

# LC-MS による代謝物ニコチアナミン定量測定の工夫

森 友子（基礎生物学研究所 技術課）

MORI Tomoko : Devices for determination of metabolite nicotianamine by LC-MS

## 1. 目的

LC-MS による生体内の代謝物の定量に際しては、その成分それぞれの物性（疎水性や親水性、あるいは極性）に応じた測定条件の設定が重要である。

担当している代謝物等の低分子化合物の同定、定量において、これまでに測定経験の無い分子ニコチアナミン定量の相談を受けた事をきっかけに、初めて測定に取り組むニコチアナミンの測定について条件検討したことについて報告する。

## 2. 方法

液体クロマトグラフ（LC : Waters 製 UPLC）では、液体中の成分を固定相と移動相の相互作用の差を用いて分離し、直列に接続した質量分析装置（MS : SCIEX 製 Triple TOF 5600）では定量対象の分子のイオンを選択的に装置内に導入し、ガス衝突誘起開裂（CID）により生じるフラグメントイオンを検出する方法：MRM(multiple reaction monitoring)法により定量を行なった。

## 3. 結果

### (1) ガス衝突誘起開裂エネルギー（CE）の最適化

ニコチアナミンのプリカーサーイオン  $m/z$  304.3 を CE により開裂させ、生じたフラグメントイオンの中で  $m/z$  189.09 をレポーターイオンとし、この強度が最大となるよう CE 値を最適化した（図 1）。

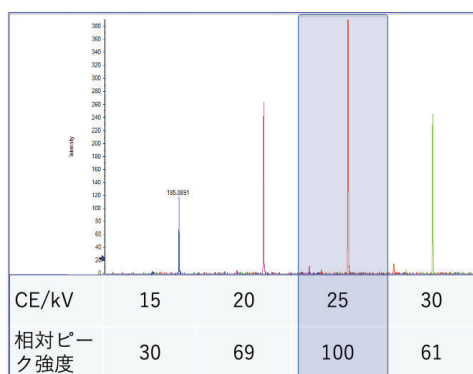


図 1. フラグメントイオン ( $m/z$  189.09) の CE 値の最適化

### (2) LC-MS 測定

最適化した CE 値を適用し、当室でよく用いている測定条件（移動相 A:0.1%ギ酸/H<sub>2</sub>O、移動相 B:0.1%ギ酸/CH<sub>3</sub>CN、カラム:フッ素化シリカ PFP (Discovery HS F5-3 15cm × 2.1mm, 3 $\mu$ m))により LC-MS 測定を行った。標品のニコチアナミンは良好なピーク形状が得られたが、生体由来サンプルではピーク割れが発生した（図 2）。

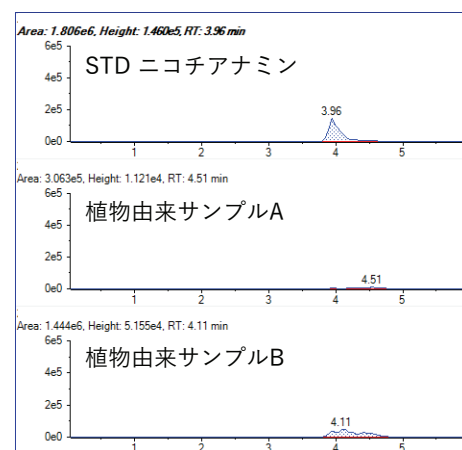


図 2. 標品(100pmol)および植物由来サンプル A,B の MRM ( $m/z$  304.3 →  $m/z$  189.09)抽出クロマトグラム

### (3) 移動相を変更

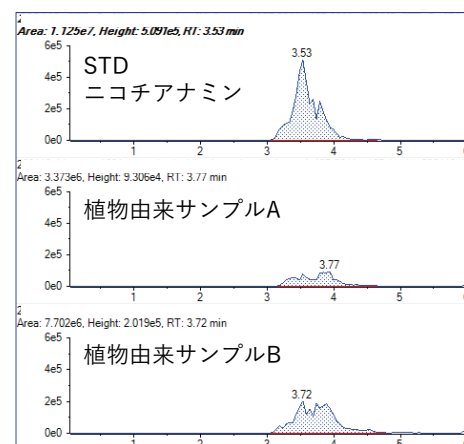


図 3. 移動相を変更した図 2 と同じサンプルの抽出クロマトグラム

文献を参考にして、移動相を A:0.01%酢酸、移動相 B:150mM 酢酸アンモニウム/CH<sub>3</sub>CN=30/70 に変更した。植物由来サンプルだけでなく、標品もピーク割れが生じた。その一方でピーク強度は向上した (図 3)。

#### (4) カラムを変更

立体構造の認識性能に優れているとされている PFP カラムから逆相 C18 カラム (Intact Scherzo SW-C18 MF 100mm × 2mm, 3μm) に変更した。その結果、標品のピーク形状は改善されたが、植物由来サンプルのピークは割れがさらに顕著となった (図 4)。

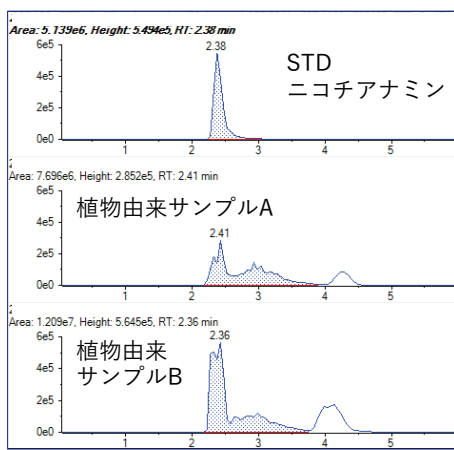


図 4. 移動相とカラムを変更した図 2 と同じサンプルの抽出クロマトグラム

#### (5) 植物由来サンプルに EDTA を添加

ニコチアナミンは金属キレート分子であることから植物由来サンプルに含まれる多種類の金属イオンをキレ

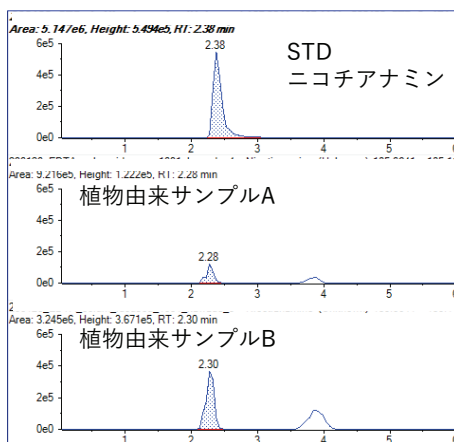


図 5. 移動相とカラムを変更した図 2 と同じサンプルの抽出クロマトグラム

ートしている可能性を考えて、サンプルに EDTA の添加を試みた結果、ピーク形状が改善された (図 5)。EDTA の添加量は 25mM。

#### (6) 検量線

設定した測定条件にて、ニコチアナミン標品を測定した結果、100fmol から 100pmol の間で良好な定量性があることを確認した (図 6)。

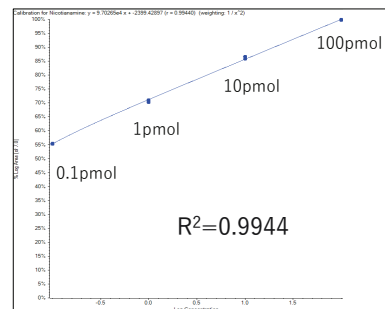


図 6. ニコチアナミン標品の検量線

#### 4. まとめ

LC-MS によるニコチアナミンの定量方法について、質量分析の測定条件では標品を用いてフラグメントイオンの選定と CE 値の最適化を行った。

液体クロマトグラフについては 移動相とカラムを変更し、更に、サンプルに EDTA を添加したことでニコチアナミンのピーク形状の改善と感度の向上が実現した。下記は決定した条件である。

- 液体クロマトグラフ : UPLC (Waters)

移動相 A : 0.01%酢酸/H<sub>2</sub>O

移動相 B : 150mM 酢酸アンモニウム/CH<sub>3</sub>CN=30/70

流速 : 100μl/min

グラジエント : 0min 0%B → 2min 0%B → 5min 25%B → 11min 35%B → 15min 95%B

カラム : 逆相 C18 Intact Scherzo SW-C18 MF 100mm × 2mm, 3μm

- 質量分析装置 : Triple TOF 5600 (SCIEX)の設定値

CUR : 25、GS1 : 20、GS2 : 15、ISVF : 5500、TEM : 550

- ニコチアナミンのトランジション

CE : 25、プリカーサーイオン : m/z 304.3、フラグメントイオン : m/z 189.09

#### 参考文献

1) 日本醸造協会誌「LC-MS/MS を用いた醤油および植物性食品中のニコチアナミンの定量分析」2013 年 108 巻 10 号 p. 716-723

<https://doi.org/10.6013/jbrewsocjapan.108.716>