

誘導体化アミノ酸の逆相クロマトによる分離と質量分析

分析の特徴

- アミノ酸を誘導体化して、 C_{18} カラムを用いた逆相クロマトグラフによる分離と、高感度質量分析を行った。
- 光学活性試薬をアミノ酸に付加することで、HPLCによるD体とL体の分離を可能にする。

協力

名古屋大学生命農学研究科
応用酵素学研究室
伊藤智和講師

参考文献

1. Chromatography (2021) 42:17-27.
2. ACS Chem Biol (2020) 15:2499-2506.
3. Chem Pharm Bull (2021) 69:265-2702506.

問い合わせ先

物質・分析技術支援室
担当職員 小川直也、河合ゆかり
✉ : ms-support@agr.nagoya-u.ac.jp

概要

殆どのアミノ酸はUV光の吸収が乏しいため、発色試薬や蛍光試薬で誘導体化してから、分析することが一般的である。生体試料や食品試料に含まれる各種アミノ酸は、夾雑成分と分けて検出する必要があるため、分析には誘導体化標品をLC-MSで分離・検出する高感度法が有用である¹。

本件では市販のアミノ酸標準混合試料を光学活性試薬キット²を用いて誘導体化し、Orbitrap Exploris240LC-MSシステムで分析することで、試料に含まれる各種アミノ酸の一斉解析を試みた。

この誘導体化法は、光学活性試薬D-FDLDAでアミノ酸を誘導体化することで、アミノ酸を汎用 C_{18} カラムで分離すること、DL-アミノ酸をD体とL体を分離すること等を可能にする^{2,3} (図1)。

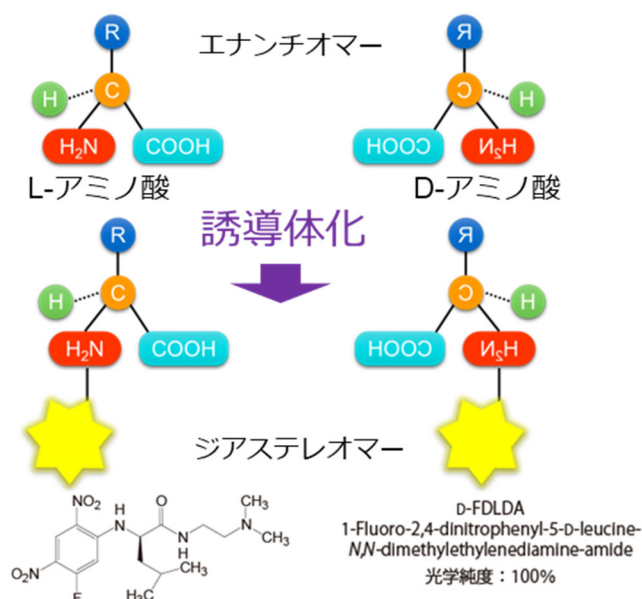


図1. 光学活性試薬によるDL-アミノ酸誘導体化

誘導体化アミノ酸の逆相クロマトによる分離と質量分析

測定試料

富士フィルム和光のアミノ酸混合標準液 (AN-2型, H型他) をナカライ D,L-アミノ酸ラベル化キットで誘導体化し、終濃度各10 μM の試料1 μL 測定に用いた。

誘導体化

アミノ酸混合試料 (各アミノ酸100 μM)

|← ラベル化剤溶液、反応開始溶液

| 50°C x 2h 反応

|← 脱ラベル化剤溶液

| 50°C x 15 min

|← 反応停止液、アセトニトリル

| 0.22 μm PTEFシリンジフィルターでろ過

| 4°C保存

| 1回の測定につき試料1 μL 使用

LC分析

- Vanquish #27101-102130 C₁₈カラム (粒径1.5 μm , 2.1 mm x 100 mm)
- カラムオープン: 50°C
- 流速: 400 $\mu\text{L} / \text{min}$
- 移動相 A: 0.1% ギ酸
- 移動相 B: 0.1% ギ酸, アセトニトリル
- 濃度勾配 0 → 100 % B × 24 min

MS条件

- イオン化法: ESI 法
- 測定モード: ポジティブ
- スプレー電圧: 3500 V
- 脱溶媒温度 350°C
- MSフルスキャン分解能 60,000
- フルスキャン範囲 400 - 1200 m/z

結果

標準試料#AN-2に含まれる25種類のアミノ酸のうち、23種類の[M+H]⁺が検出された。各アミノ酸10 pmolを供与して得られたEICのピーク強度は、1.0E6 ~ 2.0E7であった(図2)。本分析条件ではリン酸化アミノ酸 P-Ser, PEAが検出できなかった。

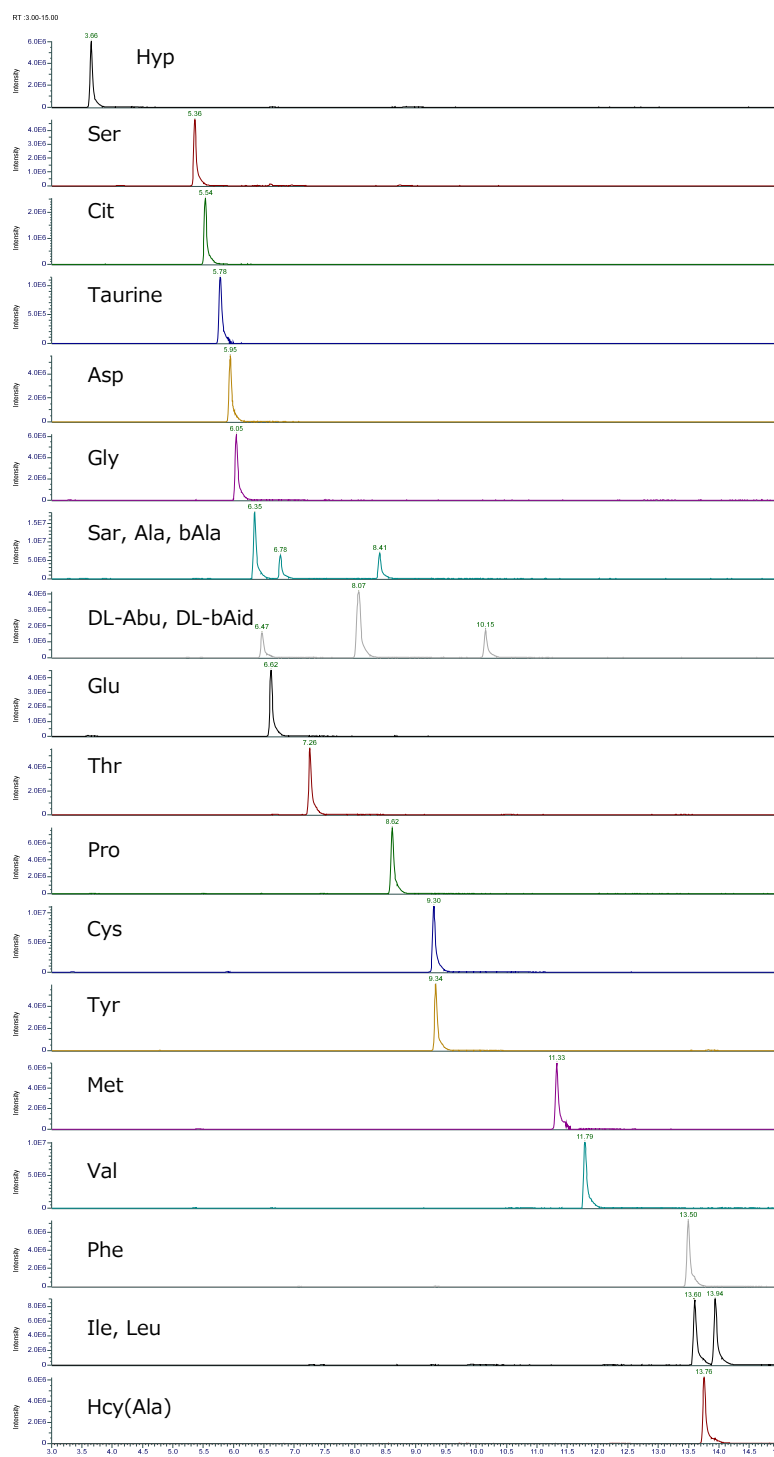


図2. 標準試料 AN-2の抽出イオンクロマトグラム (EIC)

誘導体化アミノ酸の逆相クロマトによる分離と質量分析

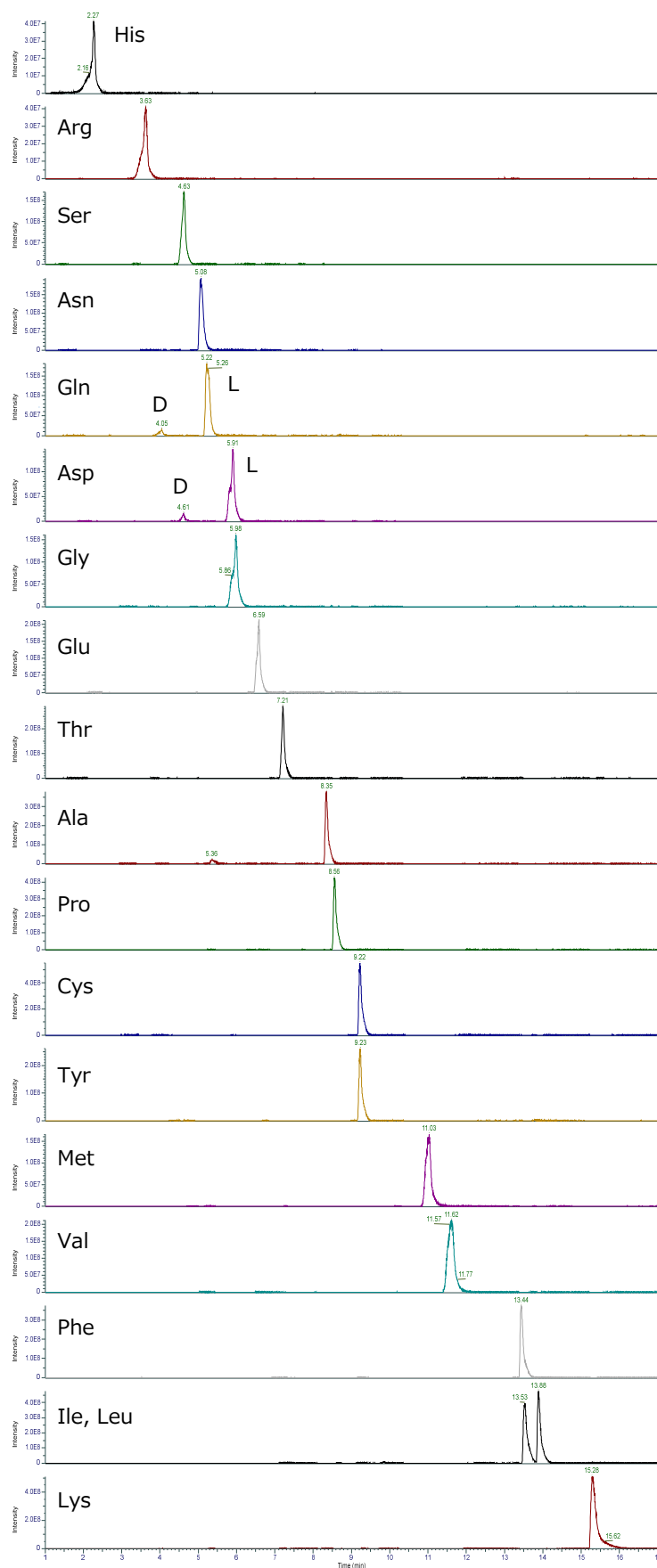


図3. H型標準試料にAsnとGlnを混合した試料のEIC

結果

標準試料#Hにアスパラギン、グルタミンを加えた19種類のアミノ酸全ての[M+H]⁺イオンが検出された。各アミノ酸10 pmolを用い、得られたEICのピーク強度は4.0E7 ~ 5.0E8であった(図3)。

キヌレニン(Kyn)、ヒドロキシキヌレニン(HKyn)各10 pmolを用い、得られたEICのピーク強度は、2.0E8 ~ 8.0E8であった(図4)。ヒドロキシキヌレニンはD体とL体と思われるピークがEICで分離された。

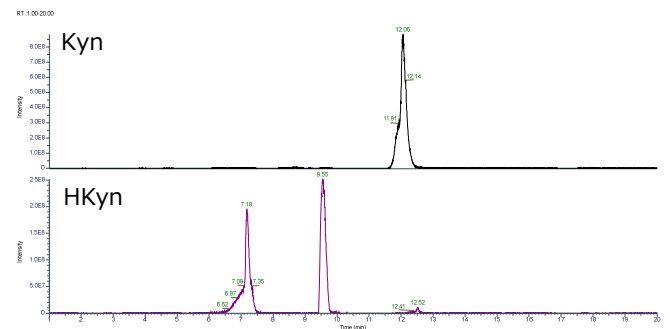


図4. キヌレニン(Kyn)とD,L-ヒドロキシ(Hkyn)混合試料のEIC

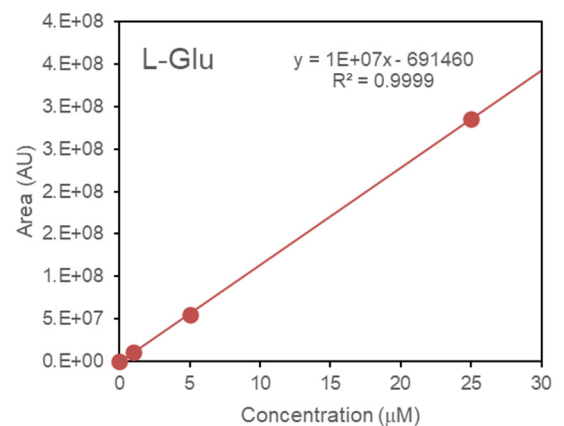


図5. 誘導体化L-グルタミン酸の検量線

1 μM~25 μMの誘導体化試料各1 μLをLC-MSで分析しピーク面積を算出した。(1 pmol~25 pmol /assay)