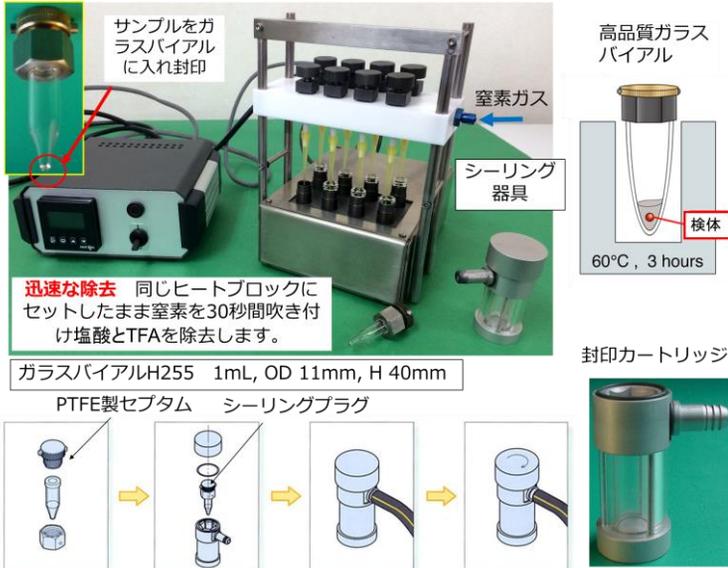


# 酸加水分解とLC/MSの組み合わせによる誘導体化不要の ハイスルーポットアミノ酸組成分析法

## 背景

- ペプチドは医薬品有効成分や薬用化粧品、サプリメント・食品添加物として広く用いられおり、簡便かつ実用的な品質管理が不可欠です。
- ハイペップ研究所のハイスルーポットな手法によって省力化が可能です。
- 質量分析装置の発展により迅速な*de novo*配列決定も可能です。従来のエドマン分解による配列決定法からアミノ酸組成分析およびMS/MSによる配列決定法に置き換えることが出来ます。
- 本手法は従来法に比べてサンプルの消費量が少なく、コンタミもなく短時間で解析が可能な手法です。

## (1) AHST-10システムによる迅速な加水分解と塩酸の除去 コンタミネーション無, 裸火や減圧乾固を必要としない封管 再蒸留塩酸 (5.7 N) + TFA; 165 °C で25 分間処理\*



セミクロススケール, ガスバーナー不要、簡便確実な封管操作(ほんの1分) : AHST-10システムのワンタッチ、封管カートリッジ  
簡便な封管作業と多サンプル同時に加熱条件下で化学誘導体化が可能です。

応用例：酸加水分解、脂肪酸等とのエステル化、トリメチルシリル化、ステロイド修飾、ダンシル化反応

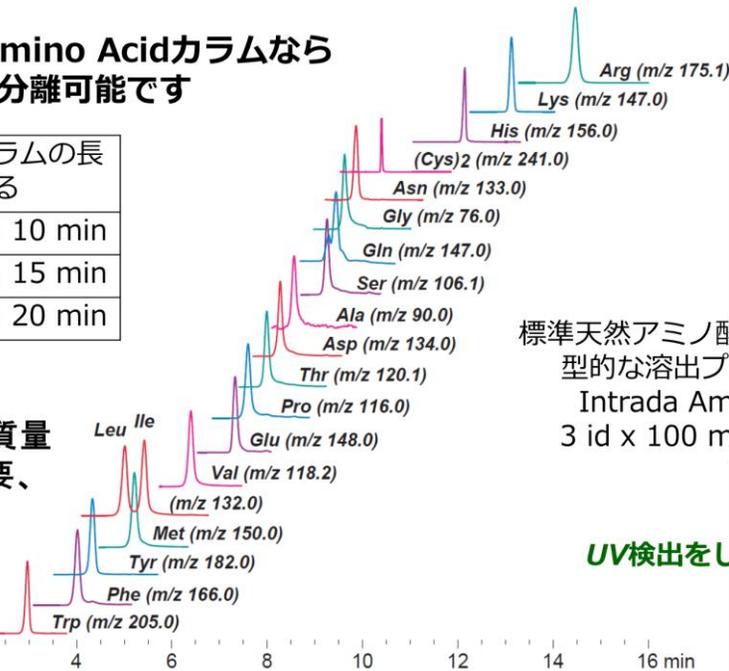
非常に優れた密封性を実現：塩化メチレンを封入して110°Cで24時間の加熱条件下で処理しても、99.9%以上保持することができます。

バイアルを使い捨てにでき、コンタミネーションの心配がありません。

\*Tsguita, A. and Scheffler, J-J., *Eur. J. Biochem.* **1982**, 124, 585.

## (2) Intrada Amino Acidカラムなら 誘導体化無しで分離可能です

| 分析時間はカラムの長さによる |           |
|----------------|-----------|
| 50 mm          | ca 10 min |
| 100 mm         | ca 15 min |
| 150 mm         | ca 20 min |



標準天然アミノ酸のための 典型的な溶出プロファイル  
Intrada Amino Acid,  
3 id x 100 mm column

UV検出をしない

## (3) LC/MS : ハイスペックな質量 分析機器は不要、 1000万円以下 でも購入可

Eluent: A = ACN, THF, 25 mM NH<sub>4</sub>COOH, HCOOH (9:75:16:0.3 v/v); B = ACN, 100 mM NH<sub>4</sub>COOH (20:80 v/v); Gradient: B = 0% (0-3 min), 0-17% (3-9 min), 100% (9-16 min) ; Flow rate 0.6 mL/min, 35 °C; detection by LC/MS (ESI positive mode), data by lmtakt

### LC-MSを用いたアミノ酸の定量法

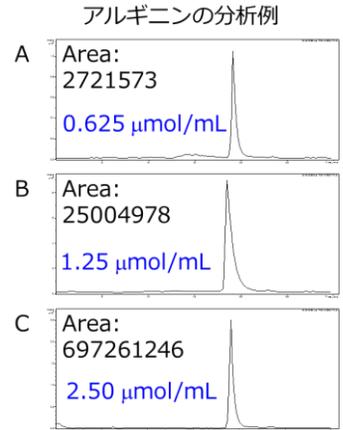
アミノ酸標準サンプルを用いて検量線を作成する。詳細は関連教科書のとおりです  
 実験例：各種アミノ酸（ここではハイペップ研究所のD/L分析用標準試薬を使用）を各 0.625, 1.25, 2.5 μmol/mLの各濃度に調製、カラム(Intrada AminoAcid)を用いてLC-MS分析した。

#### 各種アミノ酸の検量線の回帰式

| AA | 回帰式              | R <sup>2</sup> |
|----|------------------|----------------|
| F  | y = 1E+09x+7E+08 | 0.9613         |
| I  | y=9E+07x+2E+08   | 0.7582         |
| L  | y=1E+08x+1E+08   | 0.9988         |
| V  | 1E+08x+7E+07     | 0.9554         |
| E  | y=1E+08x+4E+07   | 0.9833         |
| D  | y=5E+07x+1E+07   | 0.977          |
| N  | y=6E+07x+3E+07   | 0.9487         |
| H  | y=2E+08x+5E+07   | 0.9979         |

| AA | 回帰式              | R <sup>2</sup> |
|----|------------------|----------------|
| T  | y=6E+07x-3E+07   | 0.9746         |
| G  | 1E+07x+3E+06     | 0.9817         |
| Q  | 2E+08x-2E+08     | 0.9509         |
| C  | y=7E+07x-4E+07   | 0.9997         |
| R  | y=4E+08x-3E+08   | 0.9097         |
| S  | y=5E+07x-3E+07   | 1              |
| P  | y=4E+08x-3E+06-8 | 0.9445         |
| K  | y=2E+08x-1E+08   | 0.9411         |
| M  | 4E+08x-4E+08     | 0.9257         |

カラムで分析、各アミノ酸・濃度に対応するMSクロマトグラムを得る。観測されたピークの面積から検量線を作成した結果が上表である。R2値は0.9以上で直線性のあるデータを得た。完全加水分解サンプルを測定、検量線データを元に解析することで、ペプチドやタンパク質を構成するアミノ酸の組成が算定できる



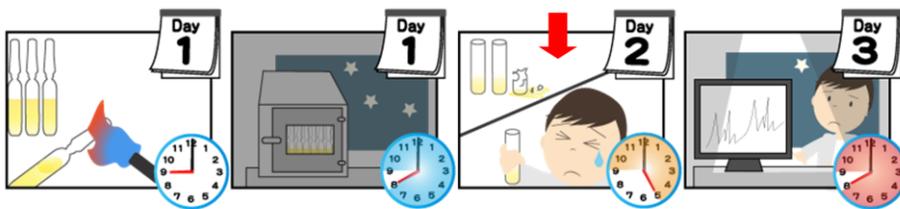
Intrada AminoAcid 150x3 mm  
 Flow Rate : 0.6 mL/min Gradient: B = 20%(0-5 min)~ 35% (5-11 min) ~ 100% (11-20 min); A: 0.3% formic acid in ACN, B: 100 mM Ammonium formate/ ACN = 80/20; at 40°C HCTplus (Bruker daltonics K.K.)

#### 残業無し：多種検体同時処理：16検体を1日で！



ランチタイムでオートサンプラー稼働

#### 従来法



朝来てみたらガラスにひびが入っており酸蒸気がオープンに充満して錆びたり壊れたり

なぜ迅速加水分解をしても問題がないか？ → 本カラムはD/L異性体を区別しないため、ラセミ化が懸念される高温で短時間の加水分解をしても支障はありません。

正確なアミノ酸組成およびD/Lキラル分析\*\* (GLP, GMP) はハイペップ研究所の分析受託サービスをご利用ください。  
<http://hipep.jp/?p=1127>;  
 1136; 1142; 1146; 1149;  
 1152

\*\* Nokihara, K., and Gerhardt, J., *Chirality*, 2001, 13, 431-434.

| 日 | 従来法                                     | HiPep法 | HiPep法                           |
|---|---|--------|----------------------------------|
| 1 | 8サンプルをアンプル封印                            | 3時間    | AHST-10, 8バイアル用                  |
|   | 8サンプルを加水分解 110°C 24時間                   | 1晩     | データまとめとも 15時頃完了                  |
| 2 | スチームバスで塩酸を除去                            | 3時間    | <b>省力 節約</b><br><br><b>QOL向上</b> |
|   | 8サンプルの分析 (プレカラム、ポストカラム誘導体化) 各種アミノ酸分析機使用 | 8時間    |                                  |
| 3 | データ収集および解析                              |        | データまとめとも 17時頃完了                  |

#### 高効率迅速省エネ操作で必要なもの

1. AHST-10システム  
<http://hipep.jp/?p=335> ;  
<http://hipep.jp/?p=392>
2. Intrada Amino Acid カラム  
 ハイペップ研究所にお問い合わせください
3. 安価なsingle Q-pole LC/Msで十分です  
 お手持ちのLCMSはなんでも使用できます