

サンプル前処理をすばやく簡単に自動化

Agilent 1260 Infinity III マルチサンプラおよび
バイアルサンプラを用いたインジェクタワークフローによる
サンプル前処理



著者

Adem Cakar
Agilent Technologies, Inc.

概要

ラボで取り扱うサンプル数の増加に伴い、自動化ワークフローの需要が高まっていますが、ラボ環境への自動化の導入は難しく、時間とコストがかかります。この技術概要では、サンプル前処理の自動化メソッドを迅速かつ容易に実装するための代替方法について説明します。これには Agilent 1260 Infinity III マルチサンプラまたは Agilent 1260 Infinity III バイアルサンプラとインジェクタワークフローを組み合わせ使用した、アミノ酸サンプルの誘導体化、サンプルの希釈、キャリブレーション溶液の調製を含みます。得られた結果は、精度、再現性、感度の点で卓越していました。また、オペレータスキルの影響を受けていませんでした。

はじめに

誘導体化やキャリブレーション溶液の調製など、手作業によるサンプル前処理ワークフローは時間と労力がかかり、結果はオペレータのスキルに大きく左右されます。システムの自動化により、手作業による分注の工程を回避し、時間とコストを節約することができます。また、自動化されたシステムから得られる結果は、オペレータのスキルによる影響を受けません。しかし、液体を扱う自動システムをラボの環境に構築することは、困難でコストのかかるプロセスです。

1260 Infinity III バイアルサンプラや 1260 Infinity IglII マルチサンプラなどの Agilent InfinityLab オートサンプラでは、キャリブレーション溶液の調製、サンプルの希釈や誘導体化など、一連の操作を定義して、順番に実行するインジェクタプログラムを使用できます。つまり、サンプル前処理の自動ワークフローを設定するために機器を追加する必要はありません。これまで、インジェクタプログラムの作成にはある程度の専門知識と経験が必要でしたが、インジェクタワークフローを用いることで、どのようなレベルの LC ユーザーでも、簡単かつ迅速に作成できるようになります。

この技術概要では、インジェクタワークフローを従来のインジェクタプログラムと比較し、その利点を実証します。アミノ酸のプレカラム誘導体化やキャリブレーション溶液の調製などの分注ワークフローの実施には、1260 Infinity III バイアルサンプラまたは 1260 Infinity III マルチサンプラを搭載した Agilent 1260 Infinity III LC システムとインジェクタワークフローの組み合わせを使用しました。

実験

機器

1260 Infinity III LC のモジュール構成は次のとおりです。

- Agilent 1260 Infinity III バイナリポンプ (G7112B)
- **次のいずれか**：Agilent 1260 Infinity III バイアルサンプラ (G7129A)。一体型カラムコンパートメント (G7130A)、100 µL 分析ヘッド、および 100 µL サンプルループ付き (デフォルト設定)
- **または**：Agilent 1260 Infinity III マルチサンプラ (G7167A)。100 µL 分析ヘッドおよび 100 µL サンプルループ (デフォルト設定)、およびマルチカラムサーモスタット (G7116A)
- Agilent 1260 Infinity III 可変波長検出器 (VWD) (G7114A)、10 mm 標準フローセル (14 µL、オプション #018) 付属
- Agilent 1260 Infinity III 蛍光検出器 (FLD) (G7121B)、8 µL FLD セル (G1321-60005) 付属

ソフトウェア

Agilent OpenLab CDS バージョン 2.8 以降

カラム

- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 50 mm、2.7 µm (部品番号 699975-902)
- Agilent AdvanceBio AAA LC カラム、3.0 × 100 mm、2.7 µm (部品番号 695975-322)、Agilent AdvanceBio AAA ガードカラム、3.0 × 5 mm、2.7 µm (部品番号 823750-946) 付き

試薬

すべての実験で、LC 用 Agilent InfinityLab グラジエントグレードのアセトニトリル (部品番号 5191-5100*) と LC 用 Agilent InfinityLab グラジエントグレードのメタノール (部品番号 5191-5110*) を使用しました。超純水は、0.22 µm メンブレンカートリッジ

を備えた Milli-Q Integral (Millipak、Merck-Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国) システムで精製しました。リン酸二ナトリウム (Na_2HPO_4) と四ホウ酸ナトリウム十水和物 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) は Sigma-Aldrich (シュタインハイム、ドイツ) から購入しました。塩酸 (HCl) (37%) とリン酸 (85%) は Merck (ダルムシュタット、ドイツ) から入手しました。

以下の標準と誘導体化試薬はアジレントから入手しました。

- アミノ酸消耗品キット (部品番号 5062-2478)。内容：L-アスパラギン、L-グルタミン、L-トリプトファン、L-4-ヒドロキシプロリン、L-ノルバリン、サルコシン (各 1 g)
- アミノ酸標準、100 pmol/µL (部品番号 5061-3332)
- ホウ酸塩緩衝液、0.4 N、pH 10.2、100 mL (部品番号 5061-3339)
- FMOC 試薬、2.5 mg/mL クロロギ酸9-フルオレニルメチル、アセトニトリル溶液、10 × 1 mL (部品番号 5061-3337)
- OPA 試薬、*o*-フタルアルデヒドおよび 3-メルカプトプロピオン酸各 10 mg/mL、0.4 M ホウ酸塩緩衝液中、6 × 1 mL (部品番号 5061-3335)
- カフェイン標準キット、125 µg/mL (部品番号 8500-6762)

アミノ酸分析用溶媒

移動相 A： Na_2HPO_4 2.8 g と $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 7.6 g を水 1.9 L に溶かし、HCl (37%) 1.5 mL を加えます。均一になるまで混合し、HCl で pH を 8.2 に調整し、水を加えて 2 L にします。藻類の繁殖を防ぐため、茶色の 2 L 溶媒ボトル (部品番号 9301-6341) の使用をお勧めします。

*一部、対象外の国や地域もあります

移動相 B: アセトニトリル:メタノール:水
45:45:10 (v:v:v)

注入希釈液: 移動相 A 10 mL + リン酸 (85%) 200 μ L

OPA または FMOC アンブルの開封後、試薬をインサート (部品番号 5181-1270) およびスクリーキャップ (部品番号 5190-7024) 付き茶色バイアル (部品番号 5182-0716) に分注して保存し、1 週間以内に使用しました。ホウ酸塩緩衝液と注入希釈液はインサートの付いていないバイアルに入れました。試薬はすべて 4 ~ 8 $^{\circ}$ C で保存しました。また、オートサンプラの試薬は毎日交換しました。

アミノ酸標準溶液

アスパラギン、グルタミン、トリプトファン各 1.8 nmol/ μ L を含む拡張アミノ酸 (EAA) 原液は、アスパラギン 59.45 mg、グルタミン 65.77 mg、トリプトファン 91.95 mg を 25 mL 計量フラスコに計量し、0.1M HCl でメスアップして調製しました。この溶液を 0.1 M HCl で 1:10 に希釈しました。

ノルバリン、サルコシン各 1 nmol/ μ L を含む内部標準 (ISTD) 原液については、ノルバリン 58.58 mg とサルコシン 44.54 mg を 50 mL の計量フラスコに計量し、0.1 M HCl でメスアップして調製しました。この溶液を 0.1 M HCl で 1:10 に希釈しました。

凍結融解サイクルを避けるため、EAA 原液を分注してマイナス 20 $^{\circ}$ C で凍結保存することをお勧めします。

キャリブレーション溶液は、EAA 原液を 900、450、225、90、45、22.5、9 pmol/ μ L に希釈し、ISTD 原液と 1:1 で混合して調製しました。この後、これを各濃度のアミノ酸標準と 1:10 の割合で混合し、最終濃度 90、45、22.5、9、4.5、2.25、0.9、0.45 pmol/ μ L のアミノ酸と ISTD 50 pmol/ μ L を作成しました。

アミノ酸誘導体化のためのインジェクタワークフローを用いたサンプル前処理メソッド

ワークフローテンプレート (図 1) の「OPA/FMOC-protocol for AAA」(AAA 用 OPA/FMOC プロトコル) では、インジェクタワークフローでアミノ酸誘導体化を設定するためのユーザーインターフェースが表示されます (図 2)。このユーザーインターフェースで、サンプラの位置とサンプル、バッファ、試薬の量を選択します。また、攪拌パラメータを最適化するオプションもあります。さらに最適化が必要な場合は、詳細ビュー (図 3) ですべての必要なパラメータを変更できます。インジェクタワークフローの詳細ビューのインターフェースは、従来のインジェクタプログラムと同じです。

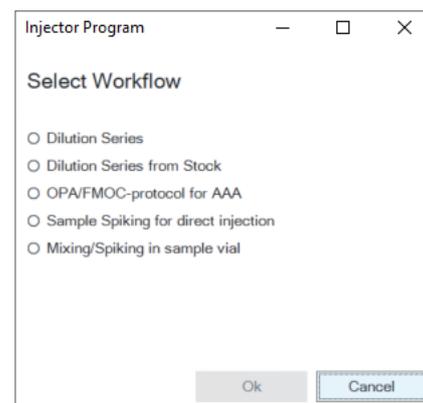


図 1. ワークフローテンプレートの選択画面

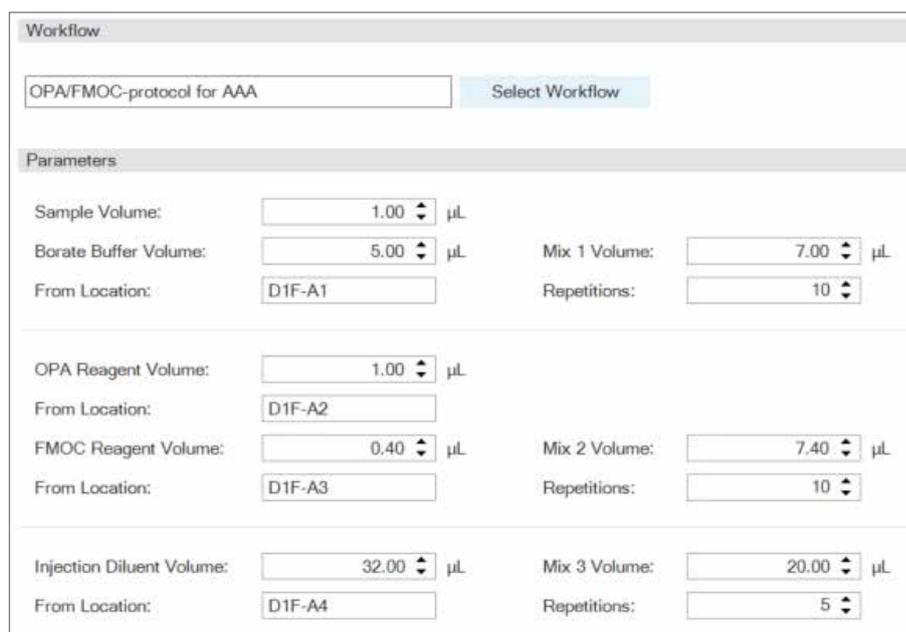


図 2. アミノ酸のプレカラム OPA/FMOC 誘導体化用ワークフローテンプレート

カフェイン原液とコントロールサンプル

カフェイン溶液 (125 µg/mL) を原液として使用し、インジェクタワークフローで 25 ~ 0.04 µg/mL のキャリブレーション溶液を調製しました。さらに、手作業で調製した カフェインコントロールサンプル 12.5 µg/mL を用いてキャリブレーションを評価しました。

インジェクタワークフローを用いた、 カフェインキャリブレーション溶液の 調製

連続希釈によるカフェインキャリブレーション溶液を調製するため、インジェクタプログラムの「Dilution Series」(段階希釈) オプション (図 1) を使用しました。希釈液が適切に混合されることを保証するため、平底ガラスバイアルインサート (部品番号 5181-3377) を使用する必要があるという点に留意することが重要です。このワークフローテンプレート (図 4) では、サンプルと希釈液の位置を割り当てる必要があります。希釈係数と希釈液の番号を選択できます。また、さらに最適化が必要な場合は、ここでも詳細ビュー (図 5) ですべての必要なパラメータを変更できます。

Function	Parameter
▶ Comm...	Comment: Workflow derived from template: OPA/FMOC-protocol for AAA
Draw	Draw 5.00 µL from location "D1F-A1" with default speed using default offset
Wash	Wash needle as defined in method
Draw	Draw 1.00 µL from sample with default speed using default offset
Wash	Wash needle as defined in method
Draw	Draw 1.00 µL from location "D1F-A2" with default speed using default offset
Wash	Wash needle as defined in method
Mix	Mix 7.00 µL from air with default speed for 10 times
Draw	Draw 0.40 µL from location "D1F-A3" with default speed using default offset
Wash	Wash needle as defined in method
Mix	Mix 7.40 µL from air with default speed for 10 times
Draw	Draw 32.00 µL from location "D1F-A4" with maximum speed using default offset
Wash	Wash needle as defined in method
Mix	Mix 20.00 µL from air with maximum speed for 5 times
Inject	Inject

図 3. アミノ酸のプレカラム OPA/FMOC 誘導体化に使用されるインジェクタワークフローにおける個々のコマンドが表示された詳細ビュー

Workflow

Dilution Series Select Workflow

Parameters

Draw Sample	From Location: Location ▼ <input type="text" value="D1F-A2"/>	Sample Volume: <input type="text" value="18.00"/> µL	
Draw Dilution Solvent	From Location: <input type="text" value="D1F-A1"/>	Dilution Factor 1: <input type="text" value="5"/>	Diluent Volume: 72.00 µL

<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Target Location</th> <th>Sample Volume in Target [µL]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>▶ D1F-B1</td><td>18.00</td></tr> <tr><td>D1F-B2</td><td>3.60</td></tr> <tr><td>D1F-B3</td><td>0.72</td></tr> <tr><td>D1F-B4</td><td>0.14</td></tr> <tr><td>D1F-B5</td><td>0.03</td></tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">Add Remove</p>	Target Location	Sample Volume in Target [µL]	▶ D1F-B1	18.00	D1F-B2	3.60	D1F-B3	0.72	D1F-B4	0.14	D1F-B5	0.03	<p>Mix Mode: Air bubble ▼</p> <p>Repetitions: <input type="text" value="10"/></p> <p>Speed: <input type="radio"/> Default <input checked="" type="radio"/> Maximum <input type="text" value="20.0"/> µL/min</p>
Target Location	Sample Volume in Target [µL]												
▶ D1F-B1	18.00												
D1F-B2	3.60												
D1F-B3	0.72												
D1F-B4	0.14												
D1F-B5	0.03												

図 4. 段階希釈用ワークフローテンプレート

Function	Parameter
▶ Comment	Comment: Workflow derived from template: Dilution Series
Draw	Draw 72.00 µL from location "D1F-A1" with default speed using default offset
Wash	Wash needle as defined in method
Eject	Eject maximum volume to location "D1F-B1" with default speed using default offset
Wash	Wash needle as defined in method
Draw	Draw 18.00 µL from location "D1F-A2" with default speed using default offset
Wash	Wash needle as defined in method
Eject	Eject maximum volume to location "D1F-B1" with default speed using default offset
Repeat	Repeat 10 time(s)
Draw	Draw maximum volume from air with default speed
Eject	Eject maximum volume to location "D1F-B1" with default speed using default offset
End Repeat	End Repeat

図 5. 段階希釈で使用されるインジェクタワークフローにおける個々のコマンドが表示された詳細ビュー

メソッド

表 1. プレカラム誘導体化アミノ酸分析のクロマトグラフィー条件

パラメータ	値															
カラム	Agilent AdvanceBio AAA LC カラム、3.0 × 100 mm、2.7 μm と Agilent AdvanceBio AAA ガードカラム、3.0 × 5 mm、2.7 μm															
移動相	A) 10 mM Na ₂ HPO ₄ および 10 mM Na ₂ B ₄ O ₇ 、pH : 8.2 B) アセトニトリル/メタノール/水 (45:45:10、v:v:v)															
グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>0.40</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>13.60</td> <td>43</td> <td>57</td> </tr> <tr> <td>14</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table> ストップタイム：17 分 ポストタイム：3 分	時間 (分)	%A	%B	0	98	2	0.40	98	2	13.60	43	57	14	0	100
時間 (分)	%A	%B														
0	98	2														
0.40	98	2														
13.60	43	57														
14	0	100														
流量	0.600 mL/min															
温度	40 °C															
検出	FLD : 励起 : 345 nm、発光 : 455 nm 13.00 分後、励起を変更 : 265 nm、発光を変更 : 315 nm PMT ゲイン : 10 ピーク幅 : > 0.025 分 (18.52 Hz)															
注入	Agilent 1260 Infinity III バイアルサンプルと 100 μL 分析ヘッドおよび 100 μL ループ - 注入量 : 1 μL - ニードル洗浄 : 3 秒。アセトニトリル: 0.1 M HCl (50:50、v:v) を使用 - サンプリング速度 : 吸引速度 : 200 μL/min、吐出速度 : 400 μL/min - ニードル高さ位置 : オフセット 0.0 mm - サンプル温度 : 8 °C Agilent 1260 Infinity III マルチサンプルと 100 μL 分析ヘッドおよび 100 μL ループ - 注入量 : 1 μL - ニードル洗浄 : 3 秒。アセトニトリル: 0.1 M HCl (50:50、v:v) を使用 - サンプリング速度 : 吸引速度 : 200 μL/min、吐出速度 : 400 μL/min - ニードル高さ位置 : バイアルボトムセンシング使用、オフセット 0.0 mm - サンプル温度 : 8 °C															

表 2. カフェインの分析のクロマトグラフィー条件

パラメータ	値												
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 50 mm、2.7 μm												
移動相	A) 水 B) アセトニトリル												
グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>3.00</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>3.1</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> </tbody> </table> ストップタイム：4 分 ポストタイム：3 分	時間 (分)	%A	%B	0	95	5	3.00	50	50	3.1	10	90
時間 (分)	%A	%B											
0	95	5											
3.00	50	50											
3.1	10	90											
流量	0.500 mL/min												
温度	40 °C												
検出	VWD : 273 nm、20 Hz												
注入	Agilent 1260 Infinity III バイアルサンプルと 100 μL 分析ヘッドおよび 100 μL ループ - 注入量 : 5 μL - ニードル洗浄 : 3 秒。アセトニトリル:水 (50:50、v:v) を使用 - サンプリング速度 : 吸引速度 : 200 μL/min、吐出速度 : 400 μL/min - ニードル高さ位置 : オフセット 0.0 mm - サンプル温度 : 8 °C Agilent 1260 Infinity III マルチサンプルと 100 μL 分析ヘッドおよび 100 μL ループ - 注入量 : 5 μL - ニードル洗浄 : 3 秒。アセトニトリル:水 (50:50、v:v) を使用 - サンプリング速度 : 吸引速度 : 100 μL/min、吐出速度 : 400 μL/min - ニードル高さ位置 : オフセット -3.0 mm - サンプル温度 : 8 °C												

結果と考察

インジェクタワークフローの自動化の可能性を示すために、キャリブレーション溶液を用いた一連のアミノ酸誘導体化ワークフローと、カフェイン溶液の連続希釈を用いたキャリブレーション溶液希釈ワークフローを作成しました。カフェインを使用したアミノ酸誘導体化と希釈のワークフローの結果は、従来のインジェクタプログラムと比較して、このインジェクタワークフローが同様の結果をもたらすことを示しています。従来のインジェクタプログラムの結果と性能はすでに発表されています^{1,2}。

アミノ酸分析

図 6 に示すクロマトグラムは、1260 Infinity III マルチサンプルとインジェクタワークフローを使用して誘導体化されたアミノ酸 22.5 pmol/μL と ISTD 50 pmol/μL を含むアミノ酸キャリブレーション溶液の分析から得られたものです。このクロマトグラムは、17 分以内に 20 種類のアミノ酸と 2 種類の ISTD の分離に成功したことを示しています。

感度を確認するために、90 ~ 0.45 pmol/μL の検量線を作成しました。再現性を示すため、アミノ酸 22.5 pmol/μL と ISTD 50 pmol/μL を含むキャリブレーション溶液を 10 回連続注入して測定しました。分析中の再現性、感度、キャリブレーションの結果を表 3 と 4 に示します。

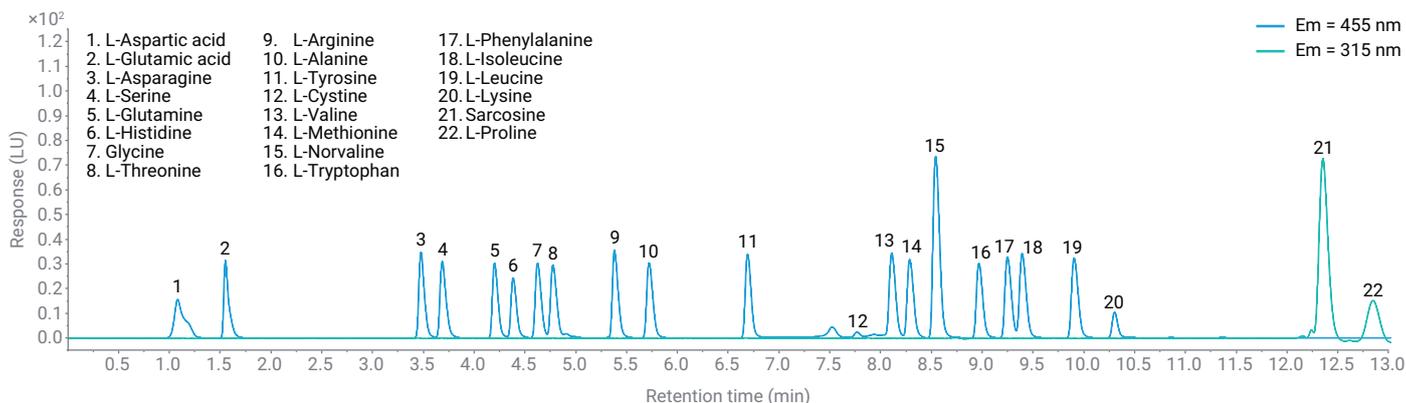


図 6. 22.5 pmol/μL のアミノ酸混合物と 50 pmol/μL の ISTD の分析から得られたクロマトグラム

表 3. Agilent 1260 Infinity III マルチサンブラでインジェクタワークフローを使用して行われたアミノ酸分析の検量線の直線性、感度、再現性。最終濃度が 22.5 pmol/μL の各アミノ酸と 50 pmol/μL の ISTD のアミノ酸混合物を 10 回連続注入して、相対標準偏差 (RSD) を計算しました。検出限界 (LOD) には、S/N 値の 3 倍をしきい値として使用しました。

ピーク番号	化合物	RT (分)	RT RSD (%)	面積 RSD (%)	LOD (pmol/μL)	キャリブレーション範囲 (pmol/μL)	キャリブレーションのタイプ	R ²
1	L-アスパラギン酸	1.07	0.61	0.34	0.227	0.45 ~ 90	直線	0.99999
2	L-グルタミン酸	1.56	0.60	0.36	0.117	0.45 ~ 90	直線	0.99997
3	L-アスパラギン	3.47	0.07	0.25	0.112	0.45 ~ 90	直線	0.99990
4	L-セリン	3.68	0.06	0.29	0.068	0.45 ~ 90	直線	0.99992
5	L-グルタミン	4.20	0.04	0.23	0.121	0.45 ~ 90	直線	0.99986
6	L-ヒスチジン	4.38	0.03	0.98	0.143	0.45 ~ 90	二次	0.99999
7	グリシン	4.62	0.03	0.32	0.090	0.45 ~ 90	直線	0.99997
8	L-トレオニン	4.77	0.03	0.20	0.122	0.45 ~ 90	直線	0.99997
9	L-アルギニン	5.38	0.02	0.21	0.107	0.45 ~ 90	直線	0.99998
10	L-アラニン	5.72	0.02	0.21	0.110	0.45 ~ 90	直線	0.99998
11	L-チロシン	6.69	0.02	0.30	0.110	0.45 ~ 90	直線	0.99998
12	L-システイン	7.76	0.04	1.71	1.399	2.25 ~ 90	二次	0.99994
13	L-バリン	8.11	0.03	0.23	0.109	0.45 ~ 90	直線	0.99997
14	L-メチオニン	8.28	0.03	0.91	0.142	0.45 ~ 90	直線	0.99998
15	L-ノルバリン*	8.54	0.03	0.36	NA	NA	NA	NA
16	L-トリプトファン	8.96	0.03	0.49	0.133	0.45 ~ 90	直線	0.99996
17	L-フェニルアラニン	9.24	0.02	0.21	0.126	0.45 ~ 90	直線	0.99998
18	L-イソロイシン	9.39	0.02	0.33	0.116	0.45 ~ 90	直線	0.99999
19	L-ロイシン	9.90	0.02	0.34	0.121	0.45 ~ 90	直線	0.99999
20	L-リジン	10.30	0.02	2.32	0.39	0.45 ~ 90	二次	0.99993
21	サルコシン*	12.35	0.02	3.29	NA	NA	NA	NA
22	L-プロリン	12.84	0.02	3.18	1.606	2.25 ~ 90	二次	0.99943

* ISTD

表 4. Agilent 1260 Infinity III バイアルサンブラでインジェクタワークフローを使用して行われたアミノ酸分析の検量線の直線性、感度、再現性。最終濃度が 22.5 pmol/μL の各アミノ酸と 50 pmol/μL の ISTD のアミノ酸混合物を 10 回連続注入して、RSD を計算しました。LOD には、S/N = 3 をしきい値として使用しました。

ピーク番号	化合物	RT (分)	RT RSD (%)	面積の RSD (%)	LOD (pmol/μL)	キャリブレーション範囲 (pmol/μL)	キャリブレーションのタイプ	R ²
1	L-アスパラギン酸	1.194	0.338	0.469	0.167	0.45 ~ 90	直線	0.99994
2	L-グルタミン酸	1.808	0.456	0.632	0.267	0.45 ~ 90	直線	0.99995
3	L-アスパラギン	3.657	0.139	0.512	0.137	0.45 ~ 90	直線	0.99980
4	L-セリン	3.875	0.110	0.563	0.137	0.45 ~ 90	直線	0.99997
5	L-グルタミン	4.389	0.081	0.623	0.141	0.45 ~ 90	直線	0.99967
6	L-ヒスチジン	4.573	0.079	1.313	0.254	0.45 ~ 90	二次	0.99972
7	グリシン	4.829	0.079	0.559	0.166	0.45 ~ 90	直線	0.99996
8	L-トレオニン	4.966	0.075	0.541	0.213	0.45 ~ 90	直線	0.99984
9	L-アルギニン	5.569	0.070	0.588	0.184	0.45 ~ 90	直線	0.99998
10	L-アラニン	5.933	0.050	0.639	0.186	0.45 ~ 90	直線	0.99997
11	L-チロシン	6.912	0.078	0.643	0.163	0.45 ~ 90	直線	0.99998
12	L-システイン	7.991	0.048	1.181	0.886	0.90 ~ 90	二次	0.99973
13	L-バリン	8.326	0.044	0.676	0.149	0.45 ~ 90	直線	0.99998
14	L-メチオニン	8.517	0.037	2.892	0.563	0.90 ~ 90	直線	0.99962
15	L-ノルバリン*	8.764	0.034	0.573	NA	NA	NA	NA
16	L-トリプトファン	9.209	0.026	0.653	0.156	0.45 ~ 90	直線	0.99981
17	L-フェニルアラニン	9.479	0.025	0.675	0.187	0.45 ~ 90	直線	0.99999
18	L-イソロイシン	9.615	0.025	0.525	0.169	0.45 ~ 90	直線	0.99997
19	L-ロイシン	10.137	0.017	0.581	0.189	0.45 ~ 90	直線	0.99997
20	L-リジン	10.535	0.012	1.287	0.564	0.45 ~ 90	二次	0.99999
21	サルコニン*	12.578	0.016	3.521	NA	NA	NA	NA
22	L-プロリン	13.067	0.013	2.961	0.477	0.90 ~ 90	二次	0.99965

* ISTD

大半の化合物で優れたリテンションタイム (RT) とピーク面積の精度が得られ、RT RSD は 0.1 % 未満、ピーク面積 RSD は 1 % 未満でした (n = 10)。また、L-システインと L-プロリンを除くすべてのアミノ酸で、LOD がほとんど 0.4 pmol/μL 未満であり優れた感度が得られました。L-システインの感度が低いのは、OPA で形成されるシステイン付加体の蛍光が他のアミノ酸の付加体の蛍光よりも低いという事実によって説明できます³。

カフェインのキャリブレーション

図 7 に、カフェイン標準の分析から得られた検量線を示します。この標準は、インジェクタワークフローから希釈系列テンプレートを使用して 1260 Infinity III マルチサンプルで調製したものです。このワークフローでは、カフェイン原液を 25 ~ 0.04 µg/mL の範囲で段階希釈してから、測定を行っています。

特定された検量線の相関係数 (表 5) は、1260 Infinity III マルチサンプルと 1260 Infinity III バイアルサンプルが優れた希釈精度をもたらすことを示しています。検量線評価のため、濃度 12.5 µg/mL の偏差コントロールサンプルを手作業で調製しました。表 4 は、1260 Infinity III マルチサンプルとバイアルサンプルの検量線が、このコントロールサンプルで卓越した結果が得られたことを示しています。

結論

インジェクタワークフローは、Agilent 1260 Infinity III マルチサンプルまたは Agilent 1260 Infinity III バイアルサンプルと組み合わせることで、アミノ酸の誘導体化、サンプルの希釈、キャリブレーション溶液の調製など、特定のサンプル前処理メソッドを優れた精度、再現性、感度で自動化できます。このインジェクタワークフローは、エラーを出さずにすばやく簡単にメソッドを設定できるため、時間とコストを節約できるという点で、従来のインジェクタプログラムとは異なります。

ホームページ

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

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。

DE-001917

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, October 21, 2024

5994-7703JAJP

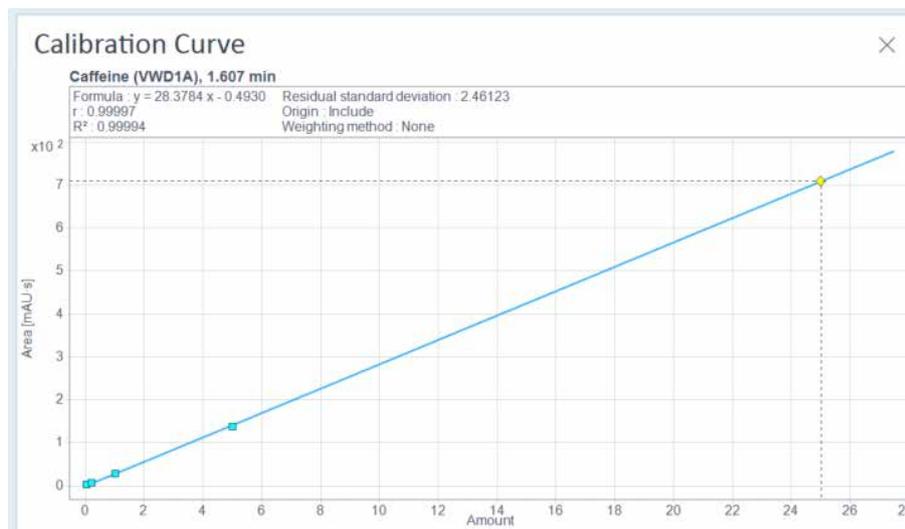


図 7. Agilent 1260 Infinity III マルチサンプルで得られた検量線

表 5. Agilent 1260 Infinity III マルチサンプルおよび Agilent 1260 Infinity III バイアルサンプルで調製したキャリブレーション溶液を使用したカフェイン検量線

オートサンプル	検量線関数	相関係数 R ²	コントロールサンプル偏差 (%)
Agilent 1260 Infinity II マルチサンプル	$y = 28.3784x - 0.4930$	R ² = 0.99994	3.58 %
Agilent 1260 Infinity II バイアルサンプル	$y = 28.5657x - 0.7107$	R ² = 0.99999	0.79 %

参考文献

- Schipperges, S. Comparison of Plant-Based Meat Alternatives and Meat. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-5950EN, **2023**.
- Schipperges, S. LC オートサンプルによるピペッティングの自動化. *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5994-1704JAJP, **2020**.

- Lee, K. S.; Drescher, D.G. Derivatization of Cysteine and Cystine for Fluorescence Amino Acid Analysis with the o-Phthaldialdehyde/2-Mercaptoethanol Reagent. *JBC* **1979**, 254(14), 6248–6251.