

ACQUITY Premier システムソリューションを用いた、ヒト血漿中の TCA 回路を構成する化合物の定量における分析感度とクロマトグラフィーピーク形状の改善

Kerri M. Smith, Paul D. Rainville

Waters Corporation

研究目的のみに使用してください。診断用には使用できません。

要約

ヒト血漿中の TCA 回路および関連する代謝物は低分子量で極性が高く、さらに同重体が多く、ヒト血漿中の濃度が幅広い上に、金属に吸着しやすいため、分析が困難です。その保持および選択性の課題に対応するため、この分析法では、単純な逆相のような移動相を使用するミックスモード陰イオン交換クロマトグラフィーを適用しています。タンデム四重極型質量分析法は高感度の検出を提供し、MaxPeak High Performance Surfaces によって、UPLC およびカラムに存在する金属表面との相互作用が軽減します。結果として、血漿中の有機酸代謝物の定量に適した、シンプルで感度の高い分析法が得られます。

アプリケーションのメリット

- ヒト血漿中の TCA 回路およびその他の代謝物の定量のための、複雑な移動相を必要としない、迅速でシンプルな分析法
- ACQUITY Premier システムソリューションの MaxPeak High Performance Surfaces テクノロジーを用いて、金属

-分析種間相互作用を排除することで、分析感度とピーク形状を改善

はじめに

トリカルボン酸回路（TCA 回路）とは、炭水化物、脂肪、タンパク質の分解により生じる基質の、一連の酵素を介した化学反応を指します¹。TCA 回路は、細胞の同化過程および異化過程の両方で使用される、厳密に制御された経路です¹。さらに、反応によって生じる代謝物は、ミトコンドリアを介した細胞のシグナル伝達を促進することがわかっています²。TCA 回路からの代謝物の最終産物は、細胞の恒常性において中心的な役割を果たします。また、その構成および産物のモニタリングにより、様々な疾病についての情報が得られます。

TCA 回路に含まれる化合物などの化合物測定には問題がつかまとう場合があります。低分子量であること、マトリック ス抽出物の複雑さ、および安定性の問題とは別に、カルボン酸基やリン酸基などの電子豊富な分子が含まれている化合物と金属との相互作用が、既知の複雑化の原因となって、分析感度の低下やピーク形状の悪化につながります³⁻⁶。このような二次相互作用に伴う測定の不確かさは、分析に悪影響を及ぼします。その軽減策として、移動相やサンプル希釈液へのキレート剤の添加が挙げられますが、このような移動相添加剤は、イオン化抑制やクロマトグラフィーの変化の原因となりかねず、問題が 1 つ解決できても、別の問題が生じる可能性があります⁷⁻¹⁰。この金属との相互作用に対応するため、ウォーターズは MaxPeak High Performance Surfaces (HPS) テクノロジーを開発しました¹¹。LC コンポーネントやカラムハードウェアでこのテクノロジーを採用することで、分析種の金属表面との相互作用を軽減し、移動相添加剤を加える必要をなくすることができます。

実験方法

原液の調製

分析種の原液は、50 mM 遊離酸の水溶液を個別に調製しました。次に、これらを合わせて 2.5 mM 水溶液にし、作業用原液としました。安定同位体標識内部標準試料（Cambridge Isotope Laboratories）は、1 mM 遊離酸の溶液を 50% ACN/50% H₂O 中にそれぞれ調製しました。次に、cis-アコニット酸-C13、2-ヒドロキシグルタル酸-C13、フマル酸-C13、リンゴ酸-C13、コハク酸-C13 の 38 μM 作業用内部標準試料混合液と、120 μM クエン酸-C13 水溶液を調製しました。

血漿の抽出

個別の健常女性ドナーの血漿サンプル4つと、乳がん陽性のサンプルを、BioIVT（ニューヨーク、Westbury）から購入しました。氷上で解凍した後、血漿サンプル各 25 μL を新しい 1.5 mL 微量遠心チューブに入れた後、5 μL の作業用内部標準試料混合液を添加しました。冷メタノール 75 μL を加え、サンプルを 1 分間ボルテックス混合しました。サンプルを、21,130 rcf で、4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分間遠心分離しました。次に、上清 75 μL を新しい微量遠心チューブに移し、遠心エバポレーター中で加熱なしで 1.5 時間真空にして乾固しました。サンプルを直ちに 75 μL の H_2O に再溶解し、20 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間放置しました。次に、再溶解したサンプルを上記と同様に遠心分離し、シラン処理済みバイアルにサンプルを移しました。血漿サンプルは 3 回繰り返し注入しました。

検量線の作成

作業用原液を H_2O 中に連続希釈することにより、ストック標準溶液（2.5 mM、1.25 mM、500 μM 、250 μM 、125 μM 、50 μM 、25 μM 、12.5 μM 、5 μM 、2.5 μM 、1.25 μM 、0.50 μM ）の検量線を作成しました。各標準試料 5 μL および内部標準混合液 5 μL を、15 μL の水が入っているシラン処理済みバイアル中に添加しました。これがキャリブレーション溶液（血漿の当初の容量である 25 μL 中にそれぞれ 500、250、100、50、25、10、5、2.5、1、0.5、0.25、0.1 μM ）となります。次に 50 μL の水を加えて、最終容量を 75 μL にし、血漿サンプルのサンプル前処理および希釈手順と一致させます。そのため、質量分析計で測定した検量線の実際の濃度は 167、83.3、33.3、16.7、8.33、3.33、1.67、0.833、0.333、0.167、0.083、0.033 μM となりました。キャリブレーション標準試料は 2 回繰り返し注入しました。

移動相の調製

分析法の再現性を保証するため、3 日に 1 度、メスフラスコと、アンプルから正確に測り取ったギ酸を用いて移動相を調製しました。

LC 条件

LC システム:	ACQUITY Premier
バイアル:	Waters トータルリカバリーバイアル、不活性型（製品番号 186000385DV）
カラム:	ACQUITY Premier CSH Phenyl-Hexyl 2.1 \times 100 mm、1.7 μm （製品番号 186009475）
カラム温度:	50 $^{\circ}\text{C}$

サンプル温度: 5 °C

注入量: 3 µL

移動相 A: 0.1% ギ酸水溶液

移動相 B: 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエント

時間	流速	%A	%B	曲線
初期条件	0.5	100	0	
0.50	0.5	100	0	6
3.50	0.5	75	25	6
3.60	0.5	0	100	6
5.00	0.5	0	100	6
5.10	0.5	100	0	6

MS 条件

MS システム: Xevo TQ-S micro

イオン化モード: ESI-

キャピラリー電圧: 0.5 kV

脱溶媒温度: 500 °C

脱溶媒ガス： 1000 L/時間

コーンガス： 50 L/時間

イオン源温度： 150 °C

化合物	プリカーサーイオン (m/z)	フラグメントイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
乳酸	89	43	20	12
リンゴ酸	133	115	25	11
2-ヒドロキシグルタル酸	147	129	15	15
コハク酸	117	73	20	10
イソクエン酸	191	111	20	13
クエン酸	191	111	20	13
フマル酸	115	71	25	7
ピルビン酸	87	43	20	8
3-ホスホグリセリン酸	185	97	20	15
α -ケトグルタル酸	145	101	10	8
ホスホエノールピルビン酸	167	79	20	16
cis-アコニット酸	173	129	20	10
リンゴ酸-C13	137	119	25	11
2-ヒドロキシグルタル酸-C13	152	134	15	15
フマル酸-C13	119	74	25	7
コハク酸-C13	121	76	20	10
クエン酸-C13	194	113	20	13
cis-アコニット酸-C13	179	134	20	10

表 1. MRM トランジションのサマリー

データ管理

MS ソフトウェア： MassLynx v4.2

結果および考察

様々な LC-MS 分析法および GC-MS 分析法を用いて、TCA および関連する成分の測定が行えました。以前に、標準的な CSH Phenyl Hexyl カラムと LC システムでのミックスモード陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて、ヒト尿中の TCA 成分の分離用の LC-MS アッセイを開発しました¹²。ここでは、ACQUITY Premier システムと ACQUITY Premier CSH Phenyl-Hexyl カラムを取り入れて、その分析法を拡張しています。ACQUITY Premier システムと ACQUITY Premier カラムの両方に MaxPeak HPS テクノロジーが採用されており、金属-分析種間相互作用が軽減されます。

カルボン酸やリン酸などの電子が豊富な分子が含まれている化合物は、金属キレートを生成する場合があります、これによって金属表面との望ましくない相互作用が生じて、最終的な結果として検出器で測定される分析種の量が低減する可能性をもたらします。このアプリケーションでの MaxPeak Premier テクノロジーのメリットとして、金属に吸着しやすい化合物におけるピーク面積の増加とピーク形状の改善が挙げられます。図 1 は、抽出した血漿サンプルからのイソクエン酸、クエン酸、3-ホスホグリセリン酸のクロマトグラムを示しており、ACQUITY Premier システムと ACQUITY Premier カラムでの分析と、標準の UPLC および標準カラムでの分析を比較しています。イソクエン酸、クエン酸、3-ホスホグリセリン酸のいずれにおいても、ピーク面積の増加が極めて明らかです。また、リンゴ酸ではピーク形状が改善しています。イソクエン酸およびクエン酸のピーク面積はそれぞれ 41 倍および 5 倍増加しており、3-ホスホグリセリン酸の増加が一番大きく、100 倍を超えていました。リンゴ酸のピークテーリングは 10% 高さで 58% 減少していました。MaxPeak Premier テクノロジーがシステムおよびカラムの準備状態に与える影響を判定するため、それぞれのシステムで新しいカラムを用い、抽出した血漿を注入しました。クエン酸を例に取った場合、血漿のピーク面積は、初回の注入では 2 桁を超えて大きく（図 2）、ACQUITY Premier UPLC およびカラムによって優れた分析感度が得られ、分析前のサンプルマトリックスによる平衡化があまり必要ないことが実証されました。

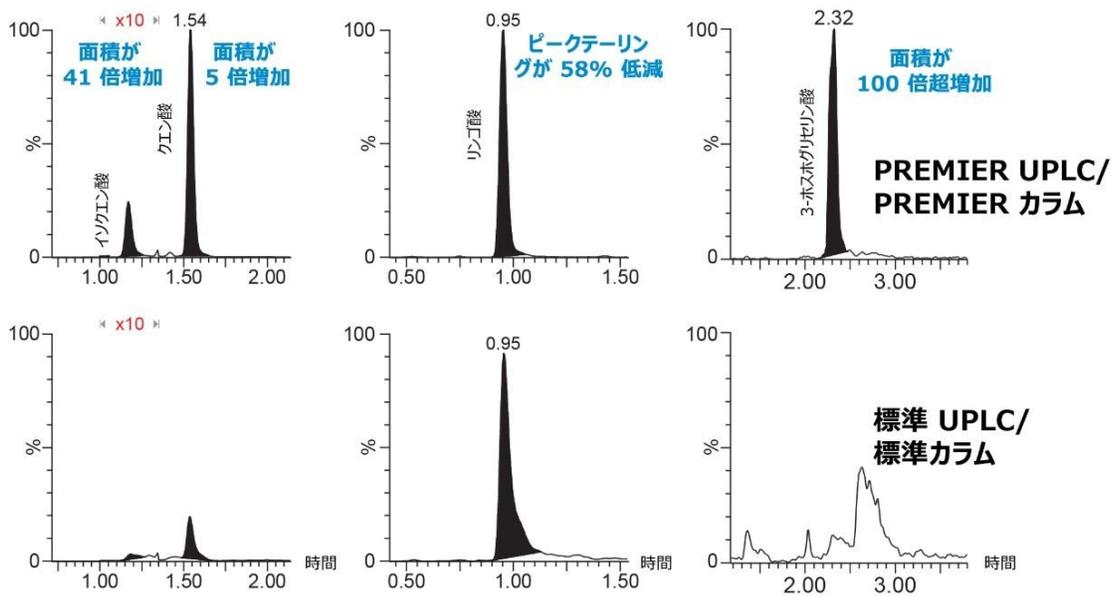


図 1. ACQUITY Premier システムおよび ACQUITY Premier カラム（上）と、標準の LC および標準カラム（下）を用いた、血漿から抽出した代謝物の分離。これらの結果では、イソクエン酸、クエン酸、3-ホスホグリセリン酸でピーク面積が増加していることが示されました。更に、リンゴ酸のピークテーリングが減少していました。

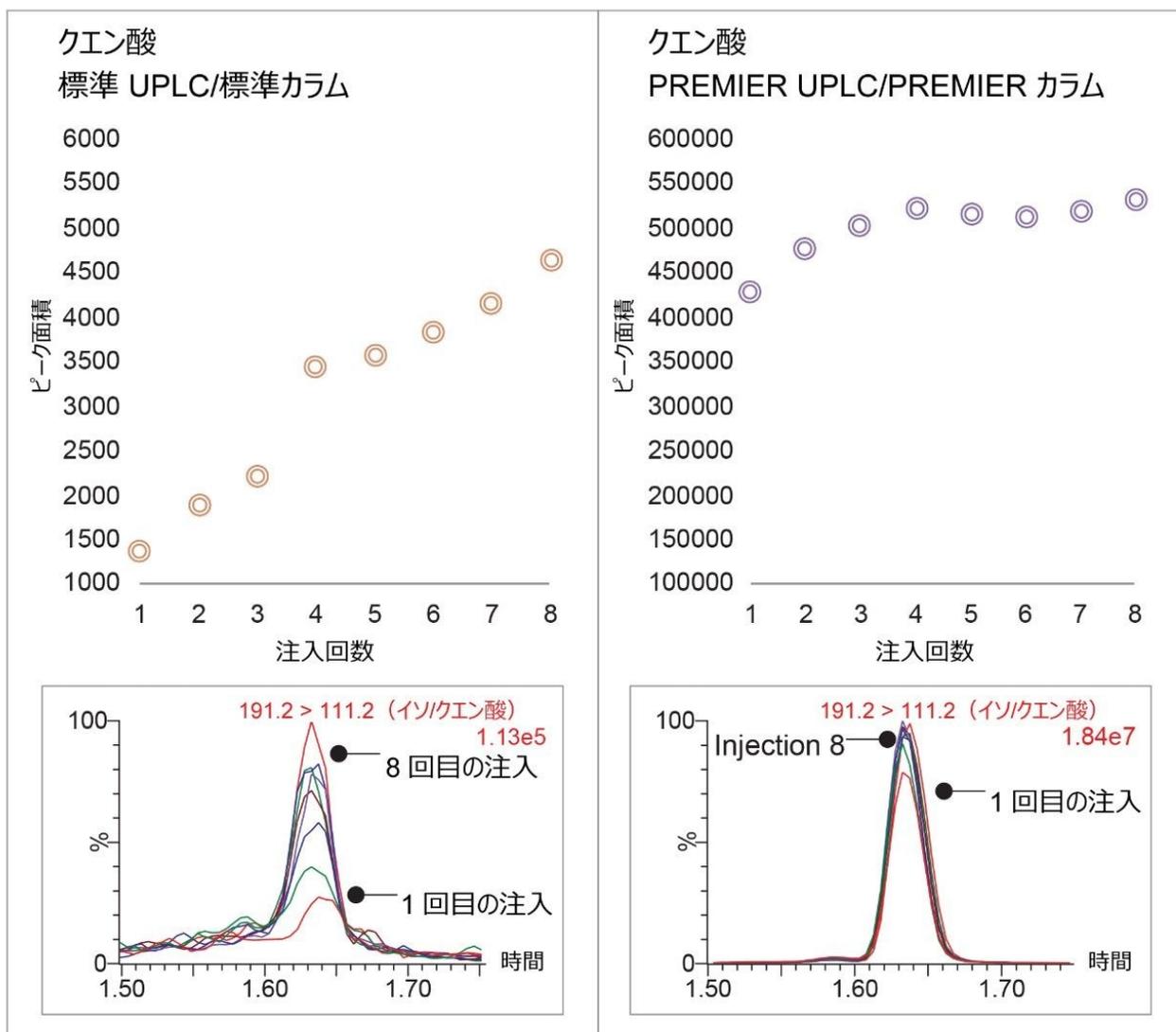


図2. 新品のカラムへの抽出した血漿クエン酸の1～8回目の注入

可能な限り、同位体標識した内部標準試料と、1/x 重み付けした線形回帰を用いて、化合物の水溶液の検量線を作成しました。キャリブレーションの結果を表2にまとめています。溶媒標準試料からの内部標準面積比を使用して、血漿から抽出した化合物の濃度を逆算しました（表3、図3）。クエン酸のTargetLynxによる定量の例を図4に示します。4つの健常対照と乳がん陽性の抽出血漿サンプルのそれぞれからの化合物の重ね描きでは、保持時間のアライメントが良好な濃度範囲を示しています（図5）。

化合物	内部標準	保持時間 (分)	直線性範囲		
			最小 (μM) LLOQ	最大 (μM)	R ² (線形回帰)
リンゴ酸	リンゴ酸-C13	0.93	0.033	167	0.9991
2-ヒドロキシグルタル酸	2-HG-C13	1.02	0.083	83.3	0.9969
コハク酸	コハク酸-C13	1.04	0.083	83.3	0.9995
イソクエン酸	クエン酸-C13	1.15	0.083	83.3	0.9943
クエン酸	クエン酸-C13	1.52	0.033	167	0.9986
フマル酸	フマル酸-C13	1.74	0.083	167	0.9989
ピルビン酸	フマル酸-C13	2.04	1.67	83.3	0.9949
3-ホスホグリセリン酸	フマル酸-C13	2.34	0.083	8.33	0.9975
α -ケトグルタル酸	フマル酸-C13	2.36	0.333	33.3	0.9981
ホスホエノールピルビン酸	アコニット酸-C13	2.67	0.033	16.7	0.9966
cis-アコニット酸	アコニット酸-C13	3.08	0.167	83.3	0.9973

表 2. 分析法とサンプル濃度のサマリー

サンプル中の平均濃度 n = 3 (μM)								
化合物	健常対照 サンプル 1	健常対照 サンプル 2	健常対照 サンプル 3	健常対照 サンプル 4	乳がん サンプル 1	乳がん サンプル 2	乳がん サンプル 3	乳がん サンプル 4
リンゴ酸	12.2	10.9	3.93	3.67	5.43	28.3	30.7	13.6
2-ヒドロキシグルタル酸	1.97	4.07	0.9	0.4	2.83	7.27	4.27	2.67
コハク酸	14.9	27.1	3.23	3.2	6.43	54.6	29.5	41.1
イソクエン酸	3.3	2.77	1.67	1.13	2.5	3.87	4.23	4.6
クエン酸	67.7	67.5	54.9	45.4	91.7	74.5	86.6	102.3
フマル酸	2.03	1.57	0.400	n/d	n/d	5.77	5.37	3.10
ピルビン酸	254	249	138	115	63.0	n/d	7.55	6.90
3-ホスホグリセリン酸	2.15	4.64	0.584	0.900	2.63	>25	19.2	13.0
α -ケトグルタル酸	33	90.9	14.5	4.73	78.9	n/d	n/d	n/d
ホスホエノールピルビン酸	BLOQ	0.517	n/d	n/d	n/d	0.386	0.15	n/d
cis-アコニット酸	2.07	2.03	1.27	0.9	1.93	3.17	3.53	3.93

表 3. 分析法とサンプル濃度のサマリー

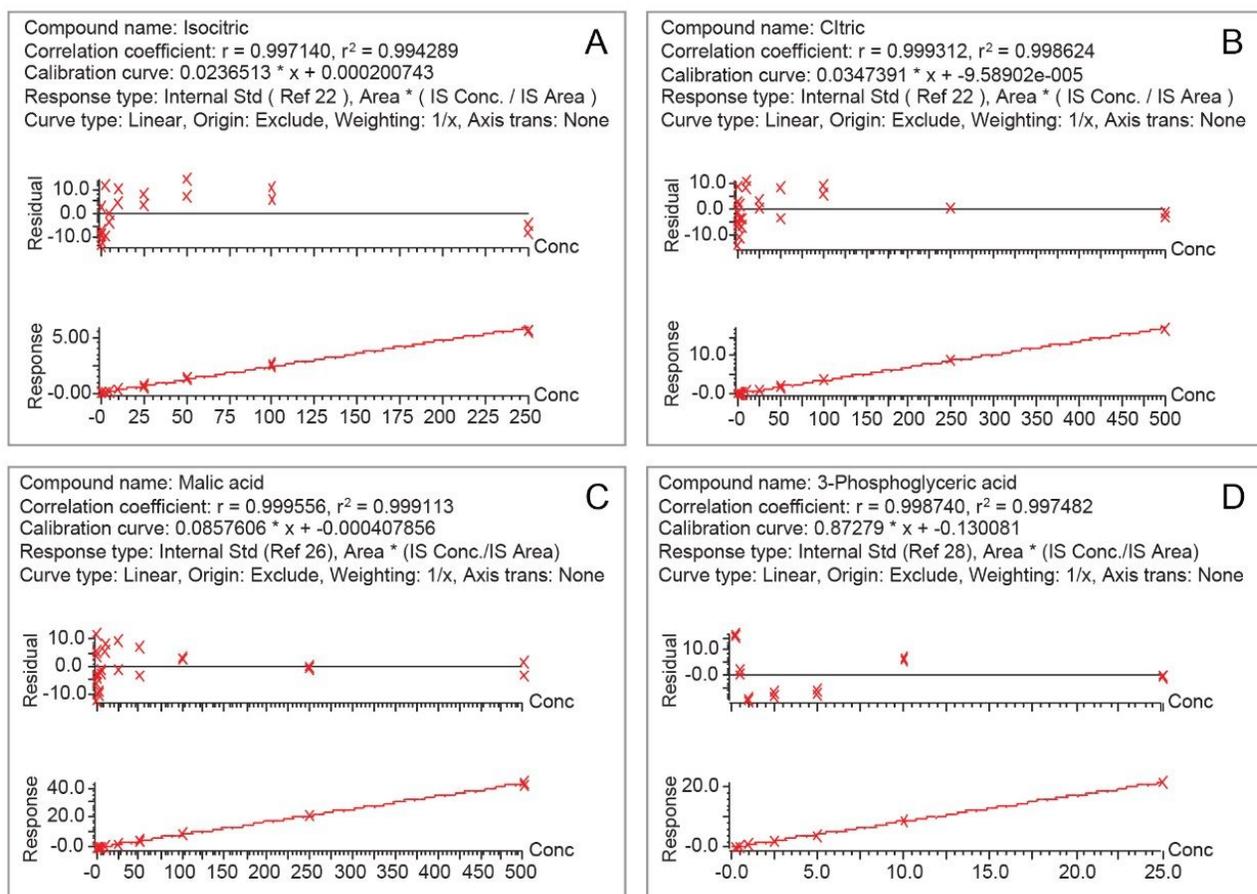


図 3. 溶液中のイソクエン酸 (A)、クエン酸 (B)、リンゴ酸 (C)、3-ホスホグリセリン酸 (D) の検量線

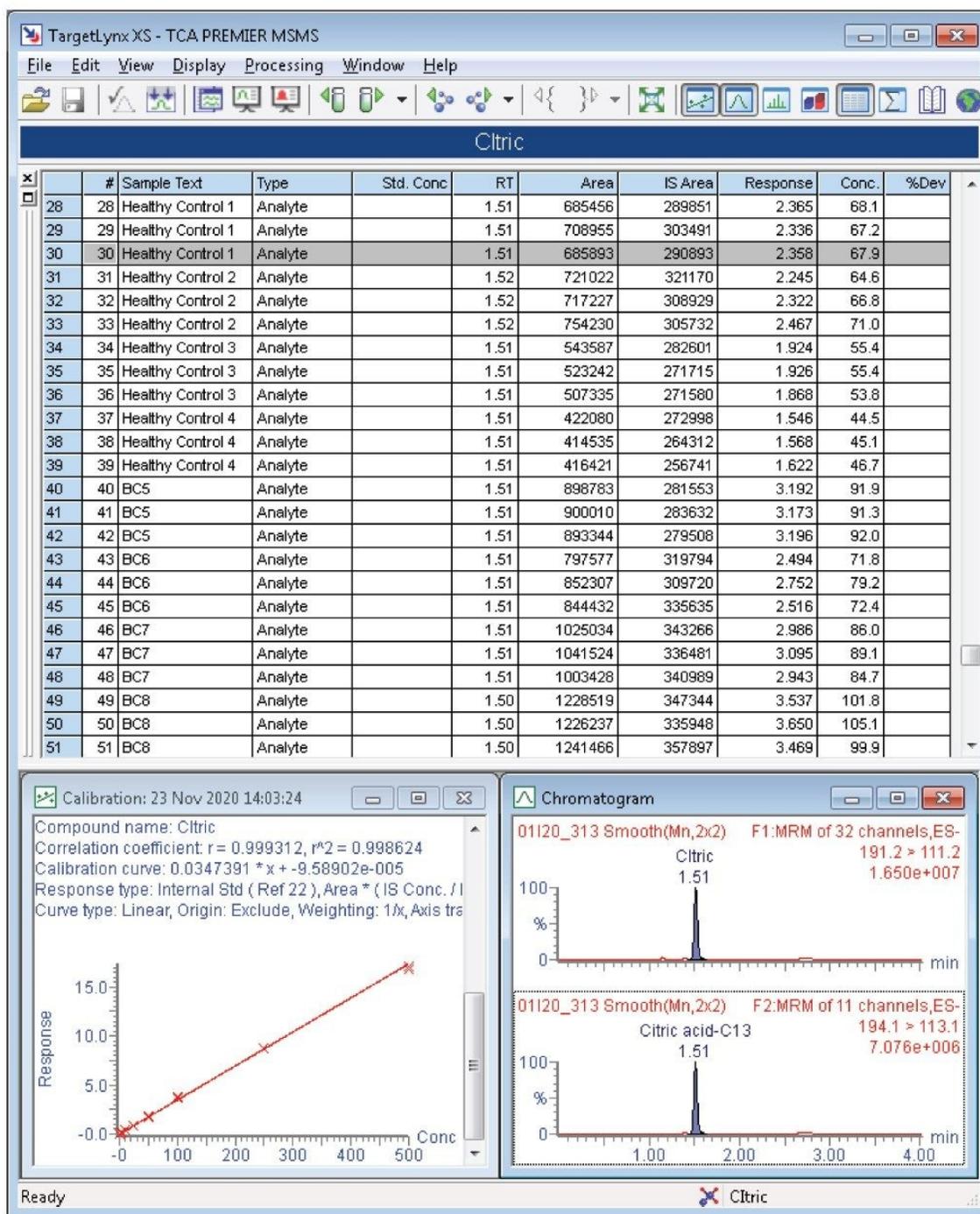


図 4. 健常および乳がん陽性の血漿サンプルからのクエン酸の TargetLynx による定量の結果

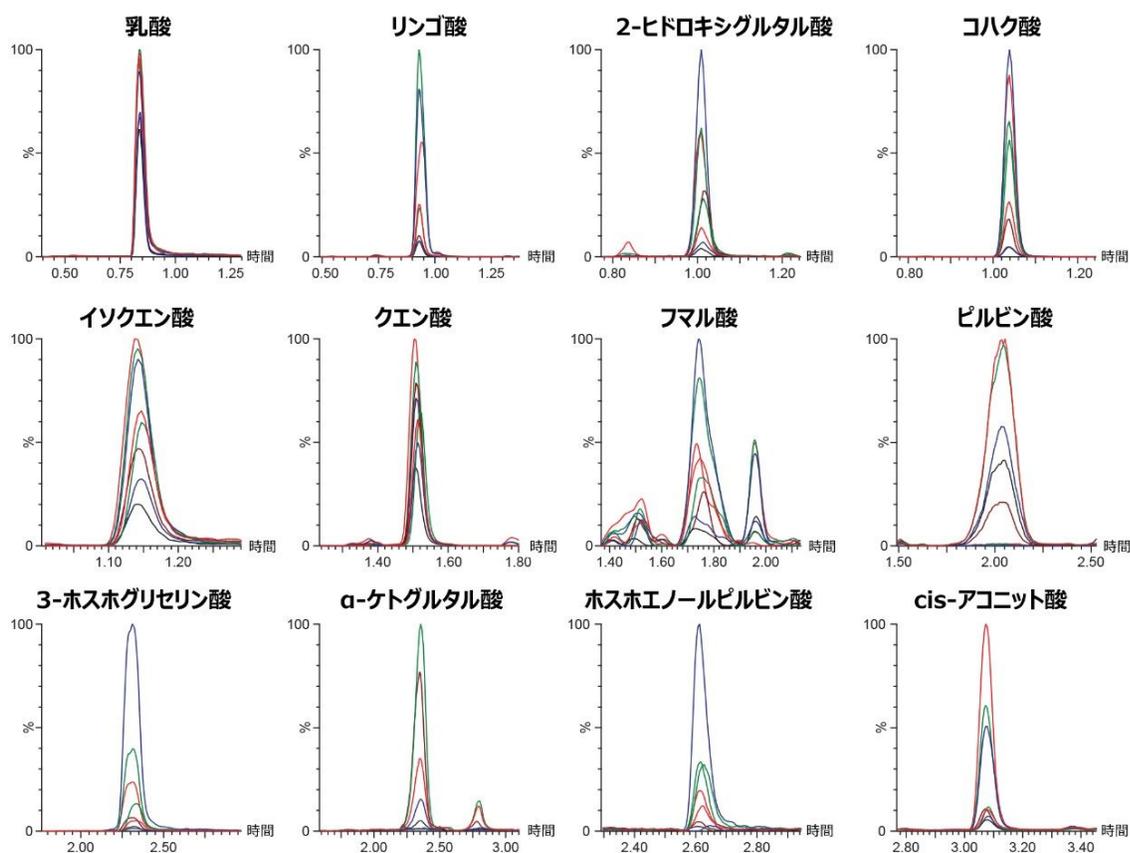


図 5. 血漿サンプルの分析の重ね描き

結論

本研究では、MaxPeak HPS テクノロジーを液体クロマトグラフィーおよび分析カラムに取り入れることで、ヒト血漿中の TCA 回路および関連する代謝物の分析が、優れた分析感度で達成できることを実証しています。ACQUITY Premier システムソリューションにより、分析種の金属との相互作用が軽減され、移動相への強酸やキレート添加剤の添加によるシステム全体の不動態化処理をしなくても、ピーク形状と分析感度が向上しました。ACQUITY Premier CSH Phenyl-Hexyl カラムを使用した、シンプルなミックスモード陰イオン交換セパレーションにより、迅速な分離が可能となり、適用しやすくなります。

参考文献

1. Murray RK, Bender DA, *et al.* Harper's Illustrated Biochemistry, 28th ed. New York: McGraw-Hill, 2009. Chapters 16–18. Pages 131–156.
2. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA Cycle Metabolites Control Physiology and Disease. *Nat Commun* 2020, 11 (1).
3. Siegel D, Permentier H, Reijngoud D, Bischoff R. Chemical and Technical Challenges in the Analysis of Central Carbon Metabolites by Liquid-Chromatography Mass Spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2014, 966, 21–33.
4. Gil A, Siegel D, Permentier H, Reijngoud D, Dekker F, Bischoff R. Stability of Energy Metabolites—An Often Overlooked Issue in Metabolomics Studies: A review. *Electrophoresis* 2015, 36 (18), 2156–2169.
5. Abrahamson HB, Rezvani AB, Brushmiller JG. Photochemical and Spectroscopic Studies of Complexes, of Iron(III) with Citric Acid and Other Carboxylic Acids. *Inorg Chim Acta* 1994, 226 (1–2), 117–127.
6. Sakamaki H, Uchida T, Lim L W, Takeuchi T. Evaluation of Column Hardware on Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of Phosphorylated Compounds. *J Chromatogr A* 2015, 1381, 125–131.
7. Siegel D, Permentier H, Bischoff R. Controlling Detrimental Effects of Metal Cations in the Quantification of Energy Metabolites via Ultrahigh Pressure-Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry by Employing Acetylacetone as a Volatile Eluent Modifier. *J Chromatogr A* 2013, 1294, 87–97.
8. Roberts D, Ruane R, Wilson I. Picolinic Acid a Mobile Phase Additive for Improved Chromatography. *Journal of Chromatography* 1989, 471, 437–441.
9. Hsiao JJ, Potter OG, Chu TW, Yin H. Improved LC-MS Methods for the Analysis of Metal-Sensitive Analytes Using Medronic Acid as a Mobile Phase Additive. *Anal Chem* 2018, 90 (15), 9457–9464.
10. Myint K, Uehara T, Aoshima K, Oda Y. Polar Anionic Metabolome Analysis by Nano-LC-MS with Metal Chelating Agent. *Analytical Chemistry* 2009, 81, 7766–7772.
11. Lauber M, Walter TH, Boissel C, Gilar M, Smith K, Birdsall R, Rainville P, Belanger J, Wyndham K. Low Adsorption UPLC Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces; Waters White Paper [720006930EN](https://www.waters.com/waters/library.htm?lid=135074404) <<http://www.waters.com/waters/library.htm?lid=135074404>> .2020.
12. Smith KM, Plumb R, Rainville PD. Separation and Detection of TCA Cycle Metabolites and Related

Compounds in Human Urine by UPLC-MS/MS.Waters Technology Brief 720006463EN <
<http://www.waters.com/waters/library.htm?lid=135005827>> .2019.

ソリューション提供製品

ACQUITY Premier システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

Xevo TQ-S micro タンデム四重極型質量分析計 <<https://www.waters.com/134798856>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007107JA、2020 年 12 月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#)
[環境設定](#)

[プライバシー](#)

[商標](#)

[サイトマップ](#)

[キャリア](#)

[クッキー](#)

[クッキー](#)