Application News

高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS™-8060NX

Shim-pack™ Mix-HILICを用いた 親水性代謝物の網羅的分析

馬越 泰

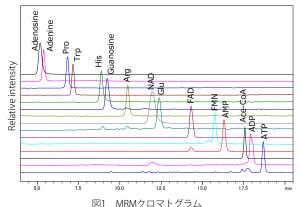
ユーザーベネフィット

- ◆ アミノ基混合ポリマーカラムであるShim-pack Mix-HILICにより、親水性代謝物を網羅的に測定することが可能です。
- ◆ 大腸菌や血漿などの生体サンプルへ適用可能です。

■はじめに

メタボロミクスとは生体中の代謝物(メタボローム)を 網羅的に測定する技術です。代謝物は多様な物理化学的性 質を有するため、単一の分析法ですべての代謝物を測定す ることは容易ではありません。LC/MSでの代謝物の測定に は、固定相にC18やPFPP (Pentafluorophenylpropyl) 基を 持つ逆相カラムや、HILICカラムがよく使用されますが、生 体内で重要なアミノ酸や核酸塩基、ヌクレオシド、ヌクレ オチド、補酵素、有機酸などを同時に分析することは困難 です。イオンペア試薬を用いると、C18カラムで高極性化 合物を保持・分離できますが、陽イオンと陰イオンの同時 分析は原理上難しく、高濃度のイオンペア試薬は装置汚染 の原因となる場合があります。

本アプリケーションでは、 Shim-pack Mix-HILICを用いた 親水性代謝物の網羅的分析事例をご紹介します。本カラム を用いてアミノ酸や核酸塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチ ド、補酵素、有機酸など49成分を対象とした測定を行いま した(図1)。また大腸菌やヒト血漿を対象とした、分析例 を紹介いたします。



(標準品、一部の代謝物を抜粋して表示、倍率はピークごとに変更

■ Shim-pack Mix-HILICについて

Shim-pack Mix-HILICは、固定相にポリメタクリレートの ポリマー基材を用いており、第一級、第二級、第三級アミ ンと第四級アンモニウム基を修飾しています。このカラム は架橋度の高いポリマー粒子に対して、アミンやアンモニ ウム基を導入することで、特有の親水性相互作用及びイオ ン性相互作用を示します。耐圧上限は35 MPaで、使用可能 pH範囲は2-13と、塩基性移動相条件でも使用可能です。

■分析条件

測定機器はNexera™ X3とLCMS-8060NXを使用しました。 表1に分析条件を示します。Solvent Aは、炭酸水素アンモ ニウム3162 mgに1 Lの超純水を加え、28%アンモニア水 10 mLを添加して作成しました。

記載のグラジエント条件では、親水性相互作用が支配的 な分離モードと、陰イオン交換が支配的な分離モードが連 続的に作用します。二種類の連続的な分離様式により、 様々な物性を持つ化合物を分離することが出来ます。

表 1 分析条件

[HPLC conditions] Nexera X3

: Shim-pack Mix-HILIC (150 mm imes 2.1 mm I.D., 5

μm) P/N: 227-32751-01

Column oven

: Water + 40 mmol/L ammonium bicarbonate (pH Solvent A

Solvent B : Acetonitrile Rinse : Methanol

Gradient : B conc. 95% (0-0.5 min) \rightarrow 40% (15.5 min) \rightarrow 0%

 $(16.5-26.5 \text{ min}) \rightarrow 95\% (27.5-35 \text{ min})$

Flow rate :04 ml/min Injection volume :5 μL

[MS conditions] LCMS-8060NX

Ionization ESI (IonFocus™) Mode : MRM Nebulizing gas 2.0 L/min Drying gas 10.0 L/min 10.0 L/min Heating gas DL temp. 250° C 400° C Heat block temp. Interface temp. 300° C CID Gas Pressure

270 kPa

分析上の注意

LCの種類によっては、使用可能なpH範囲が9.7に満たな い場合があります。使用可能なpH範囲をご確認ください。 分析終了時には塩の析出を防ぐために、Solvent B 80%で力 ラム内の溶媒を置換してください。長期保管時は取扱説明 書の記載に従い、出荷時の封入溶媒(アセトニトリル/40 mmol/L 炭酸水素アンモニウム水溶液 + 6 mmol/L ギ酸 = 40/60 (v/v))で置換してください。カラムを取り外した後は、 Solvent Aを超純水に置換して、分析系全体を洗浄してくだ さい。

■前処理

液体LB培地で培養した大腸菌を、OD600が1となるように 希釈し、2 mLを分析に使用しました。遠心分離(3,000 g、 4℃、5 min) により培養上清を取り除きました。PBS 1 mL で2回洗浄し、PBSを取り除いた後、下記の前処理を行いま した。

・大腸菌

・メタノール 1000 μL ・クロロホルム 400 μL

↓ボルテックス 30 sec、超音波 5 min ↓遠心分離(13,000 rpm、4℃、5 min)

・上清 ・クロロホルム 700 μL ・超純水 400 μL

↓ボルテックス 30 sec ↓遠心分離(13,000 rpm、4℃、5 min)

300 μL

↓上清500 μLを遠心濃縮 ↓水/メタノール(1/1) 50 μLに再溶解

LC/MS分析

ヒト血漿は、コージンバイオ株式会社より購入し、下記 の前処理を行いました。

> 血漿 ・メタノール

50 µL 550 μL

↓ボルテックス 30 sec、超音波 5 min ↓遠心分離(13,000 rpm、4℃、5 min)

500 μL ・クロロホルム 500 μL

・超純水 400 μL

> ↓ボルテックス 30 sec →遠心分離(13,000 rpm、4°C、5 min)

↓上清500 µLを遠心濃縮

↓水/メタノール(1/1) 50 µLに再溶解

LC/MS分析

■測定対象化合物

測定対象化合物とMRM条件を表2に示します。大腸菌と血漿から検出された代謝物も示します。

表 2 測定対象化合物と大腸菌・血漿から検出された代謝物

Abbreviation	Metabolite Name	Polarity	MRM	Retention time (min)	Collision Energy (V)	Classification	E. coli	Plasma
Ala	Alanine	+	90.1 > 44.1	8.1	-14	Amino acid	0	0
Arg	Arginine	+	174.9 > 70.2	10.5	-24	Amino acid	0	0
Asn	Asparagine	+	133.0 > 74.1	9.1	-17	Amino acid	0	0
Asp	Aspartic acid	+	134.0 > 74.0	12.2	-16	Amino acid		0
Gln	Glutamine	+	147.0 > 84.1	9.0	-19	Amino acid	0	0
Glu	Glutamic acid	+	147.8 > 84.1	12.4	-17	Amino acid	0	0
His	Histidine	+	155.9 > 110.1	8.9	-16	Amino acid		0
lle	Isoleucine	+	132.1 > 86.2	6.6	-13	Amino acid	0	0
Leu	Leucine	+	131.9 > 86.2	6.4	-13	Amino acid	0	0
Lys	Lysine	+	146.9 > 84.2	10.5	-19	Amino acid		0
Met	Methionine	+	149.8 > 56.2	6.9	-18	Amino acid		0
Phe	Phenylalanine	+	166.1 > 120.1	6.4	-15	Amino acid	Ō	Ö
Pro	Proline	+	116.2 > 70.2	6.8	-17	Amino acid	Ŏ	Ö
Ser	Serine	+	105.8 > 60.2	9.4	-13	Amino acid	Ō	Ö
Thr	Threonine	+	120.2 > 74.2	8.6	-13	Amino acid	Ŏ	Ö
Trp	Tryptophan	+	205.2 > 188.1	7.2	-11	Amino acid	Ŏ	Ö
Tyr	Tyrosine	+	182.2 > 91.2	8.5	-29	Amino acid	Ŏ	Ö
Val	Valine	+	117.9 > 72.2	7.1	-13	Amino acid	Ö	Ö
Ace-CoA	Acetyl-Coenzyme A	+	810.1 > 303.2	17.6	-50	Coenzyme	Ö	0
CoA	Coenzyme A	+	768.0 > 261.1	17.7	-32	Coenzyme	Ö	0
FAD	Flavin adenine dinucleotide	-	784.0 > 437.1	14.3	28	Coenzyme	lŏ	0
FMN	Flavin mononucleotide	+	456.9 > 439.1	15.8	-18	Coenzyme	Ö	0
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide	+	664.0 > 136.1	12.0	-52	Coenzyme	Ö	
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	_	741.9 > 620.0	17.4	18	Coenzyme	Ö	
Adenine	Adenine	+	136.2 > 119.0	5.4	-26	Nucleobase	Ö	
Cytosine	Cytosine	+	111.9 > 95.1	5.2	-21	Nucleobase		0
Guanine	Guanine	+	152.0 > 135.0	7.9	-22	Nucleobase	Ö	
Uracil	Uracil	_	111.3 > 42.1	4.3	15	Nucleobase	Ö	0
Adenosine	Adenosine	+	268.0 > 136.0	5.2	-19	Nucleoside	Ö	
Cytidine	Cytidine	+	243.8 > 112.1	6.7	-12	Nucleoside	Ö	
Guanosine	Guanosine	+	283.9 > 152.0	9.2	-15	Nucleoside		
Uridine	Uridine	+	245.0 > 113.1	6.7	-11	Nucleoside		
AMP	Adenosine 5'-monophosphate	+	348.0 > 136.1	16.3	-21	Nucleotide	0	0
ADP	Adenosine 5'-diphosphate	+	428.0 > 136.1	17.9	-25	Nucleotide	Ö	0
ATP	Adenosine 5'-triphosphate	+	508.0 > 410.0	18.7	-19	Nucleotide	Ö	
CMP	Cytidine 5'-monophosphate	+	324.0 > 112.1	16.6	-14	Nucleotide	Ö	
CDP	Cytidine 5'-diphosphate	+	404.0 > 112.1	17.8	-22	Nucleotide	Ö	
CTP	Cytidine 5'-triphosphate	+	484.1 > 112.1	18.3	-24	Nucleotide	Ö	
dTMP	Deoxythymidine 5'-monophosphate	+	322.8 > 81.0	15.8	-17	Nucleotide	Ö	
dTDP	Deoxythymidine 5'-diphosphate	_	400.9 > 159.1	17.7	23	Nucleotide		
dTTP	Deoxythymidine 5'-triphosphate	+	483.0 > 81.0	18.3	-38	Nucleotide		
GMP	Guanosine 5'-monophosphate	+	363.8 > 152.1	17.7	-17	Nucleotide	0	
GDP	Guanosine 5'-diphosphate	+	444.0 > 152.0	18.4	-20	Nucleotide		
GTP	Guanosine 5'-triphosphate	+	524.0 > 152.0	19.8	-31	Nucleotide		
UMP	Uridine 5'-monophosphate	+	325.1 > 97.2	17.0	-17	Nucleotide		
UDP	Uridine 5'-diphosphate	+	405.0 > 97.2	18.0	-21	Nucleotide		
UTP	Uridine 5'-triphosphate	+	484.9 > 97.1	18.5	-28	Nucleotide		
Cit	Citric acid	_	191.2 > 111.0	17.8	11	Organic acid	0	0
Mal	Malic acid	_	133.2 > 115.0	15.6	15	Organic acid		00
			ヨのシステムやカ					

■結果

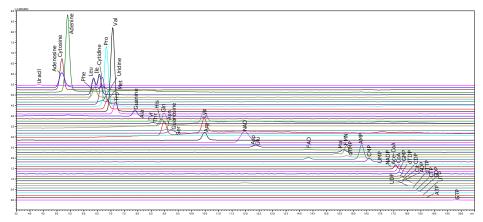
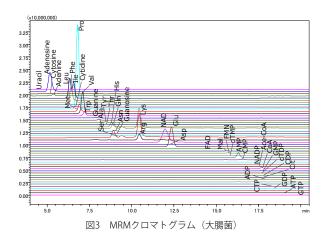
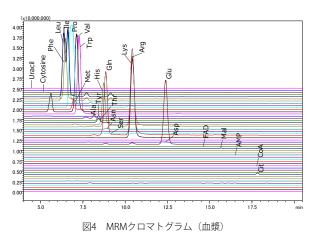


図2 MRMクロマトグラム (標準品: 1 µmol/L)

標準品の分析により得られたクロマトグラムを図2に示します。水系溶媒が50%までの範囲(0-12.8 min)に、非荷電性、陽イオン性、両イオン性化合物である、アミノ酸や核酸塩基、ヌクレオシドなどが溶出しました。水系溶媒が50%以上の範囲(12.8 min以降)に、陰イオン性化合物であるヌクレオチド、補酵素、有機酸などが溶出しました。本分析条件で大腸菌と血漿サンプルを測定しました。表2に示した通り、測定対象とした49成分中、大腸菌からは44成分、血漿からは25成分が検出されました。図3、4にそれぞれのMRMクロマトグラムを示します。





大腸菌から検出された代謝物を、一部抜粋して図5に示します。大腸菌からはアミノ酸、核酸塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド、補酵素、有機酸など幅広い化合物が検出されました。

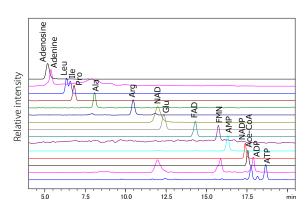


図5 MRMクロマトグラム (大腸菌、一部の代謝物を抜粋して表示、倍率はピークごとに変更)

■まとめ

Shim-pack Mix-HILICを用いると、アミノ酸や核酸塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド、補酵素、有機酸など親水性代謝物を網羅的に測定することが出来ます。大腸菌や血漿など生体由来サンプルへ適用可能なことから、本分析法ははメタボローム解析に有効な手段となることが期待されます。

<謝辞>

本アプリケーションの作成にあたり、九州大学生体防御医学研究所の馬場 健史 先生、中谷 航太 先生に多大なご協力を頂きました。心より感謝申し上げます。

LCMS、Shim-pack、NexeraおよびIonFocus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 https://www.an.shimadzu.co.jp/

01-00679-JP 初版発行: 2024年 4月

島津コールセンター 🝑 0120-131691

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。







関連分野

▶ ライフサイエンス

▶ 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