

## 高感度、高精度、ハイスループットを実現した アミノ酸の HPLC 分析

- Zorbax Eclipse-AAA カラムと Agilent 1100 HPLC  
によるアミノ酸分析

### Authors

理想的なアミノ酸の定量分析は、誘導体化反応と分析手法の双方で信頼性のある分析速度と感度を有する必要があります。このようなアミノ酸分析は、1級アミノ酸にo-フタルアルデヒド (OPA)、2級アミノ酸に9-フルオレニルメチルククロフォルメート (FMOC) を用いた自動プレカラム誘導体化法と堅牢な HPLC 分析手法との組み合わせで達成できます。Agilent 1100 HPLC により、分析速度、感度、真度と再現性に優れた理想的なアミノ酸分析が可能になります。

### はじめに

OPA と FMOC による誘導体化手法を用いることで、迅速なプレカラム誘導体化でのアミノ酸分析が可能となります。誘導体化反応を pH 10.2 の緩衝液中で行うことにより、酸加水分解サンプルを直接誘導体化することができます。1級アミノ酸はまず、3-メルカプトプロピオン酸 (3-MPA) 共存下で OPA で誘導体化されます。2級アミノ酸は OPA とは反応しないため、OPA の後に加えられる FMOC で誘導体化されます。OPA 誘導体化物の疎水性は FMOC 誘導体化物より小さくなるため、FMOC 誘導体化物の前に溶出します。過剰な FMOC やその分解物は 2級アミノ酸の後に溶出するため、分析の妨害とはなりません。

誘導体化は迅速に進行し、Agilent G1313A オートサンブラにより簡単に自動化できます。反応速度が速いため、OPA、FMOC どちらの誘導体化反応も室温で完全に終了します。誘導体化が自動化されているので、優れた再現性を得ることができます。長さ 75 mm のカラムを使用したときの分析周期は 14 分 (分析時間は 10 分)、長さ 150 mm のカラムでは、分析周期は 26 分 (分析時間は 16 分) です。どちらのカラムでも高速分析が可能です。

### 分離条件の選択

Zorbax Eclipse-AAA カラムは、バッチ間再現性に優れた逆相系充填剤を使用しています。このテクニカルノートに書かれたプロトコルを用いれば、酸加水分解されたタン

パク質、ペプチド中のアミノ酸を分離することができます。

アミノ酸は 2液グラジェントで分離します。どちらの移動相も調製が容易で、またグラジェントプログラムはリニアグラジェントを使用しているため (詳細は実験条件 / 移動相の項を参照して下さい)。アミノ酸分析のプロトコルは非常に使いやすいものとなりました。

Agilent 1100 シリーズのバイナリ、クォータリポンプのどちらでも対応可能です。

Fig. 1 に示したクロマトグラムは、バイナリポンプとダイオードアレイ検出器 (DAD) を使用したシステムで得られたアミノ酸 24 種の高速分離例です (各アミノ酸の濃度は 125 pmol)。1 回の分析はカラムの再平衡化時間を含めて 14 分

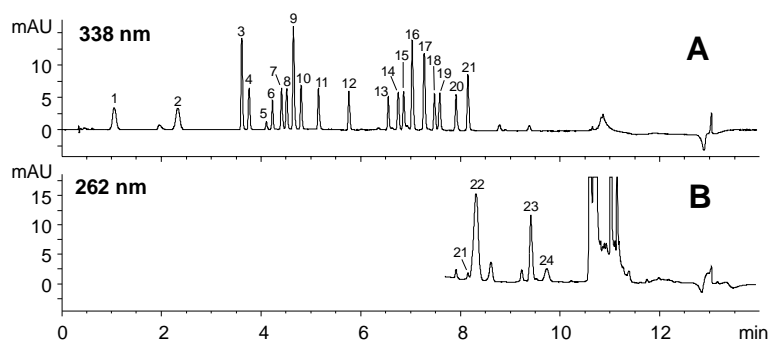


Figure 1 : Routine Analysis, High-Throughput Separation of 24 Amino Acids Using the Eclipse-A AA Protocol. The column dimensions are 4.6 x 75 mm, 3.5  $\mu$ m. See Table 1 for peak identification. Detection: A. 338 nm (OPA amino acids), B. 262 nm (FMOC-amino acids).

あり、各アミノ酸で良好な分離が得られています。詳細な分離条件は実験条件に記述されています。1級アミノ酸（OPAで誘導体化）は338 nmで検出し（Fig.1A）、2級アミノ酸（FMOCで誘導体化）は262 nmで検出しています（Fig.1B）。アミノ酸の注入量は各125 pmolです（0.5  $\mu$ l）。

Table 1. Amino Acid Elution Order Using Eclipse-AAA Protocol

Peak No.	Amino Acid	3-Letter Code
1	Aspartate	ASP
2	Glutamate	GLU
3	Asparagine	ASN
4	Serine	SER
5	Glutamine	GLN
6	Histidine	HIS
7	Glycine	GLY
8	Threonine	THR
9	Citrulline	CIT
10	Arginine	ARG
11	Alanine	ALA
12	Tyrosine	TYR
13	Cystine	CY2
14	Valine	VAL
15	Methionine	MET
16	Norvaline	NVA
17	Tryptophan	TRP
18	Phenylalanine	PHE
19	Isoleucine	ILE
20	Leucine	LEU
21	Lysine	LYS
22	Hydroxyproline	HYP
23	Sarcosine	SAR
24	Proline	PRO

75 mmカラムでの高速分析より、高い分離度が必要とされる場合は、150 mmカラムの使用が適しています。Fig.2は粒子径3.5および5  $\mu$ mの充填剤を充填した長さ150 mmのEclipse-AAAカラムでの高分解能な分離例です。ここでは、OPAで誘導体化した1級アミノ酸（338 nmで検出）の分離を示しています。粒子径3.5  $\mu$ mと5  $\mu$ mの充填剤で、クロマトグラムの形状は類似していますが、3.5  $\mu$ mの充填剤による分離は効率が高いためより高い分解能を示しています。3.5  $\mu$ mの充填剤を充填したカラムの圧損は240-300 barで、一方、5  $\mu$ mの充填剤を充填し

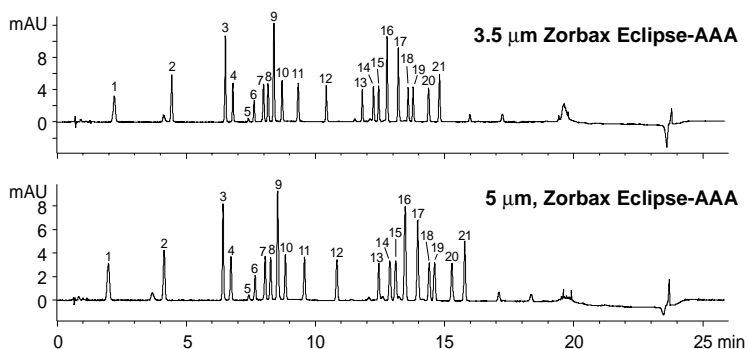


Figure 2 : High-Resolution Analysis of 21 Amino Acids: on the 5 $\mu$ m and 3.5 $\mu$ m Zorbax Eclipse-AAA Column. Column dimensions are 4.6 x 150 mm. See Table 1 for peak identification. Detection: 338 nm (OPA amino acids).

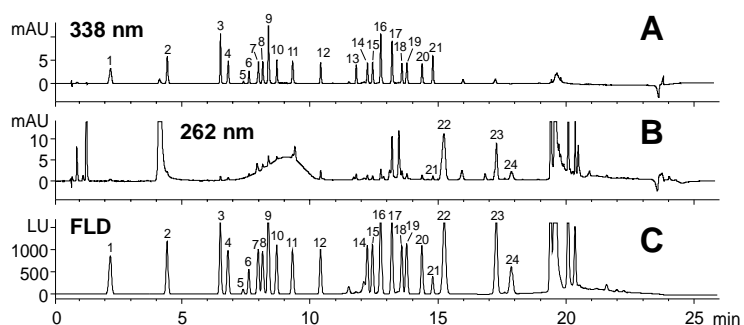


Figure 3: High Sensitivity , High-Resolution Analysis of Amino Acids Using Different Detection Modes and the Zorbax Eclipse-AAA Protocol. The column dimensions are 4.6 x 150 mm, 3.5 $\mu$ m. See Table 1 for peak identification. Detection: A. UV 338 nm (OPA amino acids), B. UV 262 nm (FMOC-amino acids), C. fluorescence (see Experimental Conditions ).

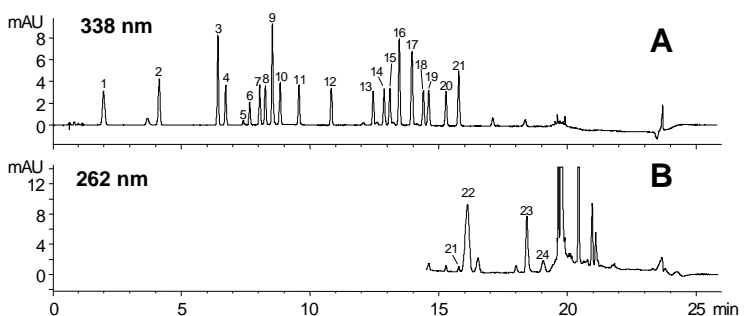


Figure 4: Routine Analysis, High Resolution of 24 Amino Acids Using the Eclipse-AAA Protocol. The column dimensions are 4.6 x 150 mm, 5 $\mu$ m. See Table 1 for peak identification. Detection: A. UV 338 nm (OPA amino acids), B. UV 262 nm (FMOC-amino acids).

たカラムの圧損は160-210 barです。したがって、1級アミノ酸だけを15 cmのカラムで分析する場合、システム全体の圧損を小さくするために5  $\mu$ mの充填剤の使用をお勧めします。

3.5  $\mu$ mの充填剤を充填した15cmカラムのメリットは、Fig.3と4の比較で明らかです。Fig. 3Aは338 nmで検出した1級アミノ酸、3Bは262 nmで検出した2級アミノ酸、3Cは蛍光検出を示しています。Fig.3と4におけるピーク#21 (リシン)とピーク#22 (ヒドロキシプロリン)の分離度に注目して下さい。小さい充填剤を充填した長いカラムを使用するとこれらのピークは分離度は向上し、その結果DADやFLDの波長切り換えのために必要な時間を、十分に確保することができます。

262 nmで検出を行うと (Fig. 3B)、誘導体化反応の副生成物に起因する小さなベースラインのうねりが7~10分の間に現れます。この時間帯では1級アミノ酸だけを338 nmで検出しているため、このベースラインのうねりは検出や分離に影響を与えません。ヒドロキシプロリンのような2級アミノ酸を検出するためには、2波長同時検出が最適です。2波長同時検出ができない検出器を使用する場合は、波長切り換えを使用します。

蛍光 (またはUV) 波長の切り換え時間は、温度や移動相等の変化に伴い、変える必要があります。Fig. 3Cでは450 nm (Ex. 340 nm) から、ピーク#21 (リシン) が溶出しピーク#22 (ヒドロキシプロリン) が溶出する前に、305 nm (Ex. 266 nm) へ切り換えるようにプログラムしています。Fig. 3Cの場合は、15分で波長を切り換えるようにプログラムしています。詳細は、実験条件 / 検出の項を参照して下さい

い。ピーク#24 (プロリン) の溶出後、移動相組成をB 100%にして反応副生成物をカラムから溶出させます。B 100%の移動相にしてから3.7分後、移動相組成を初期条件に戻しカラムを平衡化します。なお、この条件下ではピーク#13 (シスチン) は蛍光検出できません。

### リシンとヒドロキシプロリンの分離と波長切り換え

リシンとヒドロキシプロリンの分析は検出条件やカラムの選択を大きく左右し、結果的に分析時間にも影響します。ヒドロキシプロリンより前に溶出するアミノ酸 (リシンとそれより早く溶出するアミノ酸) は、OPAで誘導体化され338 nmで検出されます。ヒドロキシプロリンはリシンのすぐ後に溶出し、FMOC誘導体の中で最初に溶出しますが、検出を262 nmで行う必要があります。もっとも簡単な方法は、Agilent 1100 DADを用いて338 nmと262 nmのデータを同時に採取することです。

DADが使用できない場合は、OPA誘導体とFMOC誘導体の両方を検出するために、1チャンネルの検出波長を切り換える必要があります。Agilent 1100 VWD (可変波長型UV-Vis検出器) を使用する場合は、

1チャンネルでのデータ採取となります。リシンとヒドロキシプロリンの分離度は、複雑なグラジエントプロファイルを用いれば向上させることができます。これらの情報をAgilentでは下記のwebで公開しています。

[www.agilent.com/chem/TechnicalSupport / "User Contributed Software"](http://www.agilent.com/chem/TechnicalSupport/UserContributedSoftware)

注意! なお、このサイトで公開している情報について、国内でのサポート状況の詳細は弊社および弊社代理店担当者にお問い合わせ下さい。

ヒドロキシプロリンが測定対象になっていない場合 (タンパク質加水分解物の分析など) は、どのサイズのカラムも使用可能ですし、波長切り換えの時間はリシンと最初に溶出するFMOC誘導体 (サルコシンカプロリン) の間で任意に選ぶことができます。このケースでは、内径4.6mm、長さ75mmのカラムが適切で、分析時間も半減するメリットがあります。

### HP 1090 HPLC の AminoQuant との比較

Fig.5 AはHP1090でAminoQuantメソッドを実行したときのクロマトグラムです (アプリケーションノート、HP Pub. No. 5954-6257)。5つのアミノ酸のペア

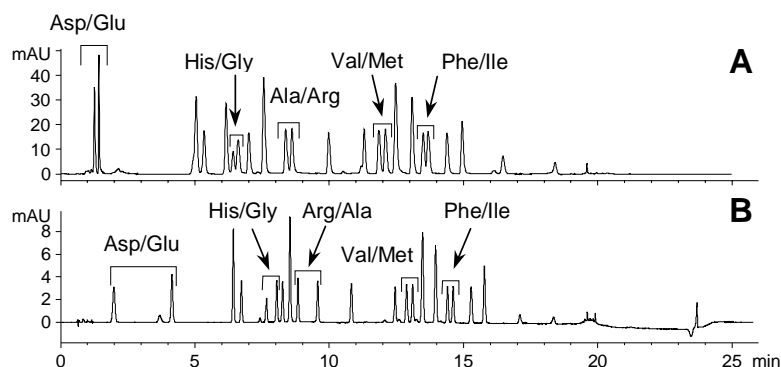


Figure 5: Comparison of Amino-Acid Analyses. A) AminoQuant Method on the HP 1090 HPLC with a Hypersil A A Column. B) Zorbax Eclipse-AAA Column (4.6 x 150 mm, 5  $\mu$ m) on the Agilent 1100 HPLC.

( Asp/Glu、 His/Gly、 Ala/Arg、 Val/Met、 Phe/Ile )での分離が良好ではなく、特にAsp/Gluはボイドボリューム付近に溶出しています。

Fig. 5BはZorbax Eclipse-AAAカラムによるクロマトグラムです。分離が悪かったアミノ酸のペアの分離度はすべて向上しています。とりわけAsp/Gluは分離度が向上した上に、ボイドボリュームからも十分に離れて溶出しています。、アルギニン ( Arg ) はアラニン ( Ala ) の前の溶出しており、AminoQuantの場合と溶出位置が逆転しています。

### 再現性

アミノ酸混合サンプルをZorbax Eclipse- AAAカラム ( 内径4.6mm、長さ150mm、粒径3.5 μ m ) で6回連続分析したときの保持時間とピーク面積値の再現性をTable 2に示します。それぞれの分析毎に誘導体化と分離が行われています。保持時間の再現性は、極めて良好な相対標準偏差 ( %rsd ) を示しており、全アミノ酸の平均値は0.18%でした。ピーク面積値の変動に現れる誘導体化反応の再現性は相対標準偏差の平均で2%でした。これらの値はHP 1090のAminoQuantで報告された値とほぼ同等です ( 保持時間：0.23%、ピーク面積値：2.3%、LC/GC International, Volume 5, Number 2, Feb 1992, pp.44-49 )。

### 直線性と感度

Eclipse-AAAを用いたアミノ酸分析手法は4.5 pmol ~ 450 pmolの範囲で直線性を示します ( アミノ酸標準液、0.5 μ l 注入時 )。Fig. 6はいくつかのアミノ酸の検量線です ( 6AはDAD、6BはFLD )。検量線の相関係数は、DAD、FLD共24種類のアミノ酸全てで0.99900 ~ 1.00000でした。

DADとFLDによる5 pmolと50

pmolのアミノ酸のクロマトグラムをそれぞれ、Fig. 7、8に示します。DADでは10 pmol程度が検出下限です ( Fig. 7 )。FLDではより高感度に検出できます ( Fig. 8 )。

Amino Acid	Retention %†rsd	Peak Area %†rsd
ASP	0.58	0.8
GLU	0.33	3.0
ASN	0.16	2.2
SER	0.12	2.8
GLN	0.12	2.4
HIS	0.11	2.7
GLY	0.15	2.5
THR	0.12	1.1
CIT	0.10	3.5
ARG	0.36	2.3
ALA	0.11	0.9
TYR	0.12	0.7
CY2	0.17	0.6
VAL	0.16	0.5
MET	0.17	1.1
NVA	0.15	0.7
TRP	0.18	0.8
PHE	0.14	0.8
ILE	0.14	1.1
LEU	0.18	1.0
LYS	0.19	3.2
HYP	0.13	4.2
SAR	0.14	6.8
PRO	0.12	2.7
Mean	0.18	2.0

Table 2: Reproducibility of the Zorbax Eclipse-AAA Protocol for the Analysis of Amino Acids. An Agilent 1100 System with quaternary pump was used. Values represent six replicate analyses.

### 結論

OPAおよびFMOC誘導体化反応と、Zorbax Eclipse-AAAカラム、Agilent 1100シリーズHPLCシステムと組み合わせることにより、タンパク質およびペプチド加水分解物のアミノ酸分析を10分以内で行うことが可能です。この手法は、HP 1090上で行っていたAminoQuantと比較して、分離が悪かったアミノ酸同士の分離が改善されています。アミノ酸分析の再現性はAmino

Quantと同等である上に、移動相の調製はバッファのpHを調整するだけ ( 移動相A ) であり、非常に簡単になりました。カラムの選択は必要とされる分析時間と分離度に応じて選択します。

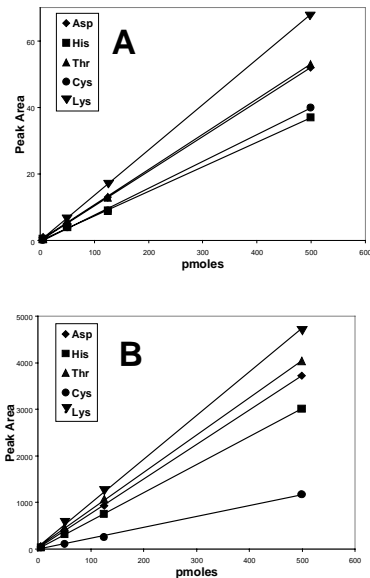


Figure 6: Calibration curves for analysis of amino acid derivatives by UV (A) or FLD (B) detection. Linearity is demonstrated for the concentration range of 4.5 to 450 pmoles in 0.5 μ l of sample.

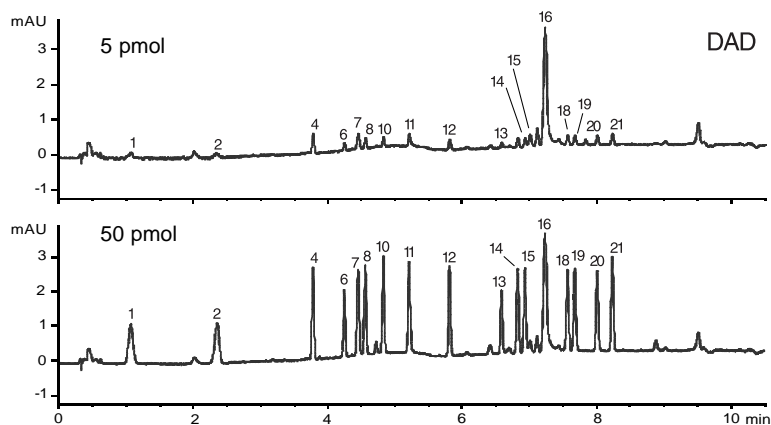


Figure 7 : UV-Detector Response 338 nm (OPA-derivatives) Using Different Concentrations of Amino Acids.

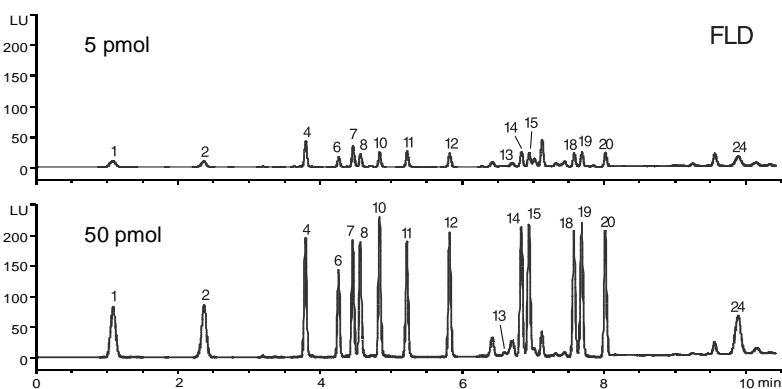


Figure 8: Fluorescence-Detector Response Using Different Concentrations of Amino Acids. Gain for the Photomultiplier Tube (PMT) = 10.

ZORBAX Eclipse - AAA, 4.6 x 75 mm (3.5 μm)  
DADを利用するハイスループット分析用です。

ZORBAX Eclipse - AAA, 4.6 x 150 mm (5 μm)  
DADを利用して低いカラム圧で高分離度を必要とする分析用です。

ZORBAX Eclipse - AAA, 4.6 x 150 mm (3.5 μm)  
FLDを利用して高感度で高分離度を必要とする分析用です。

ZORBAX Eclipse - AAA, 3.0 x 150 mm (3.5 μm)  
FLDを利用して高感度で高分離度

を必要とする分析用です。溶媒消費量とサンプル量を小さく抑えることができます。

Agilent 1313Aオートサンプラをプレカラム誘導体化に用いることで、迅速で再現性に優れた誘導体化を短時間で実現できます。この分析手順は、DADでの2波長同時検出あるいはVWDでの波長切り換えにより1級アミノ酸と2級アミノ酸のルーチン分析に使用できます。より高感度な分析には、蛍光検出器が必要です。

#### 実験条件

Fig. 1-8のクロマトグラムは以下の実験条件で採取しました。

#### 装置

推奨システムは、Agilent 1100 HPLC : G1312A バイナリポンプ、G1315B ダイオードアレイ検出器 (DAD、光路長6 mmもしくは10 mm のフローセルを使用)、G1321A プログラマブル蛍光検出器 (必要に応じて) です。ここで示したクロマトグラムはすべてバイナリポンプを使用しましたが、クォータナリポンプ (G1354A) も使用できます。

#### HPLC カラム

ZORBAX Eclipse-AAA, 4.6 x 75 mm, 3.5 μm, PN 966400-902  
ZORBAX Eclipse-AAA, 4.6 x 150 mm, 3.5 μm, PN 963400-902  
ZORBAX Eclipse-AAA, 4.6 x 150 mm, 5 μm, PN 993400-902  
ZORBAX Eclipse-AAA, 3.0 x 150 mm, 3.5 μm, PN 961400-302

#### ガードカラム\*

ZORBAX Eclipse-AAA, 4.6 x 12.5 mm, 5 μm, 4/PK, PN 820950-931

\*ガードカラムは低デッドボリュームのコネクタで分離カラムの前に直接、取り付けます。

#### 移動相

A : 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.8 (5.67gのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O) を1lの水に溶解し、10N NaOH溶液でpH 7.8に調整します)  
B : ACN / MeOH / 水= 45/45/10 (v/v/v)

pHを調整していない移動相Aの10倍濃度の原液 (400 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) を調製しておく便利です。この原液は数週間保存が可能です。使用する際に10倍に希釈しpH 7.8にpHを調整します。有機溶媒は

すべてHPLCグレードを使用して下さい。

### ポンプの設定

流量 : 2 mL/min  
 ストップタイム : 14 min  
 (75 mmカラム使用時)、  
 26 min  
 (150 mm カラム使用時)  
 ポストタイム : off  
 補助設定 (Auxiliary):  
 最大流量グラジエント  
 (Max. flow ramp):  
 100 mL/min<sup>2</sup>  
 圧縮率 (Compressibility)  
 A : 50 x 10<sup>-6</sup>  
 最小ストローク  
 (Minimal Stroke)  
 A : 20 μL  
 圧縮率 (Compressibility)  
 B : 115 x 10<sup>-6</sup>  
 最小ストローク  
 (Minimal Stroke)  
 B : Auto  
 グラジエント  
 75 mm カラム  

Time (min)	% B
0	0
1	0
9.8	57
10	100
12	100
12.5	0
14	0

### 150 mm カラム

Time (min)	% B
0	0
1.9	0
18.1	57
18.6	100
22.3	100
23.2	0
26	0

注意：カラム寿命を長くするために、一晩以上カラムを使用しないときは、カラム容積

の10倍量の移動相Bでカラムを洗浄して下さい。

### 検出器の設定

DAD:  
 ランプ:  
 UV lamp: on  
 Vis. lamp: off  
 波長：サンプル：338 nm, BW 10 nm、リファレンス：390 nm, BW 20 nm (for OPA-amino acids)  
 サンプル：262 nm, BW 16 nm リファレンス：324 nm, BW 8 nm (for FMOc-amino acids)  
 : >0.03 min (0.5 s)  
 スリット：4 nm

### FLD:

75 mm カラムを使用する場合の設定

Time (min)	Ex/Em(nm)	PMT Gain
0	340/450	10
8.5*	266/305	9

150 mm カラム

Time(min)	Ex/Em(nm)	PMT Gain
0	340/450	10
15*	266/305	9

\* 波長切り換えの時間は温度、移動相等の条件で変化します。

ピーク幅 (レスポンスタイム) : >0.5 min

### オートサンプラの設定

Fig. 9のバイアルの位置を参考にして下さい。

### インジェクタプログラム

吸引(Draw) 2.5 μL from バイアル 1 (ホウ酸緩衝液)  
 吸引(Draw) 0.5 μL from サンプル (例 #11にアミノ酸のサンプルをセット)  
 混合(Mix) 3 μL in air, max speed, 2回  
 待機(Wait) 0.5 min  
 吸引(Draw) 0 μL from バイアル 2 (キャップ無しのバイアルに水を入

れニードルを洗浄)

吸引(Draw) 0.5 μL from バイアル 3 (OPA)  
 混合(Mix) 3.5 μL in air, max speed, 6回  
 吸引(Draw) 0 μL from バイアル 2 (キャップ無しのバイアルに水を入れニードルを洗浄)  
 吸引(Draw) 0.5 μL from バイアル 4 (FMOc)  
 混合(Mix) 4 μL in air, max speed, 6回  
 [高感度で分析する場合は、ニードル洗浄を追加する  
 吸引(Draw) 0.0 μL from バイアル 6 (ACN)]  
 吸引(Draw) 32 μL from バイアル 5 (水)  
 混合(Mix) 18 μL in air, max speed, 2回  
 注入(Inject)

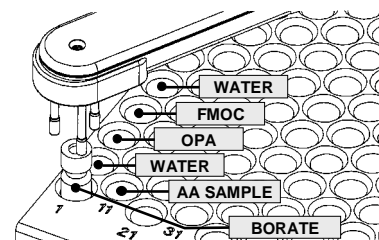


Figure 9: Position of reagent vials in the Agilent 1313A aut osampler. This positioning of vials is designed for the listed injector program.

### バイアル

OPAとFMOc試薬は少量しか使用しないので、ガラス製インサートを使用します (Fig. 10 A)。インサートは2ml スクリューキャップバイアルやクリンプバイアルに使用できます (Fig. 10 B-C)。この分析手順ではスナップキャップバイアルは使用しないで下さい。これは、FMOcが揮発しやすいこととOPAが酸素存在下で緩やかに分解していくことにより、気密性の高いシール

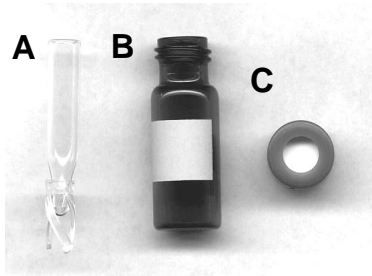


Figure 10: Insert, Vial, and Cap. Photo of conical insert A (Agilent PN 5181-1270), amber wide-opening vial B (Agilent PN 5182-0716), and screw cap C (Agilent PN 5182-0721), for amino acid analysis using the Agilent 1100 autosampler.

が必要なためです。他の機器用にデザインされたバイアルやキャップを使用しないで下さい。Agilent 1313A オートサンプラを損傷する可能性があるため、他の機器用にデザインされたバイアルやキャップを使用しないで下さい。

#### カラム恒温槽

カラム温度：40

分析可能：設定温度(0.8

#### 誘導体化試薬

ホウ酸緩衝液：

Agilent PN 5061-3339

0.4 N 水溶液 (pH 10.2)

冷蔵保存して下さい (4 °C)。

使用時にボトルからバイアルへ分注して下さい。

FMOc Reagent:

Agilent PN 5061-3337

アンプルを開けインサートをセットしたバイアルに100 μLずつ入れ、直ちにキャップをします。小分けしたFMOc試薬の保存期限は、冷蔵保存 (4 °C) で10日間です。

OPA Reagent:

Agilent PN 5061-3335

アンプルを開けインサートをセットしたバイアルに100 μLずつ入れ、直ちにキャップをします。小分

けたOPA試薬の保存期限は、冷蔵保存 (4 °C) で10日間です。

水：

HPLCグレードを使用して下さい。

このテクニカルノート最後のにあるオーダー情報を参照して下さい。

#### 注意！

バイアルに入れた全ての試薬は毎日交換して下さい。

開封後のアンプルの保存期限は冷蔵保存 (4 °C) で、10日間です。

FMOcは揮発しやすく、OPAは酸素により分解しますので、開封後のアンプルは気密状態にするか、アンプルに小分けしてしっかりとキャップをして下さい。

#### サンプルの調整

クロマトグラムチェック用アミノ酸混合標準液

クロマトグラムチェック用に、250 pmol/μL 17種アミノ酸混合標準液 (PN: 5061-3331) にシトルリン (citrulline) とサプリメントアミノ酸6種を混ぜて、おおよそ250 pmol/μLの溶液を調製します。調製には下記の2種類の溶液を使用します。サプリメントアミノ酸6種の溶液 1 μLを新しい250 pmole 17種アミノ酸混合標準液 100 μLに添加します。ボルテックスミキサーで混合すれば、24種アミノ酸混合標準液 (概ね250 pmol/L) になります。

#### 250 pmole 標準液

250 pmol/μLアミノ酸標準液 (PN: 5061-3331、1mL入アンプル) を100 μLずつに小分けしてバイアルに入れます。小分け後はキャップをして4 で保存して下さい。

#### サプリメントアミノ酸標準液

サプリメントアミノ酸キット (PN: 5062-2478) のアミノ酸 (グルタミン、アスパラギン、トリプト

ファン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン) を0.25 mモルずつ秤量し、20 mLバイアルに入れます。5 mLの脱イオン水を加え温水中で超音波をあてて、完全に溶解させます。さらに5 mLの脱イオン水を加えます。調製後は冷蔵保存 (4 ) して下さい。シトルリン (シグマアルドリッチ製) を、この混合溶液に他のアミノ酸と同じ濃度になるように加えます。

保存時は、サプリメントアミノ酸と17種アミノ酸混合標準液を混ぜないで下さい。サプリメントアミノ酸のいくつか (特にグルタミンとアスパラギン) は、17種アミノ酸混合標準液に使用されている塩酸で分解します。

#### 検量線作成用アミノ酸混合標準液

検量線作成には、17種アミノ酸混合標準液に4種類のアミノ酸と内部標準 (ノルバリンとサルコシン) を加えて調製します。4種類のアミノ酸と内部標準 (ノルバリンとサルコシン) はサプリメントアミノ酸キット (PN: 5062-2478) に含まれています。一般分析、高感度分析用の検量作成用標準液の調製法をそれぞれ Table 3、4に示しました。

#### 17種アミノ酸標準液 (A A standard, 10 pmol/(L - 1 nmol/L))

各濃度のアミノ酸標準液 (PN: 5061-3330 - 5061-3334、1mL入アンプル) を100Lずつに小分けしてバイアルに入れます。小分け後はキャップをして4 で保存して下さい。検量線作成には必要に応じて、2~5種類の濃度の標準液を使用します。

#### 4種アミノ酸標準液 (EAA)

この溶液は、サプリメントアミノ酸キット (PN: 5062-2478) の中の

4種類のアミノ酸を使用して作成します。一般分析用標準液 (Table 3) は、18 nmol/ $\mu$ L グルタミン、アスパラギン、トリプトファン、ヒドロキシプロリン混合水溶液を25mL調製します。超音波をかけて各アミノ酸を完全に溶解させます。この水溶液は冷蔵保存 (4 ) して下さい。高感度分析用標準液 (Table 4) は、上記溶液を脱イオン水で10倍に希釈して (各アミノ酸濃度は1.8 nmol/ $\mu$ L) 使用します。この水溶液も冷蔵保存 (4 ) して下さい。

#### 内部標準 (ISTD) 溶液

内部標準 (ISTD) 溶液は、サプリメントアミノ酸キット (PN: 5062-2478) の中の2種類のアミノ酸を使用して作成します。一般分析用標準液 (Table 3) は、10 nmol/ $\mu$ L ノルバリンとサルコシン混合水溶液を25mL調製します。超音波をかけて各アミノ酸を完全に溶解させます。この水溶液は冷蔵保存 (4 ) して下さい。高感度分析用標準液 (Table 4) は、上記溶液を脱イオン水で10倍に希釈して (各アミノ酸濃度は1 nmol/ $\mu$ L) 使用します。この水溶液も冷蔵保存 (4 ) して下さい。

#### 追加情報

世界中のユーザーから提供された各カラムに対応したメソッドやドキュメント、レポートレイアウト、マクロプログラムなどを下記のサイトからダウンロードすることができます。

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)  
"Technical Support" / "User Contributed Software"

なお、このサイトで公開している情報について、国内でのサポート状況の詳細は弊社および弊社代理店担当者にお問い合わせ下さい。

Table 3 : 標準アミノ酸標準液 (UV検出用) の作成。保存用溶液を下記に従い溶液を混合することで3種類の標準液を準備します。

	アミノ酸標準液 濃度 (pmol/ $\mu$ L)		
	900	225	90
18nmolEAA溶液を5 mL採取	5mL	5mL	5mL
の0.1N HClで希釈	-	15mL	45mL
希釈後のEAA 混合液の容量	5mL	20mL	50mL
希釈後のEAA溶液を5 mL 採取	5mL	5mL	5mL
10 nmol ISTD 溶液を右記容量添加	5mL	5mL	5mL
EAA-ISTD混合溶液の容量	10mL	10mL	10mL
EAA-ISTD混合液を100 $\mu$ L採取	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
右記容量の1000pmol AA標準液を添加	900 $\mu$ L	-	-
右記容量の250pmol AA標準液を添加	-	900 $\mu$ L	-
右記容量の100pmol AA標準液を添加	-	-	900 $\mu$ L
EAA 500 pmol/ $\mu$ L ISTD混合液の最終容量	1 mL	1 mL	1 mL

Table 4 : 高感度アミノ酸標準液の作成。保存用溶液を下記に従い溶液を混合することで3種類の高感度標準液を準備します。

	アミノ酸標準液 濃度 (pmol/ $\mu$ L)		
	90	22.5	9
18nmolEAA溶液を5 mL採取	5mL	5mL	5mL
の0.1N HClで希釈	-	15mL	45mL
希釈後のEAA 混合液の容量	5mL	20mL	50mL
希釈後のEAA溶液を5 mL 採取	5mL	5mL	5mL
1nmol ISTD 溶液を右記容量添加	5mL	5mL	5mL
EAA-ISTD混合溶液の容量	10mL	10mL	10 mL
EAA-ISTD混合液を100 $\mu$ L採取	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
右記容量の100pmol AA標準液を添加	900 $\mu$ L	-	-
右記容量の25pmol AA標準液を添加	-	900 $\mu$ L	-
右記容量の10pmol AA標準液を添加	-	-	900 $\mu$ L
EAA 50 pmol/ $\mu$ L ISTD混合液の最終容量	1mL	1mL	1mL

## オーダー情報

Eclipse-AAA HPLC カラム			
内容	サイズ (mm)	粒子径 ( $\mu\text{m}$ )	Agilent 部品 No
分析カラム	4.6 x 150	5 $\mu\text{m}$	993400-902
高分解能カラム (FLD検出用)	4.6 x 150	3.5 $\mu\text{m}$	963400-902
高速分析カラム	4.6 x 75	3.5 $\mu\text{m}$	966400-902
高感度、高分解能カラム	3.0 x 150	3.5 $\mu\text{m}$	961400-302
ガードカラム (4/pk)	4.6 x 12.5	5 $\mu\text{m}$	820950-931
ガードハードウェアキット	-	-	820777-901

誘導体化試薬	
内容	Agilent 部品 No.
ホウ酸バッファ: 0.4 M 水溶液, pH 10.2, 100mL	5061-3339
FMOc 試薬, 2.5 mg/mL CAN溶液, 10 x 1 mL アンブレ	5061-3337
OPA 試薬, 10mg/mL : 0.4M ホウ酸バッファ / 3-メカトピルピコ酸溶液, 6 x 1mL アンブレ	5061-3335
DTDPA 試薬 : シスチン, 5g 分析用	5062-2479

バイアル	
内容	Agilent 部品 No.
100 $\mu\text{L}$ インサート (樹脂足付), 100/pk	5181-1270
広口スクリーバイアル, 2mL, 100/pk	5182-0716
スクリーキャップ (緑), PTFE/シリコンパッキン, 100/pk	5182-0721

標準試料	
内容	Agilent 部品 No.
アミノ酸標準液 0.1 M HCl 溶液, 10 x 1mL アンブレ	
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
サプリメント アミノ酸: Nva, Sar, Asn, Gln, Trp, Hyp, 各1g	5062-2478

©Copyright Agilent Technologies  
2000

すべての権利は留保されています。著作権法で認められている場合を除き、本書を許可なく複製、改作、翻訳することは禁止されています。



For more information on our products, visit the Agilent Technologies home page at: [www.agilent.com/chem/supplies](http://www.agilent.com/chem/supplies)

Printed in Japan  
Part No. 5980-1193JAJP