

Technical Report

イオンペアクロマトグラフィーを用いた LC/MS/MSによる親水性代謝物の定量分析

Quantitative Analysis of Hydrophilic Metabolite using Ion-Pairing Chromatography with a High-Speed Triple Quadrupole Mass Spectrometer

Zanariah Hashim¹、傳寶 雄大¹、小倉 泰郎²、平野 一郎²、飯田 順子²、馬場 健史¹、福崎 英一郎¹

Abstract:

LC/MSによる親水性代謝物の定量分析は、移動相やカラムの選択が難しいことから一般的ではありません。本レポートでは、イオンペアクロマトグラフィーと高速LC/MS/MSを組み合わせた親水性代謝物の迅速な分析システムをご紹介します。

Keywords: メタボロミクス、親水性代謝物、イオンペアクロマトグラフィー、LC/MS/MS

1. はじめに

メタボロミクスは代謝物の包括的な研究分野であり、様々な代謝物情報を組み合わせることで詳細な表現型解析が可能となります。エネルギー代謝が行われている中心代謝は、生物学的に最も重要な代謝経路の一つです。この経路には糖リン酸、有機酸、核酸など多くの親水性化合物が存在します。

イオンペアクロマトグラフィーとトリプル四重極型質量分析計を組み合わせた分析手法は、これら親水性代謝物の分析技術の一つとして知られており、さらなるスループット向上のために、質量分析計には優れた高速性が求められます。今回、イオンペアクロマトグラフィーを用いた親水性代謝物の高速MRM測定により、良好な定量結果が得られましたのでご紹介します。



Fig. 1 超高速トリプル四重極型質量分析計LCMS-8040

2. 分析

Table 1 分析条件

HPLC (Nexera UHPLC system)	
Mobile Phase A	: 10 mM tri-butyl ammonium and 15 mM acetic acid in water/methanol (97/3)
Mobile Phase B	: methanol
Flow Rate	: 0.3 mL/min
Time Program	: 0%B (0-0.5 min) - 25%B (7.5 min) - 90%B (11-11.5 min) - 0%B (11.6-15min)
Analytical Column	: L-Column ODS II (2 mm I.D. × 150 mmL, 3 μm)
Oven Temp.	: 40°C
Injection Vol.	: 3 μL
MS (LCMS-8040 triple quadrupole mass spectrometer)	
Ionization	: ESI negative mode
DL Temp.	: 250°C
HB Temp	: 400°C
Drying Gas	: 10 L/min
Nebulizing Gas	: 2 L/min

3. 結果

3-1. 標準サンプルの定量分析

イオンペアクロマトグラフィーと高速トリプル四重極型質量分析計を組み合わせることで、糖リン酸、有機酸、補酵素、および核酸を含む96成分の親水性代謝物質を15分以内で分析することができました (Fig. 2)。数種類のODSカラムについて比較検討した結果、糖リン酸の分離が良いL-column ODSを選択しました。この分離方法における定量結果として、検出下限、ダイナミックレンジ、キャリアオーバーおよび安定性をTable 2にまとめました。

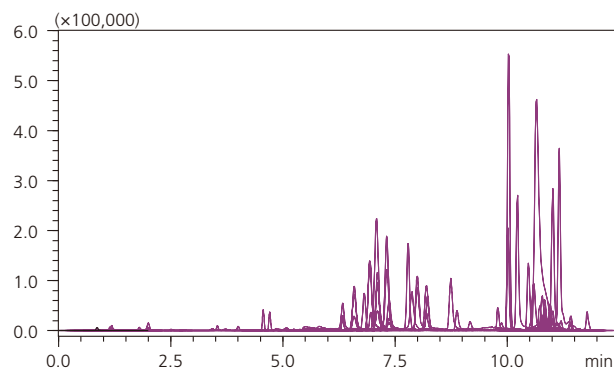


Fig. 2 標準サンプル96成分の代表的なクロマトグラム

Table 2 標準サンプル96成分の定量結果

#	Compound	<i>m/z</i>	R.T.	LOD (nmol/L)	Linearity		RSD % at 1μmol/L (n=4)	
					Linear Range (nmol/L)	R ²	R.T.	Peak area
1	Arginine	173.1>131.2	0.905	2.4	7.8 - 500	0.9924	0.14	8.1
2	Histidine	154>93.15	0.907	7.1	23.6 - 500	0.9979	0.25	3.6
3	4-Aminobutyrate	102>84	1.037	43.4	144.6 - 50000	0.9884	0.63	39.9
4	Serine	104>74.15	1.138	28.6	95.3 - 2000	0.9824	0.15	6.4
5	Asparagine	131>113.15	1.151	18.8	62.6 - 20000	0.9832	0.05	7.1
6	Glutamine	145>127.05	1.16	1.9	6.2 - 10000	0.9842	0.11	5.8
7	Hydroxyproline	130>84.15	1.179	8.6	28.8 - 1000	0.9800	0.21	14.0
8	Homoserine	118>100	1.182	1.4	4.8 - 1000	0.9895	0.17	1.4
9	Threonine	118>74.05	1.186	8.8	29.2 - 2000	0.9846	0.11	5.4
10	Leucine	130.1>84	1.201	16.5	55.1 - 1000	0.9935	0.31	15.4
11	Ribitol	151>89.1	1.243	59.4	198.1 - 5000	0.9868	0.08	5.1
12	Trehalose	341>89	1.302	27.8	92.6 - 20000	0.9897	0.42	17.4
13	Proline	114>68.1	1.331	55.3	184.3 - 5000	0.9957	0.66	31.9
14	Cytidine	242>109.15	1.845	1.3	4.2 - 50000	0.9901	0.03	1.8
15	Methionine	148>47.05	1.987	0.5	1.7 - 5000	0.9938	0.05	4.2
16	Theanine	173>155.25	2.006	3.0	10 - 20000	0.9850	0.09	2.7
17	Guanine	150>133.1	2.499	2.3	7.5 - 5000	0.9879	0.07	7.9
18	Isoleucine	130.1>45	2.578	134.3	447.6 - 50000	0.9902	0.35	32.8
19	Tyrosine	180>163.05	2.834	8.9	29.8 - 200000	0.9980	0.16	8.1
20	Amino adipic acid	160>116.2	3.345	7.2	24 - 100000	0.9880	0.26	5.0
21	Glutamate	146>102.2	3.477	44.6	148.8 - 200000	0.9894	0.18	9.2
22	Uridine	243>110.15	3.548	0.7	2.2 - 10000	0.9911	0.25	3.6
23	Aspartate	132>88.05	3.685	48.2	160.6 - 200000	0.9906	0.31	12.8
24	Thymine	125>42.05	4.003	17.6	58.5 - 50000	0.9888	0.18	4.2
25	Inosine	267>135.15	4.559	1.2	3.9 - 20000	0.9894	0.16	2.4
26	Guanosine	282.1>150.2	4.706	1.0	3.5 - 10000	0.9976	0.15	1.9
27	Phenylalanine	164>103.15	4.854	57.3	190.9 - 20000	0.9880	0.14	5.7
28	Shikimate	173>93.15	4.905	9.5	31.8 - 50000	0.9865	0.07	5.8
29	Glycerate	105>75.15	5.088	44.1	147.2 - 20000	0.9889	0.14	7.4
30	Thymidine	241.1>42.05	5.249	19.1	63.7 - 20000	0.9872	0.10	10.5
31	Glycolate	75>47.05	5.336	457.8	1526.1 - 20000	0.9975	0.12	9.8
32	Glyoxylate	73>45.05	5.577	689.3	2297.5 - 100000	0.9988	1.24	30.1
33	Inositol	179>87	6.34	744.4	2481.4 - 50000	0.9962	0.16	14.7
35	D-glucose/galactose	179>89.05	6.346	19.3	64.2 - 50000	0.9979	0.09	4.3
34	Lactate	89>43.1	6.348	71.6	238.6 - 10000	0.9744	0.09	3.3
36	Pyroglutamate	128>84.1	6.438	45.5	151.8 - 10000	0.9819	0.07	6.8
37	Glucose-6-phosphate	258.9>97.05	6.444	81.1	270.2 - 10000	0.9922	0.06	2.0
38	PIPES	301>193.25	6.637	0.6	2.1 - 10000	0.9958	0.07	1.1
39	Ribose-5-phosphate	229.1>96.95	6.759	21.8	72.7 - 10000	0.9993	0.10	5.0
40	Sedoheptulose-7-phosphate	288.9>97.1	6.867	4.3	14.3 - 10000	0.9875	0.14	2.9
41	Fructose-6-phosphate	258.9>97.1	6.927	88.1	293.7 - 10000	0.9895	0.17	4.2
42	Tryptophan	203.1>116.15	6.978	0.4	1.2 - 10000	0.9852	0.07	3.8
43	α-Glycerophosphate	171.1>79.1	7.074	7.6	25.3 - 10000	0.9912	0.19	3.7
44	Glucose-1-phosphate	258.9>79.05	7.113	149.4	497.9 - 10000	0.9925	0.21	3.2
45	Glyceraldehyde-3-phosphate	168.90>97.10	7.3	463.1	1543.8 - 100000	0.9919	0.54	21.0
46	Erythrose-4-phosphate	198.9>97.2	7.5	357.6	1191.9 - 100000	0.9885	0.75	8.8
47	Ribulose-5-phosphate	229>97.1	7.622	35.5	118.3 - 50000	0.9969	0.15	6.0
48	β-Glycerophosphate	170.9>79.05	7.753	9.6	32 - 20000	0.9868	0.13	1.2
49	Orotate	155>111.15	7.84	8.5	28.3 - 10000	0.9930	0.05	2.0

#	Compound	m/z	R.T.	LOD (nmol/L)	Linearity		RSD % at 1 μmol/L (n=4)	
					Linear Range (nmol/L)	R ²	R.T.	Peak area
50	Fructose-1-phosphate	258.9>97.05	7.925	78.0	260.1 - 10000	0.9968	0.10	3.0
51	CMP	322>79.1	7.964	17.8	59.5 - 10000	0.9925	0.09	3.4
52	NAD	662.1>540.1	8.243	1.5	5 - 10000	0.9844	0.06	2.1
53	Pyruvate	87>43.05	8.275	128.3	427.7 - 20000	0.9871	0.05	9.9
54	Dihydroxy acetone-3-phosphate	168.9>97.05	8.391	5.6	18.7 - 20000	0.9873	0.09	1.1
55	UMP	322.9>97.1	8.661	11.4	37.9 - 20000	0.9917	0.05	5.0
56	GMP	362>79.1	8.995	30.7	102.3 - 50000	0.9909	0.08	9.9
57	Oxalacetate	131>87	9.31	8383.4	27944.7 - 500000	0.9961	0.02	4.6
58	TMP	321>79.1	9.719	9.3	30.9 - 50000	0.9966	0.04	3.2
59	AMP	346>79.05	9.811	30.5	101.6 - 100000	0.9945	0.03	10.5
60	Nicotinate	122>78.15	9.983	5.7	19.1 - 5000	0.9914	0.05	4.0
61	Pantothenate	218>88	10.022	1.0	3.4 - 5000	0.9934	0.04	8.0
62	Succinate	117>73.2	10.155	6.1	20.5 - 10000	0.9881	0.05	4.7
63	Fumarate	115>71.1	10.278	269.3	897.7 - 500000	0.9923	0.05	15.3
64	cAMP	328>134.1	10.465	0.7	2.3 - 50000	0.9900	0.03	3.7
65	Malate	132.9>115.2	10.578	5.9	19.8 - 10000	0.9959	0.04	4.8
66	UDP-glucose	564.8>323.1	10.712	0.6	2 - 5000	0.9919	0.03	5.5
67	2-Oxoglutarate	145>101.2	10.745	24.6	82 - 10000	0.9825	0.04	4.1
68	CDP	401.8>79.05	10.753	28.2	94 - 5000	0.9875	0.04	7.5
69	6-Phosphogluconate	275>79	10.771	8.8	29.2 - 2000	0.9836	0.07	20.4
70	ADP-glucose	588>346.15	10.806	48.2	160.8 - 5000	0.9870	0.06	8.0
71	GDP	442>79.1	10.806	1.0	3.5 - 500	0.9913	0.02	4.7
72	UDP	402.9>79.05	10.807	13.5	44.9 - 1000	0.9820	0.03	5.7
73	ADP-ribose	558>346.15	10.81	1.8	6.1 - 500	0.9969	0.03	7.2
74	NADP	741.8>620.1	10.811	4.8	16.1 - 2000	0.9722	0.03	3.9
75	KDPG	256.9>97.05	10.828	12.1	40.4 - 10000	0.9906	0.04	8.1
76	3-Phosphoglycerate	184.9>97.05	10.829	7.8	26.2 - 20000	0.9802	0.03	6.4
77	Fructose-2,6-bisphosphate	338.9>241.15	10.834	26.8	89.4 - 5000	0.9728	0.03	10.2
78	Fructose-1,6-bisphosphate	338.9>97.1	10.838	13.1	43.8 - 2000	0.9865	0.04	0.5
79	NADH	664>78.95	10.876	3.8	12.7 - 2000	0.9744	0.03	7.6
80	Ribulose-1,5-bisphosphate	308.9>97.05	10.887	15.5	51.6 - 10000	0.9785	0.02	7.7
81	Isocitrate	190.9>117	10.891	4.8	15.8 - 5000	0.9789	0.03	12.9
82	Citrate	190.9>87	10.892	45.4	151.3 - 2000	0.9915	0.09	11.7
83	ADP	425.9>79.1	10.913	23.1	77.1 - 2000	0.9938	0.02	7.2
84	Phosphoenolpyruvate	167>78.95	10.928	6.4	21.4 - 10000	0.9764	0.03	6.4
85	FMN	455>97.1	10.985	20.2	67.4 - 5000	0.9774	0.01	1.9
86	2-Isopropylmalate	175>115.2	10.998	5.3	17.6 - 5000	0.9976	0.02	2.9
87	FAD	783.9>97.1	11.155	3.1	10.4 - 1000	0.9909	0.01	3.3
88	CTP	481.9>159.1	11.171	44.1	147 - 50000	0.9840	0.10	14.3
89	GTP	521.9>159.05	11.185	76.2	254.1 - 50000	0.9963	0.15	11.0
90	NADPH	744>159	11.201	4.5	15 - 2000	0.9960	0.02	5.2
91	UTP	482.9>159.1	11.206	52.6	175.4 - 100000	0.9914	0.03	6.7
92	ATP	505.9>159.1	11.226	35.8	119.5 - 50000	0.9851	0.24	12.1
93	Coenzyme A	766.5>79	11.343	17.1	56.9 - 20000	0.9863	0.02	11.3
94	Malonyl coenzyme A	852.1>408.1	11.367	0.6	2.1 - 10000	0.9923	0.01	7.0
95	Acetyl coenzyme A	808>408	11.382	1.6	5.5 - 10000	0.9894	0.02	7.2
96	Succinyl coenzyme A	866>408	11.391	0.3	1.1 - 10000	0.9832	0.02	9.5

3-2. 酵母抽出液の分析

本法の生体試料への有用性を検証するために、酵母抽出液を実験モデルとして分析しました。75種類の化合物を0.4 – 100,000 nMの濃度範囲(濃度は各化合物による)で検出することができました(Fig. 3)。また試料濃度が定量結果に与える影響を確認するために、試料溶液を順番に希釈して検証しました(Fig. 4)。定量結果は希釈に伴って減少しており、酵母抽出液における定量性が保たれていることが確認できました。

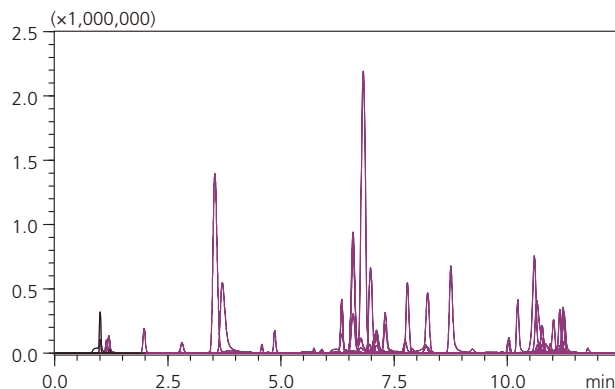


Fig. 3 酵母抽出液の代表的なクロマトグラム

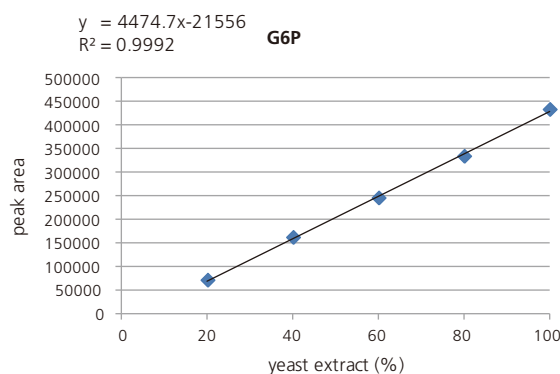


Fig. 4 サンプル希釈率-ピーク面積間の直線性

4. 結論

- ・親水性代謝物の迅速な定量分析メソッドを開発し、15分で96成分を分析することができました。
- ・酵母抽出液の分析結果から、本法が生体試料の研究に適用できることが示唆されました。

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。

初版発行：2012年8月
© Shimadzu Corporation, 2012