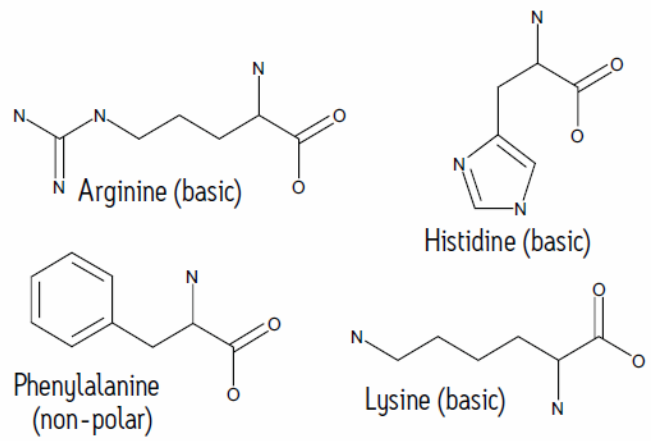
No. 720002003J

ACQUITY UPLC®/MS/MSによるアミノ酸の直接分析法(Ⅱ)
ー塩基性アミノ酸の分析ー

概要

アミノ酸は食品・栄養補助食品・医薬・生化学を始め広い分野で応用されている化合物です。現在多用されているアミノ酸のLC分析法は、高感度化とカラムへの保持を強めるためにプレカラムまたはポストカラムで誘導体化を行うものです。これらの方法は前処理に時間を要することが難点と言えます。
誘導体化を行わないアミノ酸の直接分析法は簡便で応用しやく、夾雑物や分解の影響が少ないという利点があります。
前報ではACQUITY UPLC®/MS/MS法を用いたアミノ酸の直接分析法について説明しました[1)]。イオンペア法による逆相系分析条件で酸性アミノ酸と低極性のアミノ酸が保持され良好な定量化結果が得られました。このアプリケーションノートでは塩基性アミノ酸と低極性アミノ酸に適する分析条件について説明します。

図1. アルギニン・フェニルアラニン・ヒスチジン・リジンの構造



UPLC®条件

装置　：Waters ACQUITY UPLC® システム
カラム　：ACQUITY BEH C18 1.7μm 2.1x 50 mm
カラム温度：45 ℃
流速　：0.8 mL/min
移動相A　：0.1%ペンタデカフルオロオクタン酸(PDFOA),
99.5%:0.5%=水:0.1%ギ酸/アセトニトリル,pH5.8
(NH_4OHで)
移動相B　：0.1%PDFOA,
10%:90%=水:0.1%ギ酸/アセトニトリル,pH5.8
(NH_4OHで)
グラジエント条件　：

Time (min)	%A	%B	Curve
0.0	99.9	0.1	6
0.5	98	2	6
2.0	80	20	6
4.0	60	40	6
4.5	0.1	99.9	6
8.0	99.9	0.1	1

MS条件

装置　：Waters Quattro Premier™ XE
イオン化　：ESIポジティブ
キャピラリ電圧　：0.5kV
ソース温度　：130℃
脱溶媒温度　：400℃
脱溶媒ガス：　1000L/hr
コーンガス　：　50L/hr
インタースキャンディレイ　：5ms
インターチャンネルディレイ　：　10ms
デウエルタイム　：　Func1;60ms, Func2; 100ms

試料　：Pierce Amino Acid Standard H Mix
(Protein Hydrolysate)
検量線作成のため1/100～1/500000に0.1%ギ酸水で希釈

MS/MS条件の最適化
標準サンプルをインフュージョンで導入しMRMトランジション条件を最適化。

ACQUITY UPLC® /Quattro Premier™ XE システム

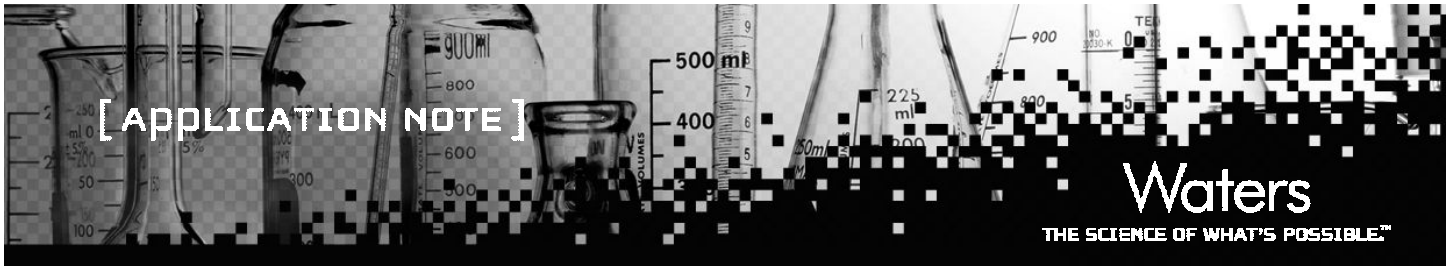


図2. アミノ酸4種のMRMクロマトグラム

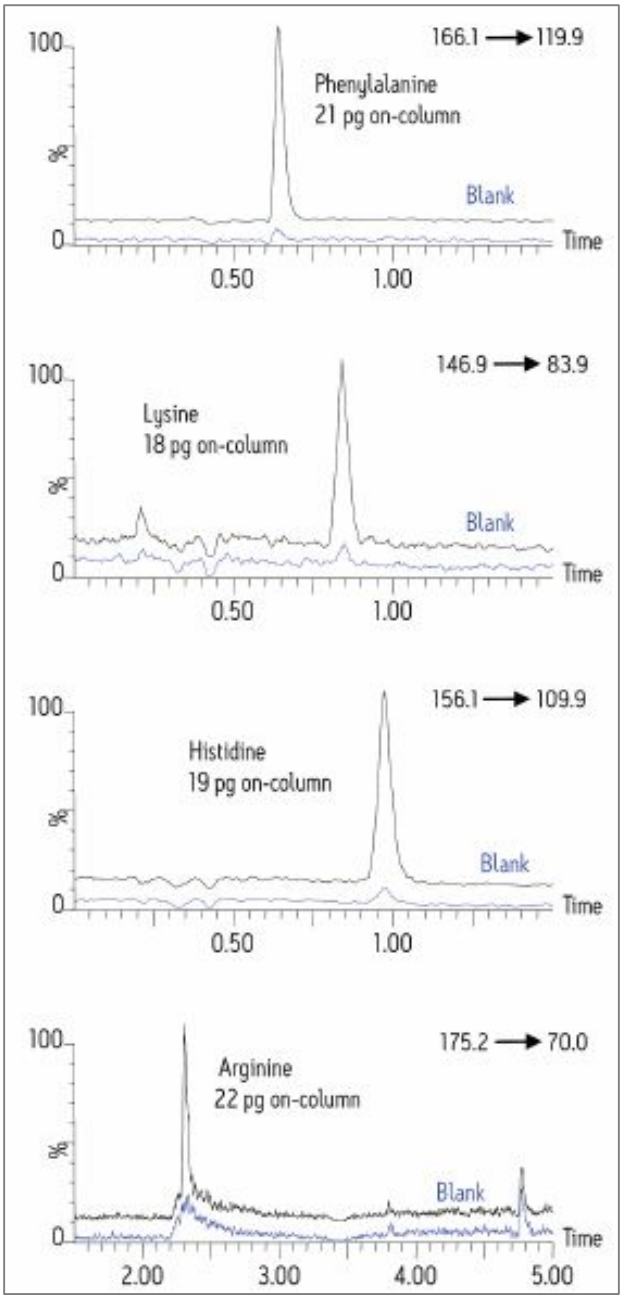


図2にはフェニルアラニン・リジン・ヒスチジン・アルギニンのMRMクロマトグラムを示します。右上の数字はMRMトランジションを表します。青いラインは0.1%ギ酸を注入したブランクです。pH5.8では極性の高い酸性アミノ酸は保持されず、塩基性アミノ酸と低極性アミノ酸を保持することができます。
MRMモードによる測定はアミノ酸のような低分子量化合物に対し高い感度と特異性を示します。

図3にはこれらアミノ酸の検量線を示します。いずれもR^2が0.995以上と直線性は良好です。

表1には検出限界をまとめました。これらのアミノ酸4種では、0.39～2.17pgとなっています。

図3. アミノ酸4種の検量線

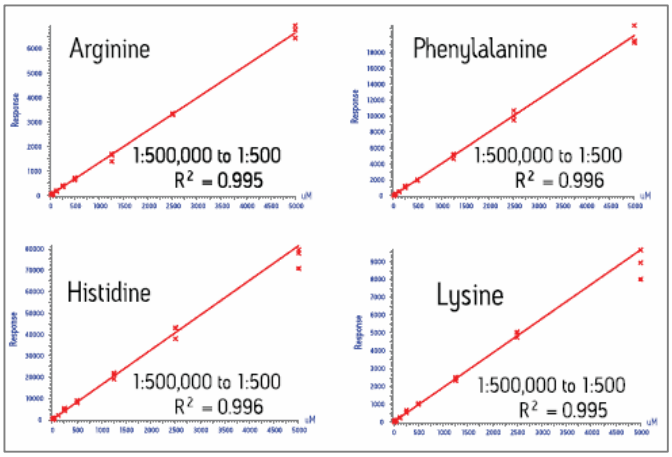


表1. アミノ酸17種の定量結果

Amino Acid	LOD µM	LOD pg on-column
Phenylalanine	0.0005 µM	0.41 pg
Arginine	0.0025 µM	2.17 pg
Histidine	0.0005 µM	0.39 pg
Lysine	0.0010 µM	0.73 pg

参考文献

1. Alden P, Yu K, Plumb R, Waters Application Note, No. 720002002EN, Mar. 2007.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™
日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10カトキチ新大阪ビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡