

Application Data Sheet

No. 102

GC-MS

Gas Chromatograph Mass Spectrometer

GC-MS/MSによるヒトES細胞解糖系代謝物の分析

 Analysis of Glycolysis Metabolites in Human Embryonic Stem Cells
 using GC-MS/MS

メタボローム解析は、疾患バイオマーカー探索など、医学系分野において基礎・臨床を問わず、幅広く用いられている手法です。シングル四重極GC-MSは優れたクロマトグラフィー分離能を有し、安定した分析が可能なため、メタボローム解析に広く用いられてきました。一方、生体試料には、多くの代謝物や多様なマトリックスが含まれているため、シングル四重極GC-MSでは分離が困難な場合があります。トリプル四重極GC-MS/MSでは2回MS分離を行うため、上記妨害成分による影響を排除することができ、より広範な代謝物を分析することが可能です。

本アプリケーションデータシートでは、Smart Metabolites Databaseに含まれるMRMメソッドを用い、ヒトES細胞抽出物の解糖系代謝産物を分析した結果を紹介します。

分析条件

4枚のDish (60 mm) よりそれぞれ回収したヒトES細胞抽出物をトリメチルシリル (TMS) 化しました。細胞から代謝物の抽出、誘導体化の詳細な手順は島津評論, 70, 123-131, 2014 (C297-0471) を参照ください。Table 1に分析条件を示します。

Table 1 分析条件

GC-MS	:GCMS-TQ8040		
カラム	:DB-5 (長さ30m, 0.25mm I.D., df=1.00 μm)		
ガラスインサート	:スプリットレスインサート ウール入り (PN:221-48876-03)		
[GC]		[MS]	
気化室温度	:280°C	インターフェース温度	:280°C
カラムオープン温度	:100°C(4分)→(4°C/分)→320°C(8分)	イオン源温度	:200°C
注入モード	:スプリットレス		
キャリアガス制御	:線速度 (39.0 cm/秒)	測定モード	:MRM
注入量	:1 μL	ループタイム	:0.3 秒

Table 2 MRM条件

化合物名	保持時間(分)	保持指標	MRMモニタリング m/z Precursor>Product
Pyruvic acid-meto-TMS	9.415	1047	174.00>74.00
Lactic acid-2TMS	9.873	1061	219.00>147.10
Phosphoenolpyruvic acid-3TMS	28.119	1611	369.10>147.10
Glyceraldehyde 3-phosphate-meto-3TMS(2)	31.624	1734	328.10>298.10
Dihydroxyacetone phosphate-meto-3TMS(1)	32.302	1760	315.20>299.10
2-Phosphoglyceric acid -4TMS	33.410	1799	459.10>299.10
3-Phosphoglyceric acid-4TMS	34.092	1825	387.20>73.00
Glucose-meto-5TMS(1)	36.799	1930	319.10>129.10
2,3-Bisphosphoglyceric acid-5TMS	43.741	2225	315.10>73.00
Fructose 6-phosphate-meto-6TMS	46.507	2354	459.20>315.10
Glucose 6-phosphate-meto-6TMS(1)	46.799	2368	387.20>73.00
2-Isopropylmalic acid-3TMS(I.S.)	27.589	1593	349.10>259.10

分析結果

GC-MS/MSを用いたMRMモードでの分析により、シングル四重極GC-MSでは検出が困難であった成分を検出することができました(シングル四重極GC-MSでの結果はLAAN-J-MS087 GC-MSを用いたヒトES細胞抽出物の代謝物分析を参照ください。)(Fig. 1)。また、多くの化合物について安定した繰り返し分析精度を得ることができました(Table 3)。以上のようにGC-MS/MSを用いることでより広範な代謝物を分析することが可能です。

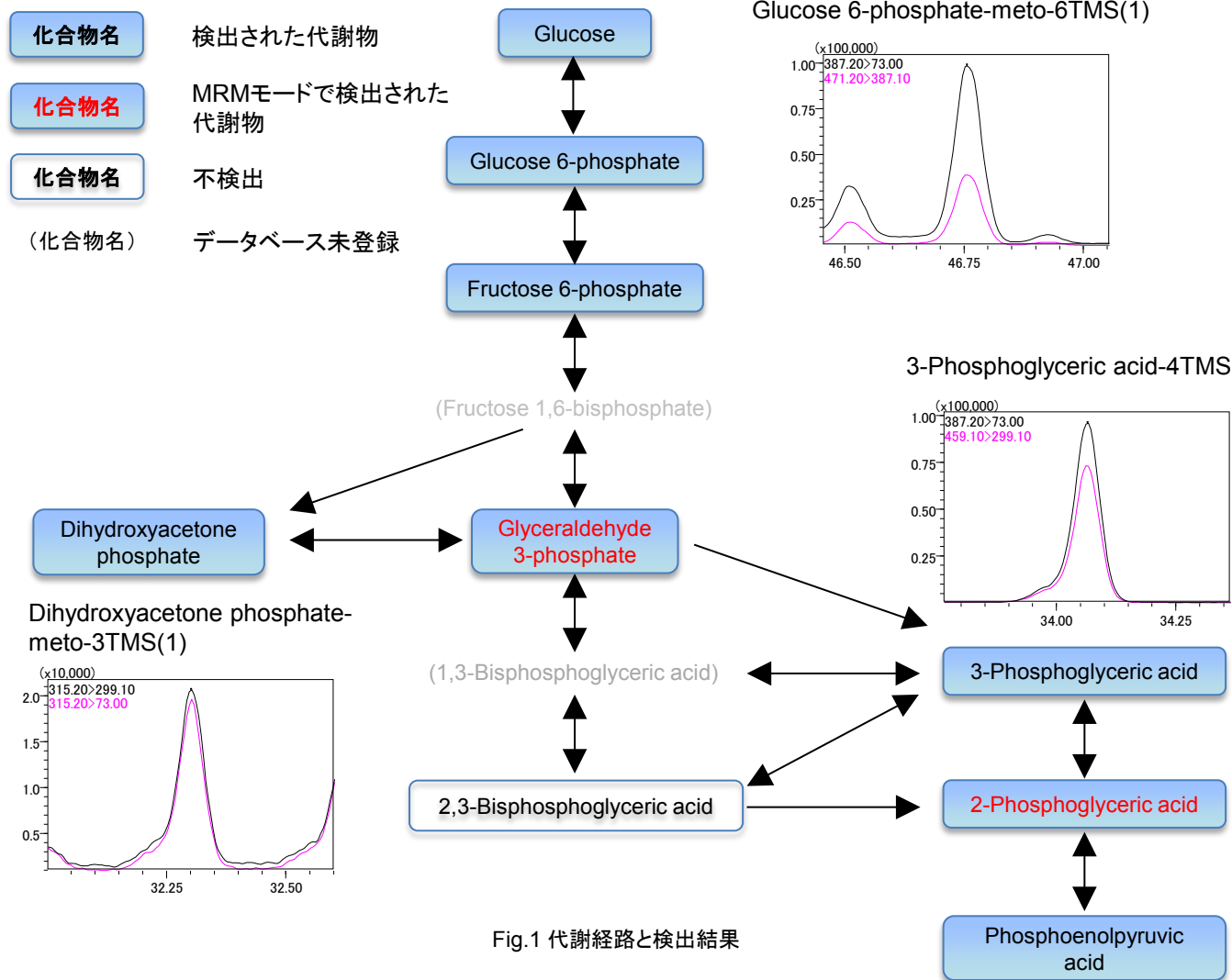


Fig.1 代謝経路と検出結果

Table 3 前処理操作を含んだ繰り返し分析精度 (n= 4)

化合物名	面積比 * 平均	標準偏差	%RSD
Pyruvic acid-meto-TMS	8.172E-02	3.574E-03	4.4
Lactic acid-2TMS	2.259E+00	1.056E-01	4.7
Phosphoenolpyruvic acid-3TMS	2.436E-02	6.081E-03	25.0
Glyceraldehyde 3-phosphate-meto-3TMS(2)	2.292E-04	3.139E-05	13.7
Dihydroxyacetone phosphate-meto-3TMS(1)	5.439E-03	1.647E-03	30.3
2-Phosphoglyceric acid -4TMS	4.780E-03	6.003E-04	12.6
3-Phosphoglyceric acid-4TMS	5.206E-02	3.957E-03	7.6
Glucose-meto-5TMS(1)	4.596E+00	6.496E-01	14.1
2,3-Bisphosphoglyceric acid-5TMS	N.D.	-	-
Fructose 6-phosphate-meto-6TMS	5.395E-03	2.992E-04	5.5
Glucose 6-phosphate-meto-6TMS(1)	4.907E-02	1.832E-03	3.7

* : 2-Isopropylmalic acid-3TMSの面積値で除した値

注記: ヒトES細胞のサンプルは、京都大学 物質-細胞統合システム 饗庭先生、中辻先生にご提供いただきました。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。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。