

AdvanceBio AAA ソリューション

自動プレカラム誘導体化アミノ酸分析

分析の手引き



アミノ酸分析ソリューション

アミノ酸分析の信頼性と効率を高めるトータルソリューション

Agilent AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA) は、Agilent InfinityLab LC シリーズの機器およびカラム技術のメリットと実績あるプレカラム誘導体化試薬を組み合わせ、ワークフローの効率を最大限に高めるトータルソリューションです。定評ある AdvanceBio ファミリーの製品として、タンパク質、抗体、複合体、新規生物物質、バイオ医薬品の徹底的な特性解析に必要な一貫性と卓越した性能を提供します。

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。InfinityLab LC シリーズの最新機器とカラム技術を活用し、高速・高感度の自動アミノ酸分析を実現します。アミノ酸の誘導体化は、Agilent 1260 Infinity II オートサンプラによりオンラインで自動化されます。手間の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。AdvanceBio AAA カラムは、サブ 2 μm カラム (内径 2 μm 以下のカラム) に匹敵する分析スピードと分離能を実現します。しかも背圧が半分に抑えられるため、カラムが目詰まりしにくくなります。

AdvanceBio AAA ソリューションは、実績あるアジレントのオルトフタルアルデヒド/9-フルオレニル-メチルクロロギ酸エステル (OPA/FMOC) 試薬によるアミノ酸誘導体化をベースとしています。これらの試薬を AdvanceBio AAA カラムおよび標準溶液と組み合わせることで、スピードと感度を兼ね備えた最適な定量および定性アミノ酸分析が実現します。このガイドでは、AdvanceBio AAA ソリューションを使用したタンパク質/ペプチド加水分解物中の一般的なアミノ酸の分離プロトコルをご紹介します。



エキスパートによる
アプリケーション
およびテクニカルサポート



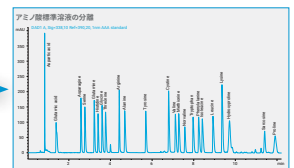
調製済みの
AdvanceBio AAA
試薬および標準溶液



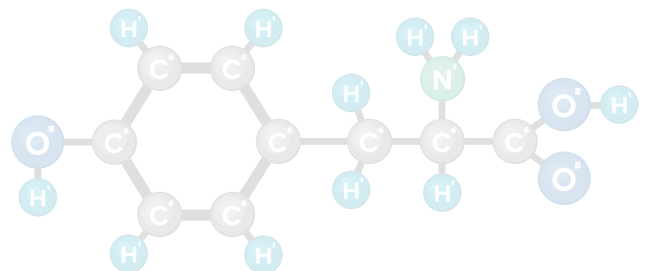
LC 分析の効率を高める
アジレントの LC システム



AdvanceBio AAA カラム
高速で確実なアミノ酸分離



信頼性の高いデータを
高速分析

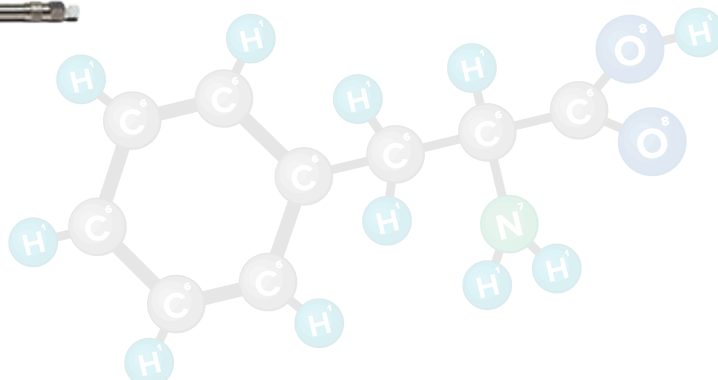
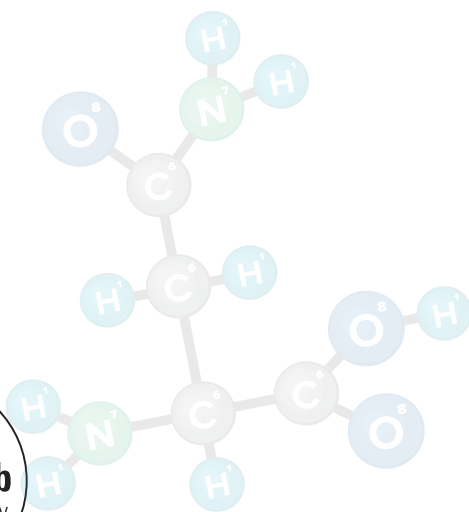
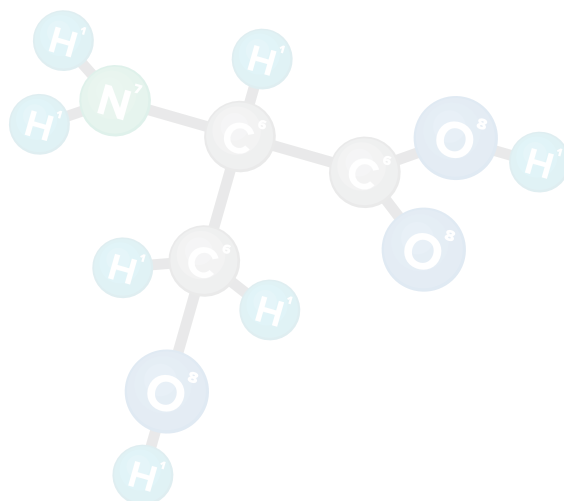


AdvanceBio AAA カラム: 表面多孔質粒子 (SPP) 技術

AdvanceBio AAA カラムには、アジレントの革新的な 2.7 μm 表面多孔質粒子 (SPP) Poroshell 技術が採用されています。粒子は 1.7 μm の硬質コアと 0.5 μm の多孔性層で構成されています。

この 2.7 μm の SPP は、サブ 2 μm 全多孔質粒子の 50 ~ 60 % の背圧で 80 ~ 90 % の分離効率を実現します。全多孔質粒子よりも粒径分布が狭いため、カラムベッドの均一性が高く、カラム内での分散が低減します。また、多孔性層が薄いため、物質移動抵抗は低くなります。さらに、カラムに組み込まれた 2 μm のフリットにより、目詰まりが 3.5 μm および 5 μm カラムと同程度に抑えられます。

最近まで、すべてのシリカベースの SPP 材料は、高 pH のバッファにおいては寿命が限られていました。寿命を延ばすためには、表面修飾や特殊な結合修飾によってベースとなる粒子を保護する必要があります。AdvanceBio AAA カラムは、アジレント独自のプロセスにより粒子表面が化学修飾され、高 pH 条件下でのシリカの溶出を防ぐ有機層が形成されています。



AdvanceBio AAA カラム: 表面多孔質粒子 (SPP) 技術

AdvanceBio AAA カラムは、アミノ酸分析に最適な選択性を備えています。

高速で確実なアミノ酸分離

- サブ 2 μm カラムと同等のスピードと分離能を半分の背圧で実現
- 2 μm フリットにより汚れたサンプルにも対応
- 高 pH における安定性とカラム寿命を高める独自の化学修飾
- カラム寿命をさらに延ばして運用コストを削減するガードカラム

信頼性をもたらすコンスタントな効率

- 最大 60 MPa、5 mL/min のパワーレンジによるスピードと分離能の向上
- インジェクタプログラミングによる自動オンライン誘導体化
- ダイオードアレイ技術に基づく多波長同時検出の感度向上
- フルスペクトル検出による同定およびピーク純度分析
- あらゆる HPLC および UHPLC アプリケーションに 100 % 対応

アジレントの検出器 - 多様なニーズに柔軟に対応

多波長検出器:

妥協のない高感度で多波長同時検出

ダイオードアレイ検出器 - スペクトルデータを高速採取:

選択性を高めながらマトリックス効果を抑制し、正確な同定とピーク純度分析を実現

蛍光検出器:

マルチシグナルモードで高感度を実現



圧倒的な信頼性:

Agilent AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA)

優れた感度と再現性で生体サンプル中のアミノ酸を高速分離できます。

AAA 分析のステップ

1. HPLC 移動相の調製
2. アミノ酸標準溶液の調製
3. 内部標準 (ISTD) 原液の調製
4. オンライン誘導体化の実施
5. 検出パラメータの設定
6. ハイスループットのルーチン分析の実行
7. 欧州薬局方 (EP) に準拠したシステム適合性の保証
8. 細胞培地およびタンパク質加水分解物標準溶液への適用



ステップ 1:

HPLC 移動相の調製

移動相 A:

10 mM Na₂HPO₄ および 10 mM Na₂B₄O₇ pH 8.2

1 L の移動相を調製するには、1.4 g の無水 Na₂HPO₄ および 3.8 g の Na₂B₄O₇・10H₂O を計量し、全量を 1 L にします。1.2 mL の濃塩酸で約 pH 8.4 に調整してから、濃塩酸をさらに数滴加えて最終 pH を 8.2 に調整します。pH の調整前に、ホウ酸ナトリウムを完全に溶解します。0.45 μm の再生セルロース膜 (p/n 3150-0576) でろ過します。

移動相 B:

アセトニトリル:メタノール:水 (45:45:10、v:v:v)

すべての移動相溶媒には、HPLC グレードを使用します。

移動相 A は移動相 B よりも消費量が多いため、移動相 B 1 L に対して移動相 A を 2 L 調製することをおすすめします。

注入希釈液

注入希釈液は、100 mL の移動相 A と 0.4 mL の濃リン酸の混合液です。この溶液は 4 °C で保管してください。

0.1 N 塩酸

拡張アミノ酸および内部標準原液は、0.1 N 塩酸溶液で調製します。0.1 N 塩酸を前処理するために、少し水を入れた 500 mL メスフラスコに 4.2 mL 塩酸 (36 %) を加えます。混合してメスアップします。4 °C で保存します。

誘導体化試薬

誘導体化試薬 (ホウ酸バッファ、OPA、および FMOC) は、アジレントから提供されている調製済みの溶液です。容器からそのままバイアルに移して使用できます。以下の点にご注意ください。

- OPA は酸化を防ぐため、不活性化ガスをアンブルに封入して出荷されています。OPA は、開封後約 7 ~ 10 日間使用可能です。OPA は 100 μL ずつマイクロバイアルインサートに移し、冷蔵庫で保管することをおすすめします。OPA のマイクロバイアルは毎日交換してください。
- FMOC は乾いた空気中では安定した状態ですが、水分に触れると劣化します。FMOC も 100 μL ずつマイクロバイアルインサートに移し、冷蔵庫で保管してください。OPA と同様に、FMOC アンブルの使用期限は 7 ~ 10 日です。
- ホウ酸バッファは、1.5 mL オートサンプリングバイアルに直接移して使用できます。バイアルインサートは不要です。3 日ごとに交換してください。

ステップ 2:

アミノ酸標準溶液の調製

アジレントでは、検量線の作成用に、アミノ酸 (AA) 17 種の溶液を 5 種類の濃度 (10 pmol/μL ~ 1 nmol/μL) でご用意しています。標準溶液は 4 °C で保管してください。

拡張アミノ酸 (EAA) を調製するには、以下のアミノ酸を計量します。

- アスパラギン 59.45 mg
- ヒドロキシプロリン 59.00 mg
- グルタミン 65.77 mg
- トリプトファン 91.95 mg

計量したアミノ酸を 25 mL メスフラスコに入れ、半量まで 0.1 N 塩酸を加え、溶解するまで振とうするか超音波処理します。次に、標線まで水を加え、各アミノ酸の総濃度を 18 nmol/μL にします。

高感度 EAA 原液を調製する場合は、この標準感度溶液 5 mL を水 45 mL で希釈します (1.8 nmol/μL)。拡張アミノ酸を含む溶液は、室温では不安定な状態です。この溶液は冷凍保存しておき、感度が低下する兆候が見られたら廃棄してください。



ステップ 3:

内部標準 (ISTD) 原液の調製

一級アミノ酸 ISTD 原液を調製する場合は、ノルバリン 58.58 mg を計量して 50 mL メスフラスコに入れます。二級アミノ酸 ISTD 原液を調製する場合は、サルコシン 44.54 mg を計量して同じ 50 mL メスフラスコに入れます。半量まで 0.1 N 塩酸を加え、溶解するまで振とうするか超音波処理します。標線まで水を加え、各アミノ酸の最終濃度を 10 nmol/μL にします (標準感度)。高感度 ISTD 原液を調製する場合は、この標準感度溶液 5 mL を水 45 mL で希釈します。高感度 ISTD の各アミノ酸の最終濃度は 1 nmol/μL です。4 °C で保存します。

検量線の作成には、実験のニーズに応じて 2 ~ 5 種類の濃度の標準溶液を使用します。「標準感度」分析用の 3 点検量線を作成する場合は、100 pmol/μL、250 pmol/μL、および 1 nmol/μL の標準溶液を使用するのが一般的です。

内部標準またはその他のアミノ酸 (拡張アミノ酸など) を加える場合は、以下の表に従ってください。表 1 は、UV 分析で一般的に使用される「標準感度」の濃度です。表 2 は、「高感度」の蛍光分析に使用される一般的な濃度です。

表 1. 標準感度用標準溶液

| | 最終的な AA 溶液の濃度 (pmol/μL) | | |
|--------------------------------------|-------------------------|---------------|---------------|
| | 900 | 225 | 90 |
| 5 mL の 18 nmol EAA を水で希釈 | 5 mL - | 5 mL 15 mL | 5 mL 45 mL |
| 希釈済み EAA 混合液 | 5 mL | 20 mL | 50 mL |
| 5 mL の希釈済み EAA 混合液を分取 | 5 mL | 5 mL | 5 mL |
| 10 nmol ISTD 溶液を追加 | 5 mL | 5 mL | 5 mL |
| EAA-ISTD 混合液 | 10 mL | 10 mL | 10 mL |
| 100 μL の EAA-ISTD 混合液を分取 | 100 μL | 100 μL | 100 μL |
| 1 nmol AA に追加 | 900 μL | - | - |
| 250 pmol AA に追加 | - | 900 μL | - |
| 100 pmol AA に追加 | - | - | 900 μL |
| EAA と 500 pmol/μL ISTD を含む最終的な AA 溶液 | 1 mL | 1 mL | 1 mL |

表 2. 高感度用標準溶液

| | 最終的な AA 溶液の濃度 (pmol/μL) | | |
|-------------------------------------|-------------------------|---------------|---------------|
| | 90 | 22.5 | 9 |
| 5 mL の 1.8 nmol EAA を水で希釈 | 5 mL - | 5 mL 15 mL | 5 mL 45 mL |
| 希釈済み EAA 混合液 | 5 mL | 20 mL | 50 mL |
| 5 mL の希釈済み EAA 混合液を分取 | 5 mL | 5 mL | 5 mL |
| 1 nmol ISTD 溶液を追加 | 5 mL | 5 mL | 5 mL |
| 高感度 EAA-ISTD 混合液 | 10 mL | 10 mL | 10 mL |
| 100 μL の EAA-ISTD 混合液を分取 | 100 μL | 100 μL | 100 μL |
| 100 nmol AA に追加 | 900 μL | - | - |
| 25 pmol AA に追加 | - | 900 μL | - |
| 10 pmol AA に追加 | - | - | 900 μL |
| EAA と 50 pmol/μL ISTD を含む最終的な AA 溶液 | 1 mL | 1 mL | 1 mL |



ステップ 4:

オンライン誘導体化の実施

オンライン誘導体化の自動化プログラムは、オートサンブラのモデルに応じて多少異なります。Agilent G7129A バイアルサンブラでインジェクタプログラムを使用する場合は、以下の手順に従います。

1. ホウ酸塩バッファバイアル (p/n 5061-3339) から 2.5 μL 吸引します。
2. サンプルバイアルから 1.0 μL 吸引します。
3. 3.5 μL をエアで 5 回混合します。
4. 0.2 分間待ちます。
5. OPA バイアル (p/n 5061-3335) から 0.5 μL 吸引します。
6. 4.0 μL をエアで 10 回、デフォルトスピードで混合します。
7. FMOC バイアル (p/n 5061-3337) から 0.4 μL 吸引します。
8. 4.4 μL をエアで 10 回、デフォルトスピードで混合します。
9. 注入希釈液バイアルから 32 μL 吸引します。
10. 20 μL をエアで 8 回混合します。
11. 注入

*注: 他のオートサンブラモデルの場合は、装着されているサンプルループの容量が異なる可能性があるため、容量の調整が必要です。

誘導体化試薬とサンプルの位置は、使用する ALS トレイ構成に合わせて
 ます。G7129A と 2 × 66 バイアルトレイを使用する場合の位置は、以下
 のとおりです。

- バイアル P1-A1: ホウ酸バッファ
- バイアル P1-A2: OPA
- バイアル P1-A3: FMOC
- バイアル P1-A4: 注入希釈液
- P1-B1: サンプル

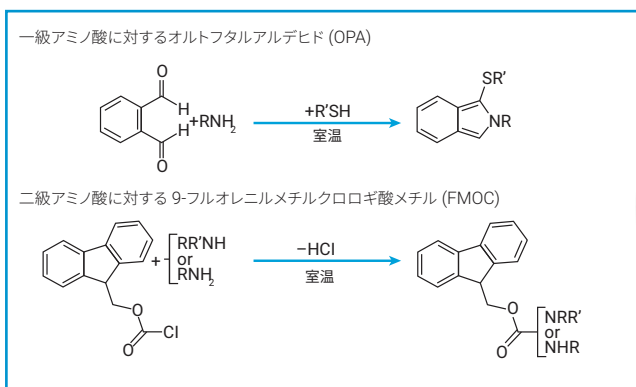
注: 適切なバイアル、キャップ、およびポンプパラメータを使用してください。

使用量の少ない OPA および FMOC 試薬はバイアルインサートに入れて
 セットする必要があります。このインサートは、広口スクリューバイアルま
 たはクリンプバイアルに対応しています。FMOC は揮発性が高く、OPA
 は酸素の存在下でゆっくり分解するため、この手順では、どちらの試薬に
 も気密シールが必要です。スナップバイアルは使用しないでください。ま
 た、オートサンプラの破損を防ぐため、他の機器用に設計されたバイアル
 やキャップは使用しないでください。



図 1. Agilent のインサート、バイアル、およびキャップ:
 A) コニカルインサート (p/n 5181-1270)、B) 広口バイアル、
 茶色 (p/n 5182-0716)、C) スクリューキャップ (p/n 5182-0721)

オートサンプラによる精度向上



試薬の自動添加

精度が向上
 手作業による誘導体化が不要



図 2. OPA および FMOC によるオンライン誘導体化: 逆相カラムでの極性アミノ
 酸の分離と UV および蛍光による検出

ステップ 5:

検出パラメータの設定

カラムコンパートメント (TCC)

左右の温度ゾーンを 40 °C に設定します。分析中、温度を ± 0.8 °C に維持できます。

ダイオードアレイ検出器 (DAD)

| | | | |
|-----------------|---------------|--------------------|---------------|
| シグナル A: 338 nm | バンド幅 10 nm | リファレンス波長 390 nm | バンド幅 20 nm |
| シグナル B: 262 nm | バンド幅 16 nm | リファレンス波長 324 nm | バンド幅 8 nm |
| シグナル C*: 338 nm | バンド幅 10 nm | リファレンス波長 390 nm | バンド幅 20 nm |

*以下の手順に従う場合、シグナル C は必要ありません。

OPA 誘導体化アミノ酸と FMOC 誘導体化アミノ酸の両方を 1 つのクロマトグラムで検出するには、最後の OPA 誘導体化アミノ酸 (リジン、標準溶液のピーク 20) が溶出してから最初の FMOC 誘導体化アミノ酸 (ヒドロキシプロリン、標準溶液のピーク 21) が溶出するまでの間に、検出器の波長を切り替える必要があります。

分析中に DAD で波長を切り替える最適なポイントは、最初に 2 つのチャネル (シグナル A 338 nm で OPA 誘導体化アミノ酸を検出し、シグナル B 262 nm で FMOC 誘導体化アミノ酸を検出) でデータを採取することにより特定できます。以降の分析は、波長が適切なタイミングで 338 nm から 262 nm に切り替わるように検出器のタイムテーブル機能をプログラムすることにより、1 つのチャネルで行えます。すなわち、OPA-リジンと FMOC-ヒドロキシプロリンが溶出するまでの間に波長を切り替えることで、OPA 誘導体化アミノ酸と FMOC 誘導体化アミノ酸の両方を 1 つのクロマトグラムで検出できます。



蛍光検出器 (FLD)

FLD は必ず、システムの最下流に接続にします。これは耐圧 2 MPa のフ
ローセルの破損を避けるためです。

ピーク幅 0.01 分、ストップタイム 18 分 (必要に応じて調整)

励起 340 nm、蛍光 450 nm、フィルタ 390 nm (デフォルトフィルタ)

シグナルタイムテーブル:

0.00 分: 励起 340 nm、蛍光、450 nm、ゲイン (必要な場合)

5.53 分: 励起 260 nm、蛍光 325 nm、

PMT ゲイン 10 (必要な場合。リジンとヒドロキシプロリンの間で切り替え)

蛍光検出器 (FLD) で波長を切り替えるポイントを特定するには、分析を 2
回実行する必要があります。まず、励起波長 340 nm、蛍光波長 450 nm
で OPA 誘導体化アミノ酸を検出します。次に、励起波長 260 nm、蛍光
波長 325 nm で FMOC 誘導体化アミノ酸を検出します。そのデータをも
とに検出器のタイムテーブル機能を設定することで、OPA 誘導体化アミノ
酸と FMOC 誘導体化アミノ酸の両方を 1 つのクロマトグラムで検出でき
ます。この機能では、最後の OPA 誘導体化アミノ酸 (リジン) が溶出して
から最初の FMOC 誘導体化アミノ酸 (ヒドロキシプロリン) が溶出するま
での適切なポイントで波長が切り替わるようにプログラムします。

注: アミノ酸の濃度が 100 pmol 未満の場合は、蛍光検出器を使用することをおす
めします。

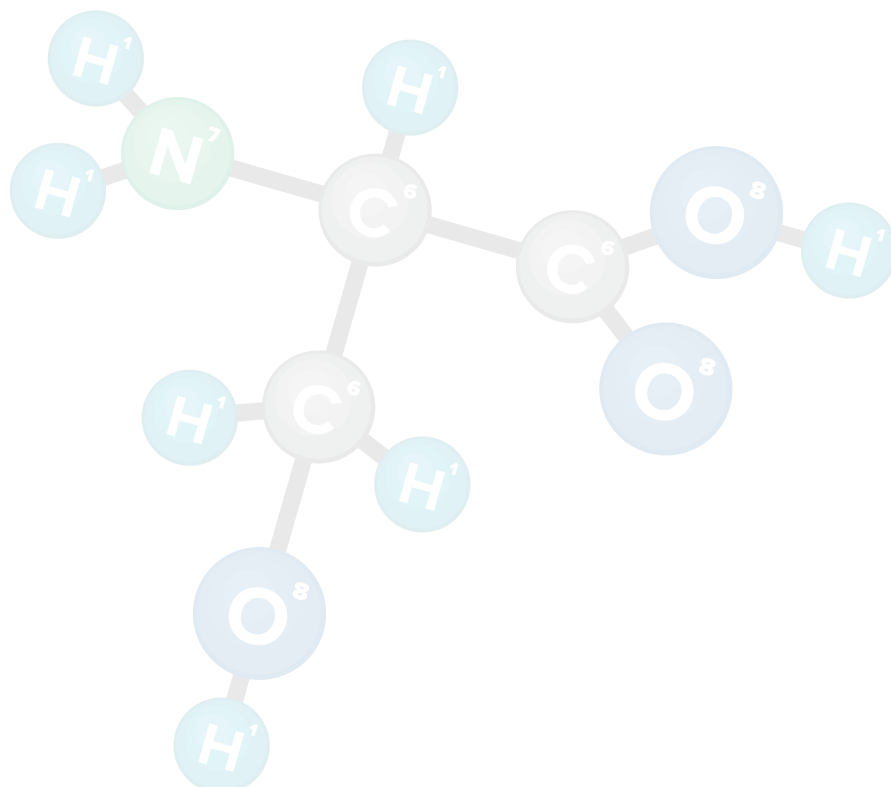


グラジエントプログラム

| 時間 (分) | % B |
|--------|-----|
| 0 | 2 |
| 0.35 | 2 |
| 13.4 | 57 |
| 13.5 | 100 |
| 15.7 | 100 |
| 15.8 | 2 |
| 18 | 終了 |

流量: 内径 4.6 mm カラムの場合は 1.5 mL/min、
内径 3 mm カラムの場合は 0.62 mL/min

注入量: 1 μ L



代表的な分離例

AdvanceBio AAA カラムによる一級アミノ酸 20 種の分離結果を図 3 に示します。

以下の点にご注意ください。

- 移動相にアジ化ナトリウムを添加しても無添加でも、アミノ酸の溶出プロファイルには影響しません。
- NaN_3 は、細菌/真菌の繁殖を抑制するための防腐剤として使用します。
- 移動相を 0.45 μm フィルタでろ過することを強くおすすめします。
注: アミノ酸の濃度が 100 pmol 未満の場合は、蛍光検出器を使用することをおすすめします。

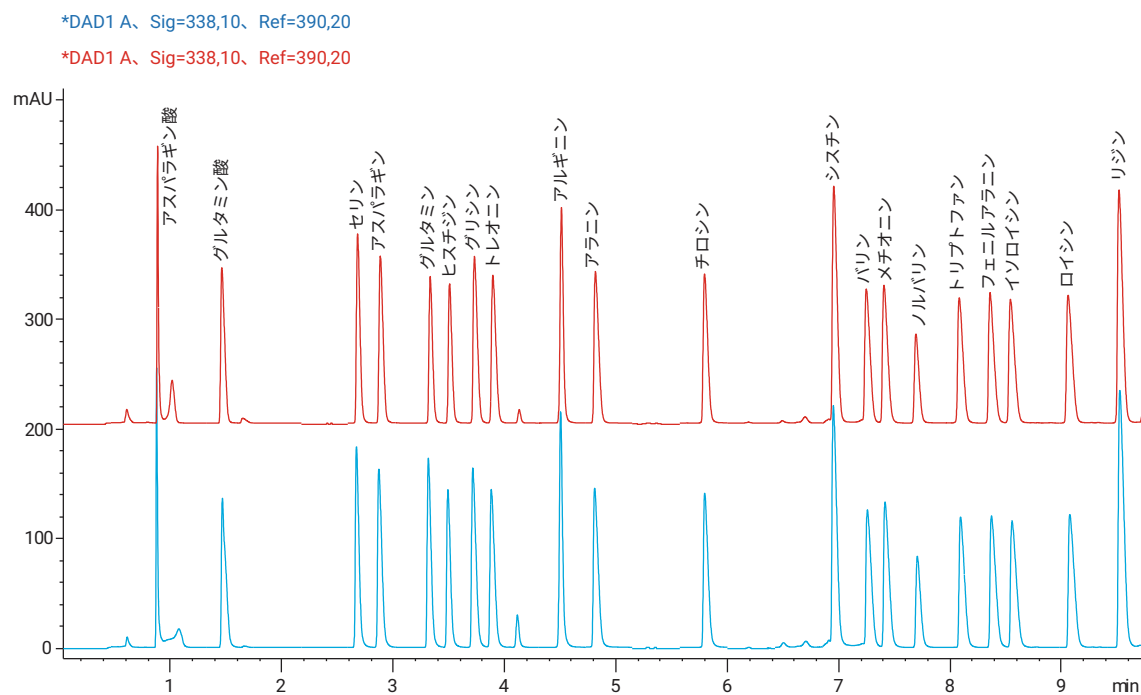


図 3. Agilent AdvanceBio AAA 4.6 x 100 mm カラムによるアミノ酸 20 種の標準溶液の分離結果: 移動相に 5 mM アジ化ナトリウムを添加した場合と無添加の場合の比較

注: 移動相 A への 5 mM アジ化ナトリウム (NaN_3) の添加は、微生物の繁殖抑制と緩衝液の消費期限延長を目的とし、必須ではありません。

ステップ 6:

アミノ酸のハイスループット分析

図 4 のクロマトグラムは、ハイスループットの一般的なルーチン分析において Agilent AdvanceBio AAA カラムにより得られる標準的な感度を示しています。これらの分離結果は、内径の異なる AdvanceBio AAA、100 mm、2.7 μ m カラムを装着した Agilent 1260 Infinity II HPLC バイナリシステムと DAD 検出器により得られたものです。1 回の分析が再平衡も含めて 20 分未満で完了し、十分な分離能が得られています。一級アミノ酸 (OPA 誘導体化) は 338 nm で、また二級アミノ酸 (FMOC 誘導体化) は 262 nm でモニタリングしました。

図 4 で、最初に溶出している 20 種類のアミノ酸は一級アミノ酸で、OPA により誘導体化されています。最後に溶出している 3 種類のアミノ酸 (ヒドロキシプロリン、サルコシン、プロリン) は、FMOC で誘導体化されています。リジンが溶出してからヒドロキシプロリンが溶出するまでに間に、プログラムにより波長が 338 nm から 262 nm に切り替えられています。

- メソッドは異なるカラム寸法に容易にスケールアップできます。
- この分析では、カラム径に応じてメソッドの流量のみを変更しました。
- カラム外容積を最小化するために、低容量熱交換器と内径 0.12 mm キャピラリー配管を使用しました。

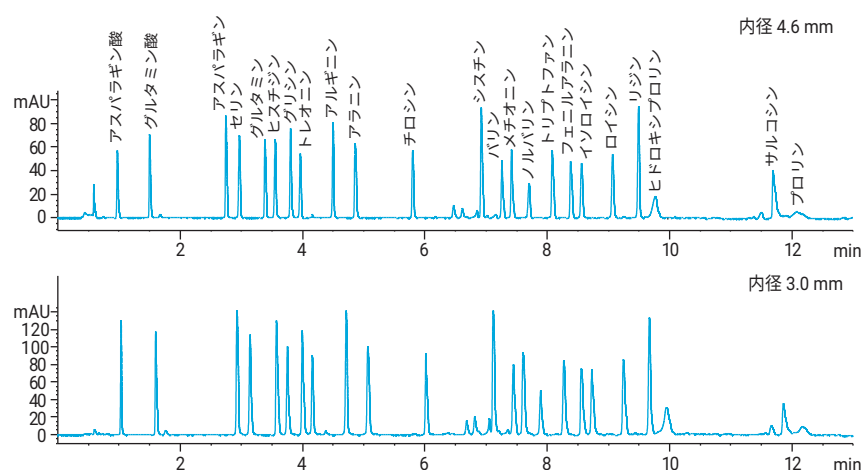


図 4. アミノ酸メソッドを用いて内径の異なる AdvanceBio AAA カラムで分析した AA 標準溶液の分離結果



100 pmol および 1000 pmol の分析における リテンションタイムと面積の精度 (n=6)

表 3. AdvanceBio AAA、4.6 x 100 mm カラムで分離したアミノ酸 (100 pmol) のリテンションタイムと面積の精度 (6 回の繰り返し分析)

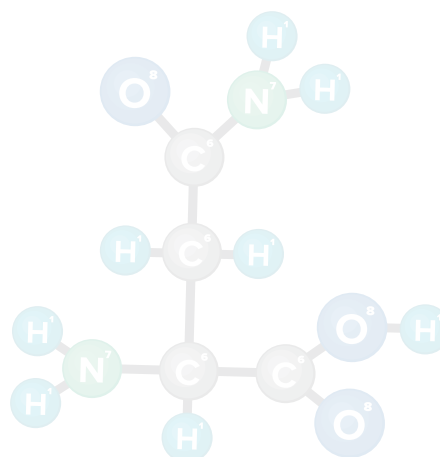
| アミノ酸 | 平均 RT | RT RSD (%) | 面積の RSD (%) |
|------------|-------|------------|-------------|
| 1. アスパラギン酸 | 0.851 | 1.270 | 1.066 |
| 2. グルタミン酸 | 1.428 | 0.973 | 1.850 |
| 3. アスパラギン | 2.639 | 0.605 | 1.790 |
| 4. セリン | 2.835 | 0.629 | 1.820 |
| 5. グルタミン | 3.285 | 0.470 | 1.560 |
| 6. ヒスチジン | 3.465 | 0.430 | 1.220 |
| 7. グリシン | 3.681 | 0.477 | 1.920 |
| 8. トレオニン | 3.837 | 0.440 | 1.950 |
| 9. アルギニン | 4.458 | 0.251 | 2.150 |
| 10. アラニン | 4.764 | 0.280 | 3.060 |
| 11. チロシン | 5.762 | 0.128 | 1.650 |
| 12. システイン | 6.870 | 0.067 | 1.900 |

| アミノ酸 | 平均 RT | RT RSD (%) | 面積の RSD (%) |
|---------------|--------|------------|-------------|
| 13. バリン | 7.201 | 0.084 | 2.47 |
| 14. メチオニン | 7.363 | 0.073 | 1.82 |
| 15. ノルバリン | 7.602 | 0.073 | 1.72 |
| 16. トリプトファン | 8.055 | 0.054 | 1.57 |
| 17. フェニルアラニン | 8.341 | 0.051 | 1.66 |
| 18. イソロイシン | 8.503 | 0.047 | 1.72 |
| 19. ロイシン | 9.000 | 0.030 | 1.70 |
| 20. リジン | 9.428 | 0.028 | 1.66 |
| 21. ヒドロキシプロリン | 9.747 | 0.021 | 4.13 |
| 22. サルコシン | 10.980 | 0.026 | 1.15 |
| 23. プロリン | 11.620 | 0.021 | 4.36 |

表 4. AdvanceBio AAA、4.6 x 100 mm カラムで分離したアミノ酸 (1000 pmol) のリテンションタイムと面積の精度 (6 回の繰り返し分析)

| アミノ酸 | 平均 RT | RT RSD (%) | 面積の RSD (%) |
|------------|-------|------------|-------------|
| 1. アスパラギン酸 | 0.837 | 0.151 | 2.60 |
| 2. グルタミン酸 | 1.400 | 0.512 | 2.19 |
| 3. アスパラギン | 2.583 | 0.124 | 2.13 |
| 4. セリン | 2.772 | 0.114 | 1.74 |
| 5. グルタミン | 3.220 | 0.092 | 1.80 |
| 6. ヒスチジン | 3.405 | 0.077 | 1.39 |
| 7. グリシン | 3.598 | 0.068 | 1.48 |
| 8. トレオニン | 3.766 | 0.059 | 2.26 |
| 9. アルギニン | 4.422 | 0.027 | 1.66 |
| 10. アラニン | 4.685 | 0.031 | 1.87 |
| 11. チロシン | 5.695 | 0.034 | 2.04 |
| 12. システイン | 6.794 | 0.030 | 2.22 |

| アミノ酸 | 平均 RT | RT RSD (%) | 面積の RSD (%) |
|---------------|--------|------------|-------------|
| 13. バリン | 7.118 | 0.025 | 2.40 |
| 14. メチオニン | 7.281 | 0.025 | 1.78 |
| 15. ノルバリン | 7.573 | 0.019 | 1.77 |
| 16. トリプトファン | 7.970 | 0.024 | 2.03 |
| 17. フェニルアラニン | 8.238 | 0.027 | 1.98 |
| 18. イソロイシン | 8.413 | 0.025 | 2.17 |
| 19. ロイシン | 8.925 | 0.020 | 1.81 |
| 20. リジン | 9.357 | 0.022 | 2.00 |
| 21. ヒドロキシプロリン | 9.718 | 0.014 | 3.14 |
| 22. サルコシン | 10.961 | 0.015 | 5.91 |
| 23. プロリン | 11.911 | 0.011 | 2.58 |



ステップ 7:

欧州薬局方 (EP) に準拠したシステム適合性の保証

欧州薬局方 (EP) では、アミノ酸およびアミノ酸混合物の定性的・定量的組成の要件が規定されています。また、許容される不純物の要件も定められています。アミノ酸メーカーには、欧州市場への製品流通前に、各社のアミノ酸がこれらの仕様に適合していることを証明することが法的に義務付けられています。

ロイシン (Leu) は、分岐鎖 α -アミノ酸の 1 種で、発酵プロセスにより製造されます。このプロセスでは、イソロイシンが副生成物として生成されることがあります。欧州薬局方の規定では、ロイシンとイソロイシンの分離度が 1.5 以上であることが求められます [1]。

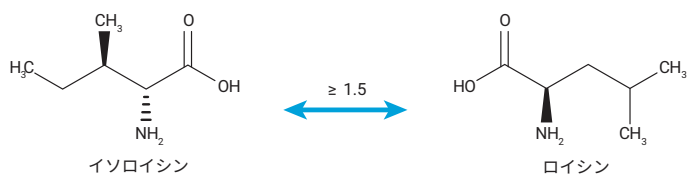


表 5. Agilent AdvanceBio AAA カラムと AA 標準溶液を用いたシステム適合性試験

| システム適合性 | AdvanceBio AAA、 C18、4.6 × 100 mm、 2.7 μ m | AdvanceBio AAA、 C18、3.0 × 100 mm、 2.7 μ m |
|--------------------------|---|---|
| ロイシンとイソロイシンの分離度 (1.5 以上) | 4.5 | 4.6 |

参考資料:

1. European pharmacopoeia 9.0 (2.2.56)
Amino Acid Analysis

ステップ 8:

細胞培地およびタンパク質加水分解物標準溶液の最適化

細胞培地は、バイオ医薬品やその他の生物活性化合物の製造に広く利用されています。細胞培地の組成は、目的とする製品の収率や構造を左右することから、その最適化に細心の注意を払う必要があります。一般的な細胞培地は、アミノ酸、ビタミン、炭水化物、無機塩の他、ペプチドやタンパク質などの多様な化合物で構成されます。細胞は、成長の際に栄養素を消費し、目的のバイオ医薬品と老廃物を放出します。アミノ酸は、タンパク質の構成要素であり、多くの代謝経路の中間生成物でもあります。このことから、細胞に必要な栄養素を供給するために、通常、細胞培地にはアミノ酸が追加されています。

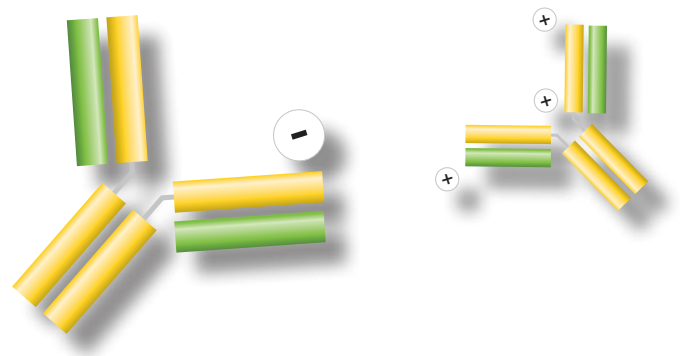
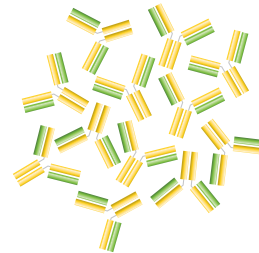
培養細胞中のアミノ酸フラックスの測定は、細胞の代謝率や状態の重要な指標になります。また、利用可能な残余炭素や窒素源の指標としても役立ちます。これは、多様な糖新生、尿素産生、およびタンパク質合成のために他の細胞種よりも大量にアミノ酸を消費する肝細胞や肝癌細胞株において、特に大きな意味を持ちます。

アミノ酸分析には、プレカラム誘導体化を使用した HPLC が標準的手法として用いられています。HPLC 分離と UV または蛍光検出のための溶液中の遊離アミノ酸のプレカラム誘導体化は、手作業によりオフラインで行われることもあります。ただし、オフラインでの誘導体化には、オペレータの技能不足やラボの技術不足がエラー原因になり、必要なサンプル操作や処理時間が増え、汚染のリスクが高まるという、直接的なデメリットがあります。一方、自動オンライン誘導体化では、これらのエラー原因が大幅に解消され、精度が即座に高まり、時間の短縮にもつながります。すなわち、オンライン誘導体化が組み込まれた堅牢な高分離能 HPLC メソッドなら、オフラインメソッドよりも格段に高い生産性が望めます。

一般的な細胞培地とタンパク質加水分解物のアミノ酸組成分析の結果を図 5～8 に示します。この分析により、細胞培地のアミノ酸組成が理論的組成と正確に一致していることが立証されました。このようなアプリケーションは、アミノ酸組成のモニタリングや調整に有効です。また、製造プロセスを最適化し、最終的なバイオ医薬品の品質を高め、最適な収率を確保するうえでも不可欠なステップです。

アミノ酸メソッドを使用した AdvanceBio AAA 4.6 x 100 mm カラムによる組成分析 (図 5～8) には、以下の細胞培地を使用しています。

1. イーグル最小必須培地 (MEM) M4655: L-アルギニン、L-シスチン、L-グルタミン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-トレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン
2. 細胞培地添加用非必須アミノ酸 (NEAA) M7145: L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、グリシン、L-プロリン、L-セリン
3. RPMI 1640 R0083: L-アルギニン、L-アスパラギン、L-シスチン、グリシン、L-ヒスチジン、ヒドロキシ-L-プロリン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-トレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン



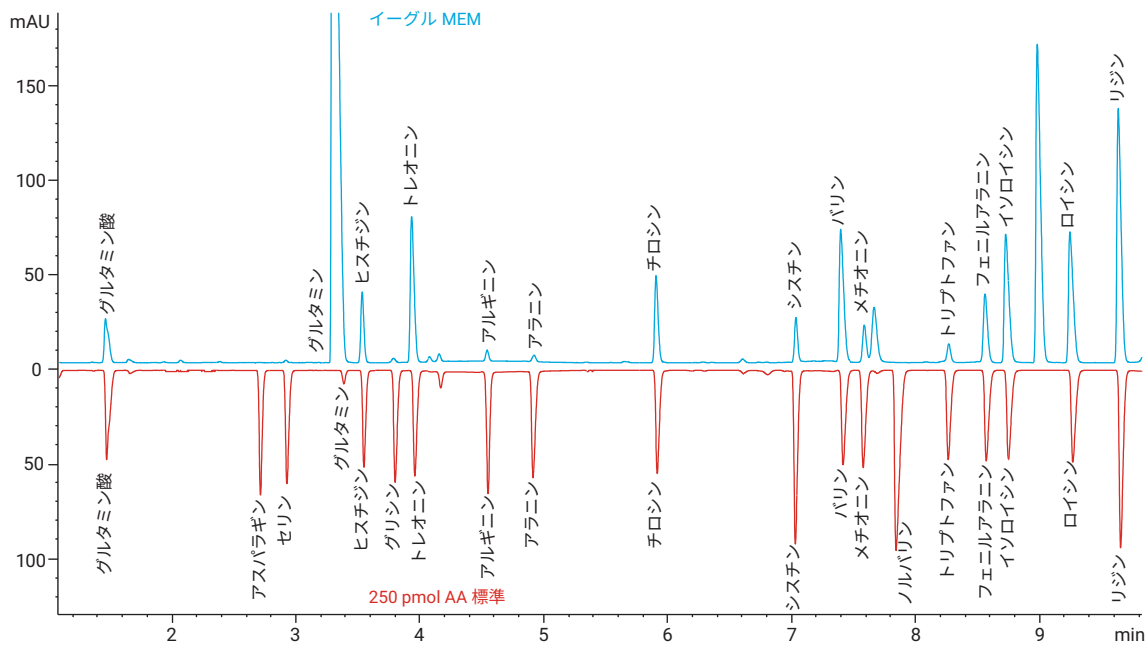


図 5. イーグル MEM 培地のアミノ酸分析結果 (青)。対比のため、Agilent AdvanceBio AAA 溶液を使用したアミノ酸標準溶液の結果 (赤) も示しています。

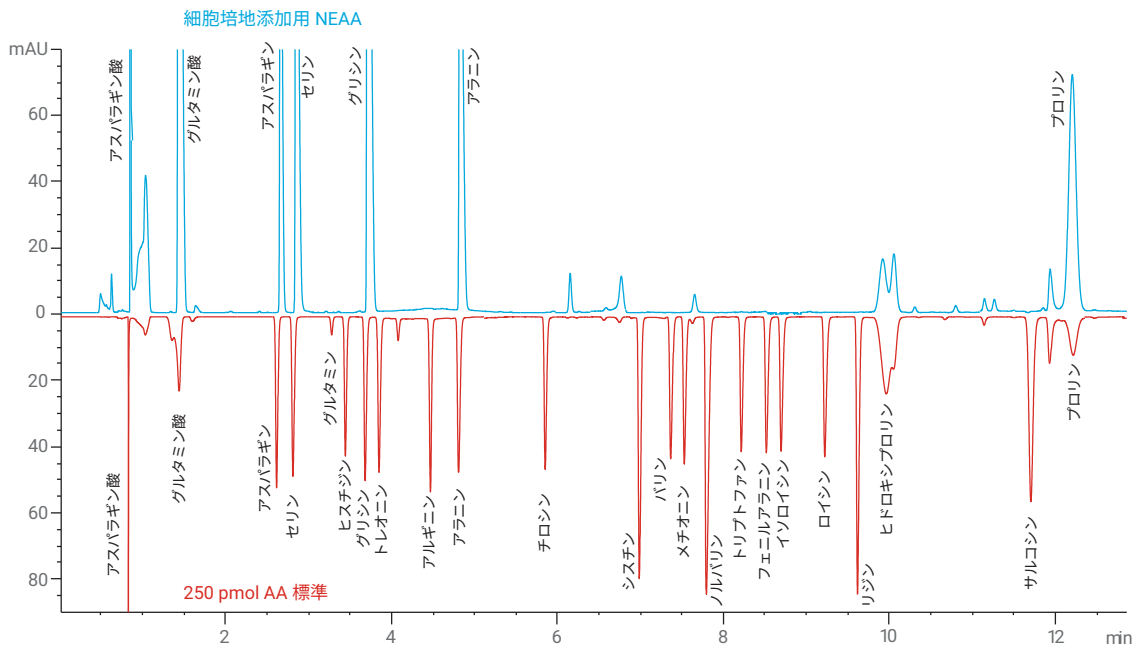


図 6. 非必須アミノ酸 (NEAA) 培地のアミノ酸分析結果 (青)。対比のため、Agilent AdvanceBio AAA 溶液を使用したアミノ酸標準溶液の結果 (赤) も示しています。

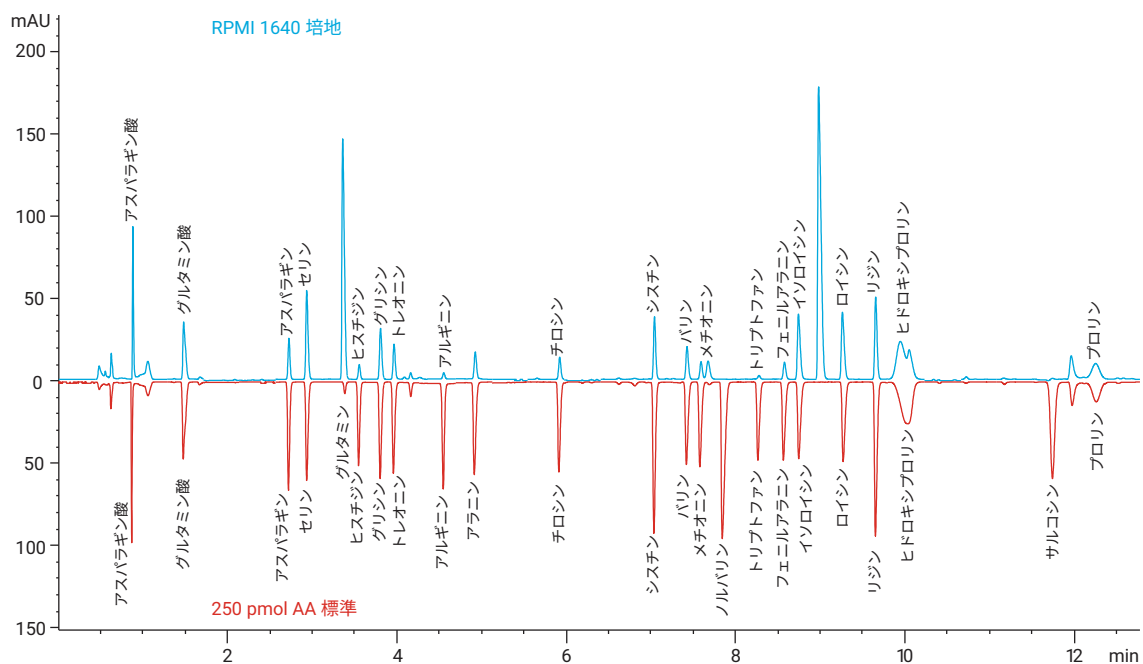


図 7. RPMI 1650 培地のアミノ酸分析結果 (青)。対比のため、Agilent AdvanceBio AAA 溶液を使用したアミノ酸標準溶液の結果 (赤) も示しています。

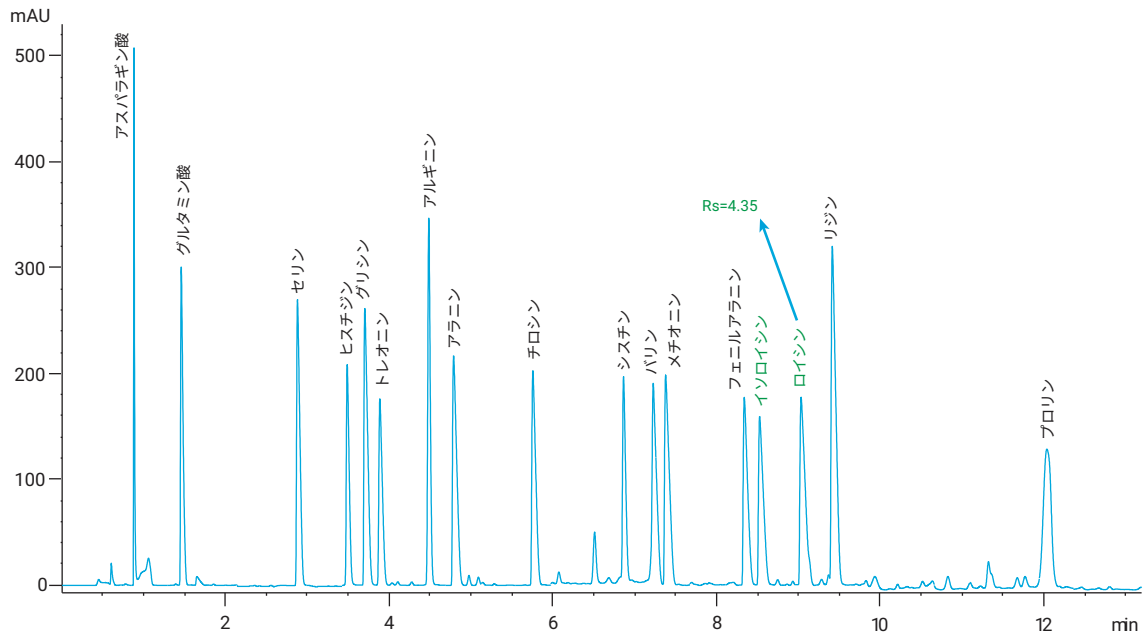


図 8. タンパク質加水分解物のアミノ酸分析結果。AdvanceBio AAA、4.6 x 100 mm、2.7 μ m カラムで得られたロイシンとイソロイシンの分離度は、システム適合性要件として公表されている値を優に上回っています。

メンテナンスとトラブルシューティング

Agilent AdvanceBio AAA ソリューションには、テクニカルサポートとアプリケーションサポートも含まれています。お客様の InfinityLab LC シリーズ機器システムをトラブルなく継続的にご使用いただくために、以下に従ってメンテナンスおよびトラブルシューティングを行うことをおすすめします。

日常的なメンテナンス:

- オートサンプラトレイにセットされている誘導体化試薬、ホウ酸塩緩衝液、アミノ酸標準溶液、および洗浄水を交換してください。
- リテンションタイムとレスポンスファクタの再キャリブレーションを実施してください。
- システム適合性レポートでカラムとガードカラムの性能を確認してください。
- 1 日おきに、移動相 A および B を新しく調製したものに交換してください。

トラブルシューティング:

クロマトグラフィー分離能が低い

- ガードカラムの劣化
- 分析カラムの損傷
- ポストカラムの過剰に長い接続によるバンドの広がり
- カラム外容積を最小限にするために、必ず、低容量熱交換器で短い赤色チューブを使用してください。

クロマトグラムのシグナル強度が低い

- OPA 試薬の劣化
- FMOC 試薬の劣化



製品情報

| カラム、消耗品、試薬 | サイズ | 部品番号 |
|--------------------------------|--|------------|
| AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA) LC カラム | 4.6 x 100 mm, 2.7 μ m | 655950-802 |
| AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA) ガードカラム | 4.6 x 5 mm, 2.7 μ m, 3 個 | 820750-931 |
| AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA) LC カラム | 3.0 x 100 mm, 2.7 μ m | 695975-322 |
| AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA) ガードカラム | 3.0 x 5 mm, 2.7 μ m, 3 個 | 823750-946 |
| ホウ酸バッファ | 0.4 M 水溶液, pH 10.2, 100 mL | 5061-3339 |
| FMOC 試薬 | 2.5 mg/mL アセトニトリル溶液, 1 mL アンブル x 10 本 | 5061-3337 |
| OPA 試薬 | 10 mg/mL, 0.4 M ホウ酸ナトリウムバッファおよび3-メルカプトプロピオン酸に溶解, 1 mL アンブル x 6 本 | 5061-3335 |
| インサート、樹脂脚付き | 250 μ L, 100 個 | 5181-1270 |
| スクリューバイアル、茶色、ラベル付き | 2 mL, 認証済み, 100 個 | 5182-0716 |
| キャップ、スクリュー、緑、PTFE/白シリコンセプタム | 100 個 | 5182-0721 |
| スクリューバイアル、透明、平底 | LC 用, 6 mL, 認証済み, 100 個 | 9301-1377 |
| キャップ、スクリュー | 6 mL バイアル用, 100 個 | 9301-1379 |
| セプタム | 6 mL バイアル用, 100 個 | 9301-1378 |
| アミノ酸標準溶液 | 1 nmol/ μ L, 1 mL x 10 本 | 5061-3330 |
| アミノ酸標準溶液 | 250 pmol, 10 本 | 5061-3331 |
| アミノ酸標準溶液 | 100 pmol/ μ L, 1 mL x 10 本 | 5061-3332 |
| アミノ酸標準溶液 | 25 pmol/ μ L, 1 mL x 10 本 | 5061-3333 |
| アミノ酸標準溶液 | 10 pmol/ μ L, 1 mL x 10 本 | 5061-3334 |
| アミノ酸消耗品キット | | 5062-2478 |

生体分子の特性解析のために開発された革新的な
Agilent AdvanceBio ファミリーの詳細については、
ホームページをご覧ください。



ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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. 2018
Printed in Japan, March 1, 2018
5991-7694JAJP

 **Agilent**
Trusted Answers