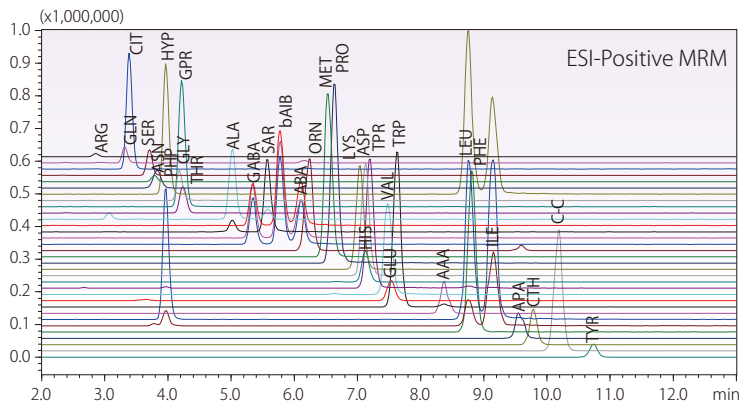


2-2. コンベンショナルLC/MS/MSによる分析

誘導体化したアミノ酸33成分をEZ:faast前処理キットに付属している標準的な逆相分析条件を使用して一斉分析した結果をFig. 3に示します。MS/MSの高選択性により、多くのアミノ酸について成分

ごとに選択的な検出が可能でした。この条件での分析時間は約20分であり、前処理誘導体化に要する約7分と合計しても30分以内で分析が可能となります。

分析条件
 Column : Phenomenex EZ:faast AAA-MS 2 × 250 mm, 4 μm
 Mobile Phase : 10 mmol/L Ammonium Formate - Water/Methanol
 Gradient Prog. : B conc. 68% (0 min)->83% (13 min)->68% (13-20 min)
 Flow Rate : 0.25 mL/min
 Column Temp.: 35°C
 Injection Vol. : 2 μL



分析時間約20 min
 (+前処理7 min)
 ⇒計27 min

UHPLC/MS/MS
 によりさらに分析
 時間を短縮

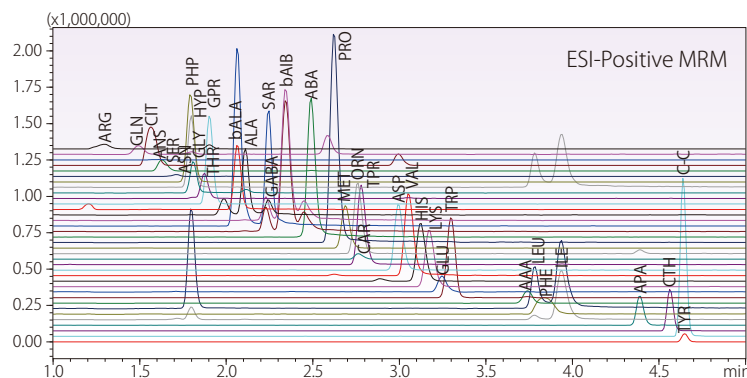
Fig. 3 コンベンショナルLC/MS/MSによるアミノ酸33成分の一斉分析

2-3. UHPLC/MS/MSによる超高速分析

分析システムに島津製作所製UHPLC NexeraおよびUHPLC対応のトリプル四重極型質量分析計LCMS-8030を、分離カラムに粒子径1.7 μmサイズのコアシェル型カラムKinetex C18 (Phenomenex) を用いて分析時間の更なる短縮を図りました。その結果、7分でアミ

ノ酸36成分の分析が可能でした。前処理と併せても要する時間は14分であり、イオン交換-ポストカラム法の約1/10に短縮することができました。

分析条件
 Column : Phenomenex Kinetex C18 2.1 × 150 mm, 1.7 μm
 Mobile Phase : 5 mmol/L Ammonium Formate - Water/Methanol
 Gradient Prog. : B conc. 50% (0 min)->65% (1-3 min)->90% (4-4.5 min)->50% (4.51-7 min)
 Flow Rate : 0.4 mL/min
 Column Temp.: 50°C
 Injection Vol. : 2 μL



分析時間7 min
 (+前処理7 min)
 ⇒計14 min

イオン交換-ポストカラム
 誘導体化HPLC法の
 約1/10

Fig. 4 UHPLC/MS/MSによるアミノ酸36成分の超高速一斉分析

3. 検量線範囲・直線性・再現性

超高速分析条件でのアミノ酸36成分の検量線範囲、直線性および面積値再現性をTable 1に示します。定量下限は誘導体化前のサンプル中の濃度として概ね2~100 pmol/mL程度でした。最小検量

点濃度における面積値再現性についても概ね10%以下とMS分析として良好な結果が得られました。

Table 1 アミノ酸36成分の検量線範囲、直線性および面積値再現性

	MRM transition	検量線範囲 pmol/mL	相関係数 R	CV %
Arg	303.2>70.1	20 - 80000	0.9934	4.5
Gln	275.2>171.9	50 - 80000	0.9953	3.7
Ans	369.2>309.2	200 - 80000	0.9892	7.7
Cit	304.2>156.1	50 - 80000	0.9907	1.2
Ser	234.1>146.0	50 - 10000	0.9938	3.8
Asn	243.1>115.1	50 - 10000	0.9926	4.1
Pro-Hyp	357.2>156.0	5 - 40000	0.9991	1.9
Hyp	260.1>172.0	10 - 4000	0.9959	1.0
Gly	204.1>118.0	500 - 10000	0.9991	1.7
Thr	248.1>159.9	50 - 10000	0.9964	7.5
Gly-Pro	301.2>157.9	2 - 10000	0.9980	10.1
βAla	218.1>98.0	5 - 10000	0.9948	7.1
Ala	218.1>130.0	100 - 80000	0.9941	2.1
GABA	232.2>130.0	100 - 10000	0.9780	1.2
Sar	218.1>115.9	100 - 80000	0.9932	1.8
βAIBA	232.2>129.9	2 - 10000	0.9976	6.9
ABA	232.2>143.9	2 - 10000	0.9963	8.3
Pro	244.2>156.0	50 - 10000	0.9993	1.8

	MRM transition	検量線範囲 pmol/mL	相関係数 R	CV %
Met	278.1>190.0	2 - 4000	0.9934	11.4
Orn	347.2>287.0	50 - 80000	0.9925	4.2
Car	441.2>284.0	20 - 10000	0.9909	9.5
Tpr	262.1>173.9	5 - 10000	0.9997	3.7
Asp	304.2>216.0	50 - 80000	0.9954	4.1
Val	246.2>157.9	50 - 80000	0.9930	3.8
His	370.2>196.0	50 - 80000	0.9971	5.2
Lys	361.2>301.0	50 - 80000	0.9911	1.8
Glu	318.2>171.9	50 - 80000	0.9886	2.4
Trp	333.2>245.0	2 - 10000	0.9968	7.9
AAA	332.2>244.0	20 - 10000	0.9949	2.9
Leu	260.2>172.0	10 - 80000	0.9947	2.3
Phe	294.2>205.9	5 - 80000	0.9918	5.3
Ile	260.2>129.9	50 - 80000	0.9946	0.9
APA	346.2>198.0	10 - 80000	0.9941	1.9
Cth	479.2>230.0	2 - 80000	0.9963	4.6
C-C	497.2>248.0	2 - 10000	0.9984	4.0
Tyr	396.2>308.0	50 - 10000	0.9971	2.1

サンプル処理量:100 μL、CVは最小検量点濃度における値、n=3

4. 実試料の分析

プレカラム誘導体化-UHPLC/MS/MS法を用いて培養細胞抽出物の分析に適用し、その妥当性について検討しました。分析試料にはヒト大腸がん細胞およびヒト正常繊維芽細胞の2種類を用いました。培養細胞はFig. 5に示した手順に従って処理されたものを、Fig. 2のEZ:faast前処理キットを用いて誘導体化しました。

ヒト大腸がん細胞の抽出物の分析結果をFig. 6に示します。今回分析対象とした各アミノ酸について夾雑成分による顕著な妨害は確認されませんでした。本分析法では多くのアミノ酸について選択的な検出が可能となります。この分析例では、高濃度で共存するGlycineの近傍に溶出する微量のProlylhydroxyprolineのように、目的としていたジペプチドなどの相対的に微量なアミノ酸を選択的かつ高感度に検出することができました。ヒト正常繊維芽細胞でも同様に顕著な妨害は確認されず、微量アミノ酸を選択的に検出することができました。分析結果の詳細をTable 2に示します。

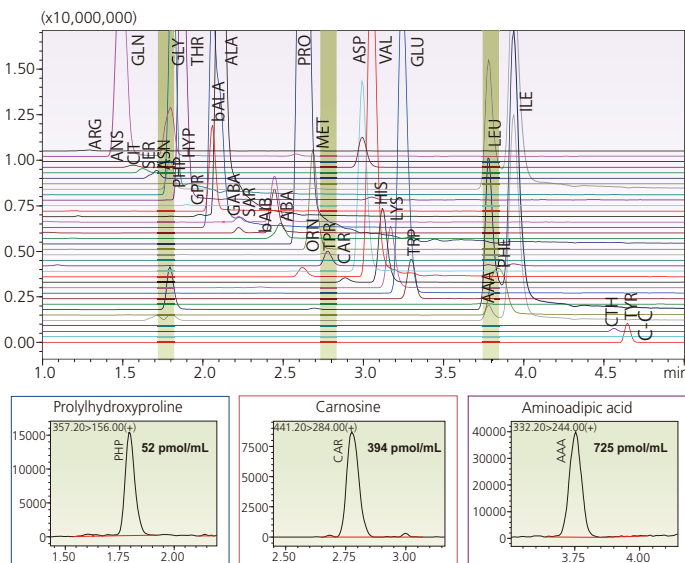


Fig. 6 ヒト大腸がん細胞抽出物のMRMクロマトグラム

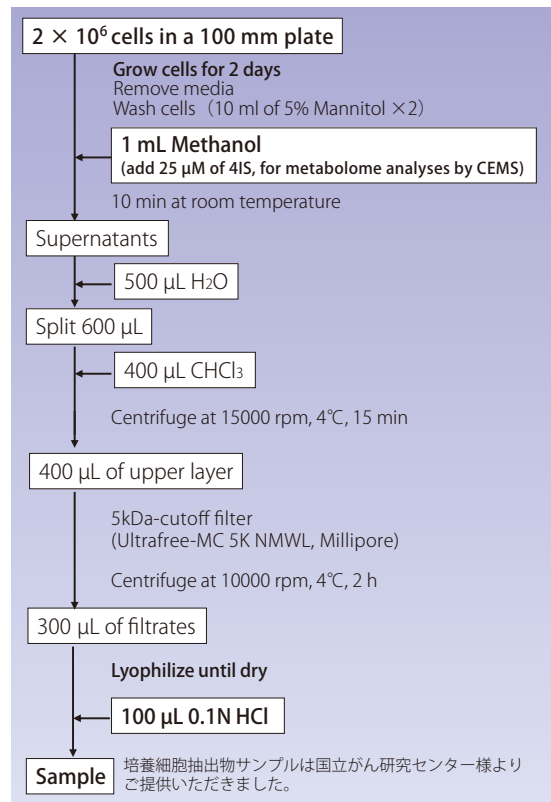


Fig. 5 培養細胞の前処理フロー (試料:ヒト大腸がん細胞、ヒト正常繊維芽細胞)

Table 2 各培養細胞の分析結果

試料濃度(pmol/mL)			試料濃度(pmol/mL)		
ヒト大腸がん細胞		ヒト繊維芽細胞	ヒト大腸がん細胞		ヒト繊維芽細胞
Arg	6120	2710	Met	45300	4510
Gln	915000*	84800	Orn	308	503
Ans	Tr	ND	Car	394	29
Cit	861	Tr	Tpr	2980	243
Ser	6390	13200	Asp	47900	24700
Asn	66600*	2540	Val	67700	11500
Pro-Hyp	52	66	His	23300	3380
Hyp	9500*	750	Lys	16600	5240
Gly	290000*	47800*	Glu	308000*	173000*
Thr	312000*	19100*	Trp	8790	1790
Gly-Pro	177	20	AAA	725	496
βAla	17200*	1750	Leu	57900	10400
Ala	297000*	89500*	Phe	40716	6417
GABA	3430	297	Ile	65600	10900
Sar	Tr	Tr	APA	ND	ND
βAlBA	35	Tr	Cth	1240	1840
ABA	2010	170	C-C	4.2	ND
Pro	134000*	12800*	Tyr	39500*	8190

ND:非検出、Tr:痕跡量

*検量線上限より高濃度であったため、希釈して再測定

各試料から検出された微量アミノ酸8成分について添加回収試験を行いました。その結果、いずれの試料についても回収率は80～120%となり、試料中の共存成分による顕著なエンハンスメントやサプレッションは確認されませんでした (Fig. 7)。

この結果より、本分析法は生体試料中の相対的に微量なアミノ酸の高速・高選択的分析手法として有効であることが示唆されます。

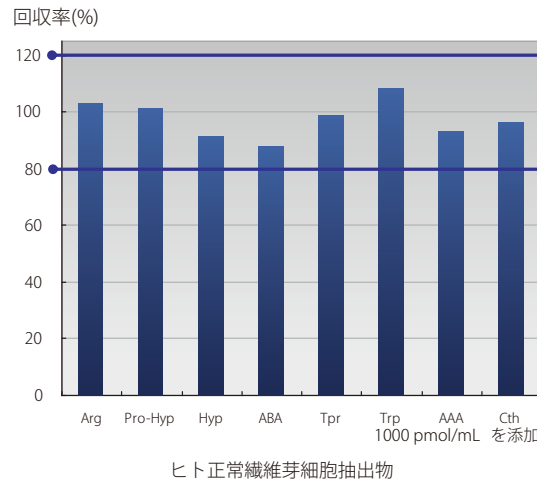
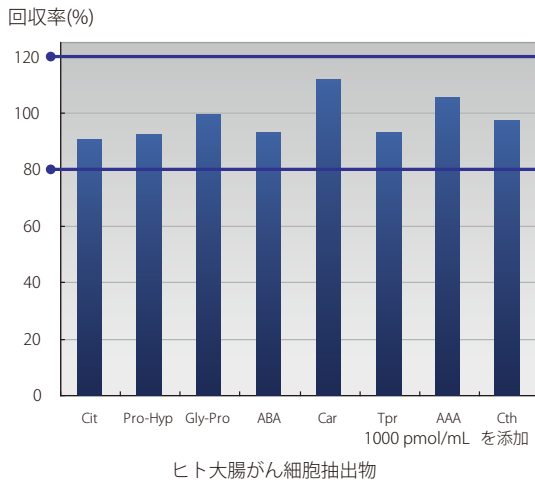


Fig. 7 各試料中の微量アミノ酸に対する添加回収試験結果

5. 結論

- 培養細胞抽出物中の微量アミノ酸の分析手法として、プレカラム誘導体化-UHPLC/MS/MSによる高速かつ高選択的な分析手法について検討しました。
- 前処理7分・分析7分でアミノ酸36成分を一斉分析することが可能でした。この分析条件におけるLOQは概ね2～100 pmol/mLでした。
- 2種の培養細胞抽出物において、夾雑成分や共存する高濃度の主要アミノ酸による影響を受けることなく、ジペプチドなどの微量アミノ酸関連物質を選択的かつ高感度に検出することができました。

謝辞

本検討にあたり、培養細胞抽出物サンプルをご提供いただきました国立がん研究センター研究所 がん分化制御解析分野 岡本康司先生に感謝の意を表します。

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12月
© Shimadzu Corporation, 2012