

## Agilent 1290 Infinity II Bio LC による 低分子バイオチオールの定量分析



BIO

### Authors

安田 恭子  
澤田 浩和

アジレント・テクノロジー株式会社

### 要旨

Agilent 1290 Infinity II Bio LC と Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS を用いて、低分子バイオチオール 7 種の定量メソッドを開発しました。バイオチオールはチオール基をもつ化合物群であり、一般的な HPLC システムでは良好なピーク形状を得ることが難しい場合があります。このアプリケーションノートでは、1290 Infinity II Bio LC を用いることで、非標識のバイオチオールを高感度に分析した例を紹介しています。

## 目的

ホモシステイン、システイン、グルタチオンなどの低分子バイオチオールは酸化-還元恒常性（ホメオスタシス）や酸化ストレス耐性などにおいて、重要な役割を果たします。バイオチオールは、チオール基を持つ化合物群であり、その反応性から一般的な HPLC では良好なピーク形状を得ることが難しく、チオール基を特異的に保護したり、蛍光標識化して高感度分析を行う手法がよく用いられています。しかしながら、保護基の導入や蛍光標識化はコストと手間がかかります。そこでこのアプリケーションノートでは、MP35N を材質として用いた HPLC である Agilent 1290 Infinity II Bio LC と HILIC カラムを用い、非標識の低分子バイオチオールを定量分析する手法の開発を試みました。MP35N は優れた耐薬品性を持ち、幅広い pH 範囲や塩濃度で使用できる素材で、一般的な LC で用いられるステンレススチール（SUS）よりもチオール基に不活性であることが期待できます。検出には、Agilent 6470 トリプル四重極検出器を用いました。

## 分析条件

測定対象としたバイオチオールを図 1 に示しました。N-アセチルシステイン（NAC）は関東化学から、それ以外の標準品はシグマアルドリッチ社より購入しました。すべてのバイオチオールは 0.1 N HCl を用いて 10,000 mg/L 濃度となるように溶解し、それをストックソリューションとしました。チオール基の非特異的吸着を抑える目的で、サンプル調整に使用する器具やバイアルはすべてポリプロピレン製のものを使用しました。

使用した機器一覧を表 1 に、また主な分析条件を表 2 に、MRM 条件を表 3 に示しました。分離に使用したカラムは接液部が PEEK 製のものを使用しました。MS はイオン源に AJS（Agilent Jet Stream、ESI）を用い、正イオンモードで測定しました。

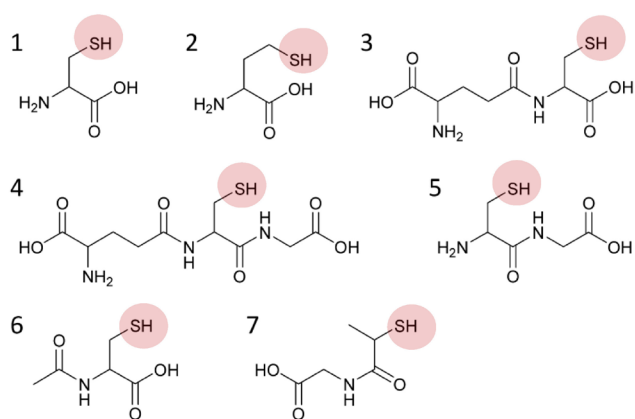


図 1. 測定に使用したバイオチオールの構造：

1, Cysteine (Cys) 2, Homocysteine (Hcy) 3,  $\gamma$ -glutamyl cysteine (GluCys) 4, Glutathione (GSH) 5, Cysteinyl glycine (CysGly) 6, N-Acetylcysteine (NAC) および 7, N-(2-mercaptopropionyl) glycine (MPG)

表 1. 装置構成

型番	装置名
G6470A	6470 トリプル四重極 MS
G7132A	1290 Infinity II バイオ ハイスピードポンプ
G7137A	1290 Infinity II バイオ マルチサンブラ
G7116B	1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット

表 2. 分析条件

パラメータ	値																					
乾燥ガス	N <sub>2</sub> , 250 °C, 10 L/min																					
シーガス	N <sub>2</sub> , 250 °C, 12 L/min																					
極性	ポジティブ																					
イオンソース	AJS (Agilent Jet Stream, ESI)																					
ネブライザ	N <sub>2</sub> , 50 psi																					
ノズル電圧	0 V																					
キャピラリー電圧	3000 V																					
測定モード	Dynamic MRM																					
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.7 $\mu$ m, 2.1x100 mm, PEEK-lined (P/N 673775-924)																					
移動相	A : 10 mM ギ酸アンモニウム + 0.1 %ギ酸を含む水溶液 B : 10 mM ギ酸アンモニウム + 0.1 % ギ酸を含む 90 % アセトニトリル水溶液																					
流速	0.4 mL/min																					
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time [min]</th> <th>A [%]</th> <th>B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>5.0</td> <td>95.0</td> </tr> <tr> <td>5.00</td> <td>20.0</td> <td>80.0</td> </tr> <tr> <td>6.00</td> <td>30.0</td> <td>70.0</td> </tr> <tr> <td>7.00</td> <td>50.0</td> <td>50.0</td> </tr> <tr> <td>9.00</td> <td>80.0</td> <td>20.0</td> </tr> <tr> <td>10.00</td> <td>80.0</td> <td>20.0</td> </tr> </tbody> </table>	Time [min]	A [%]	B [%]	0.00	5.0	95.0	5.00	20.0	80.0	6.00	30.0	70.0	7.00	50.0	50.0	9.00	80.0	20.0	10.00	80.0	20.0
Time [min]	A [%]	B [%]																				
0.00	5.0	95.0																				
5.00	20.0	80.0																				
6.00	30.0	70.0																				
7.00	50.0	50.0																				
9.00	80.0	20.0																				
10.00	80.0	20.0																				
ポストタイム	10 min																					
カラム温度	40 °C																					
注入量	1 $\mu$ L																					
希釈溶媒	0.1 N 塩酸																					

表 3. MRM 条件

Name	Fragmentor	MRM	Collision Energy	MRM	Collision Energy
Cys	70	122.0 -> 59.1	28	122.0 -> 76.0	17
Hcy	75	136.0 -> 90.1	10	136.0 -> 56.2	20
GluCys	95	251.1 -> 84.1	28	251.1 -> 56.2	56
GSH	90	308.1 -> 76.1	24	308.1 -> 84.1	40
CysGly	80	179.0 -> 76.1	16	179.0 -> 59.1	40
NAC	70	164.0 -> 122.0	8	164.0 -> 76.1	20
MPG	65	164.0 -> 76.1	8	164.0 -> 61.1	28

## 結果および考察

各標準品 1 µg/mL の MRM クロマトグラムを図 2 に示しました。すべての化合物で良好なピーク形状を得ることができました。各化合物のピーク幅は 0.237 ~ 0.489 分で、極端なテーリングは観測されませんでした。MPG と NAC はプリカーサイオンの  $m/z$  が同じですが、ベースラインで分離できていることが確認できました。

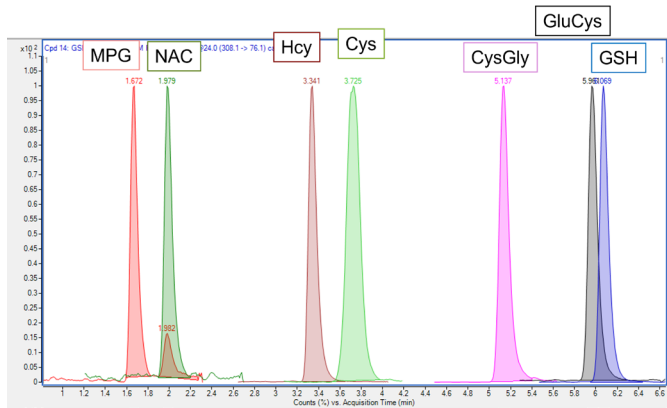


図 2. 1 µg/mL 標準品の MRM クロマトグラム

図 3 には検量線データを示しました。検量線の詳細な情報は表 4 にまとめました。すべてのバイオチオールで良好な直線性をもつ検量線を取得できました。また、バイアルや測定システムへの非特異的吸着も観測されないことがわかりました。

表 4. 検量線のとまとめ

Name	Formula	R2 Factor	Range ng/mL
Cys	$y = 15.086629x - 9.326073$	0.9999	3 ~ 10,000
Hcy	$y = 57.650888x + 21.876522$	0.9998	0.1 ~ 10,000
GluCys	$y = 47.680406x - 338.423799$	0.9997	1 ~ 3,000
GSH	$y = 34.628644x - 333.778923$	0.9995	0.1 ~ 3,000
CysGly	$y = 51.409584x - 589.100623$	0.9994	1 ~ 3,000
NAC	$y = 5.119827x - 160.132724$	0.9997	10 ~ 10,000
MPG	$y = 3.905404x + 0.157805$	0.9995	0.3 ~ 10,000

SUS 素材を使用した一般的な LC との比較を行いました。LC システム以外のカラム、バイアル、検出器は同じものを使用しました。図 4 (次頁) は低濃度領域での、各成分の MRM クロマトグラムを示しています。S/N<10 のピークは不検出としています。たとえば GSH において、一般的な LC で検出可能であった最低濃度は 1.0 ng/mL でしたが、1290 Infinity II Bio LC ではその 1/10 濃度である 0.1 ng/mL 濃度まで検出できていることが示されました。また、Cys では 1290 Infinity II Bio LC を用いることでピーク形状が改善できていることが示されました。30 ng/mL における一般的な LC での Cys のピーク幅は、0.370 分でしたが、1290 Infinity II Bio LC ではピーク幅が 0.300 分でした。全般的に 1290 Infinity II Bio LC を用いた方が低濃度までバイオチオールが検出できていることが示されました。

## まとめ

Agilent 1290 Infinity II Bio LC を用いてバイオチオール 7 種の一斉分析を検討しました。その結果、すべてのバイオチオールを良好なピーク形状で検出できることがわかりました。またすべてのバイオチオールで良好な直線性をもつ検量線を取得できました。Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムは、SUS を使用している一般的な LC システムよりも、低濃度のバイオチオールを検出できることも示されました。Agilent 1290 Infinity II Bio LC は質量分析装置の性能を最大に引き出せる HPLC として、非常に有効であることが示唆されました。

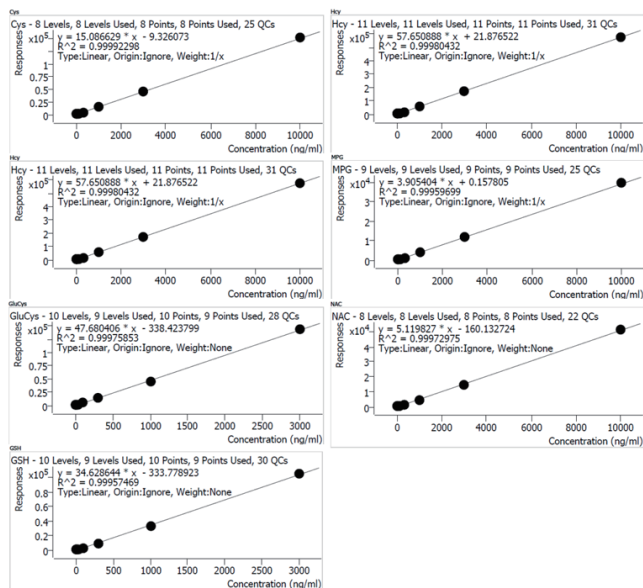


図 3. バイオチオールの検量線

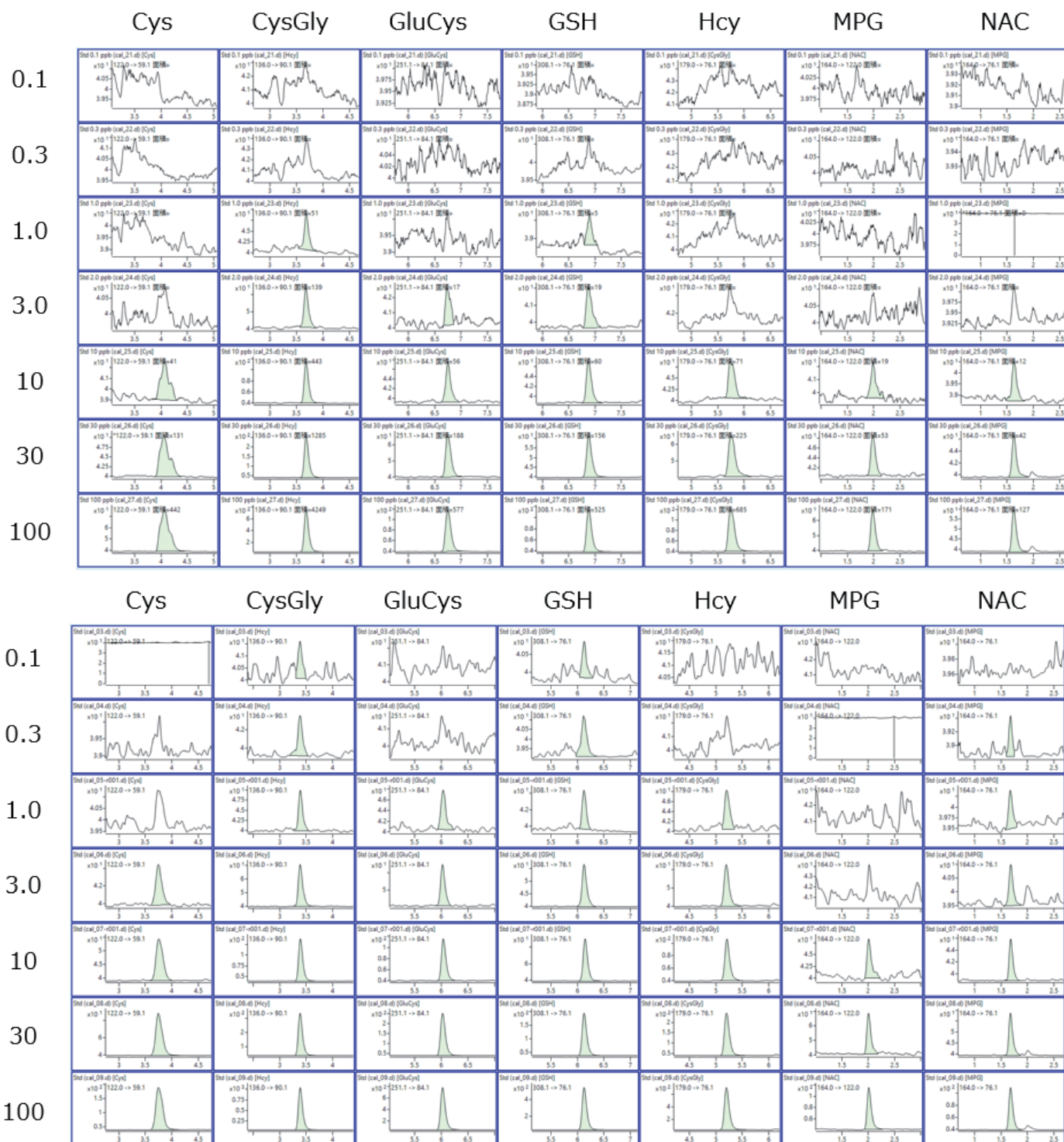


図4. 低濃度領域における一般的なLC(上)と1290 Infinity II Bio LC(下)を用いたときのクロマトグラムの比較。  
濃度は0.1、0.3、1.0、3.0、10、30、100 ng/mL

ホームページ

**[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)**

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

**[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)**

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、  
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。  
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに  
変更されることがあります。

DE44362.9569444444

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2021  
Printed in Japan, June 16, 2021  
5994-4474JAJP