

LC-MSによる核酸関連化合物の分析

Analysis of nitrogenous bases and nucleosides using LC-MS

核酸 (DNA, RNA) は、プリンおよびピリミジン塩基、糖、リン酸からなるヌクレオチドが重合した高分子で、生体内で遺伝情報を担う成分として重要な化合物です。このほか核酸関連化合物である塩基・ヌクレオシド・ヌクレオチドは、遊離の状態では生成・物質代謝など様々な生物学的機能の発現に関与しており、個体内で常に一定に保たれるよう調節されています。

プリン骨格を含む核酸成分であるプリン体は、体内で代謝されXanthineを経由し、ヒトでは最終的に尿酸(uric acid)となり、その一部は尿中に排出されます。通常、尿酸は血液中で一定濃度に保たれていますが、何らかの条件で過剰な状態(高尿酸血症)となると、結晶として関節などに蓄積し、痛風を引き起こす原因ともなっています。これ以外にも核酸成分の関与する種々の代謝異常症が知

られており、血液・尿など生体試料中の核酸成分の分析が行われています。

塩基およびヌクレオシドは、一般にイオン交換や逆相モードHPLCで分離し、紫外吸収により検出を行います。ここでは質量数情報が得られ、高感度であるLC-MSを用いた核酸関連化合物の分析例を紹介します。

Fig.1にプリン塩基の一つAdenineと、ヌクレオシドのAdenosineの構造式と、ESIマスペクトルを示します。酸性条件下、正イオンモードで、いずれもプロトン化分子(M+H)⁺が基準ピークとして観察されます。次に核酸標準品混合物のLC-MS分析結果をFig.2に示します。各核酸成分の(M+H)⁺を検出イオンとして、SIM測定を行いました。15成分の良好な分離が得られています。

S.Yamaki

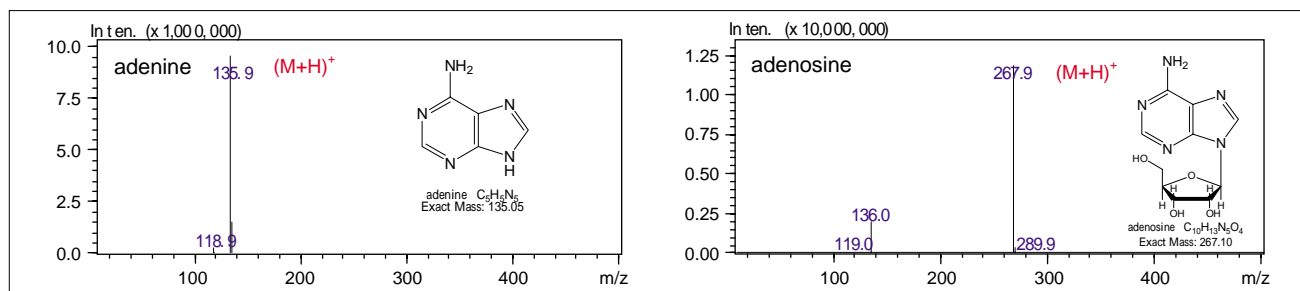


Fig.1 アデニン、アデノシンの正イオンESIマスペクトル
Positive ESI-MS spectra of adenine and adenosine.

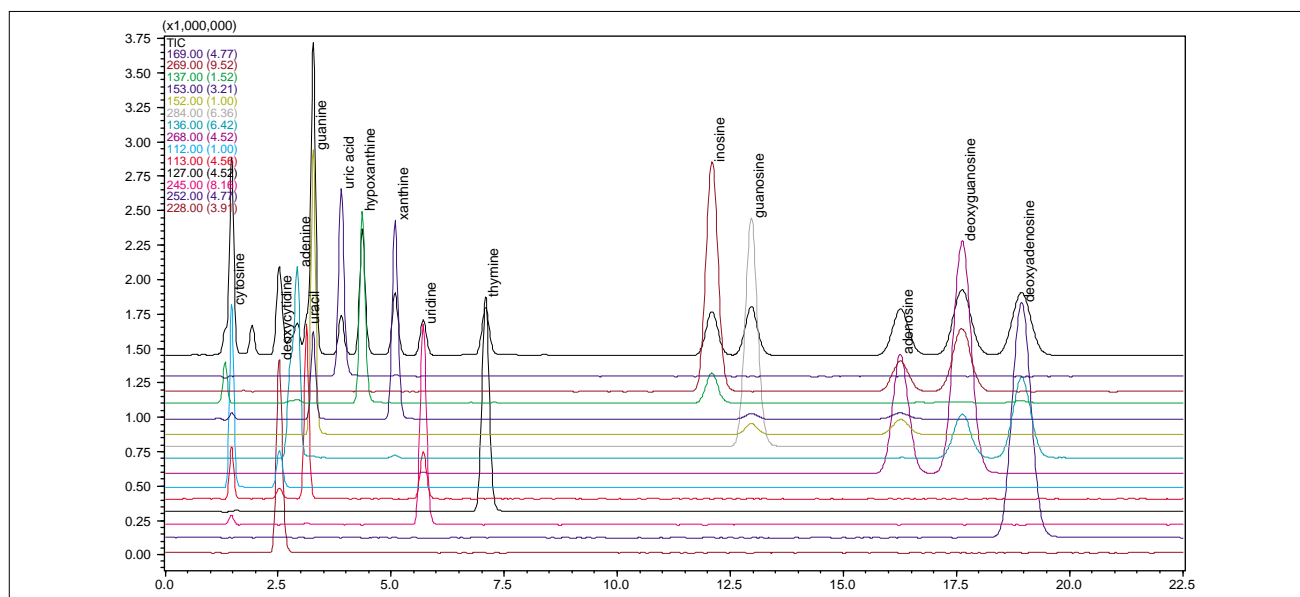


Fig.2 核酸塩基、ヌクレオシド標準品混合物のSIMクロマトグラム
MS chromatogram of nitrogenous bases and nucleosides mixture (SIM mode).

先に述べた痛風の原因としては、遺伝的要因、食生活、ストレスなど様々な要因があげられています。食物中のプリン体も血尿酸値に寄与するといわれ、その含有量に関心が集まっており、プリン体を減らした商品も販売されています。ここではビール類に含まれるプリン塩基・

プリンヌクレオシドを分析した例を示します(Fig.3)。ビール類は超純水で100倍に希釈し、フィルター濾過後、分析用試料としました。ビール中にはXanthine, Guanosine, 等が検出されますが(Fig.3A), プリン体カットビールでは、これらプリン体はほとんど検出されませんでした(Fig.3B)。

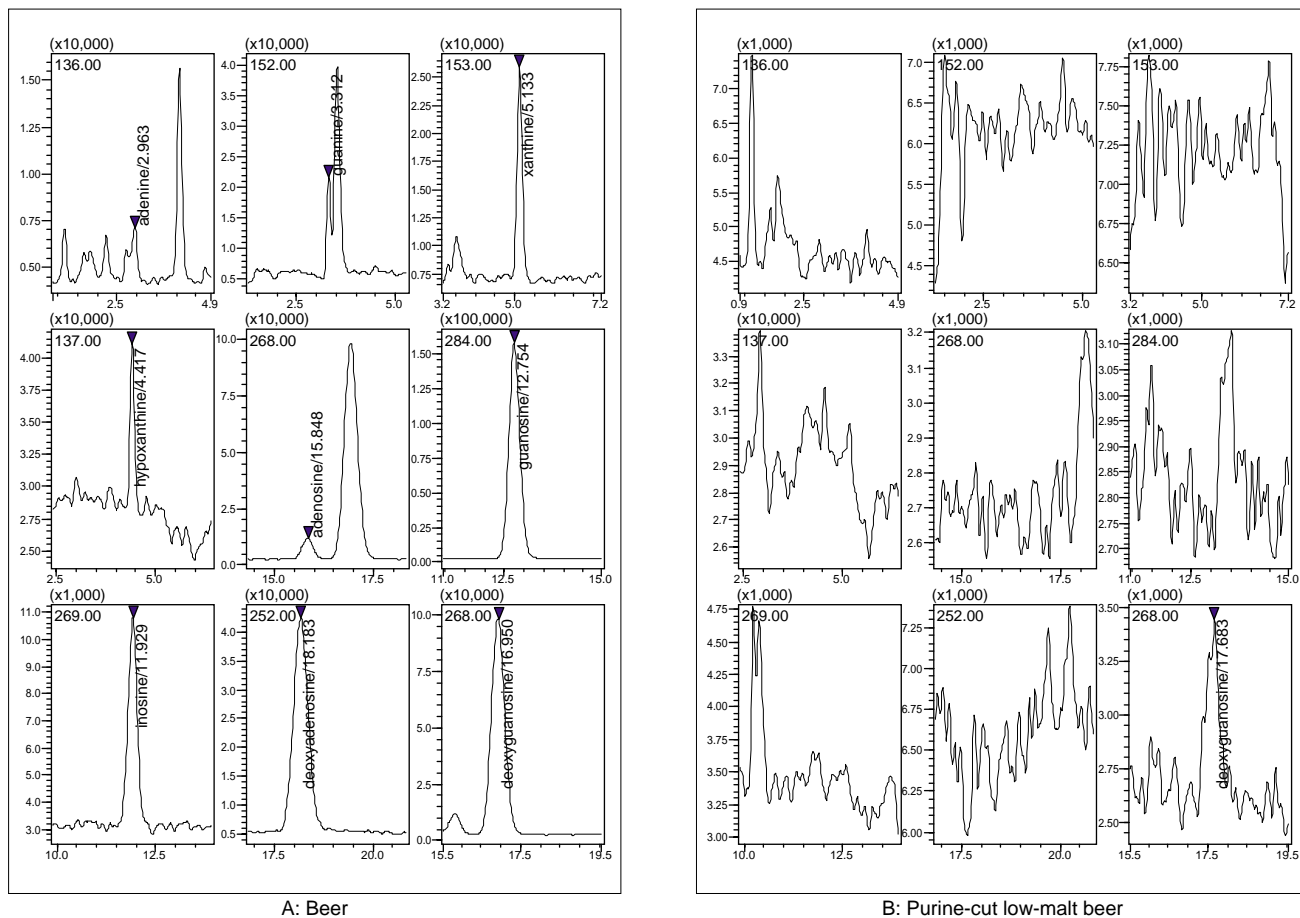


Fig.3 ビール類中のプリン塩基、ヌクレオシドのSIMクロマトグラム
MS chromatograms of purine bases and nucleosides in beer(A) and purine-cut low-malt beer(B)

Table 1 分析条件
Analytical conditions for LC-MS

Column	: L-columnODS(2.1mm I.D. × 150mmL.)	
Mobile phase A	: 0.1% acetic acid-water	
Mobile phase B	: acetonitrile	
Time program	: 1% B(0-20min)-80% B(20.1-30min)	
Flow rate	: 0.2mL/min	
Injection volume	: 3μL	Column temperature : 30°C
Probe voltage	: +4.5kV(ESI-Positive mode)	
CDL temperature	: 200°C	Block heater temperature : 200°C
Nebulizing gas flow	: 1.5L/min	
Drying gas pressure	: 0.1MPa	
CDL voltage	: +15V	
Q-array DC voltage	: Scan mode	Q-array RF voltage : Scan mode
SIM	: m/z 136, 137, 152, 153, 169, 228, 252, 268, 269, 284	