

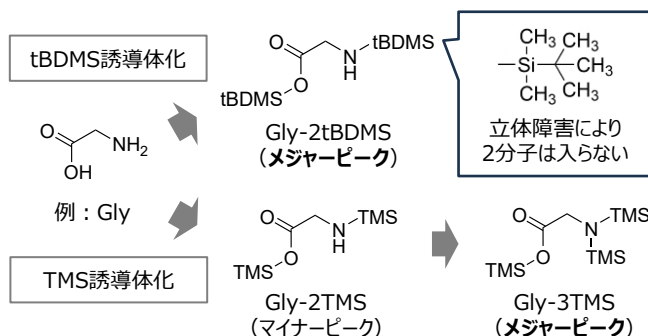
安定同位体希釈法によるアミノ酸定量分析

はじめに

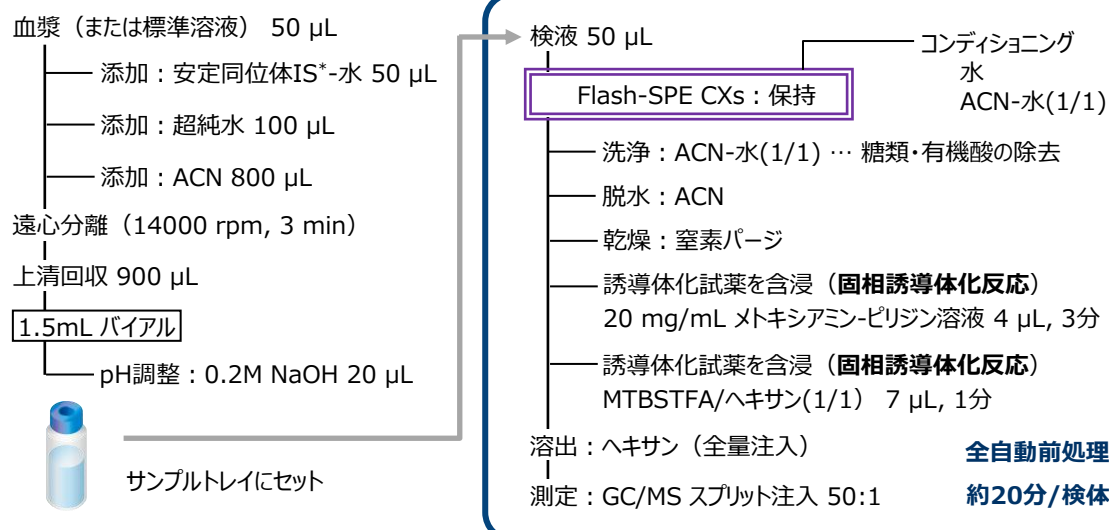
アミノ酸はタンパク質を構成する成分としてだけでなく生体内で様々な基質として利用されており、その濃度をモニタリングすることは極めて重要です。アミノ酸を高精度かつ網羅的に定量できる測定系はポストカラム誘導体化を組み合わせたHPLCが主流ですが、本報告ではtert-ブチルジメチルシリル(tBDMS)誘導体化を用いたGC/MS分析と安定同位体希釈法を用いたアミノ酸の定量分析系について紹介します。

tBDMS (固相) 誘導体化の特徴

- ・ 非イオン成分（糖類）の除去
- ・ TMS誘導体化と比較して
加水分解に強い
- ・ アミノ基に対し1つの置換基が結合し**単一ピークで検出しやすい**
- ・ フラグメントイオンが大きい



実験方法/前処理フロー



* 内部標準溶液として、HPLC法により各安定同位体標識アミノ酸濃度を値付け（鹿児島大学共同獣医学部にて実施）した無細胞くん用アミノ酸混合物水溶液-UL- ^{13}C , ^{15}N （日本酸素株式会社）の超純水500倍希釈液を用いました。

測定条件

SPE-GCインターフェース

固相カートリッジ

PTV注入口

インサート

注入口温度

ガスクロマトグラフ

注入条件

制御モード

プレカラム

分析カラム

オープン温度

トランスファーライン

質量分析計

データ取得モード

データ取得時間

SPL-M100FE (AiSTI SCIENCE)

Flash-SPE CXs

LVI-S250 (AiSTI SCIENCE)

スパイラルインサート

220 $^{\circ}$ C(0.5 min)-50 $^{\circ}$ C/min-290 $^{\circ}$ C(23 min)

スプリット注入; 50:1

流量一定（コンスタントフロー）, 1.0 mL/min

0.25 mm i.d. x 0.5 m

InertCap-5HT, 0.25 mm i.d. x 30 m, df=0.25 μ m

100 $^{\circ}$ C(2 min)-10 $^{\circ}$ C/min-320 $^{\circ}$ C(2min)

290 $^{\circ}$ C

Scan (m/z 70-600)

3.0-26 min



SPL-M100

for SPE-GC system

Sample



Information

AiSTI SCIENCE

Product

オンライン SPE-GC
SPL-M100

固相カートリッジ
Flash-SPE

大量注入口装置
LVI-S250



AiSTI SCIENCE Co., Ltd.

Tel : +81-73-475-0033

E-mail : as-support@aisti.co.jp

HP : <https://www.aisti.co.jp>

結果

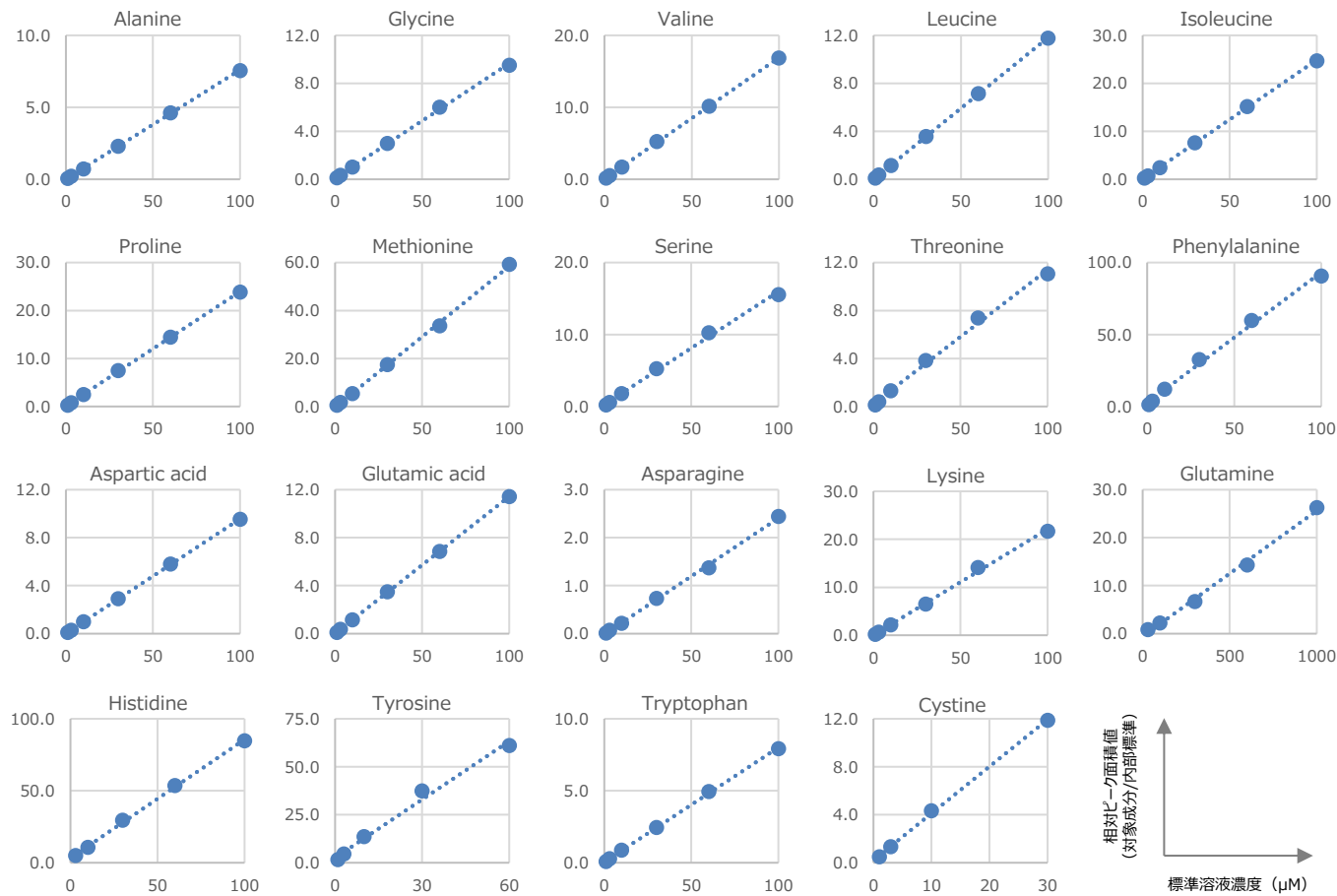


図: 安定同位体希釈法によるアミノ酸標準溶液の検量線

表: 市販ヒト血漿（EDTA）を用いた再現性試験および添加回収試験結果

	定量イオン(m/z)		検量線範囲 (μM)	決定係数 R ²	血漿							血漿 + 40 μM添加試料					回収率 (%)
	対象成分	内部標準			1	2	3	4	5	平均	RSD (%)	1	2	3	平均	RSD (%)	
Ala-2tBDMS	260	264	1-100	0.9998	32.5	33.0	32.0	32.1	32.3	32.4	1.3	70.3	71.1	70.6	70.7	0.6	96
Gly-2tBDMS	246	249	1-100	0.9991	23.0	22.7	23.2	23.2	22.7	23.0	1.2	62.9	62.9	63.0	62.9	0.1	100
Val-2tBDMS	186	191	1-100	0.9999	18.9	18.7	18.9	18.7	18.9	18.8	0.5	59.1	59.3	59.6	59.4	0.4	101
Leu-2tBDMS	200	206	1-100	0.9999	10.4	10.1	10.2	10.3	10.4	10.3	1.3	51.4	50.7	50.3	50.8	1.0	101
Ile-2tBDMS	200	206	1-100	0.9997	5.8	5.6	5.7	5.9	5.8	5.8	1.9	47.4	46.1	46.7	46.7	1.4	102
Pro-2tBDMS	184	189	1-100	0.9998	19.7	19.3	19.8	19.4	19.2	19.5	1.3	59.5	60.0	60.3	59.9	0.7	101
Met-2tBDMS	292	297	1-100	0.9990	1.6	1.6	1.5	1.6	1.6	1.6	2.3	42.1	40.6	41.2	41.3	1.8	99
Ser-3tBDMS	390	394	1-100	0.9967	6.6	6.8	6.4	7.1	7.0	6.8	4.3	52.2	48.6	51.3	50.7	3.8	110
Thr-3tBDMS	303	306	1-100	0.9952	12.1	12.0	11.5	11.4	12.4	11.9	3.5	54.7	55.6	55.7	55.3	1.0	109
Phe-2tBDMS	302	306	1-100	0.9952	5.0	4.1	4.5	4.1	4.8	4.5	8.9	50.9	49.0	53.1	51.0	4.0	116
Asp-3tBDMS	418	423	1-100	0.9999	1.2	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	10.7	40.9	41.9	40.2	41.0	2.1	100
Glu-3tBDMS	432	438	1-100	1.0000	19.5	19.6	19.8	19.5	19.1	19.5	1.3	58.4	59.8	59.8	59.3	1.3	100
Asn-3tBDMS	417	423	1-100	0.9986	31.5	29.3	30.2	30.6	31.5	30.6	3.1	70.9	72.0	73.7	72.2	1.9	104
Lys-3tBDMS	300	307	1-100	0.9975	14.8	14.2	13.9	13.3	14.5	14.1	3.9	52.4	52.7	54.9	53.4	2.6	98
Gln-3tBDMS	431	438	30-1000	0.9955	372.4	378.3	397.8	360.2	357.2	373.2	4.4	404.0	387.7	424.8	405.5	4.6	81
His-3tBDMS	196	202	3-100	0.9989	4.3	3.9	5.3	5.5	5.6	4.9	15.4	49.8	50.4	50.0	50.1	0.6	113
Tyr-3tBDMS	302	306	1-60	0.9877	8.3	7.3	7.7	7.7	7.2	7.6	5.6	46.8	47.6	47.3	47.3	0.8	99
Trp-2tBDMS	302	306	1-100	0.9995	47.6	49.3	47.7	47.6	48.4	48.1	1.6	88.8	88.6	86.7	88.1	1.3	100
Cystine-4tBDMS	348	352	1-30	0.9992	1.5	1.8	1.8	1.4	1.4	1.6	12.8	35.8	35.7	34.6	35.4	1.8	84

※ 対象成分と内部標準の定量イオン差が小さい成分については、試料中濃度や内部標準濃度に応じて他の安定同位体で補正することにより良好な結果が得られる場合がございます。

謝辞

本研究の遂行にあたり、安定同位体標識内部標準物質に関する情報提供および確認にご協力いただいた日本酸素株式会社の池田明夏里氏に深く御礼申し上げます。本研究はアミノ酸分析検討小委員会の活動として実施しました。日本アミノ酸学会および国際アミノ酸科学協会の御支援に感謝申し上げます。