SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

高速液体クロマトグラフ質量分析計　LCMS™-8060NX

LC/MS/MSメソッドパッケージ 一次代謝物 Ver. 3によるラット脳中の一次代謝物の分析

伊藤 友紀、荒尾洋平

ユーザーベネフィット

- ◆ 2つの分析法（イオン対メソッドと非イオン対メソッド）により、延べ198成分の一次代謝物の分析が可能です。
- ◆ Mastro™2 C18による新規イオン対メソッドにより、MRMでの分離が難しい糖リン酸の分離・検出が可能です。
- ◆ 医薬・食品・細胞工学研究における代謝解析手法としてご利用ください。

■はじめに

メタボロミクスとは、生体内に存在する低分子代謝物を網羅的に解析する技術です。近年、医学研究分野においてメタボロミクスを活用することが多くなっており、組織や血液などを分析対象試料としたバイオマーカー探索の有効な手段として期待されています。

筆者らはトリプル四重極型質量分析計のMRMをベースとした一斉分析法「LC/MS/MSメソッドパッケージ　一次代謝物 Ver. 3」を開発しました。本メソッドパッケージには、イオン対メソッドと非イオン対メソッドの2種類が収載されています。従来のVer. 2よりも分析対象成分を大幅に拡張し、延べ198成分の代謝物分析が可能です（図1）。イオン対メソッドでは対象成分を従来の55成分から112成分に拡充し、分析カラムをMastro2 C18に更新しました。さらにイオン対試薬をジペンチルアミンに変更することで、糖リン酸の分離を改善しました。非イオン対メソッドではメバロン酸経路やシキミ酸経路の新たな代謝物経路上の化合物を追加し、対象成分は従来の97成分から141成分になりました。分析カラムをShim-Pack™ GIST-PFPPに変更しました。

本稿では、「LC/MS/MSメソッドパッケージ　一次代謝物 Ver. 3」を用いて、ラット脳中の一次代謝物を網羅的に分析した事例をご紹介します。

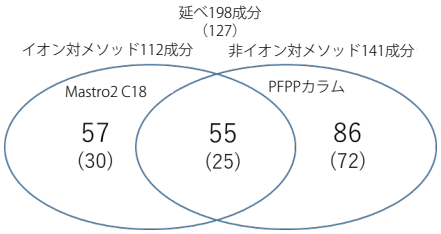

図1　LC/MS/MSメソッドパッケージ　一次代謝物 Ver. 3における分析対象成分数（括弧内はVer. 2における分析対象成分数を示す）

■試料の前処理

ラット脳試料は野生型のSDラットから採取したものを使用しました。全脳に組織重量の10倍量のメタノールを加えて十分にホモジナイズしました。続いて、ホモジネート500 µLをマイクロチューブに移し、次いで、250 µLの超純水を加えて十分に攪拌しました。その後、懸濁液600 µLを別のマイクロチューブに移し、続いて、400 µLのクロロホルムを添加して十分に攪拌しました。15000 rpmで15分間の遠心分離後、上清400 µLを別のマイクロチューブに移し、次いで、真空濃縮器で蒸発乾固しました。最後に、50 µLの超純水で再溶解させた溶液を、ガラスインサートを有するバイアルに移してLC/MS/MS分析に供しました（図2）。

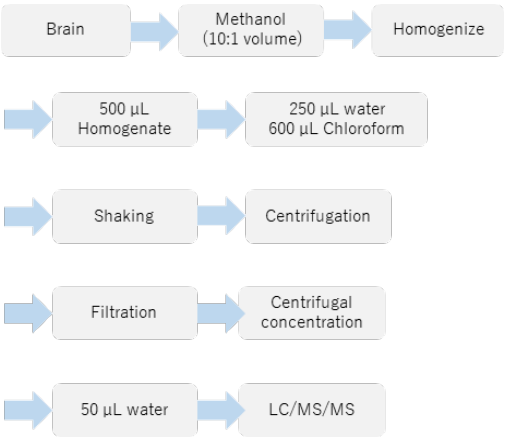

図2　試料の前処理

図3　LC/MS/MSメソッドパッケージ　一次代謝物Ver. 3およびLC-MSシステム

■ 分析条件

一次代謝物の分析には、「LC/MS/MSメソッドパッケージ一次代謝物Ver. 3」に含まれる2種類の分析法およびLCMS-8060NX（図3）を使用して行いました。

表1にイオン対試薬・Mastro2 C18を用いた分析法（イオン対メソッド）のHPLCおよびMSの分析条件を、表2に非イオン対試薬・PFPPカラムを用いた分析法（非イオン対メソッド）のHPLCおよびMSの分析条件を示しました。

表 1　イオン対メソッドの分析条件

UHPLC (Nexera™ X3 system)	
Column	: Mastro2 C18 (150 mm×2.0 mm, 3.0 µm, Shimadzu GLC) P/N: 370-01005-84
Mobile phase	: A) Acetic acid/Dipentylamine/Water B) Methanol
Mode	: Gradient elution
Flow rate	: 0.3 mL/min
Injection volume	: 3 µL

MS (LCMS-8060NX)	
Ionization	: IonFocus™ ESI (Negative)
Mode	: MRM (112 Compounds)
Nebulizing gas flow	: 2.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250 ℃
Block heater temp.	: 400 ℃
Interface temp.	: 270 ℃

＊本メソッドで使用しているDipentylamineは指定毒物ではありません。

表 2　非イオン対メソッドの分析条件

UHPLC (Nexera X3 system)	
Column	: Shim-pack™ GIST PFPP (150 mm×2.1 mm, 3.0 µm, Shimadzu GLC) P/N: 227-30858-07
Mobile phase	: A) Formic acid/Water B) Formic acid/Acetonitrile
Mode	: Gradient elution
Flow rate	: 0.25 mL/min
Injection volume	: 3 µL

MS (LCMS-8060NX)	
Ionization	: IonFocus ESI (Positive/Negative)
Mode	: MRM (141 Compounds)
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250 ℃
Block heater temp.	: 400 ℃
Interface temp.	: 270 ℃

■ 分析結果

<イオン対メソッドでの結果>

イオン対試薬・Mastro2 C18を用いた分析法では、ラット脳抽出液から87種類の一次代謝物が検出されました。図4に本分析法で得られたクロマトグラムを示します。生体内には分子構造が類似の代謝物が数多く存在します。そのうち以下5種の糖リン酸Glucose 6-phosphate（G6P）、Fructose 6-phosphate（F6P）、Mannose 6-phosphate（M6P）、Glucose 1-phosphate（G1P）、Fructose 1-phosphate（F1P）はMRMトランジションが同一のため、LCでの分離が重要です。図5には上記5種の糖リン酸のクロマトグラムを示しました。本分析法を用いることで5種の糖リン酸を分離・検出できることが示されました。

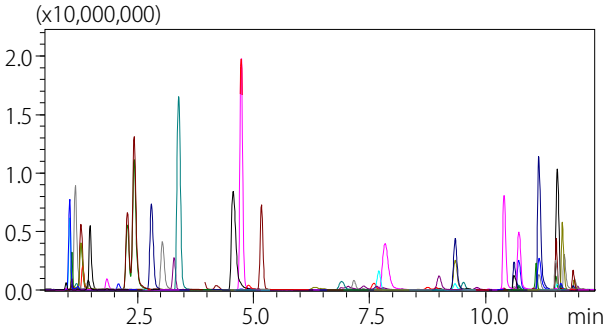

図 4　イオン対試薬・Mastro2 C18を用いた分析法での
マスクロマトグラム

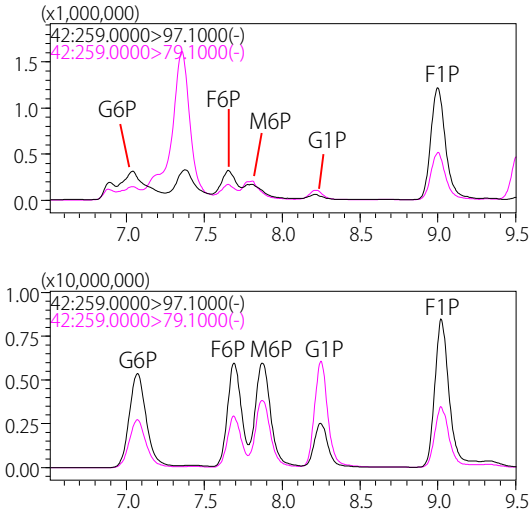

図 5　脳サンプルにおける糖リン酸のクロマトグラム（上図）および
10 µM標品における糖リン酸のクロマトグラム（下図）

<非イオン対メソッドでの結果>

非イオン対試薬・PFPPカラムを用いた分析法では、ラット脳抽出液から94種類の一次代謝物が検出されました。図6に本分析法で得られたクロマトグラムを示します。

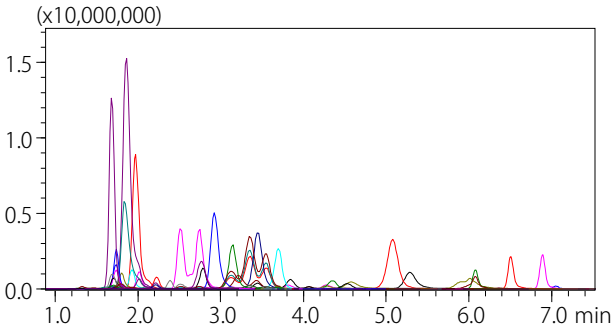

図 6　非イオン対試薬・PFPPカラムを用いた分析法での
マスクロマトグラム

<ラット脳抽出液から検出された成分>

図7にはイオン対メソッドと非イオン対メソッドで検出できた一次代謝物の一覧を示しました。延べ137成分が検出されました。また、本分析法で検出された化合物の面積値%RSDはいずれも20未満であり、再現性の高い結果が得られました。

	成分名	イオン対	非イオン対
解糖系	2,3-Bisphosphoglyceric acid	○	
	3-Phosphoglyceric acid_2-Phosphoglyceric acid	○	
	Dihydroxyacetone phosphate	○	
	Glucose 6-phosphate	○	
	Lactic acid	○*	○
	Phosphoenolpyruvic acid	○	
	Pyruvic acid	○	○
ペントース・リン酸経路	Fructose 1,6-bisphosphate	○	
	Fructose 6-phosphate	○	
	Glyceraldehyde 3-phosphate	○	
	6-Phosphogluconic acid	○	
	Ribose 1-phosphate	○*	
	Ribulose 5-phosphate	○	
	Sedoheptulose 7-phosphate	○	
	Xylulose 5-phosphate	○*	
糖リン酸	Fructose 1-phosphate	○*	
	Glucose 1-phosphate	○	
	Mannose 6-phosphate	○*	
TCA回路	2-Ketoglutaric acid	○*	○
	Acetyl coenzyme A	○	
	Aconitic acid		○
	Citric acid		○
	Fumaric acid		○
	Isocitric acid		○
	Malic acid		○
	Succinic acid		○
尿素回路	Argininosuccinic acid		○
	Ornithine		○
	Arginine	○	○
	Citrulline		○
アミノ酸	2-Aminobutyric acid	○*	○
	4-Aminobutyric acid	○*	○
	4-Hydroxyproline	○*	○
	Alanine	○	○
	Asparagine	○	○
	Aspartic acid	○	○
	Asymmetric dimethylarginine		○
	Dimethylglycine		○
	Glutamic acid	○	○
	Glutamine	○	○
	Glycine	○	○
	Histidine	○	○
	Isoleucine	○*	○
	Leucine	○*	○
	Lysine	○	○
	Methionine sulfoxide		○
	Phenylalanine	○	○
	Proline	○*	○
	Serine	○	○
	Symmetric dimethylarginine		○
	Threonine	○	○
	Tryptophan	○	○
	Tyrosine	○	○
	Valine	○*	○
Methionine回路およびTranssulfuration経路	Cystathionine		○
	Homocysteine		○
	Methionine	○	○
	5-Glutamylcysteine		○
	Glutathione		○
	Oxidized glutathione		○
	S-Adenosylhomocysteine		○
	S-Adenosylmethionine		○
補酵素	Coenzyme A	○*	
	FAD	○*	○
	FMN	○*	○
	NAD	○	○
	NADH	○	
	NADP	○	
	NADPH	○	
	Niacinamide		○

	成分名	イオン対	非イオン対
有機酸	2-Isopropylmalic acid	○*	
	Creatine		○
	Glyceric acid	○*	
	Glycerol 3-phosphate	○	
	Glycolic acid	○*	○*
	Glyoxylic acid		○*
	Indole 3-acetic acid	○*	
	Orotic acid	○*	○
	Pantothenic acid	○*	
	Urocanic acid		○*
カテコールアミン	Dopamine		○
	Norepinephrine		○
	Serotonin		○
ビタミンB	Pantothenic acid		○
塩基・ヌクレオシド・ヌクレオチド	Adenine	○*	○
	Adenosine	○*	○
	Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate	○	○
	Adenosine diphosphate	○	
	Adenosine monophosphate	○	○
	Adenosine triphosphate	○	
	Adenylsuccinic acid		○
	AICAR	○*	○*
	Cytidine	○*	○
	Cytidine diphosphate	○	
	Cytidine monophosphate	○	○
	Cytidine triphosphate	○	
	Cytosine		○
	Guanine	○*	○
	Guanosine	○*	○
	Guanosine diphosphate	○	
	Guanosine monophosphate	○	○
	Guanosine triphosphate	○	
	Inosine	○*	○
	Inosine monophosphate	○*	
	Thymidine diphosphate	○	
	Thymidine monophosphate	○	○
	Thymidine triphosphate	○	
	Uracil		○
	Uridine	○*	○
	Uridine diphosphate	○	
	Uridine monophosphate	○	
	Uridine triphosphate	○	
	Xanthosine monophosphate	○*	
糖ヌクレオチド	ADP-glucose	○*	
	UDP-glucose	○*	
プリン誘導体および代謝産物	Allantoin		○
	Hypoxanthine	○*	○
	Uric acid	○*	○
	Xanthine	○*	○
メバロン酸経路	Mevalonic acid		○*
	MVA-P		○*
その他	4-Hydroxybenzoic acid		○*
	Acetylcarnitine		○
	Acetylcholine		○
	Carnitine		○
	Carnosine		○
	Choline		○
	Citicoline		○
	Creatinine		○
	Dihydroxyphenylacetic acid		○
	Ergothioneine		○*
	Histamine		○
	Kynurenine		○
	Salicylic acid		○*
	Vanillin		○*

※：＊のついた化合物はVer. 3で新たに追加した化合物です。

図７　イオン対試薬・Mastro2 C18を用いた分析法および非イオン対試薬・PFPPカラムを用いた分析法で検出された一次代謝物

■まとめ

「LC/MS/MSメソッドパッケージ 一次代謝物Ver. 3」のイオン対メソッドでは、MRMトランジションが同一で分離が難しい5種の糖リン酸を分離・検出できることが示されました。ラット脳抽出液を分析することで87種類の代謝物を検出でき、非イオン対メソッドでは検出できないFructose 6-phosphateやRibose 1-phosphateなどの解糖系やペントース・リン酸経路の代謝物が検出できました。非イオン対メソッドではラット抽出液から94種類の代謝物を検出し、イオン対メソッドでは検出できないSuccinic acidやCystathionineなどのTCA回路やメチオニン回路およびトランススルフレーション経路の代謝物を検出できました。

本手法を、医薬・食品・細胞工学研究における代謝解析手法としてご利用ください。

<謝辞>
本アプリケーションニュース作成にあたり、大日本住友製薬株式会社前臨床研究ユニット　梅村様・橋本様・渡辺様より試料提供およびご指導などのご協力をいただきました。

LCMS、LabSolutions、Nexera、Shim-Pack、IonFocus、およびMastroは、株式会社島津製作所またはその関係会社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

01-00192-JP　初版発行：2021年 6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。
改訂版は会員制サイト Solutions Navigator で閲覧できます。
https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm
閲覧には、会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録ください。
https://solutions.shimadzu.co.jp/

© Shimadzu Corporation, 2021

アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。

LCMS-8060NX
トリプル四重極質量分析計

LCMS-TQ RX シリーズ
トリプル四重極質量分析計

関連分野

- ライフサイエンス
- バイオ医薬品
- 食品・飲料
- バイオマーカー
- メタボロミクス

- 価格お問い合わせ
- 製品お問い合わせ
- 技術お問い合わせ
- その他お問い合わせ