

# Agilent Poroshell HPH-C18 カラムを用いた 自動アミノ酸分析

## アプリケーションノート

食品検査、農業、医薬品

### 著者

William Long  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

このアプリケーションノートでは、3.5 および 1.8  $\mu\text{m}$  の Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムに関して以前に開発された自動プレカラム OPA/FMOC アミノ酸メソッドを、2.7  $\mu\text{m}$  の Agilent Poroshell HPH-C18 表面多孔質カラムも対象に含めて実施しています。この分析において、このカラムの寿命が長いこと、および異なるカラム寸法への変換が容易できることが示されています。さらに、発酵生成物に対するカラムのアプリケーションについても説明します。



**Agilent Technologies**

## はじめに

表面多孔質粒子 (SPP) の技術は、硬質なコアと表面が多孔性の外殻を持つ粒子をベースとしています。これらの粒子は、1.7  $\mu\text{m}$  の硬質コアと 0.5  $\mu\text{m}$  の多孔性外殻で構成されています。全体として 1 個の粒子サイズは約 2.7  $\mu\text{m}$  です。2.7  $\mu\text{m}$  の表面多孔質粒子では、サブ 2  $\mu\text{m}$  の全多孔質粒子よりも背圧は 40 ~ 50 % 低く、効率はサブ 2  $\mu\text{m}$  の全多孔質粒子の 80 ~ 90 % です。表面多孔質粒子は全多孔質粒子よりも、狭い粒子サイズの分布を示します。この結果、より均一性が高いカラムベッドとなり、カラムの分散が低減します。また、多孔性外殻が薄いため、物質移動抵抗は低くなります。これにより、高流量での効率の損失が最低限に抑えられます [1]。また、カラムには 2  $\mu\text{m}$  のフリットが組み込まれているため、詰まりに対しては、3.5  $\mu\text{m}$  および 5  $\mu\text{m}$  のカラムと同程度の耐性があります。最近まで、すべてのシリカベースの SPP 材料は、リン酸バッファなどの高 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、表面修飾または特殊な結合修飾によってベースの粒子を保護する必要があります。Agilent Poroshell HPH-C18 粒子の表面は、独自プロセスにより有機層を形成するように化学的に修飾されており、高 pH 条件でのシリカ溶出に対して耐性があります。

HPLC カラムと機器は絶えず改良されているため、それに応じて HPLC メソッドも随時改善されています。HP 1090 シリーズ時代に HPLC システムで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) により誘導体化したアミノ酸を対象として開発された実績のあるメソッドは、後に Agilent 1100 シリーズ用にアップデートされました。現在では Agilent 1260 Infinity バイナリ LC および Agilent Poroshell HPH-C18 表面多孔質カラムを利用するように改良されています [2 ~ 8]。

## 実験方法

### HPLC 移動相の前処理

移動相 A には、10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、10 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  (pH 8.2)、および 5 mM  $\text{NaN}_3$  が含まれています。1 L の水に、1.4 g 無水  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、3.8 g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、および 32 mg  $\text{NaN}_3$  を計量して加えます。1.2 mL HCl で約 pH 8.4 に調整してから、塩酸を数滴加えて pH 8.2 にします。pH の調整前に、ホウ酸ナトリウム結晶が完全に溶出するよう攪拌時間を設定します。0.45  $\mu\text{m}$  再生セルロース膜 (p/n 3150-0576) を通してろ過します。移動相 B には、アセトニトリル:メタノール:水 (45:45:10、v:v:v) が含まれています。すべての移動相溶媒には、HPLC グレードのものを使用しました。移動相 A は B よりも高い反応性で消費されるため、1 L の B ごとに 2 L の A を使用するのが最適です。

注入希釈液は 100 mL 移動相 A で、100 mL ボトル内に 0.4 mL  $\text{H}_3\text{PO}_4$  を加えて 4 °C で保存しました。

0.1 N HCl を前処理するために、少し水を入れた 500 mL 計量フラスコに 4.2 mL HCl (36 %) を加えます。混合して、印の部分まで水を充填します。この溶液は、拡張アミノ酸および内部標準原液を作成するためのものです。4 °C で保存します。

誘導体化試薬 (ホウ酸ナトリウムバッファ、OPA、および FMOC) は、アジレントから提供されている既製の溶液です。この試薬は、容器からオートサンパイアルに移すだけです。次のような注意事項があります。

- 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。100  $\mu\text{L}$  量の OPA をマイクロバイアルインサートに移すことを推奨します。名前と日付が記載されたラベルを貼り、ふたをして冷蔵保存します。OPA オートサンパラ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。これも 100  $\mu\text{L}$  量をマイクロバイアルインサートに移すことを推奨します。名前と日付が記載されたラベルを貼り、しっかりとふたをして冷蔵保存します。FMOC アンブルは OPA と同様に、開封後 10 個のマイクロバイアルインサートに移して使用する場合の使用期限は 10 日です (1 日あたり 1 個のバイアルを使用)。
- ホウ酸ナトリウムバッファは、バイアルインサートを用いなくても 1.5-mL オートサンパイアルに移すことが可能です。3 日ごとに交換してください。

### アミノ酸標準の前処理

検量線用として、アジレントの 5 種類の濃度 (10 pmol/ $\mu\text{L}$  ~ 1 nmol/ $\mu\text{L}$ ) による 17 種類のアミノ酸溶液が使用できます。1 mL アンブルの各標準 (p/n 5061-3330 ~ 5061-3334) を 100  $\mu\text{L}$  ずつコニカルバイアルインサートに分割します。ふたをして 4 °C で冷蔵保存します。

拡張アミノ酸 (EAA) 原液を作成するために、59.45 mg アスパラギン、59.00 mg ヒドロキシプロリン、65.77 mg 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 計量フラスコに入れます。0.1 N HCl を半分まで充填し、溶解するまで振るか、または超音波洗浄器にかけます。印の部分まで水を充填し、総濃度 18 nmol/ $\mu\text{L}$  のアミノ酸を作成します。

高感度 EAA 原液を作成する場合は、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/ $\mu\text{L}$ )。拡張標準を含む溶液は、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、強度が低下する兆候が見られたら廃棄してください。

一級アミノ酸 ISTD 原液を作成する場合は、58.58 mg ノルバリンを計量して 50 mL 計量フラスコに入れます。二級アミノ酸を作成する場合は、44.54 mg サルコシンを計量して同じ 50 mL フラスコに入れます。0.1 N HCl を半分まで充填し、溶解するまで振るか、または超音波洗浄器にかけたあと、印の部分まで水を充填し、最終濃度 10 nmol/μL のアミノ酸を作成します (標準感度)。高感度 ISTD 原液を作成する場合は、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。4 °C で保存します。

実験での必要性に応じて、2~5 種類の標準で検量線を作成します。通常、標準感度分析の 3 点検量線の場合は、100 pmol/μL、250 pmol/μL、および 1 nmol/μL を使用します。

## ポンプパラメータ

すべてのメソッドに対するポンプパラメータとして、圧縮率 ( $\times 10^{-6}$  bar) A: 35、B: 80 が指定されており、最小ストローク A、B は 20 μL です。

## オンライン誘導体化

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 G1376C ウェルプレート自動液体サンブラ (WPALS) の場合、次の注入プログラムを使用します。

1. ホウ酸ナトリウムバイアル (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 を洗浄ポートで 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 を洗浄ポートで 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 を洗浄ポートで 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 を洗浄ポートで 8 回混合します。
11. 注入します。
12. 0.1 分間待ちます。
13. バルブをバイパスします。

誘導体化試薬とサンプルの位置は、分析者と ALS トレイ構成に合わせます。G1367C と 2×56 ウェルプレートトレイ (p/n G2258-44502) を用いた場合の位置は、次のとおりでした。

- バイアル 1: ホウ酸ナトリウムバッファ
- バイアル 2: OPA
- バイアル 3: FMOC
- バイアル 4: 注入希釈液
- P1-A-1: サンプル

## カラムコンパートメント (TCC)

左側および右側の温度を 40 °C に設定しました。温度が  $\pm 0.8$  °C 以内に収まっている場合は、分析が実施できます。

## ダイオードアレイ検出器 (DAD)

シグナル A: 338 nm、10 nm バンド幅、および参照波長 390 nm、20 nm バンド幅。

シグナル B: 262 nm、16 nm バンド幅、および参照波長 324 nm、8 nm バンド幅。

シグナル C: 338 nm、10 nm バンド幅、および参照波長 390 nm、20 nm バンド幅。

DAD は、リジン溶出後とヒドロキシプロリン溶出前に 262 nm、16 nm バンド幅、参照波長 324 nm、8 nm バンド幅に切り替わるようにプログラミングしました。シグナル C は、ピーク 20 と 21 の間でシグナル A と B の時間枠を調査した後、波長を切り替える最適なポイントを選択して決定しました。切り替え時間を決定してメソッドにプログラミングした後、シグナル A と B は省略可能になりました。

すべてのカラムに対して、ピーク幅 > 0.01 分に設定しました。

## 結果と考察

図 1 からわかるように、同じクロマトグラフィー条件を用いた場合、分離状態は非常によく似ていました。両方のカラムにおける混合物の溶出順序は同じであり、また図 2 に示すように、Eclipse Plus C18 と Poroshell HPH-C18 の間のアミノ酸サンプルのリテンションタイムには高い相関性があり、相関係数は 0.997 でした。クロマトグラムからわかるように、Poroshell HPH-C18 カラムでのリテンションタイム

ムが多少短くなっていました。一部のクロマトグラフィーでは違いが顕著に現れています。ここに示す例では、Poroshell HPH-C18 の方がロイシンおよびリジンの分離は良好であるようですが、リジンとヒドロキシプロリンおよびサルコシン/プロリンのペアの間の分離は劣っているように見えます。以前のアプリケーションノートで説明されているように、望ましいピークペアの分離能を向上させるために分離を最適化することができます。

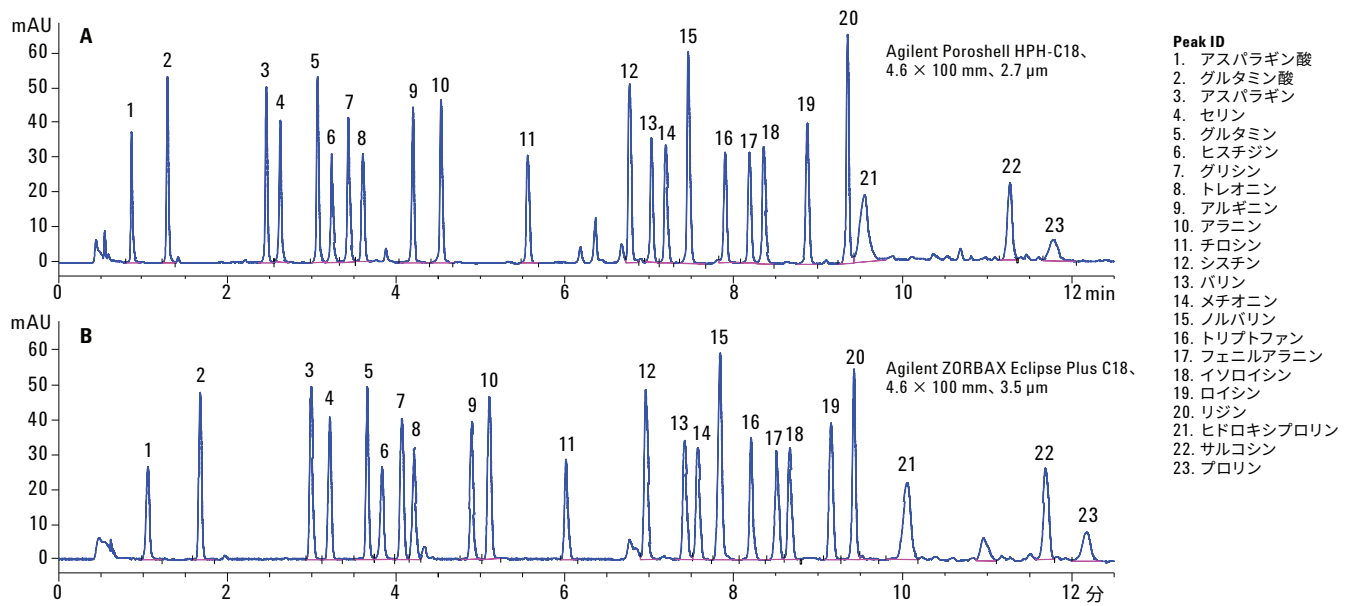


図 1. アミノ酸メソッドを用いた Agilent Poroshell HPH C18 と Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムの比較

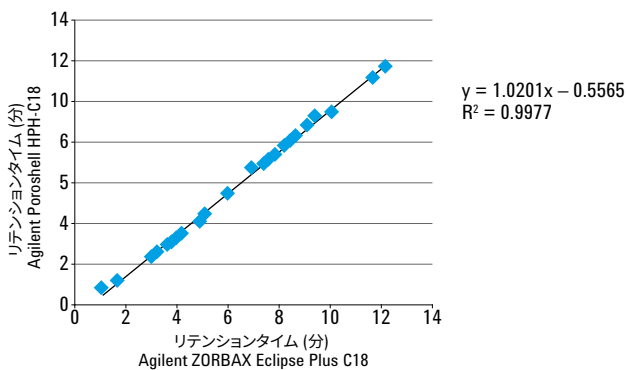


図 2. Agilent Poroshell HPH-C18 および Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムを使用したリテンションタイムの相関性

表 1. 図 1. の条件

カラム:	Agilent Poroshell HPH C18、4.6 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695975-702) または Agilent Eclipse Plus C18、4.6 × 100 mm、3.5 μm (p/n 959961-902)
流量:	1.5 mL/min
グラジエント:	時間 (分)    %B
	0                2
	0.35           2
	13.4           57
	13.5           100
	15.7           100
	15.8           2
	18              end

## カラム寸法

メソッドは異なるカラム寸法に容易にスケールリングできます。この研究では、3種類のカラム寸法について調査しました。図3に示すように、すべてのカラムは長さ100 mmで、内径4.6、3.0、または2.1 mmでした。ここでメソッドへの唯一の変更点として、流量を変更しました。表1に、全体を通して使用したグラジエントプログラムを示します。流量は、カラム径によって幾何学的に変わります。4.6×100 mmカラムで使用した流量は1.5 mL/minでした。3および2.1 mmカラムで使用した流量は、それぞれ0.62 および0.21 mL/minでした。いずれのケースでも、余分なカラム容量を最小限にするため、低容量熱交換器が短い赤色キャピラリーと共に使用されました。Agilent 1260 Infinity バイナリ LC に低拡散熱交換器およびキャピラリーを組み合わせて使用したところ、カラム圧力はおよそ175 barでした。

カラム内径を大きいものから小さいものに変えると、すべての成分のリテンションタイムが多少増大することがわかりました（選択性は変わりません）。この原因は、グラジエント遅延時間が増大したためです。流量はスケールリングされた結果、カラム内径が大きいものから小さいものになると低減しますが、グラジエントディレイボリュームは一定に維持されるため、カラムに到達するまでのグラジエントに要する時間が増大します。さまざまなカラム内径間でのリテンションの差は、LCシステムでのグラジエントディレイボリュームをスケールリングする（ポンプとカラム注入口間のキャピラリーの長さ/直径/容量を増大または低減させる）ことにより、低減または除去される可能性があります。

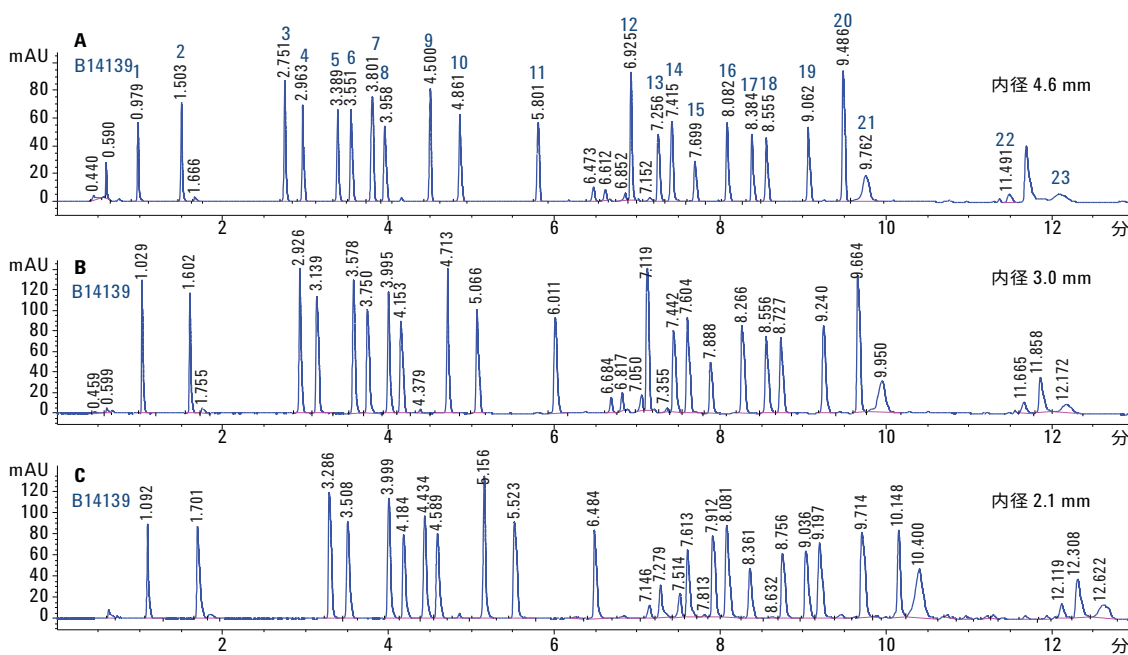


図3. アミノ酸メソッドを用いた異なる内径の Agilent Poroshell HPH-C18 100 mm カラム

## ロット間のばらつき

メソッド開発では、バッチ間またはロット間の再現性も重要な要因になります。メソッドを採用する前に最初に実施するバリデーション手順の1つとして、異なるロットから作成された最低3つのカラムに対して、メソッドの性能を調査することを推奨します。

適切なバリデーション手法に従い、4.6、3.0、および2.1×100 mm カラムに対して、異なる生産バッチから粒子をロードした3つのカラムについて調査しました。これら3つの結果を重ね合わせたものを、図4A～Cに示します。図4Aからわかるように、4.6×100 mm カ

ラムでのアミノ酸分離では、すべての化合物に対して良好なピークおよびベースライン分離形状を示しました。溶出順序に変化は認められず、ロット間の再現性は良好でした。図4Aによると、 $k'$ 値は一定のままですが、リテンションタイムが多少変化していることがわかります。ただし、ロイシンとヒドロキシプロリンの溶出時間と関係があるため、波長切り替え時間に多少の変更が必要です。また、図4Bと4Cからわかるように、内径が小さいカラムの場合も、明らかに同様の再現性が達成されています。

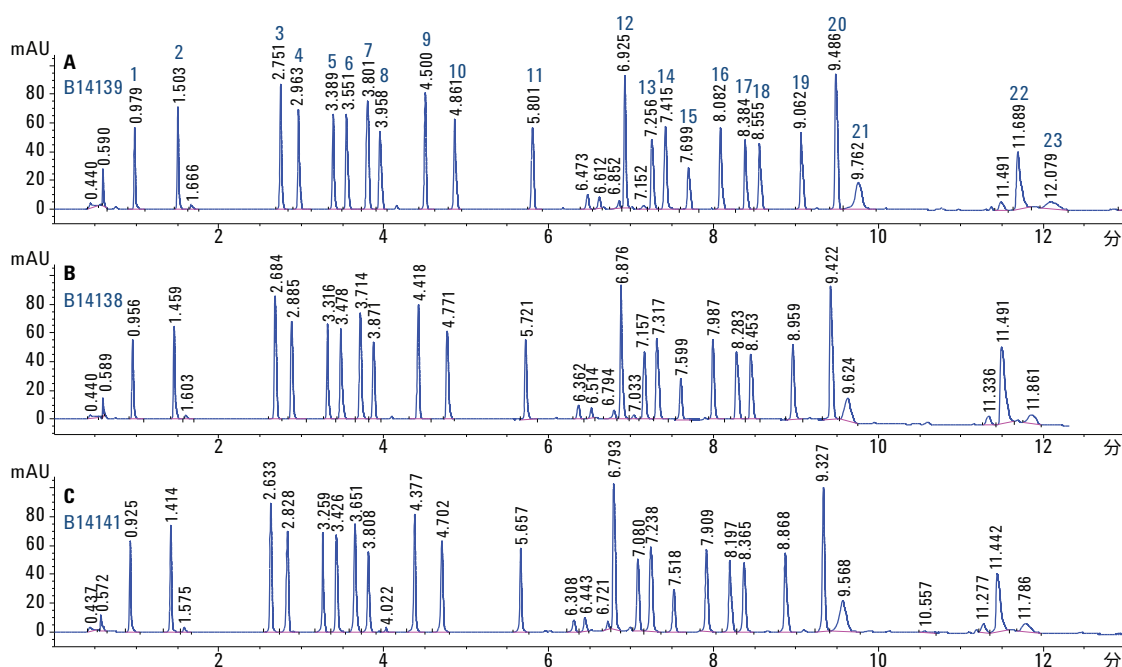


図4A. 3つのロットの Agilent Poroshell HPH-C18、4.6×100 mm、2.7 μm (p/n 695975-702) に関するアミノ酸と内部標準の分離

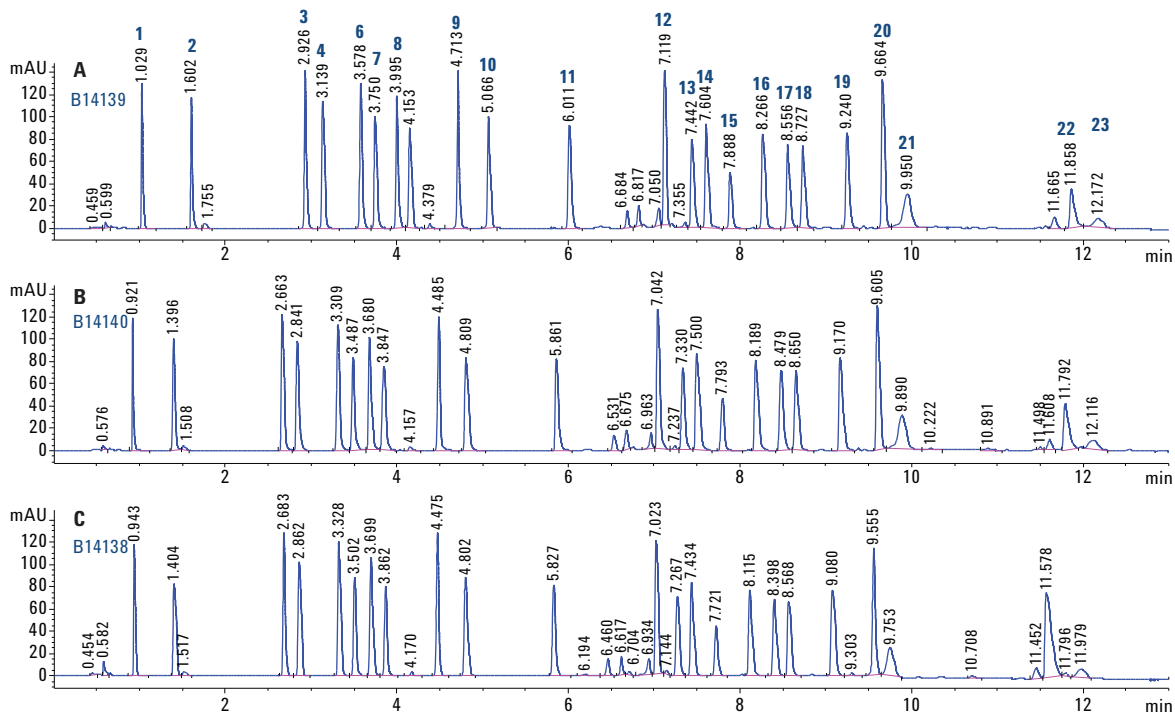


図 4B. 3 つのロットの Agilent Poroshell HPH-C18、3 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695975-502) に関するアミノ酸と内部標準の分離

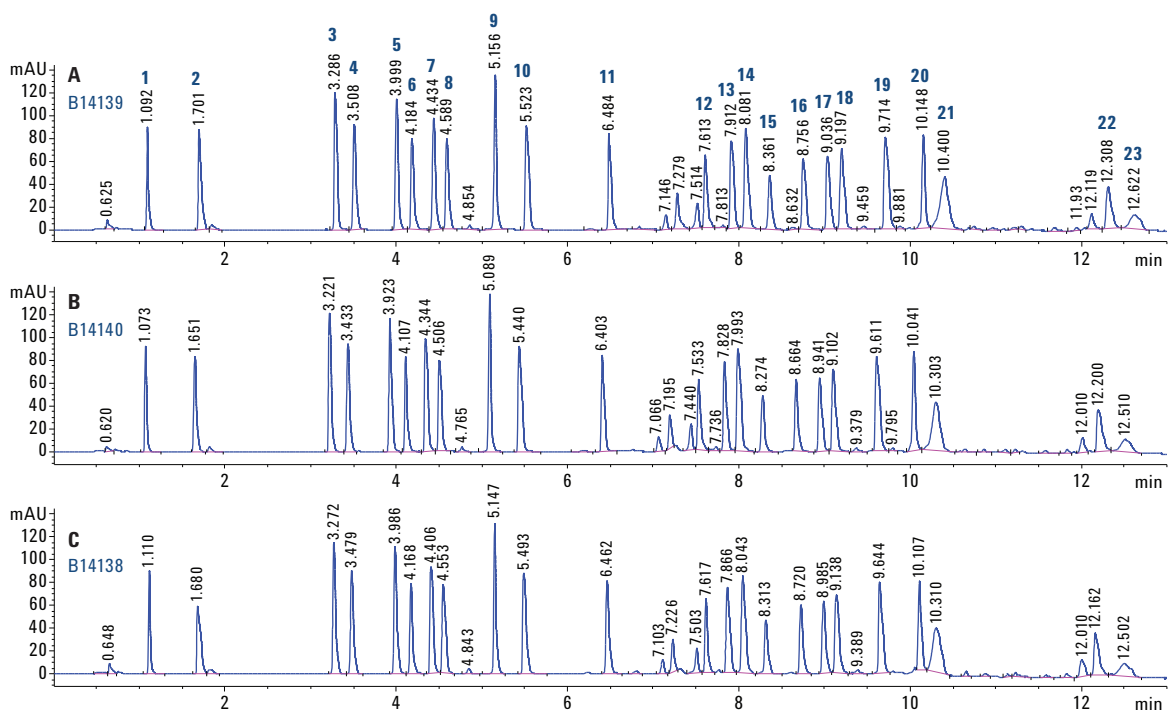


図 4C. 3 つのロットの Agilent Poroshell HPH-C18、2.1 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695775-702) に関するアミノ酸と内部標準の分離

## 寿命

カラム寿命は、アミノ酸サンプルを分析する研究者にとって、考慮すべき重要な事項です。ほとんどのシリカカラムは、これらの条件に長く曝された後には効率が低下します。Kirkland ほか [9] および Tindall and Perry [10] では、リン酸バッファ中のシリカカラムの寿命が短くなる理由について考察していますが、両論文ともにカラムの寿命はそれほど長くないという点で一致しています。

シリカ HPLC カラムで高 pH での安定性を達成するには、2つの方法があります。1つは、Agilent ZORBAX Extend C18 カラムのように、特殊な結合相を採用する方法です。このカラムは、高 pH でのシリカの溶解を防ぐために二座型結合相を使用しています。高 pH での安定性を実現するもう1つの方法は、シリカ自体を修飾し、溶解しにくくする方法です。Poroshell HPH 粒子の表面は、独自プロセスにより有機層を形成するように化学的に修飾されており、高 pH 条件でのシリカ溶出に対して耐性があります [11]。

図5は、4つのクロマトグラムの重ね表示です。移動相AとBをそれぞれ1つの4Lボトルで前処理しました。1つの2.1×100 mm カラムを使用し、4週間にわたって500回の分析を行う寿命検査を実施しました。この一連の検査では、週ごとにおよそ102回の注入が、開封した直後のアミノ酸標準混合液および試薬を使用して行われました。シーケンスの最後に、カラムを100% Bの移動相によって40分間洗浄し、機器をシャットダウンしました。このようにしてメソッドは3.5日間実行され、その後カラムは3.5日間分析を行わずに保管されました。ここでは、サンプルを長時間分析してからカラムを洗浄して保管するという標準的なラボの慣行をシミュレートしました。元のアミノ定量メソッドでは、カラムを100%の移動相Bに保管することが推奨されていました。頻繁にアミノ酸を分析し、成果を上げている多くのラボでは、これが一般的な方法となっています。現実に沿った寿命検査を実施したところ、1か月間の500回にわたる標準注入での使用において、カラムは優れた寿命を示しました。なお、この検査では、シーケンスが終了するごとにシャットダウンして保管しました。図5からわかるように、17種類のアミノ酸サンプルに対して分離能が低下することはなく、リテンションタイムに多少のシフトが観察されただけです。

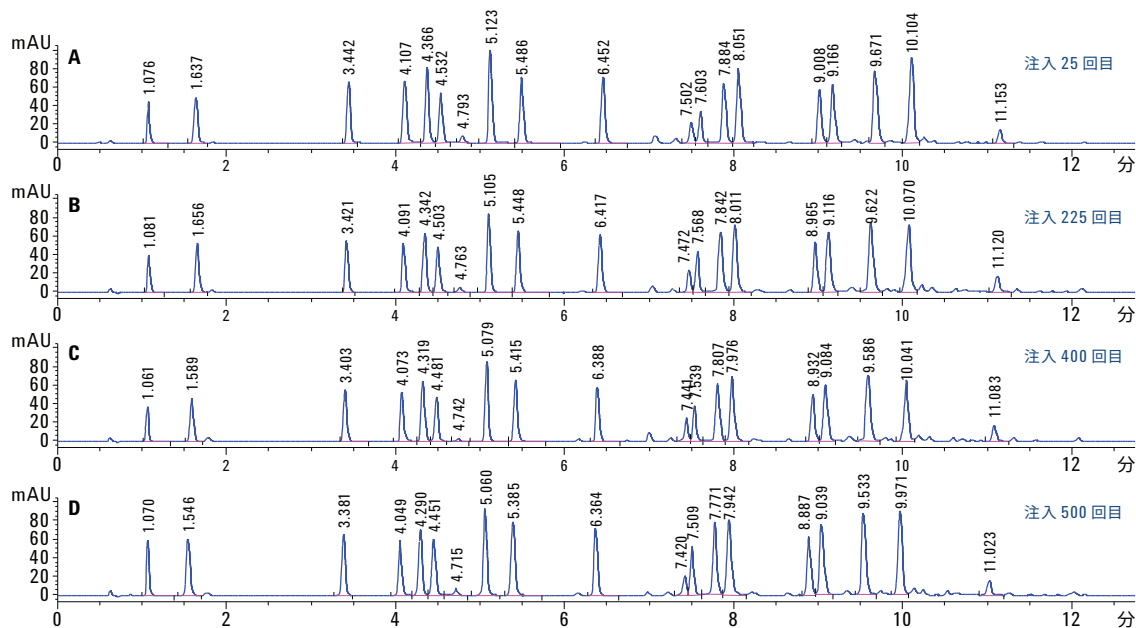


図5. Agilent Poroshell HPH-C18、2.1 x 100 mm のカラムを使用してアミノ酸メソッドを実行したカラム寿命の検査

## 結論

Agilent Poroshell HPH-C18 には、全多孔質 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 に類似した選択性があります。そのため、アミノ酸メソッドなどの既存のメソッドを容易に移管できます。この研究では、クロマトグラフィ条件には変更を加えませんでした。グラジエントに変更を加えて、選択されたアミノ酸に対する分離能を向上させることは可能です。大部分のケースにおいて、Poroshell HPH-C18 は、全多孔質 Eclipse Plus C18 よりも保持力が多少低くなっていました。メソッドは、4.6、3.0、および 2.1 mm × 100 mm カラムを用いて調査しました。低容量カラムヒーターを使用することを推奨します。全体で 4 つの粒子ロットを調査しましたが、波長切り替え時間に多少の変更が必要なだけでした。現実に沿った寿命検査を実施したところ、1 か月間の 500 回にわたる標準注入での使用において、カラムは優れた寿命を示しました。なお、この検査では、シーケンスが終了するごとにシャットダウンして保管しました。

## 参考文献

1. Wang, X.; Barber, W. E.; Long, W. J. Applications of superficially porous particles: High Speed, high efficiency or both? *J. Chromatogr. A*. **2012**, 1228, 72-88.
2. Schuster, R.; Apfel, A. A new technique for the analysis of primary and secondary amino acids; Application note, Hewlett-Packard Publication number 5954-6257, **1986**.
3. Schuster, R. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*. **1988**, 431, 271-284.
4. Henderson, Jr., J. W.; Ricker, R. D.; Bidlingmeyer, B. A.; Woodward, C. Rapid, Accurate, Sensitive and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5980-1193E, **2000**.
5. Woodward, C.; Henderson, Jr., J. W.; Todd Wielgos, T. High-Speed Amino Acid Analysis (AAA) on Sub-Two Micron Reversed-phase (RP) Columns; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5989-6297EN, **2007**.
6. Gratzfeld-Huesgen, A. Sensitive and Reliable Amino Acid Analysis in Protein Hydrolysates using the Agilent 1100 Series HPLC; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5968-5658EN, **1999**.
7. Greene, J.; Henderson, Jr., J. W.; Wiksw, J. P. Rapid and Precise Determination of Cellular Amino Acid Flux Rates Using HPLC with Automated Derivatization with Absorbance Detection; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-3283EN, **2009**.
8. Henderson, Jr., J. W.; Brooks, A. Improved Amino Acid Methods using Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns for a Variety of Agilent LC Instrumentation and Separation Goals; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-4547EN, **2010**.
9. Kirkland, J. J.; van Straten, M. A.; Claessens, H. A. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of basic compounds at pH 11 with silica-based column packings. *J. Chromatogr. A*. **1998**, 797, 111-120.
10. Tindall, G. W.; Perry, R. L. Explanation for the enhanced dissolution of silica column packing in high pH phosphate and carbonate buffers. *J. Chromatogr. A*. **2003**, 988, 309-312.
11. Anon. Extending Column Lifetime in Pharmaceutical Methods with High pH-Stable Poroshell HPH Chemistries; Technical overview, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-5022EN, **2014**.

## 詳細情報

本文書のデータは代表的な結果を記載したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト ([www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)) をご覧ください。

ホームページ

**[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)**

カスタムコンタクトセンタ

**0120-477-111**

**[email\\_japan@agilent.com](mailto: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. 2016

Printed in Japan, July 7, 2016

5991-5571JAJP



**Agilent Technologies**