

オートサンプラによる自動希釈・誘導体化を用いたアミノ酸の分析

著者

野田 莉帆
内藤 厚子
澤田 浩和

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

Agilent オートサンプラのインジェクタプログラムにより、キャリブレーション溶液の調製などの分注のワークフローを自動化できます。分注手順の自動化により、手作業で生じる時間と費用を低減できます。AdvanceBio AAA は、試薬/標準溶液、カラム、およびアプリケーションサポートを含む総合的なソリューションです。アミノ酸の誘導体化は、Agilent オートサンプラによりオンラインで自動化されます。手間にかかる手作業が不要になり、反応結果の再現性も高まります。これらの技術を組み合わせ、検量線試料調製から、誘導体化まで自動化したワークフローをご紹介します。

測定システム

Agilent 1260 Infinity III Prime LC System

G7104C フレキシブルポンプ

G7117C ダイオードアレイ検出器

G7129C バイアルサンブラ

G7130A 内蔵型カラムオープン

OpenLab CDS 2.8

バイアルおよびキャップ

5182-0716 スクリューバイアル 2 mL 茶色

5183-2078 赤、スリット入り、PTFE/シリコンセプタム

5183-2086 不活性化ガラス平底インサート 400 μ L

試薬

- ・ホウ酸バッファ (PN : 5061-3339)
- ・OPA 試薬 (PN : 5061-3335)
- ・FMOC 試薬 (PN : 5061-3337)
- ・注入希釈液 (移動相 A 10 mL にリン酸を200 μ L 添加)
- ・アミノ酸標準溶液 (PN : 5061-3330)
- ・アミノ酸補助キット (PN : 5062-2478)

分析条件

表 1. 分析条件

パラメータ	
移動相 A	20 mM リン酸水素 2 ナトリウム pH 8.0
移動相 B	アセトニトリル/メタノール/水 = 45/45/10, v/v/v
B conc.	4 % (0 - 0.35 min) \rightarrow 57 % (13.4 min) \rightarrow 100 % (13.5 - 17 min) \rightarrow 4 % (17.1 - 18 min)
ニードル洗浄	移動相 A 3s
カラム	AdvancedBio アミノ酸分析 3.0 \times 100 mm, 2.7 μ m (PN : 695975-322)
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
UV	338 nm BW 4 nm, Ref 390 nm BW 20 nm (OPA) 262 nm BW 16 nm, Ref 324 nm BW 8 nm (FMOC)

オートサンブラに希釈溶媒と高濃度標準品、インサートをセットした空バイアルを準備し、インジェクタプログラムのワークフロー選択 (図 1) で、段階希釈を選択しました。

サンプル容量 30 μ L、3 倍ずつ段階希釈した検量線用試料を調製するメソッドとしました (図 2 参照)。

アミノ酸の誘導体化は図 3 に示すアミノ酸分析用プロトコルを使用しました。各反応試薬のロケーションを入力し、サンプルや試薬の容量は必要に応じて変更しました。

シーケンスの作成例を図 4 に示します。1 行目に段階希釈のプレップメソッドを挿入し自動で検量線試料を調製し、次行以降の検量線試料としました。

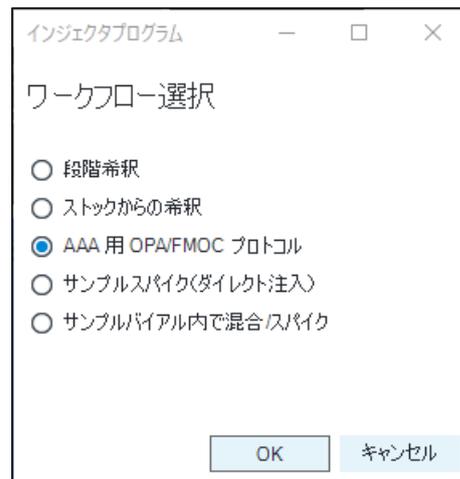


図 1. インジェクタプログラムワークフロー選択

サンプルプレップメソッド - 希釈.smx



▲ 全般
プロパティ

▲ 機器の設定
サンプル

ワークフロー

段階希釈 ワークフロー選択

パラメータ

サンプル吸引 ロケーション: サンプル サンプル容量: 30.00 μL

希釈溶媒の吸引 ロケーション: P2-A1 希釈率 1: 3 希釈液容量: 60.00 μL

希釈

サンプルロケーション	ターゲット中のサンプル容量 [μL]
▶ P2-A2	30.00
P2-A3	10.00
P2-A4	3.33
P2-A5	1.11
P2-A6	0.37
P2-A7	0.12

混合モード: エア-バブル 繰り返し: 3 速度: ● デフォルト ● 最高 ● 20 μL/min

追加 削除

図 2. サンプル希釈のインジェクタプログラム

サンプルプレップメソッド - AA.smx

詳細設定

▲ 全般
プロパティ

▲ 機器の設定
サンプル

ワークフロー

AAA 用 OPA/FMOC プロトコル ワークフロー選択

パラメータ

サンプル容量: 1.00 μL ホウ酸バッファー容量: 2.50 μL 混合 1 エア-容量: 4.00 μL ロケーション: P1-A1 繰り返し: 10

OPA 試薬容量: 0.50 μL ロケーション: P1-A2 FMOC 試薬容量: 0.40 μL 混合 2 エア-容量: 4.40 μL ロケーション: P1-A3 繰り返し: 10

注入希釈液量: 20.00 μL 混合 3 エア-容量: 40.00 μL ロケーション: P1-A4 繰り返し: 5

図 3. アミノ酸誘導体化のインジェクタプログラム

シーケンス - 20241122 134719Run1.sqx

テンプレートの適用 ▶

希釈行

バイアル	サンプルタイプ	タイプ	レベル	測定メソッド	サンプルプレッ...	解析メソッド	注入回数	注入量	サンプル名	倍率 1
1	P1-B9	サンプル		AA-prep.amx	希釈.smx		1	メソッド設定を使用	検量線Sample prep	1.00000
2	P1-B1	ブランク		AA.amx	AA.smx	AArep.pmx	1	メソッド設定を使用	blank	1.00000
3	p2-a7	キャリブレーション	検量線をすべて...	AA.amx	AA.smx	AArep.pmx	1	メソッド設定を使用	500/3^6	1.00000
4	p2-a6	キャリブレーション		AA.amx	AA.smx	AArep.pmx	1	メソッド設定を使用	500/3^5	1.00000
5	p2-a5	キャリブレーション		AA.amx	AA.smx	AArep.pmx	1	メソッド設定を使用	500/3^4	1.00000
6	p2-a4	キャリブレーション		AA.amx	AA.smx	AArep.pmx	3	メソッド設定を使用	500/3^3	1.00000
7	p2-a3	キャリブレーション		AA.amx	AA.smx	AArep.pmx	1	メソッド設定を使用	500/3^2	1.00000
8	p2-a2	キャリブレーション		AA.amx	AA.smx	AArep.pmx	1	メソッド設定を使用	500/3^1	1.00000
9	p1-B9	キャリブレーション		AA.amx	AA.smx	AArep.pmx	1	メソッド設定を使用	500/3^0	1.00000
10	P1-B1	ブランク		AA.amx	AA.smx	AArep.pmx	1	メソッド設定を使用	blank	1.00000
11	P2-b1	サンプル		AA.amx	AA.smx	AArep.pmx	1	メソッド設定を使用	Sample1/10	10.00000
12	P1-B1	ブランク		AA.amx	AA.smx	AArep.pmx	1	メソッド設定を使用	blank	1.00000

アミノ酸誘導体化

図 4. シーケンス設定例

結果

図 5 に 500 μM におけるクロマトグラムを、表 2 に直線性の範囲と決定係数を示します。20 種のアミノ酸の分離は良好で、0.686 - 500 μM の広い範囲での直線性を確認できました。

手動ピペティングで希釈し、検量線を作成した結果と比較すると、決定係数・回帰式共に同等の結果が得られました。図 6 にアスパラギン酸の検量線の比較を示します。決定係数はどちらも 0.999 以上、回帰式の傾きは 0.472、0.471 と同等の結果でした。

表 2. 検量線範囲と決定係数

化合物名	検量線範囲 (μM)	決定係数
Asp	0.686-500	0.99973
Glu	0.686-500	0.99954
Asn	0.686-500	0.99968
Ser	0.686-500	0.99952
Gln	0.686-500	0.99963
His	0.686-500	0.99948
Gly	0.686-500	0.99972
Thr	0.686-500	0.99982
Arg	0.686-500	0.99965
Ala	0.686-500	0.99968
Tyr	0.686-500	0.99975
Cystine	0.686-500	0.99950
Val	0.686-500	0.99971
Met	0.686-500	0.99978
Trp	0.686-500	0.99966
Phe	0.686-500	0.99993
Ile	0.686-500	0.99993
Leu	0.686-500	0.99975
Lys	0.686-500	0.99845
Pro	0.686-500	0.99993

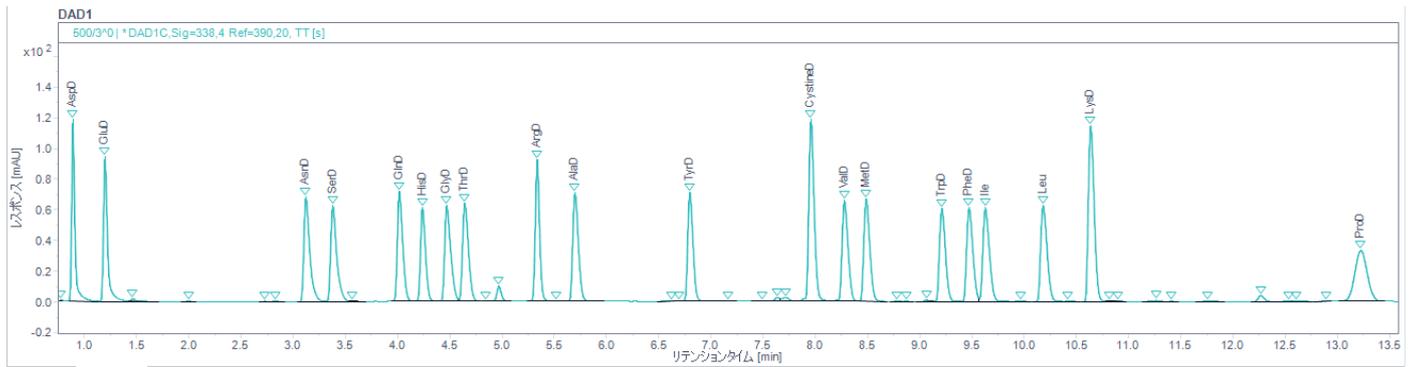


図 5. 各 500 μM におけるクロマトグラム

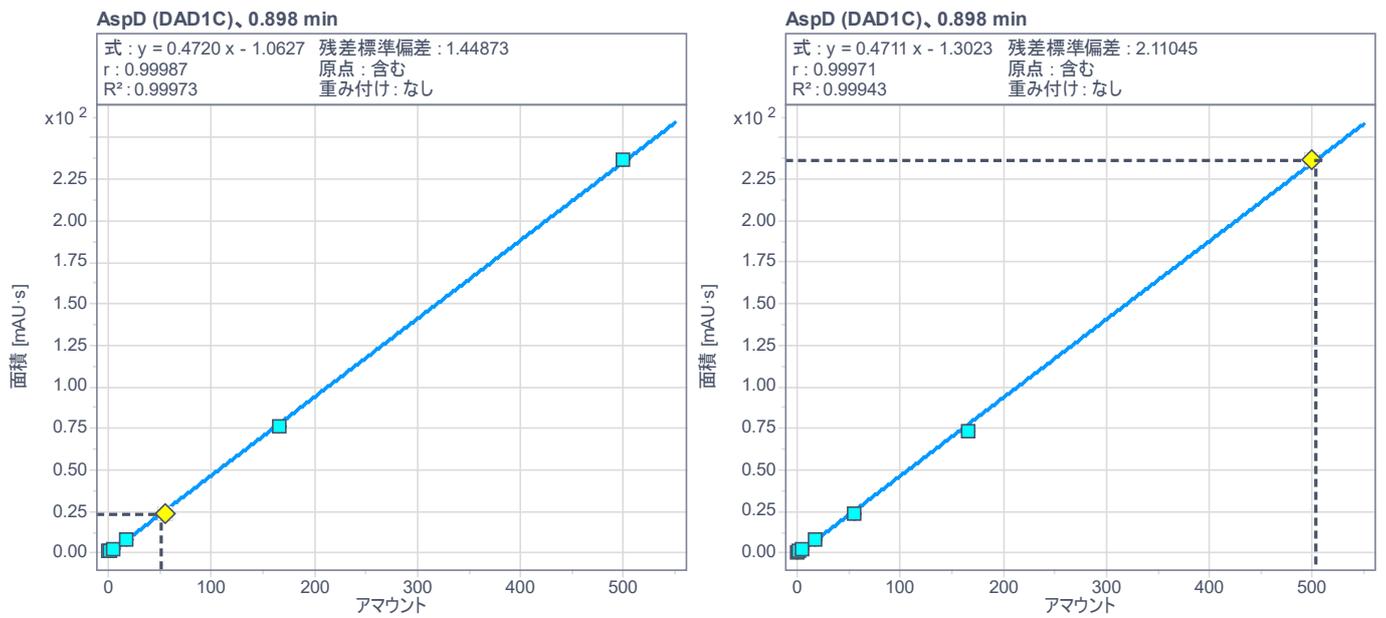


図 6. サンプラによる自動希釈による検量線 (左) と手動ピペッティング希釈による検量線 (右) の比較

まとめ

オートサンプラに標準搭載されている、インジェクタプログラムを用いて、検量線試料の調製とアミノ酸誘導体化を自動で行いました。インジェクタプログラムのワークフローを選択することで、簡便に設定可能で、精度の高い分析が可能でした。

参考

1. 5994-1704JAJP オートサンプラによるピペッティングの自動化
2. 5991-7694JAJP 自動プレカラム誘導体化アミノ酸分析

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマ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いません。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。

DE39442797

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2025
Printed in Japan, January 9, 2025
5994-8062JAJP