

COSMOSIL

COSMOSIL PBr

C18 (ODS) カラムでは分離困難な親水性化合物 (ニコチンアミド代謝) の一斉分離

Technical Note

25₃

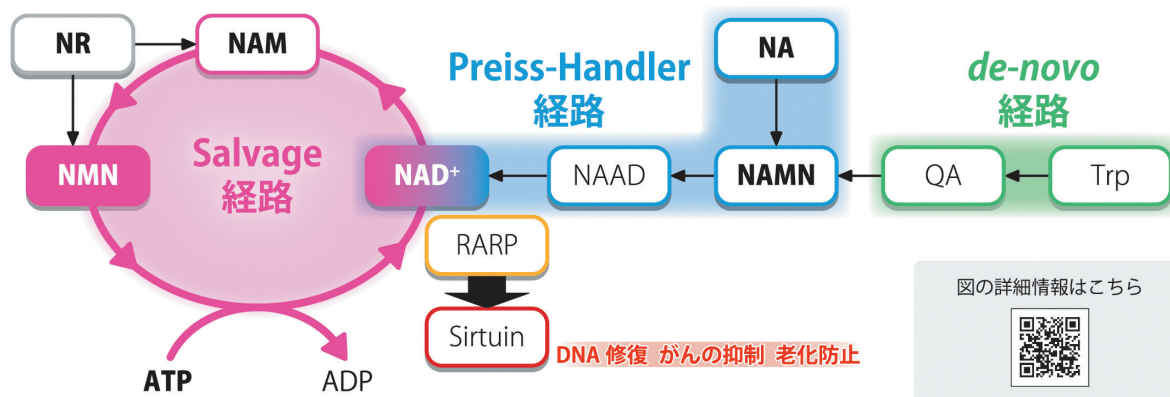
全ての生物種に含まれている補酵素のニコチンアミド類をコスモシール PBr カラムで分離することができましたので、紹介します。

はじめに

●ニコチンアミド類について

ニコチンアミド類は補酵素の一種であり、糖尿病・認知症・がんなどの老化関連疾患への関与が報告されているサーチュイン遺伝子の活性化に関係しています(図1)。サーチュイン遺伝子を活性化させることで、ミトコンドリアのエネルギー生産やテロメアの保護作用が向上すると考えられています。その中でも、ニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN)はがんの抑制や老化防止に効果があるとされており、健康食品やサプリメントなどが販売されています。そのため、NMNを含めたニコチンアミド類をバイオマーカーとした分析技術の確立が求められています。

※太字：測定対象サンプル



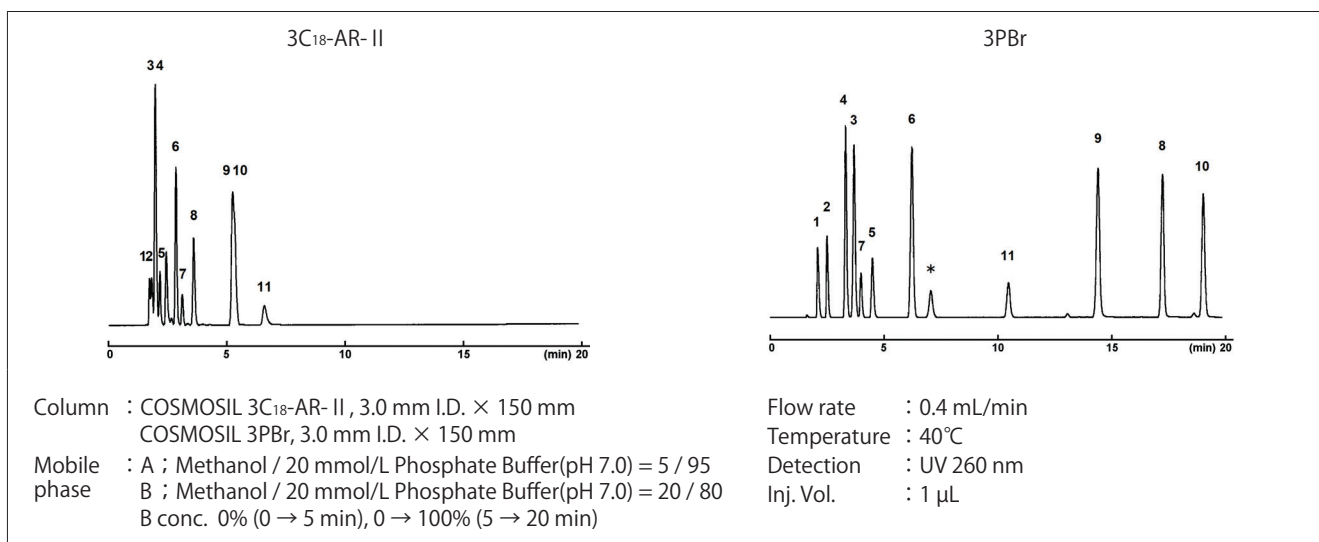
図の詳細情報はこちら



図1. ニコチンアミド類の合成経路

しかしながら、ニコチンアミド類は親水性が高く、疎水性相互作用を利用して分離するC18カラムでは保持が小さいため、各化合物を分離することができません。弊社が開発したペンタプロモベンジル基を修飾したPBrカラムは強い分散力を有しており、逆相クロマトグラフィーで親水性化合物の分離が可能です。そこで、PBrカラムを用いて、ニコチンアミド類の合成に関与する11種類の化合物の一斉分離を試みました。

■ C18カラムとPBrカラムを用いたニコチンアミド類の分析(各ピークの化合物は次ページに記載)

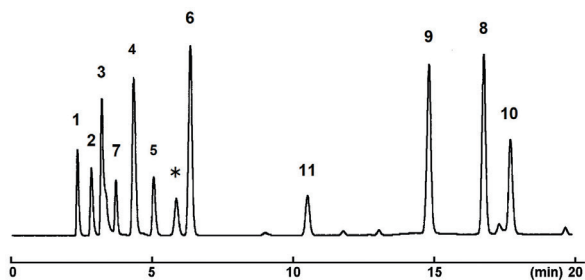


コスモシール PBr カラムを用いることで、C18カラムでは分離することが難しいニコチンアミドの合成に関与する11種類の化合物を簡単なグラジエント条件で分離することができました。

■ PBr カラムを用いた LC-MS によるニコチンアミド類の分析

食品や生体サンプルの分析の際には、目的物と不純物とのピークが重なることが懸念されるため、LC-MS や LC-MS/MS などを用いて、目的物と不純物の識別を行います。LC-MS の分析においては、各化合物を揮発させて検出するため、移動相に不揮発性の塩が含有した緩衝液などを使用することができません。そこで、LC-MS の分析に使用することができる移動相を使用して、UV 検出下においても良好に各化合物を分離することが可能かを確認しました。

移動相：緩衝液をりん酸系からぎ酸系に変更



Sample :

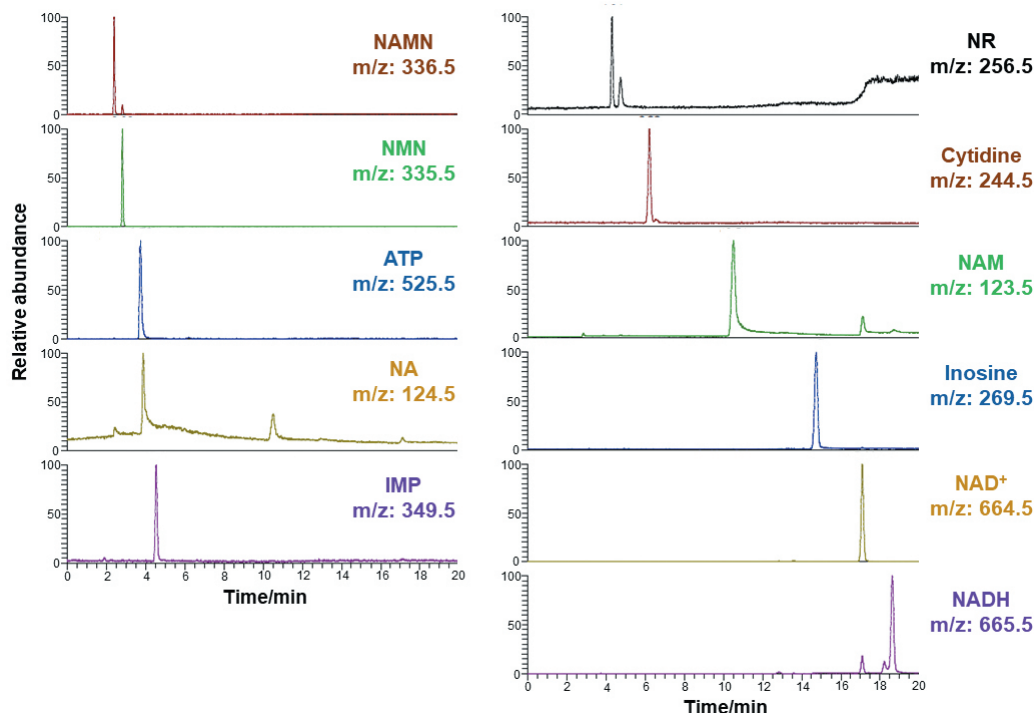
1. NAMN (Nicotinic Acid Mononucleotide) M.W. 335.20
 2. NMN (Nicotinamide Mononucleotide) M.W. 334.22
 3. ATP (Adenosine Triphosphate) M.W. 507.5
 4. IMP (Inosinic Acid) M.W. 348.21
 5. NR (Nicotinamide Riboside) M.W. 255.5
 6. Cytidine M.W. 243.21
 7. NA (Nicotinic Acid) M.W. 123.11
 8. NAD⁺ (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) M.W. 663.43
 9. Inosine M.W. 268.23
 10. NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) M.W. 664.43
 11. NAM (Nicotinamide) M.W. 122.12
- *. 成分不明

※ 移動相にりん酸緩衝液を使用した場合 (p.1 参照) と比較すると、りん酸緩衝液での溶出順は、4. IMP → 3. ATP → 7. NA → 5. NR ですが、ぎ酸緩衝液では 3. ATP → 7. NA → 4. IMP → 5. NR となり溶出順が異なります。

Column : COSMOSIL 3PBr, 3.0 mm I.D. × 150 mm	Flow rate : 0.4 mL/min
Mobile phase : A ; Methanol / 20 mmol/L Ammonium Formate = 5 / 95	Temperature : 40°C
B ; Methanol / 20 mmol/L Ammonium Formate = 20 / 80	Detection : UV 260 nm
B conc. 0% (0 → 5 min), 0 → 100% (5 → 20 min)	Inj. Vol. : 1 μL

移動相の変更により、溶出順に変化は見られましたが、ニコチンアミドの合成に関与する 11 種類の化合物を分離することができました。

つづいて、LC-MS を使用し、上記と同様の条件で各化合物を良好に検出することが可能かを確認しました。

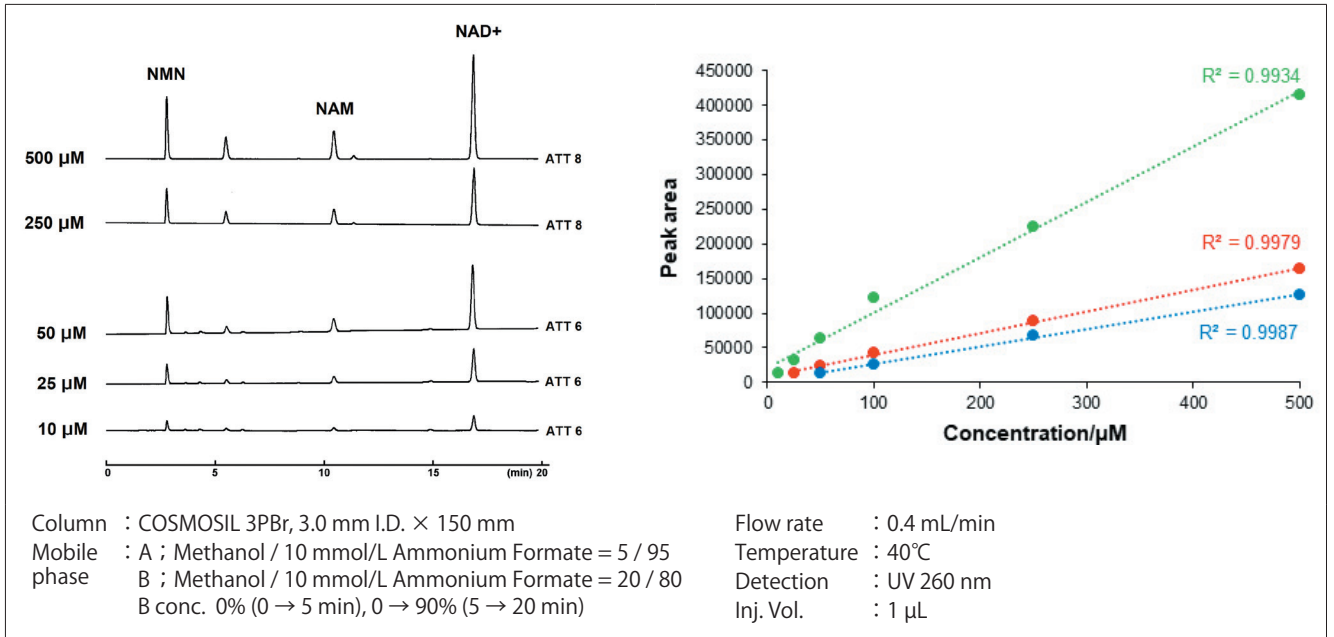


Column : COSMOSIL 3PBr, 3.0 mm I.D. × 150 mm	Flow rate : 0.4 mL/min
Mobile phase : A ; Methanol / 20 mmol/L Ammonium Formate = 5 / 95	Temperature : 40°C
B ; Methanol / 20 mmol/L Ammonium Formate = 20 / 80	Detection : MS
B conc. 0% (0 → 5 min), 0 → 100% (5 → 20 min)	Inj. Vol. : 1 μL

PBr カラムを用いることで、分子量の差が 1 である NAMN と NMN に加えて、計 11 種類のニコチンアミド類をりん酸系 (p.1 参照)、ぎ酸系の 2 種類の移動相で分離することができました。

■ PBr カラムを用いたニコチンアミド代謝物の検出限界

● 濃度の異なるニコチンアミド類を UV 検出器で分析した際のピーク形状と検量線



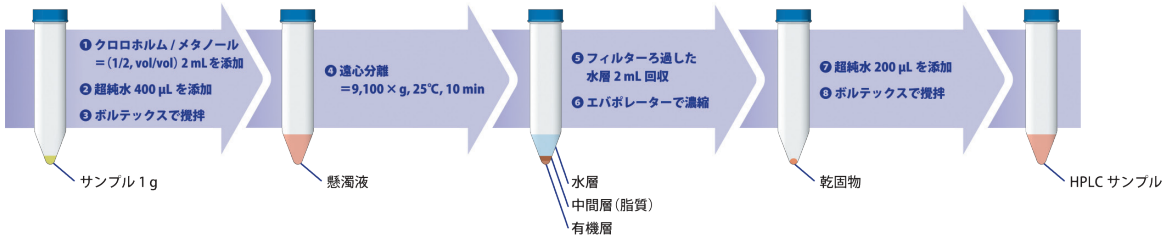
濃度の異なる3種類のニコチンアミド類を分析したところ、直線的な検量線を作成することができ、NAMは50 μM、NMNは25 μM、NAD⁺は10 μMまで検出することが可能でした(注入量を増加させれば、数 μM以下の濃度においても分析可能です)。また、濃度を低下させても、それぞれの化合物由来のピーク形状も良好でした。

■ サンプルの前処理

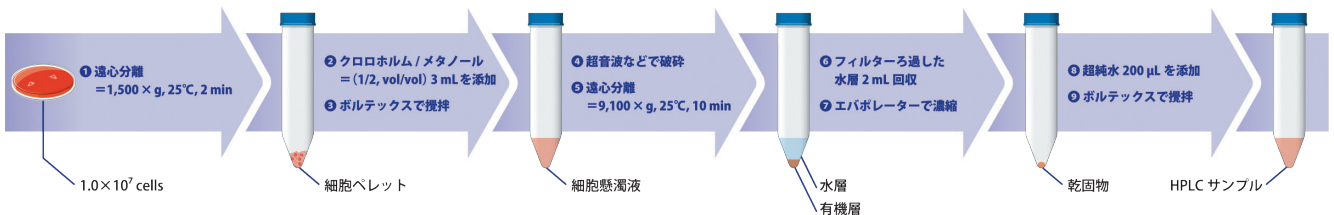
食品や生体サンプル中には多量のタンパク質や脂質などの成分が含まれています。タンパク質や脂質はカラムに吸着しやすいため、代謝物質などをHPLCで分析する際には、前処理によりこれらの物質を除去する必要があります。

前処理操作 ※抽出・破碎処理を行い、取得したHPLCサンプルはムラがない均一な状態でサンプリングする必要があります。

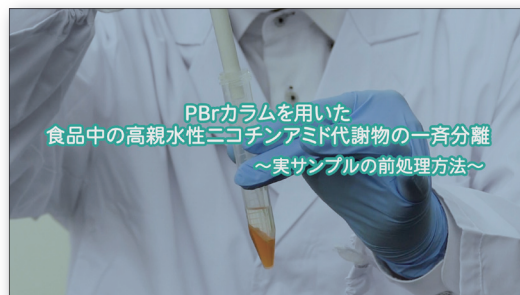
● トマトの前処理



● 培養細胞 (HEK 293) の前処理



トマトの前処理のポイントを動画でご確認いただけます

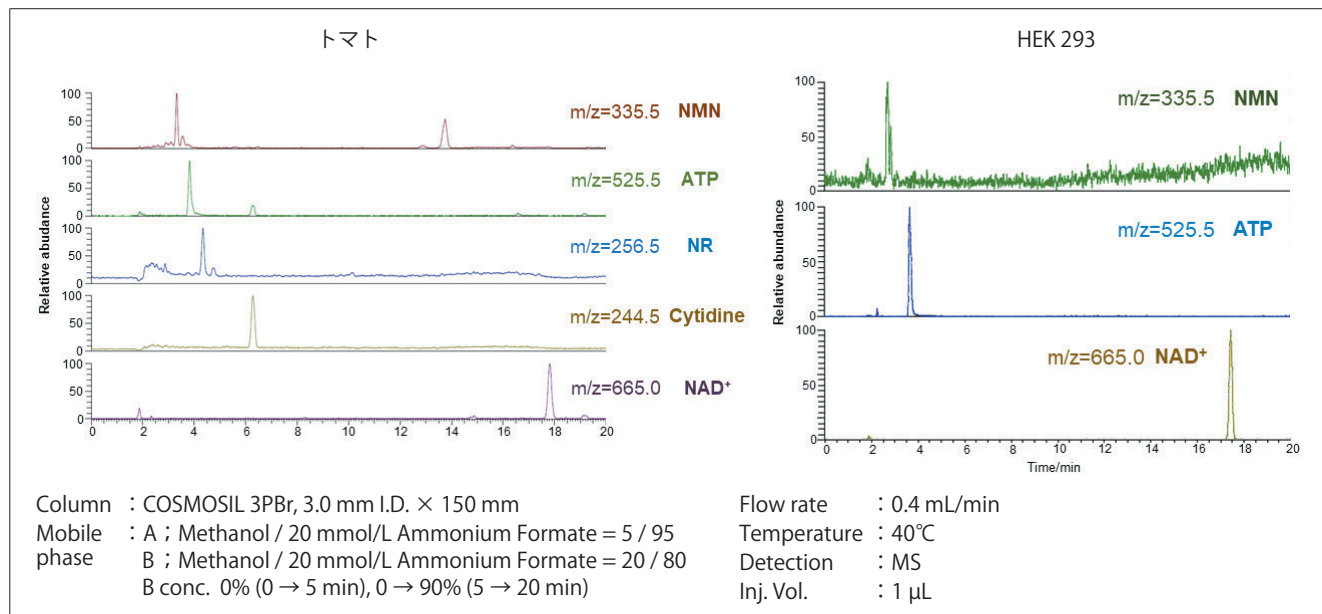


動画はこちら



食品や生体サンプル中の NMN の分析

NMN の含有量が多いことが報告されているトマトおよび HEK 293 を例として細胞中のニコチンアミド類を PBr カラムを用いて分析しました。



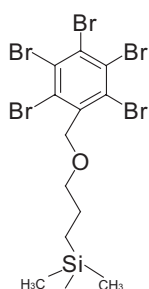
LC-MS で分析した結果、トマトおよび HEK 293 細胞中に含有している NMN やその他代謝物を検出することができました。

分析に用いた製品 (価格は、オンラインカタログ e-Nacalai Search Version (<https://www.e-nacalai.jp>) で検索していただくことでご覧になれます。)

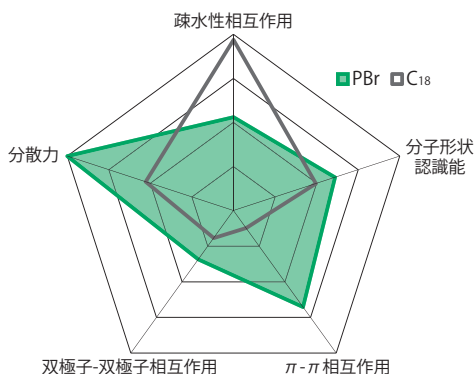
分類	用途	製品名	メーカー / 規格	製品番号	サイズ 内径 × 長さ (mm) / 容量	
カラム	分析	コスモシール 3PBr パックドカラム	SP (高速液体クロマトグラフ用)	19352-91	3.0 mm I.D. × 150 mm	
		コスモシール 3C ₁₈ -AR-II パックドカラム		ご照会	3.0 mm I.D. × 150 mm	
試薬	移動相	メタノール	劇	SP	21929-81	1 L
		蒸留水		(高速液体クロマトグラフ用)	14029-91	1 L
		りん酸緩衝液 (pH 7.0)(5 倍濃縮)			08968-81	1 L
		ギ酸アンモニウム		GR	02509-55	500 g
		クロロホルム	劇	JIS 試薬特級 GR	08402-55	500 mL
器具	サンプル前処理	Millex-LG 0.20 μm, 13 mm	MERCK	SLLG013SL	100 pkg	

COSMOSIL PBr カラムの特長

固定相構造



分離特性



PBr カラムは C₁₈ カラムでは分離困難な親水性化合物の分離に特化したカラムです。PBr カラムは C₁₈ カラムと同じような使用感でお使いいただけます。

PBrカラムの詳細情報はこちら



COSMOSIL コスモシール はナカライテスク株式会社、QR コードは株式会社デンソーウェーブの登録商標です。

ご注意 試験・研究用以外には使用しないでください。

※掲載内容は予告なく変更になる場合があります。

nacalai tesque
The quality for certainty.



● URL
<https://www.nacalai.co.jp/cosmosil/>

■ 販売取扱店

● 価格・納期のご照会
TEL: 0120-489-552

ナカライテスク株式会社

〒604-0855 京都市中京区二条通烏丸西入東玉屋町498

● 製品に関する技術的なご照会
<https://www.nacalai.co.jp/ss/Contact/>
TEL: 075-211-2703