

高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (HPLC-ESI-MS/MS) を用いた

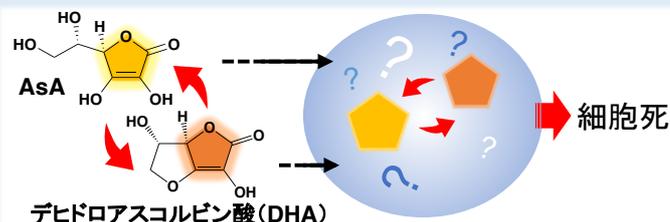
細胞内アスコルビン酸定量法の確立

○ 安部知純、樋口央紀、宮澤大樹、宮澤陽夫
東北大学 未来科学技術共同研究センター

背景 アスコルビン酸 (AsA, ビタミン C)
: 食品に含まれる代表的抗酸化物質
コラーゲン合成等に関与

高濃度投与によってがん細胞死を誘導する

しかし直接的に細胞内挙動を捉えた報告はない



目的 高感度・高選択的アスコルビン酸定量法の確立と細胞内アスコルビン酸挙動評価

【分析装置】

HPLC: ExionLC™ AD pump, an AD autosampler and an AD column oven (AB SCIEX, CA, USA)

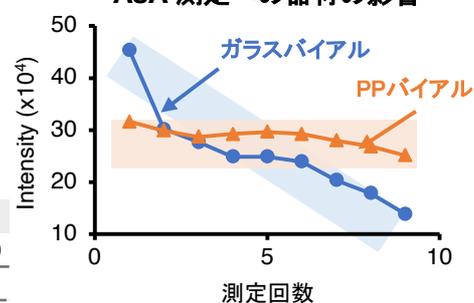
*column: HILIC column (2.0 mm × 100 mm, 5 μm pore size, Nacalai Tesque, INC., Kyoto, Japan)

MS: QTRAP® 6500+ mass spectrometer with a Turbo V source (AB SCIEX, CA, USA) with ESI course

Multiple reaction monitoring (MRM)条件

Compound	RT (min)	ion mode	Q1(MS1)	Q3(MS2)	DP(V)	CE (V)	CXP (V)
AsA	5.48	negative	174.9	114.9	-45.0	-18.0	-13.0
			71.1	-45.0	-18.0	-7.0	

AsA 測定への器材の影響



ガラスバイアルへアスコルビン酸が吸着し分析感度が低下する

高感度・高選択分析条件の確立 (LOD: 1 pg, LOQ: 2.5 pg)

【細胞種】

* HepG2 細胞 (肝癌由来)

* THP-1 細胞 (白血病単球由来)

【プロトコル】

細胞 (1 × 10⁶ 個)

↓

AsA/DHA 共培養

↓

洗浄 (cold PBS)

↓

遠心分離 (300 × g, 5 min, 4 °C)

↓

0.1 % メタリン酸 (300 μL)

↓

ホモジナイズ

↓

遠心分離 (16,000 × g, 5 min, 4 °C)

↓

上清回収

↓

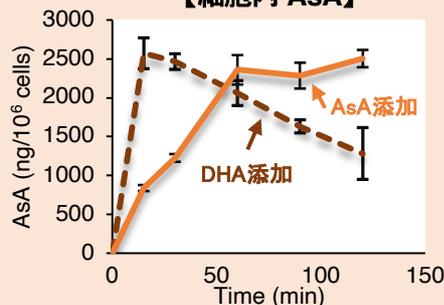
フィルター濾過 (0.45 μm)

↓

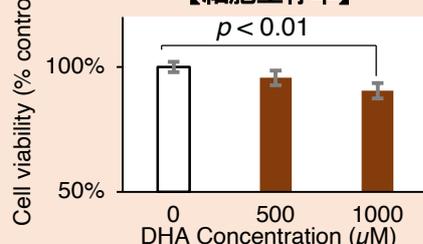
HPLC-ESI-MS/MS 分析

HepG2

【細胞内 AsA】

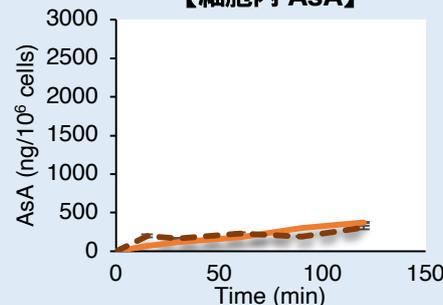


【細胞生存率】

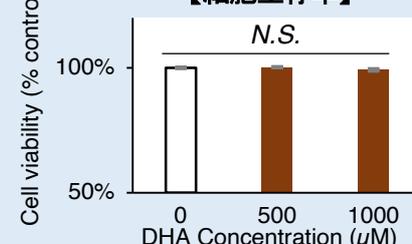


THP-1

【細胞内 AsA】



【細胞生存率】



細胞種によって細胞内アスコルビン酸挙動・細胞死誘導が異なる

結論

✓ 従来と比較して高感度・高選択的アスコルビン酸測定法を確立 (LOD 1 pg)

✓ 細胞内アスコルビン酸挙動は取り込まれる分子形態・細胞種によって異なる