

一次代謝物分析と共通の前処理方法による 血中エイコサノイド類の分析

石井 寿成

ユーザーベネフィット

- ◆ 今回の前処理溶液を、一次代謝物の分析にそのまま使用することが出来ます。
- ◆ トロンボキサンのようなLC-MSでのクロマト分析が難しい化合物でも、良好なピーク形状で感度良く分析できます。
- ◆ 10 ng/mL程度の極微量濃度でも分析可能です。

■はじめに

脂質メディエーターの一種であるエイコサノイド類は、炎症や血液凝固といった生理活性を示す生理活性物質として知られています。生体内では、外傷やストレスなどの刺激に応じて、アラキドン酸から合成されます。エイコサノイド類の解析は、一次代謝成分と並んで、生理機能の解明やバイオマーカー探索に重要な化合物とされています。

今回、メトキシム-トリメチルシリル(TMS)化による誘導体化を行い、GCMS-TQ8050 NXを用いて7種類のエイコサノイド類、Prostaglandin E₂ (PGE₂)、11β-Prostaglandin E₂ (11β-PGE₂)、8-iso-Prostaglandin E₂ (8-iso-PGE₂)、6-keto-Prostaglandin F_{1α} (6-keto-PGF_{1α})、Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α})、Prostaglandin D₂ (PGD₂)、Thromboxane B₂ (TXB₂) を定量しました。

■前処理

Smart Metabolites Database™の一次代謝物と同様の手順で試料を前処理しました(図1参照)。血漿サンプルは、メタノール/水/クロロホルムの混合溶媒で除タンパクを行いました。上清を遠心エバポレーターを用いて乾固させました。エイコサノイド類にはPGE₂、TXB₂など、ケトエノール互変異性を生じる化合物が多く含まれます。そのため、メトキシアミン塩酸塩によるメトキシム化によって、ケトン基の保護を行いました。次に、MSTFAを用いたTMS化処理を行いました。揮発性と分離を向上させることができます。

血漿 (40 μL)

- ↓ 有機溶媒による除タンパク
- ↓ 遠心エバポレーターによる乾固
- ↓ 凍結乾燥
- ↓ add 80 μL メトキシアミン塩酸塩 (20 mg/mL) ピリジン溶液
- ↓ 30°C, 90 min 振とう
- ↓ 40 μL MSTFA
- ↓ 37°C, 30 min 振とう

GC-MS分析へ

■分析条件

表1に、本稿で使用した装置、分析条件を示します。

表1 装置、分析条件

モデル	: GCMS-TQ8050 NX
GC	
氮化室温度	: 300°C
注入方法	: スプリットレス (1.5 min)
キャリアガス	: He
キャリアガス制御	: 線速度 (40 cm/sec)
カラム	: DB-5MS (30 m × 0.25 mm, I.D., 0.25 μm)
カラム温度	: 150 °C → (20 °C/min) → 200 °C → (5 °C/min) → 300 °C
MS (EI法, MRM)	
イオン源温度	: 230 °C
インターフェース温度	: 300 °C
チューニングモード	: 標準
測定モード	: MRM
トランジション	
PGF _{2α} -4TMS	: 191.0>73.0 (CE 12 V) 391.0>73.0 (CE 39 V) 191.0>91.0 (CE 15 V)
8-iso-PGE ₂ -3TMS	: 225.0>73.0 (CE 21 V) 225.0>91.0 (CE 15 V) 566.0>73.0 (CE 36 V)
PGD ₂ -3TMS	: 526.0>296.0 (CE 12 V) 436.0>73.0 (CE 36 V)
11β-PGE ₂ -3TMS	: 225.0>73.0 (CE 18 V) 225.0>91.0 (CE 15 V) 353.0>131.0 (CE 12 V)
PGE ₂ -3TMS	: 225.0>73.0 (CE 18 V) 225.0>91.0 (CE 18 V) 225.0>155.0 (CE 9 V)
TXB ₂ -4TMS	: 211.0>73.0 (CE 12 V) 301.0>211.0 (CE 9 V) 301.0<73.0 (CE 21 V)
6-keto-PGF _{1α} -4TMS	: 436.0>205.0 (CE 9 V) 436.0>73.0 (CE 24 V) 476.0>73.0 (CE 24 V)
イベント時間	: 0.3 秒

■ 標準試料の分析

標準試料をピリジンで希釈し、10, 50, 100, 500 ng/mLの検量線用試料を調製しました。100 ng/mLのMRMクロマトグラムを図2に示します。検量線は緩やかな2次曲線となり、すべての化合物でR²が0.995以上と良好な結果を得ました。LC-MS法でピーク形状不良の起きやすいTXB₂に関しても、10 ng/mLでS/N 53と十分な感度を得ました。

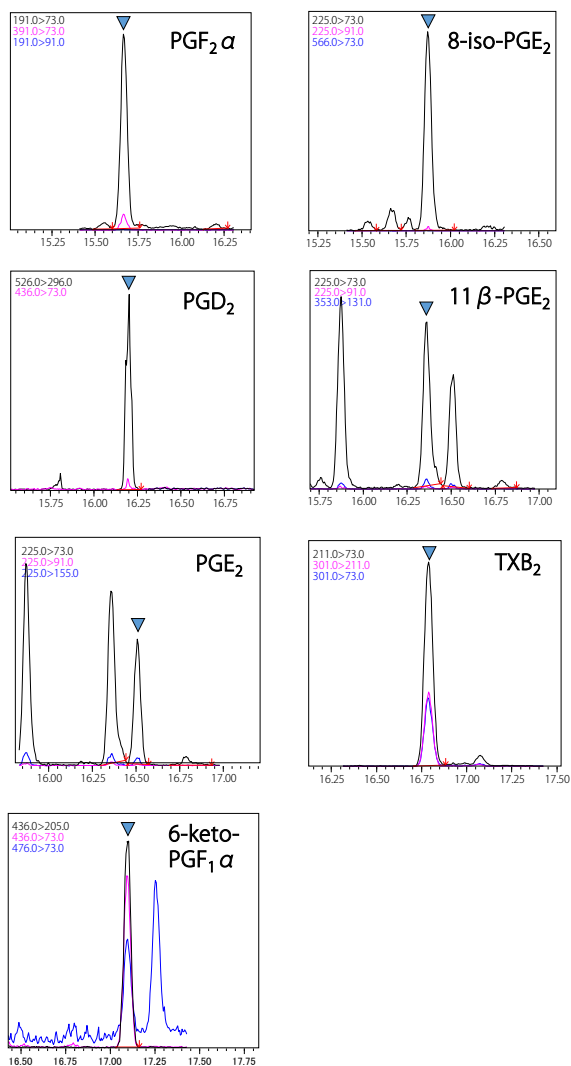


図2 標準品 (100 ng/mL) のMRM分析結果

■ 生体試料の分析

生体試料としてヒト標準血漿を使用しました。標準的な血漿から、今回の分析対象物であるエイコサノイド類は検出されないため、終濃度が200 ng/mLになるように標準品を添加して分析しました。分離が難しいPGE₂、11β-PGE₂と、他の分析機器で比較的解析が難しいとされるTXB₂のMRMクロマトグラムを図3に示します。このとき、回収率が80.4~119.3%であり、今回の前処理でも良好な回収率が得られました (表2参照)。

表2 血漿からの回収率

化合物	回収率 (%)
(+)-PGF ₂ α-4TMS	104.9
8-iso-PGE ₂ -3TMS	80.4
PGD ₂ -3TMS	92.2
11β-PGE ₂ -3TMS	83.3
PGE ₂ -3TMS	119.3
TXB ₂ -4TMS	105.3
6-keto-PGF ₁ α-4TMS	114.0

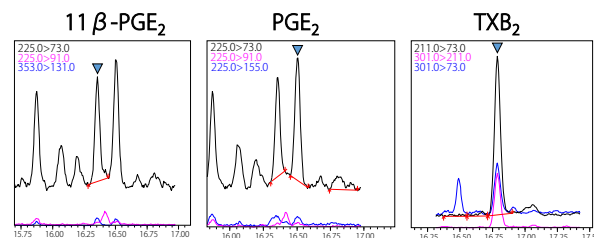


図3 標準添加 (200 ng/mL) した血漿のMRM分析結果

■ まとめ

メトキシム-TMS化によって、GC-MSで7種のエイコサノイド類を確認できました。メトキシム化前にカルボキシル基をメチル化することで、より安定した誘導体にすることができますが、今回の手法でも十分な感度を得ることが可能です。

■ Smart Metabolites Databaseの活用

今回調製したサンプルは、Smart Metabolites Databaseを用いて一次代謝物分析でも使用することができます。カラムやインサートの交換も不要で、一次代謝物とエイコサノイド類の両方を分析することができます。Garudaなどの解析ソフトウェアと組み合わせることで多変量解析や代謝マップの作成も行うことができます。

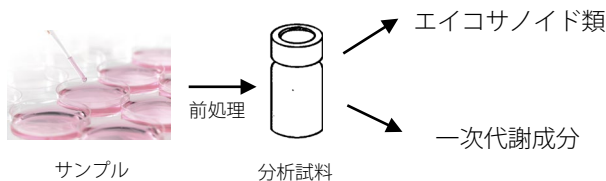
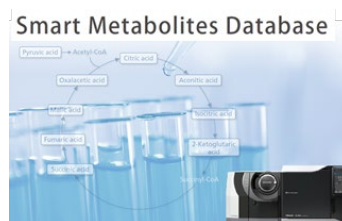


図4 Smart Metabolites Database™の活用

GCMS-TQおよびSmart Metabolites Databaseは、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00296-JP 初版発行：2021年12月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Clubにご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。

新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2021