

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムと Agilent HPLC による既存アミノ酸分析法の改良

アプリケーション

食品、医薬品

著者

John W Henderson Jr,
Anne Brooks
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Rd
Wilmington, DE 19808
USA

はじめに

HPLC カラムや分析機器の性能改善に伴い、既存の HPLC メソッドを改良することができます。HP 1090 シリーズ HPLC システムで開発された実証済み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 (OPA/FMOC) 誘導体化アミノ酸分析メソッドは、その後 Agilent 1100 シリーズ HPLC システム用に更新され、Agilent 1200 シリーズ SL および Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 固定相カラムをさらに活用するように進化しました。[1-5]

このプロトコルが以前のプロトコルより優れている点は次のとおりです。

- 最初に溶出する 2 つのアミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸の保持が強くなります。
- 使用されるカラム構成に応じて、隣接して溶出するいくつかのアミノ酸ペアの分解能が向上します。
- 3 種類の粒子径、複数のカラム長さや内径などの 10 種類のカラム構成により、分析者は自身の仕様と制約 (たとえば、使用可能な Agilent HPLC モデル、希望するスループット、または希望する分解能) に合わせて分離をカスタマイズできます。
- クォータナリポンプのオプション。

当然、以前のプロトコルの利点 (特に自動オンライン OPA/FMOC 誘導体化) は維持されています。



Agilent Technologies

クロマトグラムは、カラムまたはメソッドごとに提示されます。これらは3つのカテゴリに分かれます。

- 高分解能を提供する従来型 5 µm 粒子径カラム
- 5 および 1.8 µm 粒子径カラム (ラピッドレゾリューション) の高分解能とスピードを組み合わせた実用的な 3.5 µm 粒子径カラム
- (ラピッドレゾリューションハイスルーブットの) 優れた分解能を提供する、スルーブットが最高の 1.8 µm 粒子径カラム

2.1 × 150 mm、3.5 µm ラピッドレゾリューションメソッドは、カラム P/N 79916AA-572 を使用したオリジナルの AminoQuant メソッドの置き換えメソッドとして推奨されます。

すべてのメソッドは、以前の Agilent メソッドに基づいて同じ化学薬品と OPA/FMOC 誘導体化を使用します [1-6]。これらのメソッド間の違いは、移動相グラジエントプログラムと流路です。この2つのパラメータは、カラムサイズと LC 機器のモデルに応じて最適化されます。

10 個のメソッドは、50 mm カラムと 1.8 µm 粒子を使用した最低 1.5 の R_s 係数のハイスルーブット分析 (10分未満のサイクルタイム) から、250 mm カラムと 5 µm 粒子を使用した 40 分の高分解能メソッド (すべてのピークペアで $R_s > 2$) に及びます。オプションとして、粒子が 3.5 µm で長さが 150 mm のカラム、または粒子が 1.8 µm で $R_s > 2$ の 100 mm カラムを使用できます。表 1 を参照してください。

表 1. さまざまな分離目標を満たす Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラム

メソッド番号	メソッドカテゴリ	カラム/ メソッド名	部品番号	再平衡化を 含む 分析時間	典型的な 最小分離 係数	概算の mL 溶媒/ 分析*	Agilent HPLC 機器
1	従来型高分解能	4.6 × 250, 5 µm	959990-902	40 分	2.4	64	1200 or 1200 SL
2		3.0 × 250, 5 µm	カスタム	40 分	2.4	28	1200 or 1200 SL
3	ラピッドレゾリューション	4.6 × 150, 3.5 µm	959963-902	25 分	2	42	1200 or 1200 SL
4		3.0 × 150, 3.5 µm	959963-302	25 分	2	18	1200 or 1200 SL
5		2.1 × 150, 3.5 µm†	959763-902	25 分	2	12	1200 or 1200 SL†
6	ラピッドレゾリューションハイスルーブット	4.6 × 100, 1.8 µm	959964-902	16 分	2.4	28	1200SL
7		2.1 × 100, 1.8 µm	959764-902	16 分	2.4	8	1200SL
8		4.6 × 50, 1.8 µm	959941-902	9 分	1.7	23	1200SL
9		3.0 × 50, 1.8 µm	959941-302	9 分	1.7	10	1200SL
10		2.1 × 50, 1.8 µm	959741-902	9 分	1.7	5	1200SL

*インジェクタプログラムとプレラン DAD オートバランス (2.42 分)、および再平衡時間を含みます。

† AminoQuant メソッドに推奨される置き換えメソッド

† 1200SL は、推奨される AminoQuant 置き換えメソッドに必要です。

使用できる LC

メソッドの選択は、LC モデルと構成によって決まります。Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 メソッドは、次の機器用に開発されました。

- クォータリポンプを搭載した Agilent 1100
- バイナリポンプを搭載した Agilent 1100
- バイナリポンプ (400 bar) を搭載した Agilent 1200
- バイナリポンプ (600 bar) を搭載した Agilent 1200

10 種類のメソッドは、それぞれのカラムサイズと特定の LC モジュールにより独自のものになっています。他のメソッドパラメータの大部分は同じです。2.1 × 150 mm、3.5 µm カラムメソッドの分析時間は AminoQuant メソッドに匹敵しカラムサイズはほぼ同じであるため、2.1 × 150 mm カラムメソッドは既存の AminoQuant ユーザーに推奨される置き換えメソッドです。

実験:

同様のメソッドパラメータ: 化学的前処理

移動相 A: 10 mM Na_2HPO_4 : 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 8.2: 5 mM NaN_3
 1 リットルの場合: 約970 mLの水に1.4 g の無水 Na_2HPO_4 と3.8 g の $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、+32 mg NaN_3 を加えて溶かし、濃塩酸で約 pH 8.4 前後にしてから、pH 8.2 になるまで1 M程度の希塩酸液滴を添加し、pH 調整後、水で全容を 1 Lとします。なお、 NaN_3 は防腐剤として添加しており、添加をしない場合も、アミノ酸の分離に影響はありません。

0.45 μm の再生セルロース被膜 (Agilent 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は HPLC クラスです。移動相 A は B より速い速度で消費されるため、B を 1 L ごとに A を 2 L 作成すると便利です。

注入希釈剤: 100 mL ボトルに 100 mL の移動相 A + 0.4 mL の濃 H₃PO₄。4 °C で保管します。

0.1 N HCl: 4.2 mL の濃 HCl (36 %) を、一部水で満たした 500 mL のメスフラスコに添加します。混合し、マーク位置まで水を入れます。溶液は、拡張アミノ酸と内部標準原液を作成するためのものです。4 °C で保管します。

誘導体化試薬: ホウ酸塩緩衝液、OPA、および FMOC は、アジレントによって提供される既成の溶液です。これらは単純にコンテナからオートサンバイアルに移すだけです。いくつかの注意点を次に示します。

- OPA は、酸化を防ぐために不活性ガスを充てんしたアンブルで出荷されます。OPA は開封後約 7~10 日間有効です。OPA の 100 μL をマイクロバイアルインサートに移して名前と日付のラベルを付け、キャップを閉めて冷蔵することをお勧めします。マイクロバイアルインサートに移してからは、10 日以内に使い切ってください。また、オートサンバイアルにセットしたマイクロバイアルは、毎日交換してください。
- FMOC は、乾燥空气中で安定しますが、湿度が高いと劣化します。FMOC の 100 μL をマイクロバイアルインサートに移して名前と日付のラベルを付け、キャップを閉めて冷蔵することをお勧めします。マイクロバイアルインサートに移してからは、10 日以内に使い切ってください。また、オートサンバイアルにセットしたマイクロバイアルは、毎日交換してください。
- ホウ酸塩緩衝液は、バイアルインサートを使用せずに、1.5 mL オートサンバイアルに移すことができます。これは、10 日ごとに交換します。

アミノ酸標準試料の前処理

アミノ酸標準試料の前処理は、以前のアジレントの手順またはアプリケーションノートから変わっていません。[4、5、6] 部品番号のリストについては、最終ページの表 7 を参照してください。

アミノ酸標準試料 (10 pmol/μL ~ 1 nmol/μL): 検量線用に 5 種類の濃度の 17 のアミノ酸の溶液をアジレントから入手できます。P/N 5061-3330 ~ 5061-3334 の標準試料の各 1 mL アンブルを、円錐形バイアルインサートに 100 μL ずつ分けます。キャップを閉めて、4 °C で冷蔵します。

拡張アミノ酸 (EAA) 原液

59.45 mg のアスパラギン、59.00 mg のヒドロキシプロリン、65.77 mg のグルタミン、および 91.95 mg トリプトファンを計量して 25 mL のメスフラスコに入れます。0.1 N HCl で半分ほど満たし、溶解するまで攪拌または超音波処理します。マーク位置まで水を入れ、各アミノ酸の合計濃度が 18 nmol/μL になるようにします。

高感度 EAA 原液の場合は、この標準感度溶液を 5 mL 取り出し、45 mL の水で希釈します (1.8 nmol/μL)。

拡張アミノ酸を含む溶液は、室温では不安定です。凍結して保存し、強度が低下した場合は破棄してください。

内部標準 (ISTD) 原液

一級アミノ酸については、58.58 mg のノルバリンを計量して 50 mL メスフラスコに入れます。二級アミノ酸については、44.54 mg のサルコシンを計量して同じ 50 mL メスフラスコに入れます。0.1 N HCl で半分ほど満たし、溶解するまで攪拌または超音波処理してから、マーク位置まで水を入れて、各アミノ酸 10 nmol/μL の最終濃度になります (標準感度)。

高感度 ISTD 原液の場合は、標準感度溶液を 5 mL 取り出し、45 mL の水で希釈します。4 °C で保管します。

検量線は、実験のニーズに応じて 2 ~ 5 種類の標準試料を使用して作成できます。通常は、100 pmol/μL、250 pmol/μL、および 1 nmol/μL を「標準感度」分析の 3 ポイント検量線に使用します。

内部標準試料またはその他のアミノ酸 (たとえば、拡張アミノ酸) が添加される場合は、次の表に従う必要があります。表 2 では、UV 分析で一般に使用される「標準感度」濃度について説明します。表 3 は、一般に「高感度」蛍光分析で使用されます。

表 2. 標準感度較正用標準溶液

	最終 AA 溶液の濃度 (pmol/μL)		
	900	225	90
5 mL の 18 nmol EAA を取得 水で希釈	5 mL	5 mL	5 mL
	—	15 mL	45 mL
希釈した EAA 混合物質	5 mL	20 mL	50 mL
5 mL の希釈済み EAA 混合物質を取得	5 mL	5 mL	5 mL
10 nmol ISTD 溶液を添加	5 mL	5 mL	5 mL
EAA-ISTD 混合物質	10 mL	10 mL	10 mL
100 μL の EAA-ISTD 混合物質を取得	100 μL	100 μL	100 μL
添加、1 nmol AA	900 μL	—	—
添加、250 pmol AA	—	900 μL	—
添加、100 pmol AA	—	—	900 μL
EAA および 500 pmol/μL ISTD を含む最終 AA 溶液	1 mL	1 mL	1 mL

表 3. 高感度校正用標準溶液

	最終 AA 溶液の濃度 (pmol/μL)		
	90	22.5	9
5 mL の 1.8 nmol EAA を取得 水で希釈	5 mL —	5 mL 15 mL	5 mL 45 mL
希釈した EAA 混合物質	5 mL	20 mL	50 mL
5 mL の希釈済み EAA 混合物質を取得 1 nmol ISTD 溶液を添加	5 mL 5 mL	5 mL 5 mL	5 mL 5 mL
EAA-ISTD 混合物質	10 mL	10 mL	10 mL
100 μL の EAA-ISTD 混合物質を取得 添加、100 pmol AA	100 μL 900 μL	100 μL —	100 μL —
添加、25 pmol AA	—	900 μL	—
添加、10 pmol AA	—	—	900 μL
EAA および 50 pmol/μL ISTD を含む最終 AA 溶液	1 mL	1 mL	1 mL

個々のメソッドパラメータ

LC ポンプ

表 4 を参照してください。すべてのメソッドのその他のポンプパラメータは次のとおりです。

- 圧縮率 ($\times 10^{-6}$ bar) A: 35、B: 80
- 最小ストローク A、B: 20 μL

オートサンプラ (ALS): オンライン誘導体化

オートサンプラのモデルに応じて、自動オンライン誘導体化プログラムは若干異なります。

G1376C ウェルプレートオートサンプラ (WPALS)、 注入プログラムあり:

1. ホウ酸塩バイアル (Agilent P/N 5061-3339) から 2.5 μL 注入します。
2. サンプルバイアルから 1.0 μL 注入します。
3. 3.5 μL を洗浄ポートで 5 回混合します。
4. 0.2 分待ちます。
5. OPA バイアル (Agilent P/N 5061-3335) から 0.5 μL 注入します。
6. デフォルトのスピードで 4.0 μL を洗浄ポートで 10 回混合します。
7. FMOC バイアル (Agilent P/N 5061-3337) から 0.4 μL 注入します。
8. デフォルトのスピードで 4.4 μL を洗浄ポートで 10 回混合します。
9. 注入希釈剤バイアルから 32 μL 注入します。
10. 20 μL を洗浄ポートで 8 回混合します。
11. 注入します。
12. 0.1 分待ちます。
13. バルブをバイパスします。

表 4. 移動相グラジエントプログラム

従来型高分解能メソッドグラジエント、5 μm

時間 (分)	4.6 × 250 mm P/N 959990-902	3.0 × 250 mm P/N カスタム
	%B	%B
0	2	2
0.84	2	2
33.4	57	57
33.5	100	100
39.3	100	100
39.4	2	2
40	終了	終了
流量 (mL/分)	1.5	0.64

ラピッドレゾリューションメソッドグラジエント、3.5 μm

時間 (分)	4.6 × 150 mm P/N 959963-902	3.0 × 150 mm P/N 959963-302	2.1 × 150 mm P/N 959763-902
	%B	%B	%B
0	2	2	2
0.5	2	2	2
20	57	57	57
20.1	100	100	100
23.5	100	100	100
23.6	2	2	2
25	終了	終了	終了
流量 (mL/分)	1.5	0.64	0.42

ラピッドレゾリューションハイスループットメソッドグラジエント 1.8 μm、100 mm

時間 (分)	4.6 × 100 mm P/N 959963-902	2.1 × 100 mm P/N 959763-902
	%B	%B
0	2	2
0.35	2	2
13.4	57	57
13.5	100	100
15.7	100	100
15.8	2	2
16	終了	終了
流量 (mL/分)	1.5	0.42

ラピッドレゾリューションハイスループットメソッドグラジエント 1.8 μm、50 mm

時間 (分)	4.6 × 50 mm P/N 959941-902	3.0 × 50 mm P/N 959941-302	2.1 × 50 mm P/N 959741-902
	%B	%B	%B
0	2	2	2
0.2	2	2	2
7.67	57	57	57
7.77	100	100	100
8.3	100	100	100
8.4	2	2	2
9	終了	終了	終了
流量 (mL/分)	2.0	0.85	0.42

G1329A オートサンブラ (ALS)、注入プログラムあり:

1. ホウ酸塩バイアル (Agilent P/N 5061-3339) から 2.5 μ L 注入します。
2. サンプルバイアルから 1.0 μ L 注入します。
3. 空気中で 3.5 μ L をデフォルトのスピードで 5 回混合します。
4. 0.2 分待ちます。
5. OPA バイアル (Agilent P/N 5061-3335) から 0.5 μ L 注入します。
6. 空気中で 4.0 μ L をデフォルトのスピードで 10 回混合します。
7. FMOC バイアル (Agilent P/N 5061-3337) から 0.4 μ L 注入します。
8. デフォルトのスピードで 4.4 μ L を 10 回混合します。
9. 注入希釈剤バイアルから 32 μ L 注入します。
10. 空気中で 20 μ L をデフォルトのスピードで 8 回混合します。
11. 注入します。
12. 0.1 分待ちます。
13. バルブをバイパスします。

誘導体化試薬とサンプルのロケーションは、ハードウェアと ALS トレイ構成によって決まります。G1367C と 2 \times 56 ウェルプレートトレイ (G2258-44502) を使用した場合、ロケーションは次のとおりでした。

- バイアル 1: ホウ酸塩緩衝液
- バイアル 2: OPA
- バイアル 3: FMOC
- バイアル 4: 注入希釈剤
- P1-A-1: サンプル

カラムコンパートメント (TCC)

左と右の温度は、40 $^{\circ}$ C に設定されます。温度が \pm 0.8 $^{\circ}$ C 以内のときに分析を有効にします。使用するヒートシンクについては、表 5 を参照してください。

ダイオードアレイ検出器 (DAD)

信号 A: 338 nm、10 nm 帯域幅、およびリファレンス波長 390 nm、20 nm 帯域幅。

信号 B: 262 nm、16 nm 帯域幅、およびリファレンス波長 324 nm、8 nm 帯域幅。

信号 C: 338 nm、10 nm 帯域幅、およびリファレンス波長 390 nm、20 nm 帯域幅。リシンの溶出後とヒドロキシプロリンの溶出前に、262 nm、16 nm 帯域幅、リファレンス波長 324 nm、8 nm 帯域幅に切り替えるようにプログラムされています。信号 C は、ピーク 20 と 21 の間の信号 A と B のタイムフレームを調べてから、波長を切り替えるのに適した時点を選択することで決定されます。切替時間が設定されてメソッドにプログラムされた場合、信号 A と B はオプションになります。

ピーク幅設定は次のとおりです。

- ラピッドレゾリューションハイスルーブット (RRHT) 1.8 μ m カラムメソッドの場合は >0.01 分
- ラピッドレゾリューション (RR) 3.5 μ m カラムメソッドの場合は >0.03 分
- 従来型高分解能 5 μ m カラムメソッドの場合は >0.03 分

表 5. 流路仕様

メソッド名	従来型高分解能メソッド (5 μ m)		ラピッドレゾリューションメソッド (3.5 μ m)		
	4.6 \times 250 mm	3.0 \times 250 mm	4.6 \times 150 mm	3.0 \times 150 mm	2.1 \times 150 mm
LC モデル	1100	1200	1200 SL	1200 SL	1200 SL
ポンプ	G1312A	G1311A quat	G1312B	G1312B	G1312B
ダンブナ	あり	N/A	あり	あり	バイパス
スタティックミキサ	G1312-87330	N/A	G1312-87330	G1312-87330	バイパス
バージバルブから ALS	G1328-87600 (緑色 500 mm)	G1328-87600 (緑色 500 mm)	5021-1823 (赤色 400 mm)	5021-1823 (赤色 400 mm)	5021-1823 (赤色 400 mm)
ALS	G1367A	G1329A	G1367C	G1367C	G1367C
ニードルシート	G1367-87101 (緑色)	G1313-87201 (緑色)	G1367-87201 (赤色)	G1367-87201 (赤色)	G1367-87201 (赤色)
ALS から熱交換器	G1313-87305 (緑色 180 mm)	01090-87611 (赤色 105 mm)	01090-87611 (赤色 105 mm)	01090-87611 (赤色 105 mm)	01090-87611 (赤色 105 mm)
熱交換器	G1316 A 3 μ L	G1316 A 3 μ L	G1316-80003 1.6 μ L	G1316-80003 1.6 μ L	G1316-80003 1.6 μ L
熱交換器からカラムまたはガード	5021-1817 (緑色 150 mm)	5021-1816 (緑色 105 mm)	5021-1820 (赤色 105 mm)	5021-1820 (赤色 105 mm)	5021-1820 (赤色 105 mm)
オプションのガードカートリッジ	820950-936-4 個、内径 4.6	821125-936-4 個、内径 2.1	820950-936-4 個、内径 4.6	821125-936-4 個、内径 2.1	821125-936-4 個、内径 2.1

表 5. 流路仕様

メソッド名	従来型高分解能メソッド (5 µm)		ラピッドレゾリューションメソッド (3.5 µm)		
	4.6 × 250 mm	3.0 × 250 mm	4.6 × 150 mm	3.0 × 150 mm	2.1 × 150 mm
カラム	959990-902	カスタム	959963-902	959963-302	959763-902
ポストカラムから ユニオン	5065-9931 (200 mm 緑色)	5065-9931 (200 mm 緑色)	N/A	N/A	N/A
ZDV ユニオンから フローセル検出器	5022-2184 G1315B	5022-2185 G1315D	N/A G1315C	N/A G1315C	N/A G1315C
フローセル	2 µL G1315-60024	2 µL G1315-60024	2 µL G1315-60024	2 µL G1315-60024	2 µL G1315-60024
メソッド名	ラピッドレゾリューションハイスルーブットメソッド (1.8 µm 100 mm)		ラピッドレゾリューションハイスルーブットメソッド (1.8 µm 50 mm)		
	4.6 × 100 mm, 1.8 µm	2.1 × 100 mm, 1.8 µm	4.6 × 50 mm, 1.8 µm	3.0 × 50 mm, 1.8 µm	2.1 × 50 mm, 1.8 µm
LC モデル	1200 SL	1200 SL	1200 SL	1200 SL	1200 SL
ポンプ	G1312 B	G1312 B	G1312 B	G1312 B	G1312 B
ダンブナ	あり	バイパス	あり	バイパス	バイパス
スタティックミキサ	G1312-87330	バイパス	G1312-87330	バイパス	バイパス
ページバルブから ALS	5021-1823 (赤色 400 mm)	5021-1823 (赤色 400 mm)	5021-1823 (赤色 400 mm)	5021-1823 (赤色 400 mm)	5021-1823 (赤色 400 mm)
ALS	G1367C	G1367C	G1367C	G1367C	G1367C
ニードルシート	G1367-87201 (赤色)	G1367-87201 (赤色)	G1367-87201 (赤色)	G1367-87201 (赤色)	G1367-87201 (赤色)
ALS から 熱交換器	01090-87611 (赤色 105 mm)	01090-87611 (赤色 105 mm)	01090-87611 (赤色 105 mm)	01090-87611 (赤色 105 mm)	01090-87611 (赤色 105 mm)
熱交換器	G1316-80003 1.6 µL	G1316-80003 1.6 µL	G1316-80003 1.6 µL	G1316-80003 1.6 µL	G1316-80003 1.6 µL
オプションの ガードカートリッジ	なし	なし	なし	なし	なし
カラム PN	959964-902	959764-902	959941-902	959941-302	959741-902
カラムから フローセル	直接接続	直接接続	直接接続	直接接続	直接接続
検出器	G1315C	G1315C	G1315C	G1315C	G1315C
フローセル	2 µL G1315-60024	2 µL G1315-60024	2 µL G1315-60024	2 µL G1315-60024	2 µL G1315-60024

カラムとガードカートリッジ

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムと推奨されるガードカートリッジについては、表 5 を参照してください。ガードカートリッジを収容するにはカートリッジハードウェアキット (P/N 820888-901) が必要です。カートリッジは、平衡化のためにカラムに接続する前に、数ミリリットルの移動相 B で洗浄する必要があります。

3.0 × 250 mm、5 µm は、本資料の印刷時点でのカスタムカラム構成ですが、LC カスタムカラムショップ (http://www.chem.agilent.com/cag/lccustom_1page.asp?&rc at=LCColumns) で注文できます。

結果と考察

3 種類の粒子径 (5、3.5、1.8 µm) 間での Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 固定相カラムのスケラビリティにより、多くの微調

整されたメソッドに対応できます。表 1 にまとめたように、分析者は、分析時間、分離係数、溶媒の使用状況、または機器モデルに基づいてカラムまたはメソッドを選択できます。

3 つの各カテゴリには、固有のメソッドパラメータがあります。特に重要なのは、小容量カラムの移動相流路構成です。異なるカラム内径と長さ間でのグラジエントメソッドのスケリングは若干複雑です。これは特に、異なる流量によってグラジエントのディレイタイムが変化することが原因です。ディレイタイムは、グラジエントが組成ポイントからカラムヘッドまで移動するのにかかる時間です。

流量の他に、ディレイタイムはグラジエント組成ポイントとカラムヘッドの間の流路容積によって決まります。ディレイボリュームは、機器によって異なる場合があります。このアプリケーションノートすべてのクロマトグラムを得るのに使用した際の流路を、表 5 に示しています。

従来型 5 μm 高分解能メソッド

最初のグループは、「従来型 5 μm 高分解能」オプションです。この 2 つのオプションは、大量のサンプルまたは高分解能分析に理想的です。すべてのアミノ酸の分離係数は 2.0 より大きく、圧力は 400 bar 未満です。3.0 mm id ソルベントセーバオプションでは、4.6 mm id メソッドより 57% 少ない溶媒を使用します (図 1 を参照)。250 mm のカラム長さは、「ラピッドレゾリューション 3.5 μm」および「ラピッドレゾリューションハイ スループット 1.8 μm」オプションに比べて分析時間が最長になることを意味します。

図 1 の最初の 20 個のアミノ酸は、OPA で誘導体化されます。最後の 3 つのヒドロキシプロリン、サルコシン、およびプロリン

は、FMOC で誘導体化されます。リシン (ピーク 20) の溶出後、ヒドロキシプロリン (ピーク 21) の溶出前に、OPA誘導体を検出する338nm から FMOC誘導体を検出する265 nm へ測定波長を変更します。

ラピッドレゾリューションメソッド

2 番目のグループである「ラピッドレゾリューション」メソッドも、分離係数は 2 を超えますが、分析時間は 40 分から 25 分に短縮され、溶媒使用量も削減されます。3.5 μm カラムは 5 μm カラムよりも効率が高いため、同様に短いカラムと分析時間で高分解能も実現できます。図 2 で、3 つのカラムサイズを比較します。

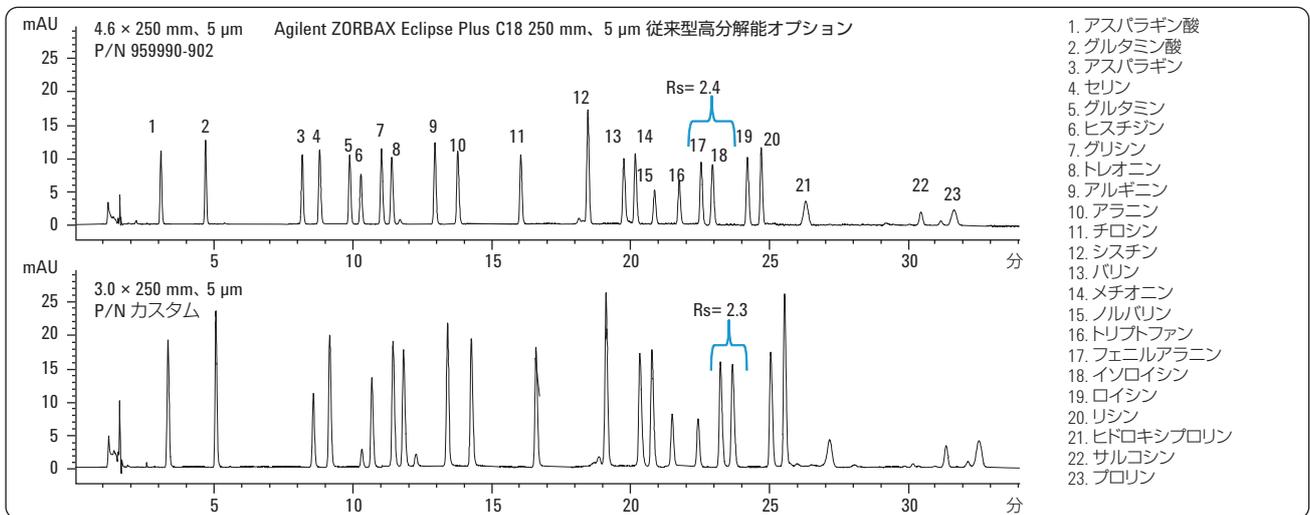


図 1. 250 mm、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、5 μm カラムを使用したアミノ酸分析

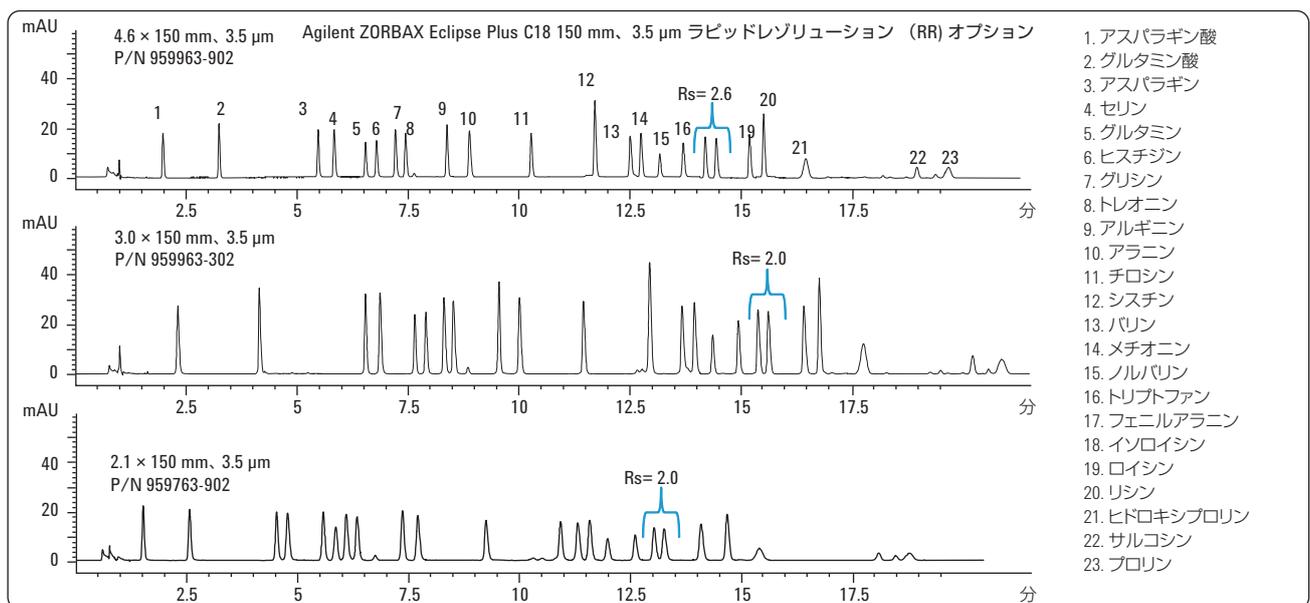


図 2. 150 mm、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 3.5 μm カラムを使用したアミノ酸分析

オリジナルの AminoQuant メソッドから Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 AA メソッドへの アップグレード

ラピッドレゾリューションメソッドには、AminoQuant カラム (2.1 × 200 mm、5 μm) と同じ内径および同様の効率の 2.1 × 150 mm、3.5 μm カラムが含まれます。その結果、AminoQuant カラムと同程度の分析時間およびピーク幅のクロマトグラムが、ラピッドレゾリューションメソッドでも得られます。

Eclipse Plus C18 アミノ酸メソッドにアップグレードし、AminoQuant の結果に匹敵するクロマトグラムを希望している AminoQuant ユーザーは、2.1 × 150 mm、3.5 μm メソッドを表 5 に示した Agilent 1200 SL シリーズ HPLC と共に使用する必要があります。

補足アミノ酸 (Gln、ASsn、Trp、nva、Hyp、Sar) を含む標準アミノ酸混合物のピーク溶出順序は、アルギニンを除いて 2 つのメソッドで同じです。AminoQuant メソッドでは、アルギニンはアラニンの直後に溶出します。Eclipse Plus C18 メソッド (およびすべての旧 ZORBAX アミノ酸メソッド) では、アルギニンはアラニンの直前に溶出します。

Eclipse Plus アミノ酸メソッドにアップグレードする AminoQuant ユーザーは、オリジナルの AminoQuant クロマトグラムと分析時間が同様のクロマトグラムに制約されない場合には、他の 9 個のメソッドのいずれかを選択できます。このようなユーザーは、分析時間、分解能、溶媒消費量、または機器に関するニーズに最適なメソッドを選択する必要があります。

ラピッドレゾリューション ハイスループットメソッド

これらのメソッドは、100 または 50 mm のカラム内径と 1.8 μm の粒子を使用します。図 3 に示す 100 mm RRHT カラムの分離係数は、図 2 の 3.5 μm オプションよりも大きく、図 1 の「従来型高分解能」カラムとほぼ同じ値です。

これは、100 mm、1.8 μm カラムの効率が 250 mm、5 μm カラムとほぼ同じであることを示しています。これらの高速高分解能メソッドでは、分析のシステム圧力が約 400 bar であるため、Agilent 1200 SL システムが必要です。

カラム長さが半分になると、分析時間 (および圧力) が半減しますが、分解能は低下します。短い RRHT カラムを使用する利点は、

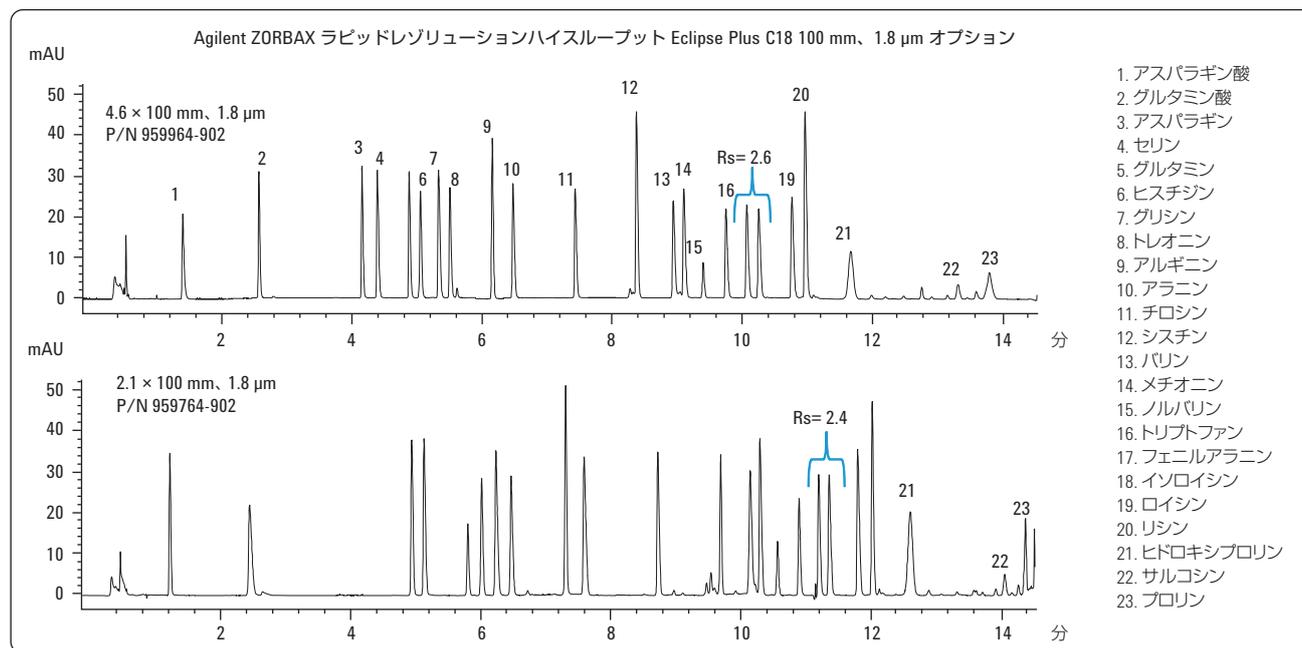


図 3. 100 mm、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、1.8 μm カラムを使用したアミノ酸分析

近接した2つのピークの2未満のRs係数での再平衡化を含む分析時間が9分であることです(図4)。

この場合も、狭いピークを正確に検出および定量するDAD検出器のより高速なサンプリングスピードと、グラジエントディレイボリュームを最小化する柔軟なポンプ流路構成を実現するために、これらの1.8 μmメソッドには1200 SLが必要です。

バッチ間の再現性

バッチ間またはロット間の再現性は、異なるロットの充填剤から作られた3種類のカラムで分析を実行することにより測定

されました。さらに、分離係数(α)、または選択性が、近接するピークに対して測定されました。

選択性は、固定相と移動相の間の分析対象成分の平衡分布に直接影響するため、バッチ間の再現性に関して適切な測定基準になります。平衡分布は、移動相組成、固定相の性質、および温度の影響を受けます。移動相組成と温度は一定であるため、分離係数の差異は固定相の違いによるものです。

図5、6、7の近接ピークを選択性係数は同じであることに注意してください。

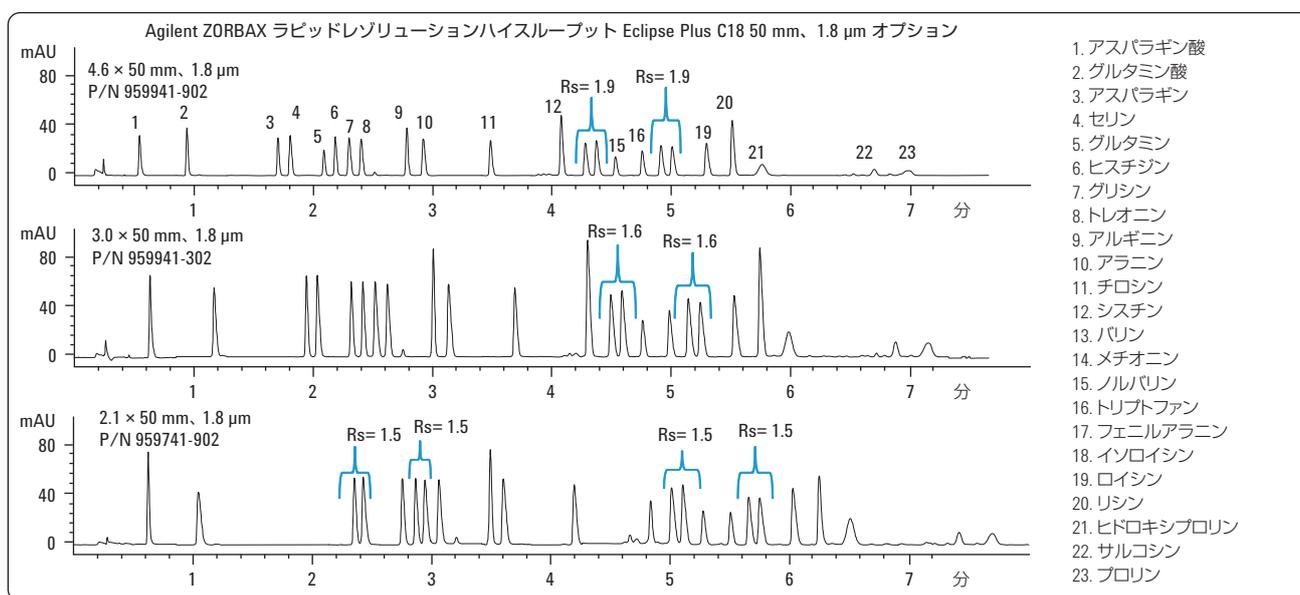


図4. 50 mm, Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 1.8 μm カラムを使用したアミノ酸分析

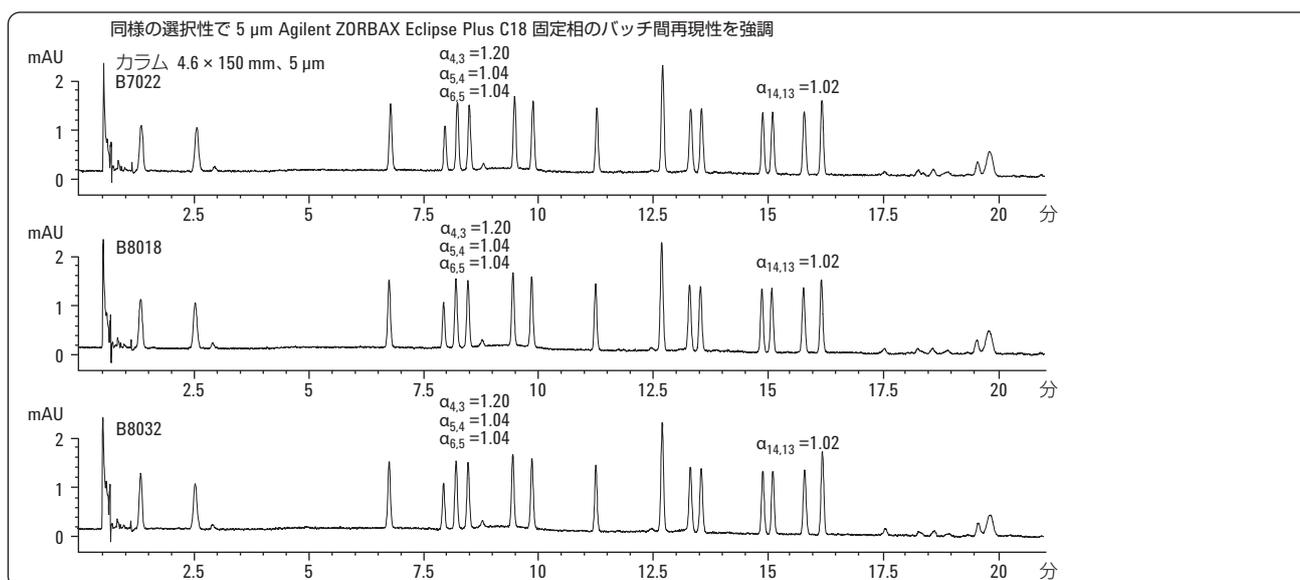


図5. Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 5 μm のバッチ間再現性

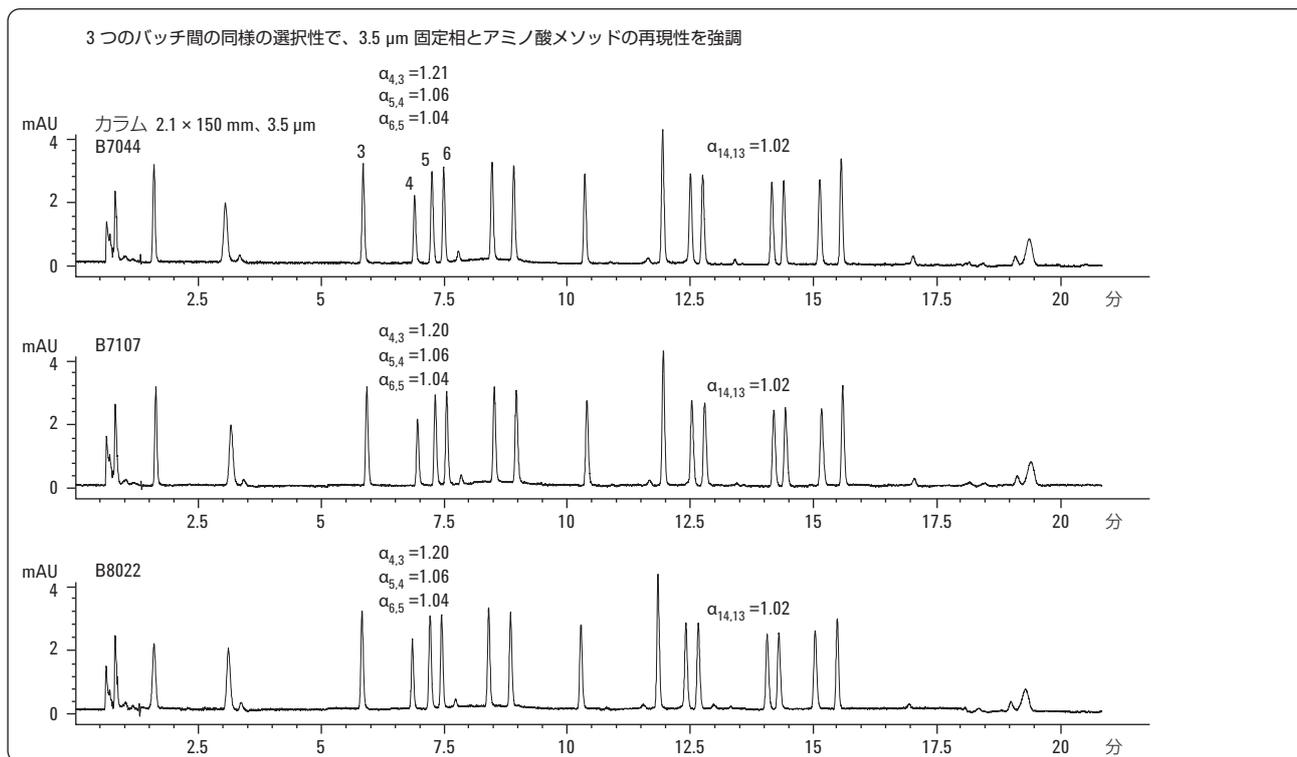


図 6. Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.5 μm のバッチ間再現性

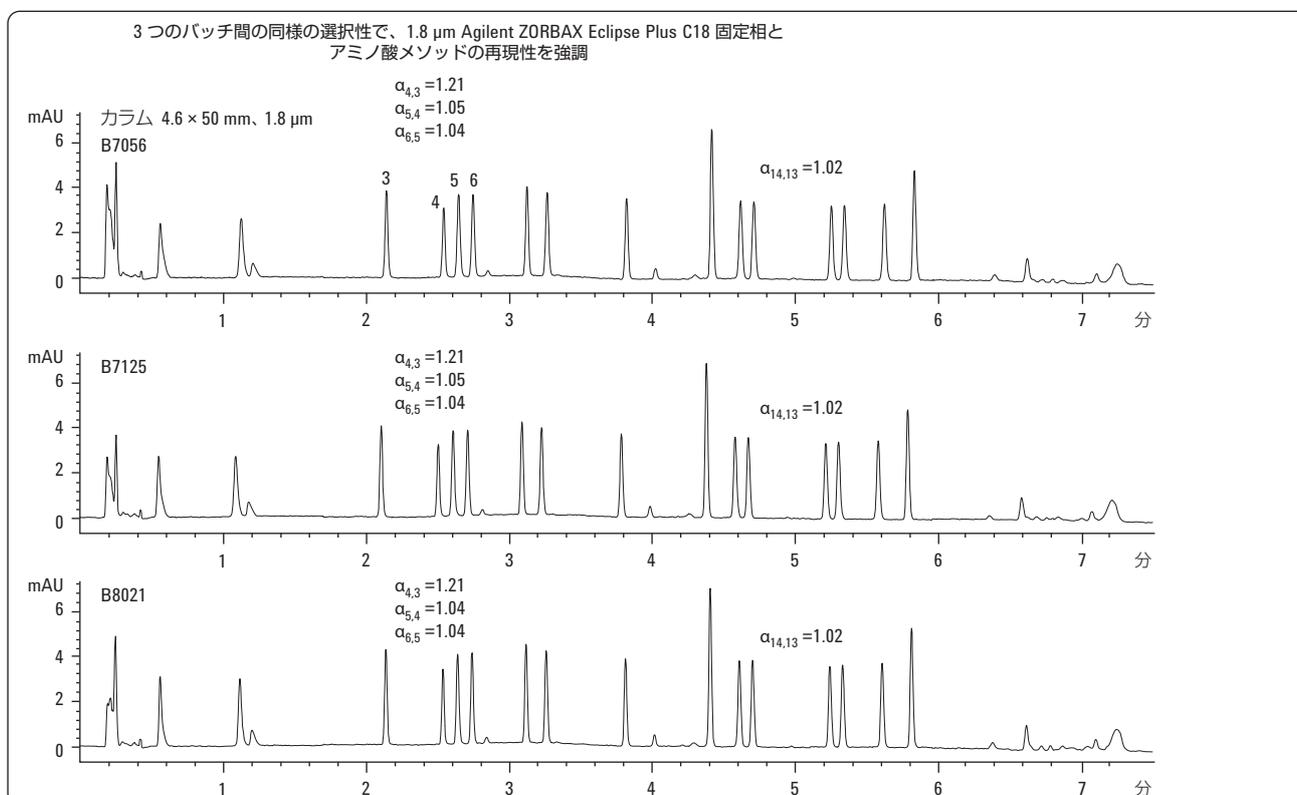


図 7. Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 1.8 μm のバッチ間再現性

1つの例でのみ、選択性係数が1%異なっています。バッチ間再現性は、3種類の粒子径について一貫性と信頼性があります。

バッチ間の比較には、異なるカラムサイズを使用しました。

- 1.8 μm 粒子の比較には 4.6 \times 50 mm
- 3.5 μm 粒子の比較には 2.1 \times 150 mm
- 5 μm 粒子の比較には 4.6 \times 150 mm

選択性はカラムサイズに依存しないため、異なるサイズが適合します。また、これらはメソッドの堅牢性をさらに実証します。実際には、バッチ間再現性を示している 4.6 \times 150 mm サイズ (図 5 を参照) は、このアプリケーションノートでは推奨されていない構成です。その理由は、5 μm カラムは 3.5 μm カラムと同様の選

択性でアミノ酸を分離しますが、4.6 \times 150 mm、3.5 μm カラムは効率が高いため、より優れた分解能を達成するからです。このため、5 μm カラムよりも優れたオプションになります。

寿命/長時間テスト

図 8 に、500 回の注入を行うために 10 日間連続してアミノ酸メソッドを繰り返した ChemStation シーケンスを示します。追加の長時間テスト (図 9 を参照) は、G1311A クォータナリポンプおよび 3.0 \times 250 mm カラムを使用して行いました。長いほうのカラムは 4 日余分にかかり、合計 14 日の無停止運転で 500 回の分析が完了しました。分解能は、どちらの場合にも 2 週間の期間に徐々に低下しましたが、依然として 1.5 を上回る R_s 係数が得られました。

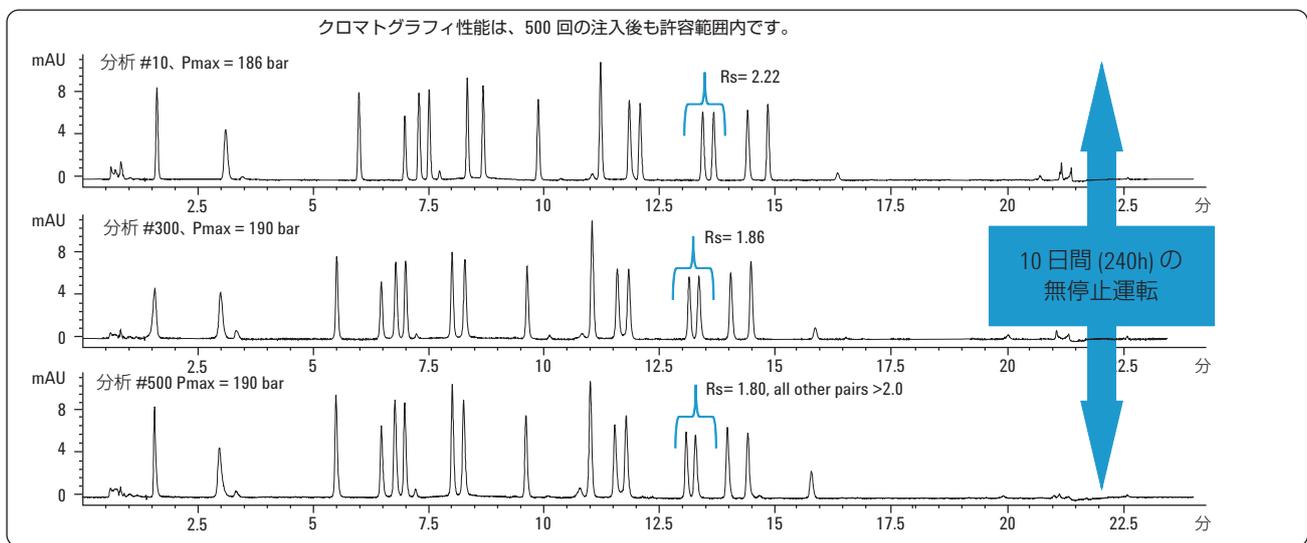


図 8. Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 \times 150 mm、3.5 μm の長時間テスト

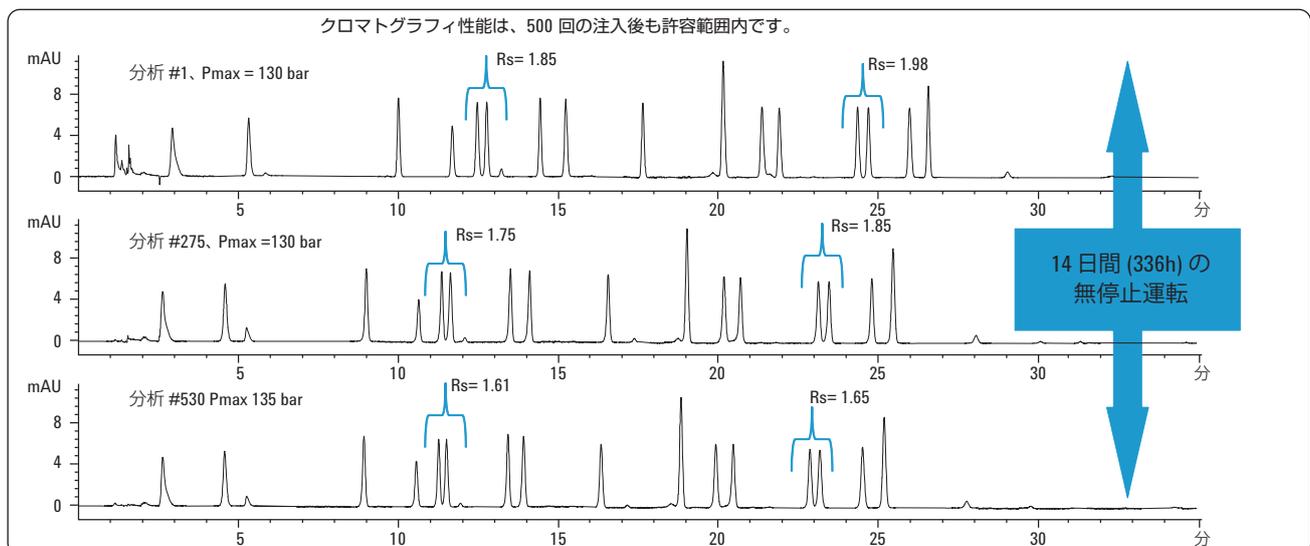


図 9. クォータナリ 1200 システムでの Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 3.0 \times 250 mm、5 μm の長時間分析

注入間の再現性

長時間分析データから、注入の再現性も認められました。図 10 は、9 回の反復注入の重ね書きです。これにより、リテンションタイムの再現性とピーク面積も簡単に比較できます。

溶出の早い、中程度、および遅いアミノ酸のピーク面積の相対標準偏差率 (%RSD) がクロマトグラムの下に計算されています。異なるカラムサイズを使用した同様の結果が報告されています [5、7]。

直線性

2.1 × 150 mm、3.5 μm と 4.6 × 100 mm、1.8 μm の 2 つのカラムを選択して直線性を示します。以前のアミノ酸プロトコルからの 3 ポイントの「標準感度」検量線を、100、250、および 1000 pmol/μL の「標準感度」アミノ酸混合物標準試料と追加の 10 および 25 pmol/μL の「高感度」標準試料 (蛍光検出用) を使用した 5 ポイントの検量線に拡張しました。

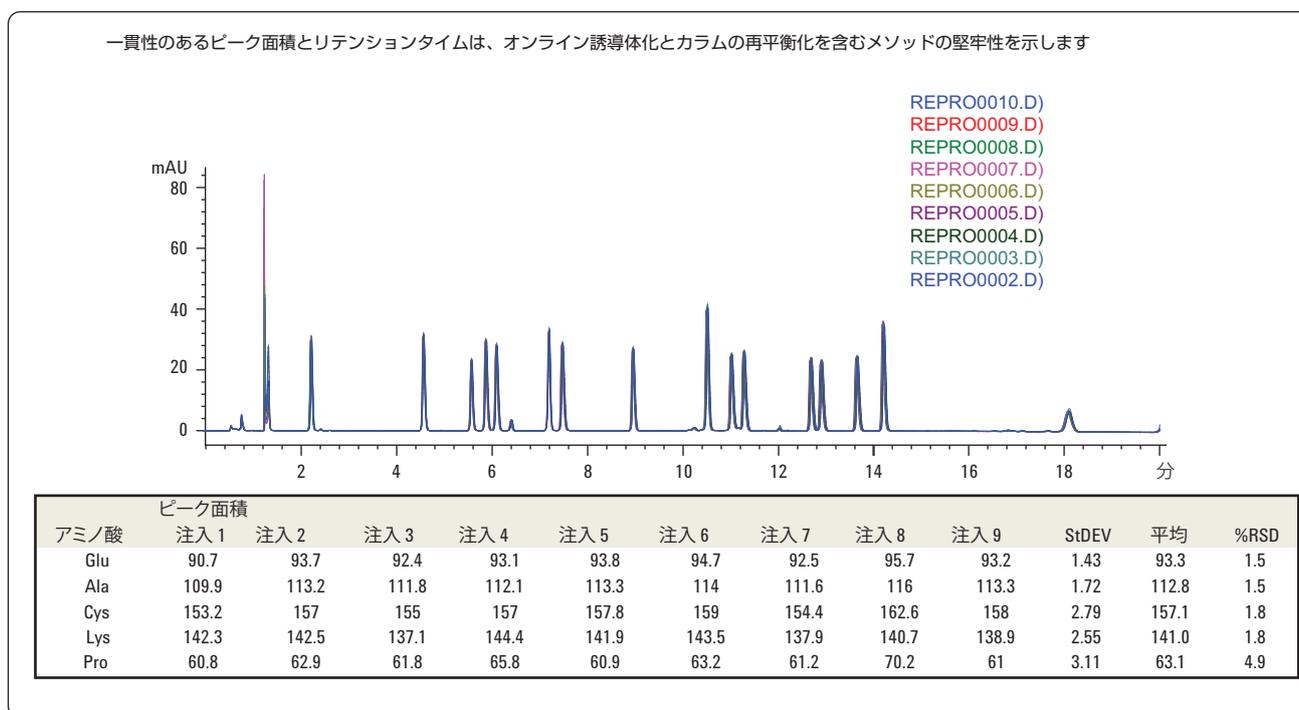


図 10. 連続注入の重ね書き、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、2.1 × 150 mm、3.5 μm、1 nmol/μl サンプル

図 11 と 12 は、Fmoc 誘導体化アミノ酸を含む、2つのカラム構成での溶出の早い、中程度、および遅いアミノ酸の検量線をプロットしています。この検量線は、標準試料の他のアミノ酸を代表するものです。表 6 に、これまでのアミノ酸メソッドで説明した、5 ポイントの検量線、およびより高濃度での 3 ポイントの検量線を使用した両方のカラムのすべての R^2 値をまとめます。10 ~ 1000 pmol/ μ L の直線性は、100 ~ 1000 pmol/ μ L の場合と同様に堅牢です。

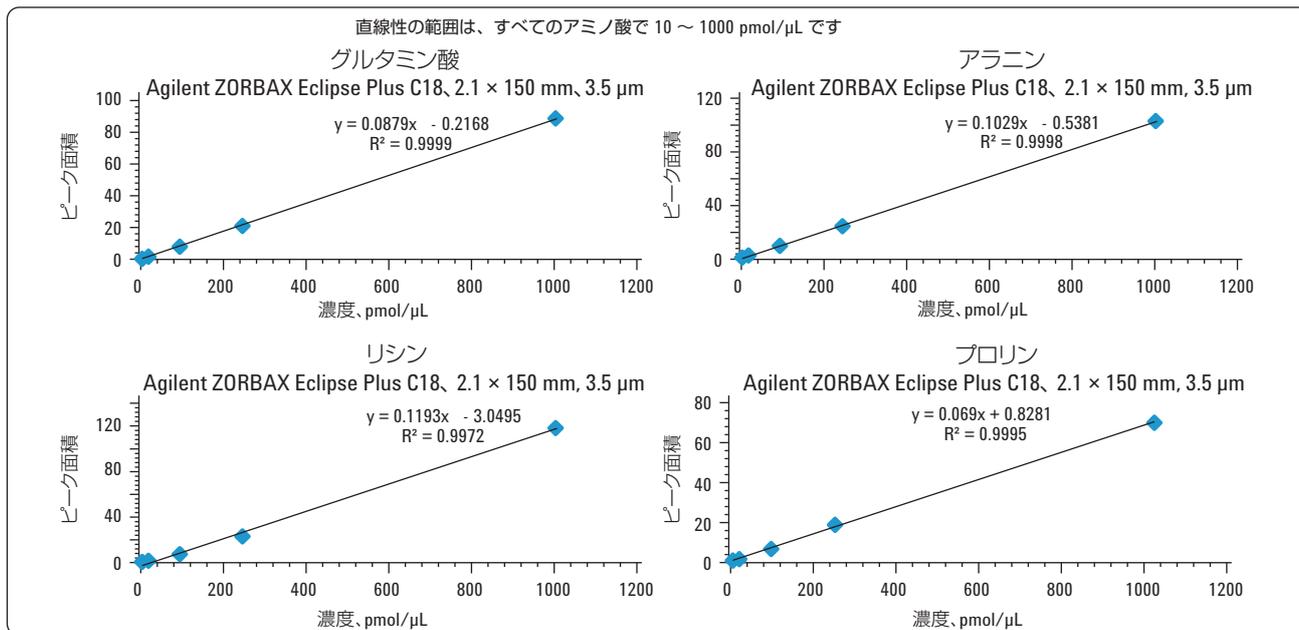


図 11. Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 2.1 × 150 mm、3.5 μm カラムでの溶出の早い、中程度、および遅いアミノ酸の 5 ポイントの検量線

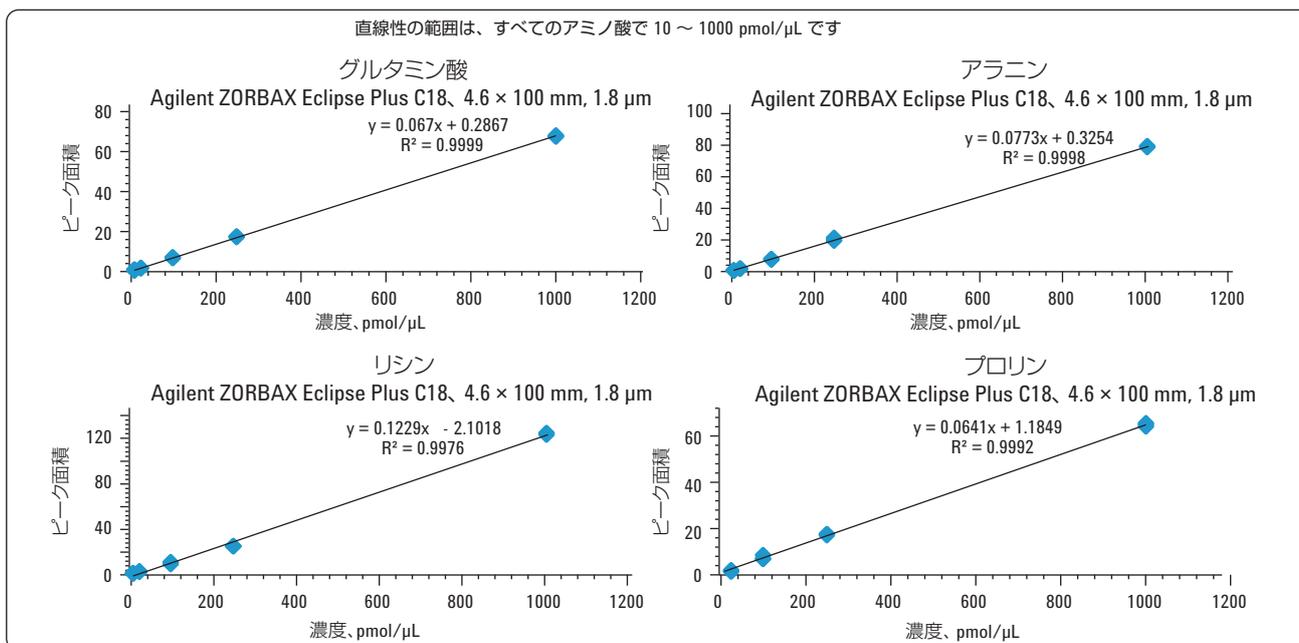


図 12. Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6 × 100 mm、1.8 μm カラムでの溶出の早い、中程度、および遅いアミノ酸の 5 ポイントの検量線

表 6. 5 ポイントおよび 3 ポイント検量線の R² 値

5 ポイント検量線の R² 値 (10 ~ 1000 pmol/μL)

アミノ酸	2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm 検量線	R ²	4.6 mm × 100 mm, 1.8 μm 検量線	R ²
ASP	y=0.0952x-0.2994	0.9999	y=0.0723x+1.1861	0.9976
GLU	y=0.0879x-0.2168	0.9999	y=0.0670x+0.2867	0.9999
SER	y=0.0983x-0.2968	0.9996	y=0.0746x+0.1128	1.0000
HIS	y=0.0716x-0.4109	0.9997	y=0.0555x+0.1748	1.0000
GLY	y=0.0956x-0.8918	0.9993	y=0.0758x-0.1374	0.9999
THR	y=0.0990x-0.3423	0.9999	y=0.0744x+0.2991	0.9999
ARG	y=0.1001x-0.5964	0.9997	y=0.0769x+0.1386	0.9999
ALA	y=0.1029x-0.5381	0.9998	y=0.0773x+0.3254	0.9998
TYR	y=0.0934x-0.4675	0.9998	y=0.0716x+0.1888	1.0000
CYS	y=0.1472x-2.0912	0.9994	y=0.1202x-0.5441	0.9998
VAL	y=0.1029x-0.3804	0.9998	y=0.0794x+0.2804	0.9999
MET	y=0.1008x-0.4284	0.9998	y=0.0780x+0.0927	1.0000
PHE	y=0.0945x-0.5314	0.9998	y=0.0730x+0.2714	0.9999
ILE	y=0.0982x-0.3882	0.9998	y=0.0739x+0.3198	0.9999
LEU	y=0.1001x-0.5408	0.9998	y=0.0767x+0.2263	0.9999
LYS	y=0.1193x-3.0495	0.9972	y=0.1229x-2.1018	0.9976
PRO	y=0.0690x+0.8281	0.9995	y=0.0641x+1.1849	0.9992

3 ポイント検量線の R² 値 (100 ~ 1000 pmol/μL)

アミノ酸	2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm 検量線	R ²	4.6 mm × 100 mm, 1.8 μm 検量線	R ²
ASP	y=0.0958x-0.7365	0.9999	y=0.0710x+2.2162	0.9982
GLU	y=0.0884x-0.6010	1.0000	y=0.0668x+0.4858	0.9999
SER	y=0.0995x-1.2270	0.9999	y=0.0745x+0.2204	1.0000
HIS	y=0.0723x-0.9605	0.9998	y=0.0554x+0.2005	0.9999
GLY	y=0.0971x-2.1402	0.9997	y=0.0762x-0.4390	1.0000
THR	y=0.0996x-0.7722	1.0000	y=0.0742x+0.4565	0.9999
ARG	y=0.1011x-1.4018	0.9998	y=0.0768x+0.1926	0.9999
ALA	y=0.1037x-1.1823	0.9999	y=0.0771x+0.5060	0.9997
TYR	y=0.0941x-1.0366	0.9999	y=0.0714x+0.3964	1.0000
CYS	y=0.1489x-3.4631	0.9997	y=0.1201x-0.4196	0.9999
VAL	y=0.1038x-1.1299	0.9999	y=0.0792x+0.4669	0.9998
MET	y=0.1016x-1.1133	0.9999	y=0.0779x+0.1347	1.0000
PHE	y=0.0954x-1.2188	0.9999	y=0.0728x+0.4522	1.0000
ILE	y=0.0990x-1.0161	0.9999	y=0.0737x+0.5095	0.9999
LEU	y=0.1009x-1.1797	0.9999	y=0.0765x+0.3618	0.9999
LYS	y=0.1233x-6.2802	0.9993	y=0.1261x-4.6725	0.9986
PRO	y=0.0686x+1.0919	0.9994	y=0.0635x+1.6958	0.9995

カスタマイズ

各メソッドの流路構成を表 5 に示します。移動相グラジエントは、多くのアミノ酸の分離に不可欠です。既知の流路によって、グラジエントディレイボリュームが、このアプリケーションノートで使用した LC システムとお客様のラボの LC システムとの間で同様であることが保証されます。ただし、カラム、移動相、および LC システムの堅牢性は、変更またはカスタマイズの

余地があります。たとえば、より長いフローセルに置き換えて、感度を向上させることができます (図 13 を参照)。

メソッドをカスタマイズする別の方法は、二級アミノ酸が重要ではない場合に、インジェクタプログラムの FMOC 誘導体化手順を排除し、グラジエントを変更することです。

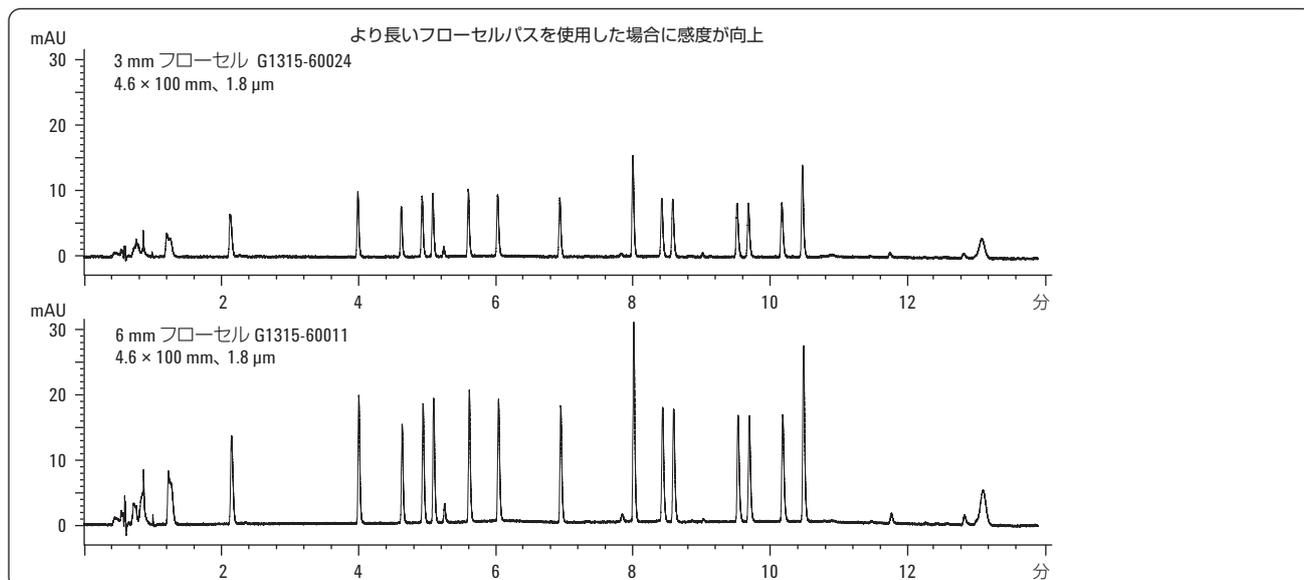


図 13. 100 mm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムと、異なるフローセルを使用した RRHT アミノ酸分析

結論

アミノ酸の自動オンライン誘導体化メソッドは、長さ、カラム内径、および 3 種類の粒子径を含む 10 種類のカラムサイズの Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムを使用して改良されました。多様なカラム選択肢により、高分解能、高速性、溶媒消費量の削減、またはニーズに最適な組み合わせが提供されます。

2.1 × 150 mm、3.5 μm カラムでは、AminoQuant メソッドに最も似たクロマトグラムが得られます。以前のプロトコルよりこのプロトコルが優れているもう 1 つの点は、クォータナリポンプ LC からバイナリポンプ LC、または 400-bar LC (Agilent 1100) から 600-bar LC (Agilent 1200 SL) など、あるタイプの LC システムから別のタイプへのメソッドの変換に柔軟性があることです。このプロトコルでは、最初に溶出する 2 つのアミノ酸であるアスパラギン酸およびグルタミン酸のリテンションも向上します。メソッドの正確性は、長時間テスト、バッチ間テスト、直線性テスト、およびカスタマイズ機能によって示されました。信頼性の高い Agilent LC 機器および実証済みの自動オンライン誘導体化と組み合わせられた ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムで、遊離アミノ酸の分析を向上させることができます。

参考文献

1. Rainer Schuster and Alex Apfel, Hewlett-Packard App. Note, Pub.# 5954-6257 (1986)
2. Rainer Schuster, J. Chromatogr., 431, 271-284 (1988)
3. Herbert Godel, Petra Seitz, and Martin Verhoef, LC-GC International, 5(2), 44-49 (1992)
4. John W. Henderson Jr, Robert D. Ricker, Brian A. Bidlingmeyer, and Cliff Woodward, "Rapid, Accurate, Sensitive and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids" Agilent Pub.# 5980-1193E (2000)
5. Cliff Woodward, John W Henderson Jr. and Todd Wielgos, "High-Speed Amino Acid Analysis (AAA) on Sub-Two Micron Reversed-phase (RP) Columns" Agilent Pub.# 5989-6297EN (2007)
6. Angelika Gratzfeld-Huesgen, "Sensitive and Reliable Amino Acid Analysis in Protein Hydrolysates using the Agilent 1100 Series HPLC" Agilent Pub.# 5968-5658EN (1999)
7. Jason Greene, John W. Henderson Jr., John P. Wikswo, "Rapid and Precise Determination of Cellular Amino Acid Flux Rates Using HPLC with Automated Derivatization with Absorbance Detection" Agilent Pub.# 5990-3283EN (2009)

表 7. 注文情報

誘導体化試薬 説明	アジレント 部品番号	
ホウ酸塩緩衝液: 水中に 0.4 M、pH 10.2、100 mL	5061-3339	
FMOC 試薬、ACN 中に 2.5 mg/mL、10 × 1 mL アンプル	5061-3337	
OPA 試薬、0.4M ホウ酸塩緩衝液中に 10mg/mL および 3-メルカプトプロピオン酸、6 × 1 mL アンプル	5061-3335	
システイン分析用の DTDPA 試薬、5 g	5062-2479	
移動相および注入希釈剤成分 説明	製造元	製造元 部品番号
Na ₂ HPO ₄ 、リン酸ナトリウム、二塩基性	Sigma	S 7907
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O、四ホウ酸ナトリウム十水和物	Sigma	S 9640
NaN ₃ 、アジ化ナトリウム	Sigma	S 2002
H ₃ PO ₄ 、オルトリン酸	Sigma	79617
バイアル 説明	アジレント 部品番号	
ガラスバイアルインサート、100 μL、樹脂足付	5181-1270	
茶色、広口、ライトオン、スクリューキャップバイアル、 2 mL、100 個	5182-0716	
青ポリプロピレンキャップ、PTFE/シリコンセプタム、 100 個	5182-0721	
透明ガラススクリューキャップバイアル、 6 mL、6 mm キャップサイズ、100 個	9301-1377	
スクリューキャップ、16 mm、100 個	9301-1379	
PTFE/シリコンセプタム、16 mm、100 個	9301-1378	
標準試料 説明	アジレント 部品番号	
0.1 M HCl 中のアミノ酸標準試料、10 × 1 mL アンプル		
1 nmol / mL	5061-3330	
250 pmol / mL	5061-3331	
100 pmol / mL	5061-3332	
25 pmol / mL	5061-3333	
10 pmol / mL	5061-3334	
アミノ酸補助キット:		
Nva、Sar、Asn、Gln、Trp、Hyp、各 1 g	5062-2478	

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

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., 2010
Printed in Japan
January 12, 2010
5990-4547JAJP



Agilent Technologies