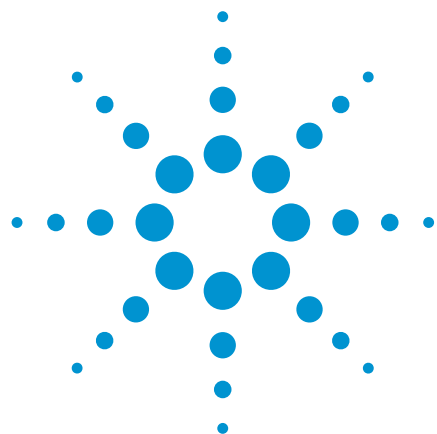




Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC 1.9 μm カラムでの遊離アミノ酸の LC/MS 分析

アプリケーションノート

農業、食品検査、低分子医薬品

著者

Anne Mack
Agilent Technologies, Inc.
Wilmington, DE, USA

概要

Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC 2.1 $\times$ 150 mm、1.9 μm カラムでギ酸アンモニウムとアセトニトリルのグラジエントを使って、12 種類の遊離アミノ酸を LC/MS で分析しました。同じ質量数のロイシンおよびイソロイシンをベースライン分離能 ($R_s = 1.9$) で、550 bar、11 分間で分析完了できました。



Agilent Technologies

はじめに

表面多孔質粒子 LC カラムは、液体クロマトグラフィーでよく使用されるツールです。表面多孔質粒子カラムは全多孔質粒子カラムの同等製品と比べて、低圧で高効率です [1]。この主な理由は、表面多孔質粒子カラムのほうが物質移動距離が短く、カラム内の粒子サイズ分布が実質的に狭いためです [2]。表面多孔質粒子を使用する場合は、粒子サイズを小さくして効率を上げる方法が現在の主流になっています。効率の向上によって、分析速度が上がります。あるいは、分解能と感度が上がりより良い成果を得ることができます。

このアプリケーションノートでは、Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC 1.9 μm カラムの UHPLC 性能と、LC/MS による 12 種類の遊離アミノ酸の分析能 (同質量数 2 成分のベースライン分離能を含む) について説明します。

表 1. UHPLC システム構成

Agilent 1290 Infinity LC システム構成

Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)	35 μL 溶媒ミキサー : Agilent Jet Weaver、35 μL/100 μL (G4220-60006)
Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンブラ (G4226A)	シートアセンブリ、超低分散、Agilent 1290 Infinity オートサンブラ用 (G4226-87030) オートサンブラとヒーター : キャピラリ、ステンレス、0.075 × 220 mm、SV/SLV (5067-4784) バイアル、スクリュートップ、茶色、ラベル付、認証済み、2 mL、100 個 (5182-0716) ふた、ネジ、青色、PTFE/赤色シリコンセプタム、100 個 (5182-0717) バイアルインサート、250 μL、ガラス、樹脂足付、100 個 (5181-1270)
Agilent 1290 Infinity サーマスタット付カラムコンパートメント (G1316C)	熱交換器、低分散、1.0 μL、ロング、ダウン (G1316-80012) InfinityLab クイックターンフィッティング (5067-5966) カラムと MS イオン源: キャピラリ、ステンレス、0.075 × 340 mm、SV/SLV (5067-4783)
Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212A)	超低分散 Max-Light カートリッジフローセル、10 mm (G4212-60038)
Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS (G6460A)	Agilent Jet Stream 技術
Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェア LC/MS データ取り込み、6400 シリーズトリプル四重極バージョン B.07.01 ビルド 7.1.7112.0	G4220A: B.06.72 [0002] G4226A: A.06.54 [006] G1316C: A.06.53 [002] G4212A: B.06.72 [0002]
Agilent LC カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC、2.1 × 150 mm、1.9 μm (693675-901)

表 2. 遊離アミノ酸分析用の UHPLC メソッドパラメータ

パラメータ	値
移動相 A	10 mM ギ酸アンモニウム pH 3 水溶液
移動相 B	10 mM ギ酸アンモニウム pH 3 アセトニトリル溶液 (アセトニトリル:水 = 9:1)
流速	0.4 mL/min
グラジエント	100 ~ 95 %B で 5 分、その後 95 ~ 60 %B で 6 分
ポストラン	4 分
注入量	5 μL
オートサンブラ温度	4 °C
カラム温度	15 °C
ダイオードアレイ検出器	オフ
カラム	Agilent Poroshell 120 HILIC、2.1 × 150 mm、1.9 μm (693675-901)
サンプル	Agilent AA 標準溶液、1 nmol/μL (5061-3330)、1:10 の割合でアセトニトリルで希釈

実験方法

この実験では、Agilent 1290 Infinity LC システムと Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS を使用しました。システムの標準構成を変更して、システムボリュウムと分散を大幅に減らしました。表 1 は構成の詳細と、この実験で使用した Agilent LC カラムを示しています。表 2 は LC メソッドパラメータ、表 3 は MS パラメータ、表 4 は MS SIM パラメータを示しています。

このアプリケーションノートで分析する 12 種類のアミノ酸は、アジレント製の混合成分溶液 (5061-3330) です。サンプルは注入前に、1:10 の割合でアセトニトリルで希釈しました。ギ酸アンモニウムとギ酸は Sigma-Aldrich から購入しました。アセトニトリルは Honeywell (Burdick and Jackson) から購入しました。用いた水は Milli-Q システム (Millipore) の 0.2 μm ろ過水 18 MW です。

結果と考察

図 1 は、InfinityLab Poroshell 120 HILIC、2.1 × 150 mm、1.9 μm カラムでの 12 種類の遊離アミノ酸の分離を示しています。LC/MS 検出の場合、すべての化合物一括でのベースラインクロマトグラフィー分離能は不要です。検出器にて各化合物固有の質量フラグメントによって、成分が分離されるためです。ただし同じ質量数の化合物が存在する場合は、ベースラインクロマトグラフィー分離能が必要です。図 2 のとおり、ロイシンとイソロイシンのクロマトグラフィー分離能は 1.9 でした。これは、この 2 つの同じ質量数成分の積分と定量に適した数値です。

表 3. MS メソッドパラメータ

MS イオン源パラメータ		MS 取り込みパラメータ	
ガス温度	300 °C	スキャンタイプ	MS2 SIM
ガス流速	5 L/min	質量	表 4 を参照
ネブライザ	45 psi	フラグメンタ	表 4 を参照
シースガス温度	400 °C	セル加速電圧	7 V
シースガス流量	11 L/min	極性	ポジティブ
キャピラリー	3,500 V	時間セグメント 1	3.6 分
		時間セグメント 2	6.6 分

表 4. MS SIM メソッドパラメータ

アミノ酸 (溶出順)	MW	M+H	ドウェル		
			フラグメンタ	タイム	時間
			電圧	(ミリ秒)	セグメント
L-フェニルアラニン	165.19	166	25	5	1
L-チロシン	181.19	182	25	5	1
L-イソロイシン/ロイシン	131.17	132	25	1	1
L-メチオニン	149.21	150	75	5	1
L-バリン	117.15	118	25	5	2
L-トレオニン	119.12	120	25	5	2
L-アラニン	89.09	90	25	5	2
L-セリン	105.09	106	25	5	2
L-プロリン	115.13	116	50	5	2
グリシン	75.07	76	25	5	2
L-グルタミン酸	147.13	148	75	5	2

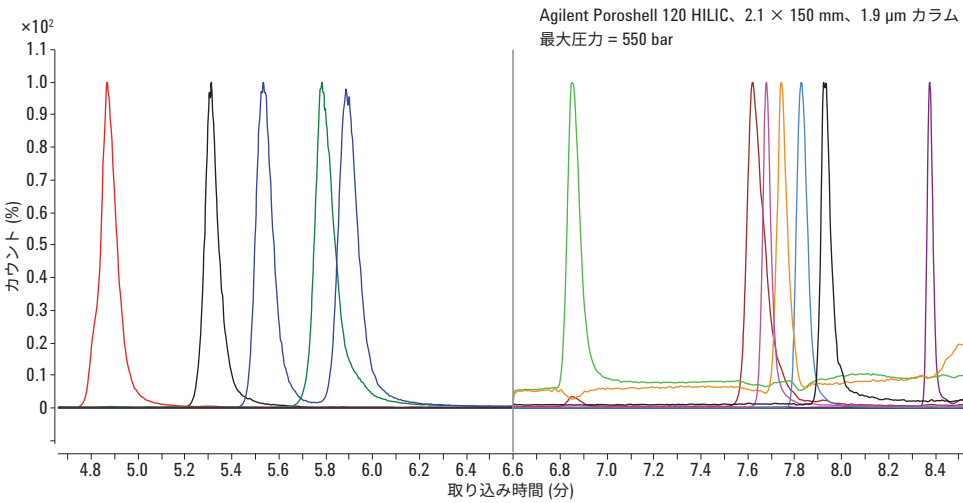


図 1. Agilent Poroshell 120 HILIC、1.9 μm カラムでの 12 種類の遊離アミノ酸の分離

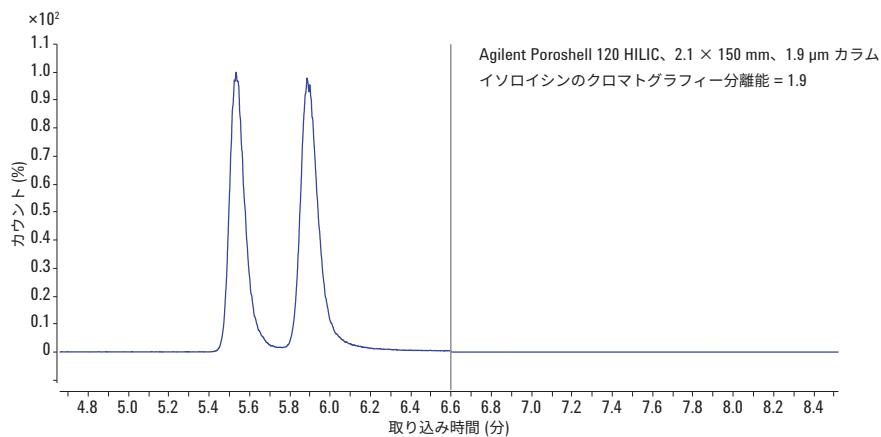


図 2. Agilent Poroshell 120 HILIC、1.9 μ m カラムでの同じ質量数であるロイシンとイソロイシンの分離

結論

Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC 1.9 μ m カラムを使って、LC/MS で遊離アミノ酸を分離できました。この小さい表面多孔質粒子カラムは効率が
高いため、同じ質量質量数の 2 成分をベースライン分離する分解能を実現しました。

参考文献

1. A. Gratzfield-Huguen, E. Naegel. Maximizing efficiency using Agilent Poroshell 120 Columns. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-5602EN, **2016**.
2. V. R. Meyer. *Practical High Performance Liquid Chromatography*. Fourth Edition, p. 34. Wiley (2004).

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 をご覧ください。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, October 19, 2016

5991-7541JAJP



Agilent Technologies