

GC/MS対象メタボローム分析のための 固相誘導体化法の開発

2015年7月1日

株式会社アイスティサイエンス

佐々野僚一



Beyond your Imagination

AiSTI SCIENCE

従来の誘導体化前処理法

誘導体化前処理時間

9~19時間

減圧濃縮遠心分離 (1600rcf, 4℃, 3min)

— 凍結：液体窒素

凍結乾燥 (一晚：16時間)

— 誘導体化試薬添加
メトキシアミン/ピリジン溶液 20mg/mL 100uL

インキュベーション (30℃, 90min) : 誘導体化反応

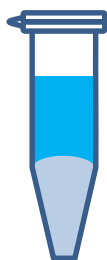
— 誘導体化試薬添加 : MSTFA 50uL

インキュベーション (37℃, 30min) : 誘導体化反応

遠心分離 (16000 rcf, 4℃, 3min)

分取：上澄み 100μL → バイアル瓶

測定：GC/MS：注入1μL (スプリット 25:1)



CX固相誘導体化前処理法（アミノ酸）

誘導体化前処理時間

6分

試料（抽出液）負荷時の
水-アセトニトリルの比率を検討

抽出液分取 50 μ L

Hybrid-SPE **CXi3**-2mg

コンディショニング
水 100 μ L
ACN 100 μ L

洗浄：ACN 100 μ L（**脱水効果**）

誘導体化試薬を含浸 **MSTFA** 20 μ L

固相誘導体化反応

溶出：ヘキサン 100 μ L

添加：ヘキサン 400 μ L

検液

GC/MS：大量注入10 μ L

AX固相誘導体化前処理法（有機酸）

誘導体化前処理時間

6分

試料（抽出液）負荷時の
水-アセトニトリルの比率を検討

抽出液分取 50 μ L

Hybrid-SPE AXi3-2mg

コンディショニング
水 100 μ L
ACN 100 μ L

洗浄：ACN 100 μ L（脱水効果）

誘導体化試薬を含浸 MSTFA 20 μ L

固相誘導体化反応

溶出：ヘキサン 100 μ L

添加：ヘキサン 400 μ L

検液

GC/MS：大量注入10 μ L

AX固相誘導体化前処理法（糖類）

誘導体化前処理時間

10分

抽出液分取 20 μ L

試料（抽出液）負荷時の
水-アセトニトリルの比率を検討

添加 ACN 100 μ L

コンディショニング
水 100 μ L
ACN 100 μ L

Hybrid-SPE **AXi3**-2mg

洗浄：ACN 100 μ L（脱水効果）

メトキシム化時の
メトキシアミン濃度の検討

誘導体化試薬を含浸
20%メトキシアミン溶液5 μ L

固相上誘導体化反応：3min

誘導体化試薬を添加 MSTFA 25 μ L

固相誘導体化反応

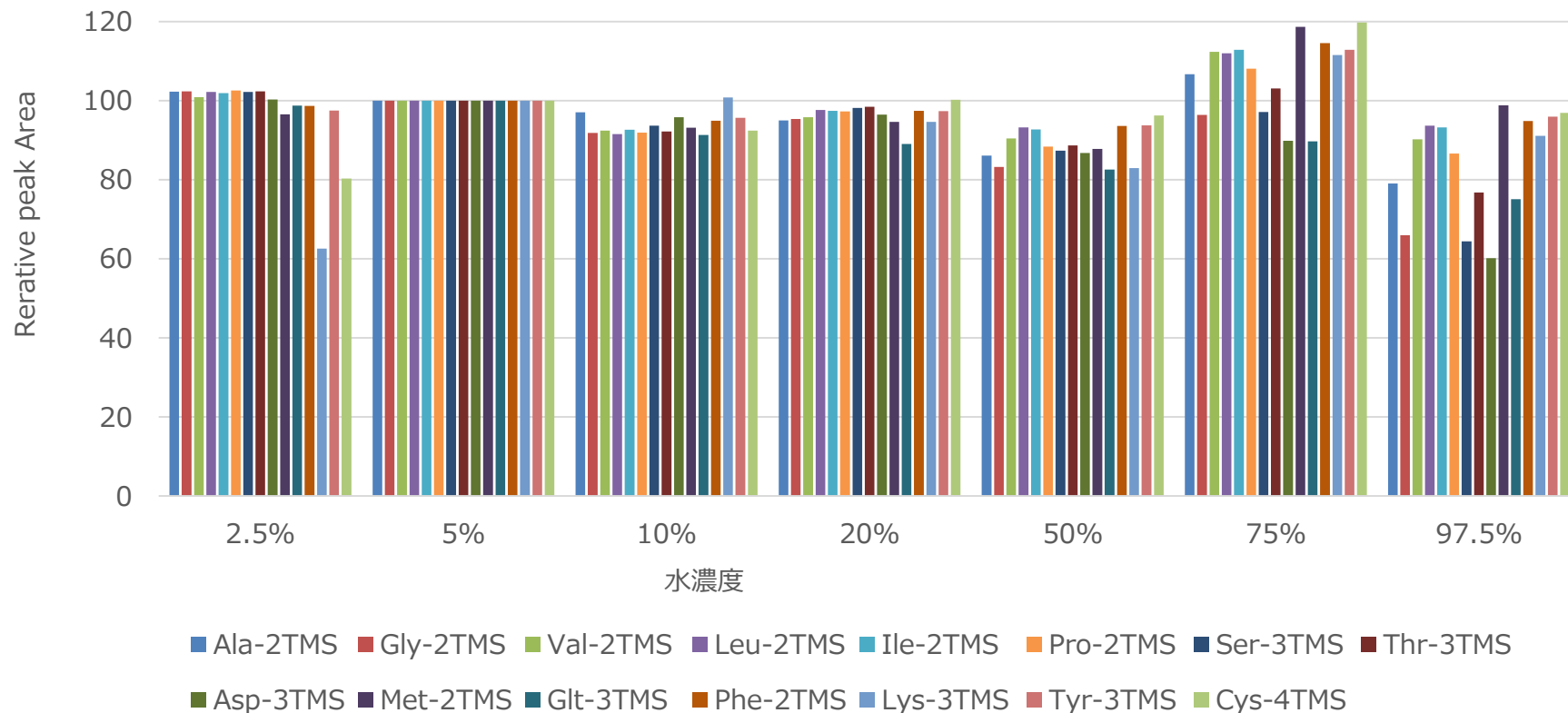
溶出：ヘキサン 100 μ L

添加：ヘキサン 400 μ L

検液

GC/MS：大量注入10 μ L

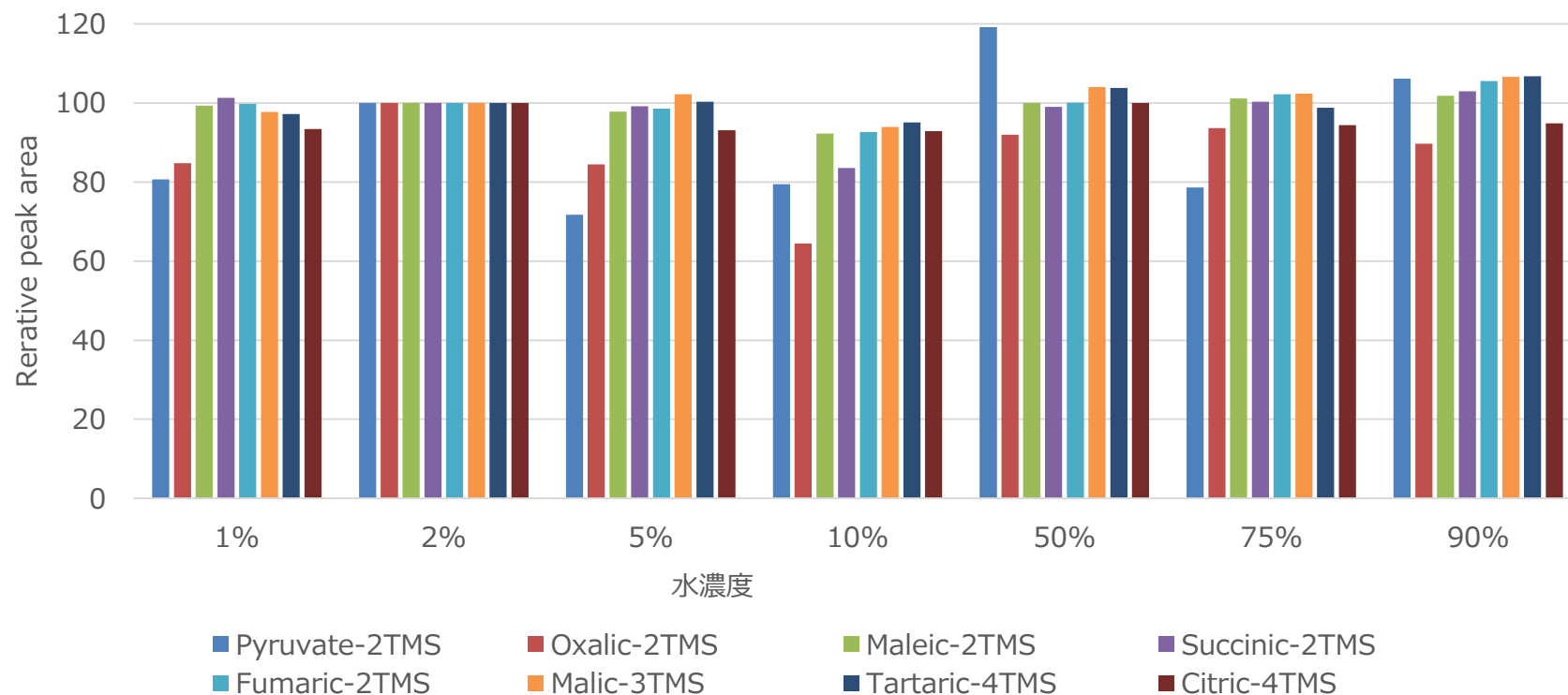
試料負荷時の水濃度とアミノ酸のCX固相への保持について



試料負荷時の水濃度と相対ピーク面積値の関係

アミノ酸とCX固相において、試料負荷時は水濃度が75%以下であれば保持できることがわかった。イオン交換相互作用により保持されていると考えられる。

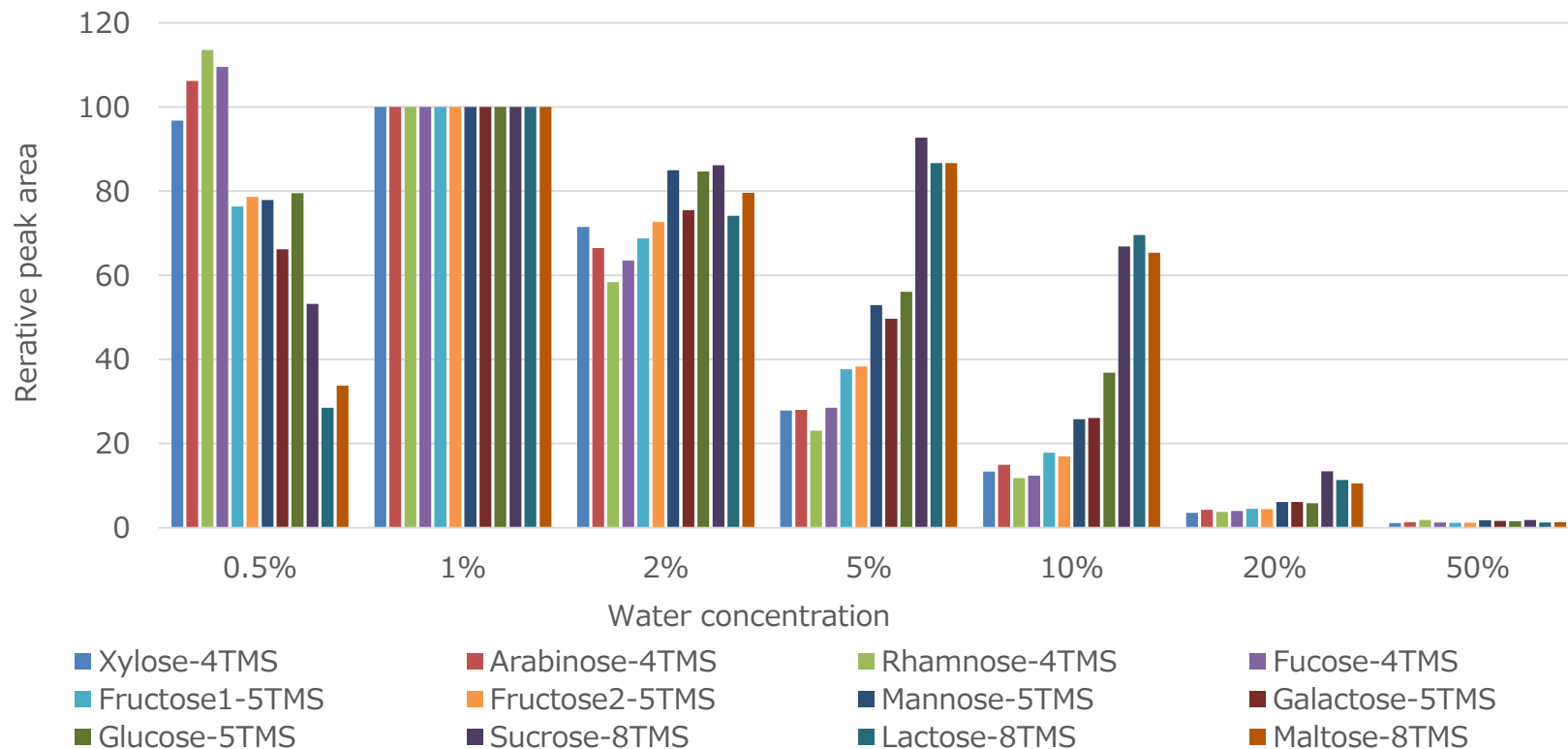
試料負荷時の水濃度と有機酸のAX固相への保持について



試料負荷時の水濃度と相対ピーク面積値の関係

有機酸とAX固相において、試料負荷時は水濃度に依存することなく保持できることがわかった。イオン交換相互作用により保持されていると考えられる。

試料負荷時の水濃度と糖類のAX固相への保持について

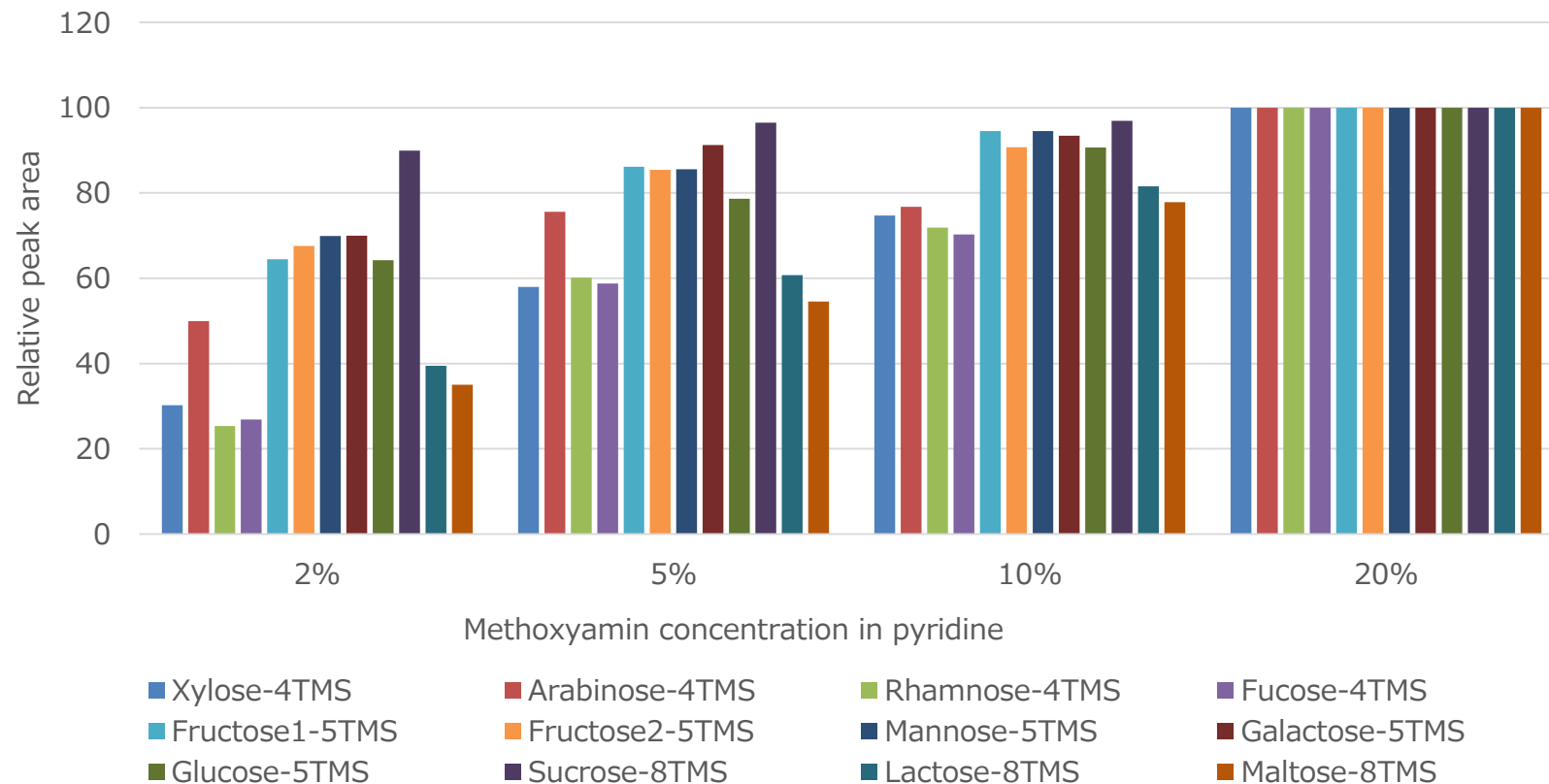


試料負荷時の水濃度と相対ピーク面積値の関係

糖類とAX固相において、試料負荷時は水濃度が1%が最適な保持条件であることがわかった。極性相互作用により保持されていると考えられる。

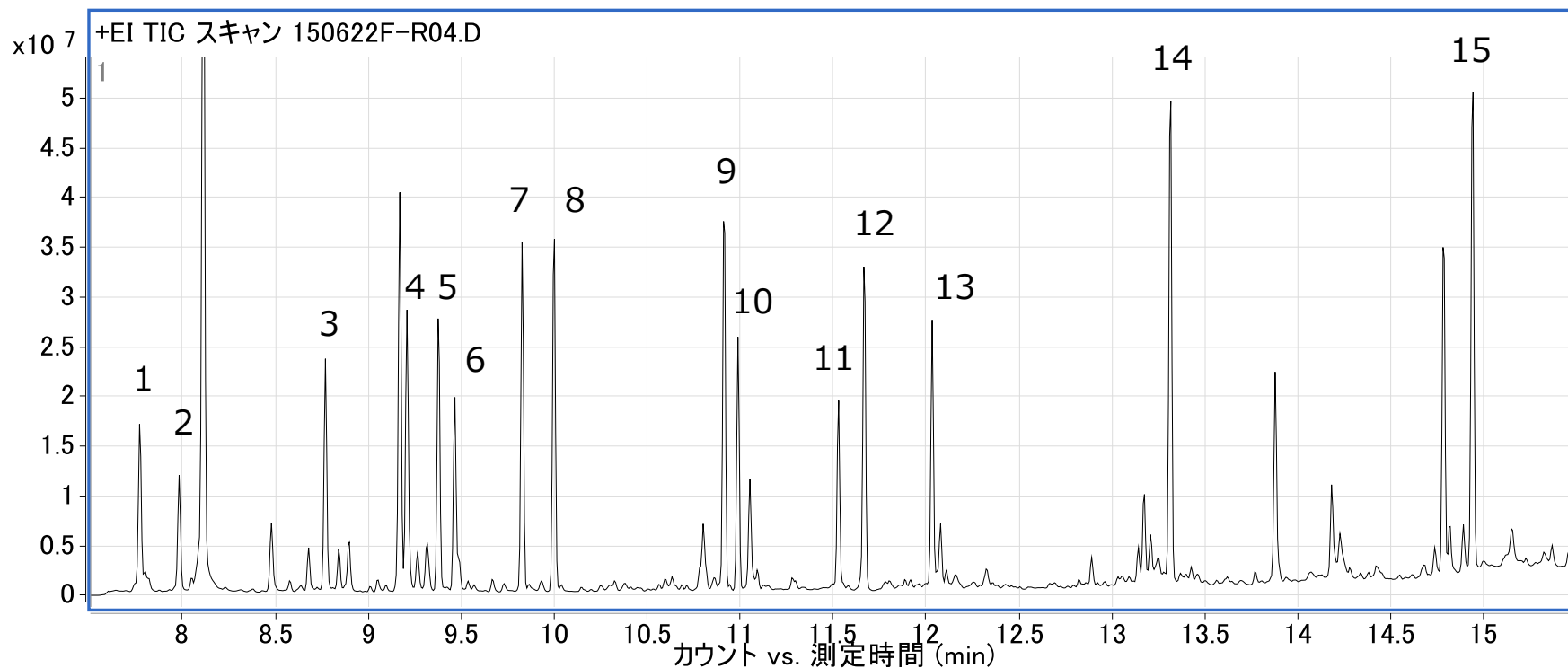
また、0.5%以下になるとSucrose, Lactose, Maltoseは溶液に溶解できなくなり、カートリッジ壁面等に析出していることが考えられる。

メトキシアミン濃度と固相メトキシム化について



固相誘導体化時のメトキシアミン濃度と相対ピーク面積値の関係

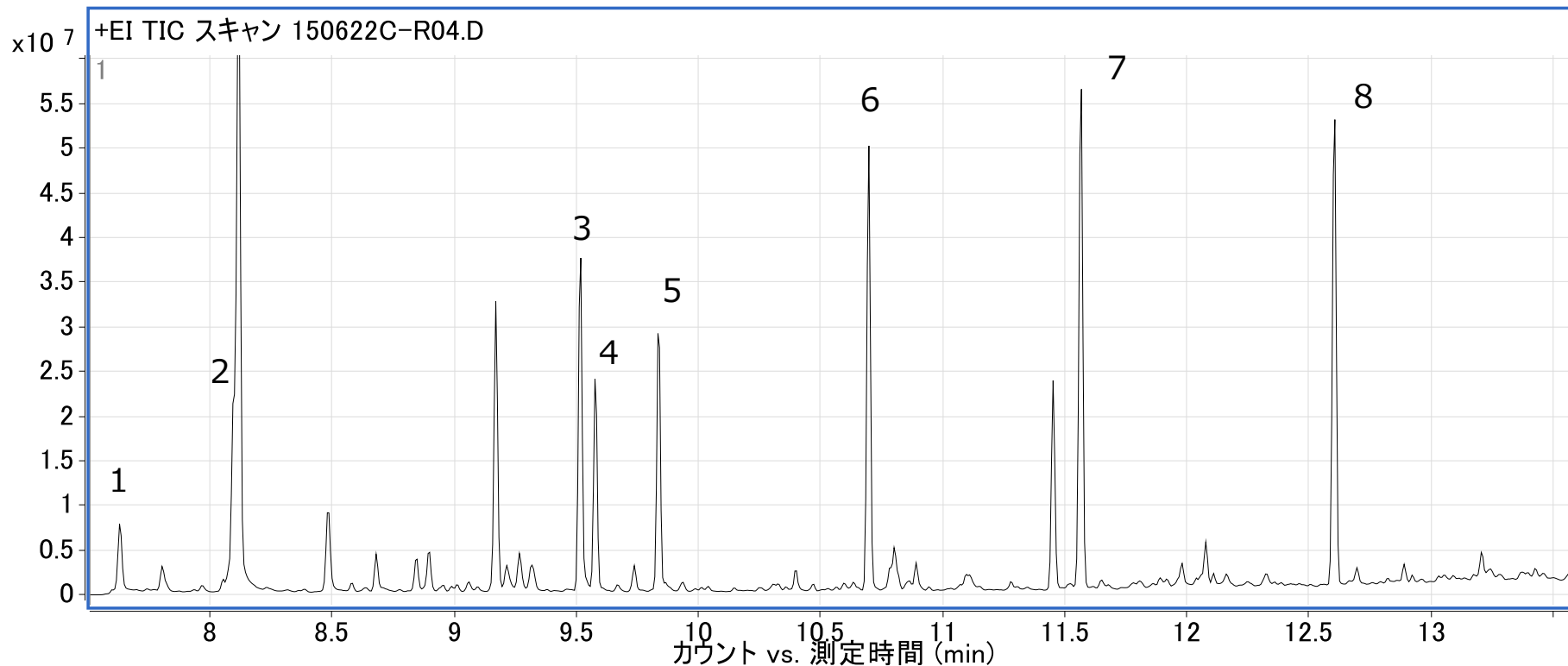
CX固相誘導体化前処理法（アミノ酸）



- | | | | |
|------------------------|---------------------|------------------------|-------------------|
| 1. Alanine-2TMS | 2. Glycine-2TMS | 3. Valine-2TMS | 4. Leucine-2TMS |
| 5. Isoleucine-2TMS | 6. Proline-2TMS | 7. Serine-3TMS | 8. Threonine-3TMS |
| 9. Aspartic acid-3TMS | 10. Methionine-2TMS | 11. Glutamic acid-3TMS | |
| 12. Phenylalanine-2TMS | 13. Lysine-3TMS | 14. Tyrosine-3TMS | 15. Cystine-4TMS |

SCAN トータルイオンクロマトグラム

AX固相誘導体化前処理法（有機酸）



1. Pyruvate acid-2TMS

2. Oxalic acid-2TMS

3. Maleic acid-2TMS

4. Succinic acid-2TMS

5. Fumaric acid-2TMS

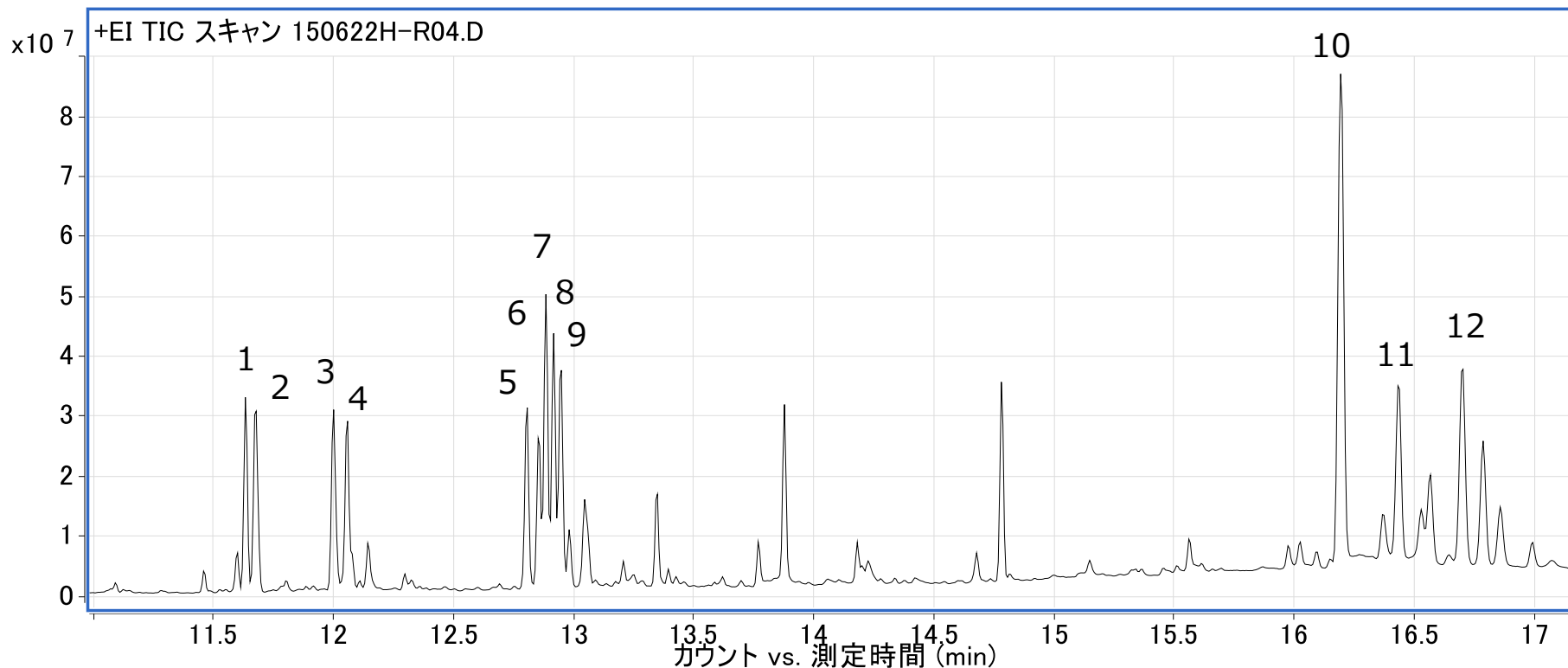
6. Malic acid-3TMS

7. Tartaric acid-4TMS

8. Citric acid-4TMS

SCANトータルイオンクロマトグラム

AX固相誘導体化前処理法（糖類）



1. Xylose-4TMS
5. Fructose1-5TMS
9. Glucose-5TMS

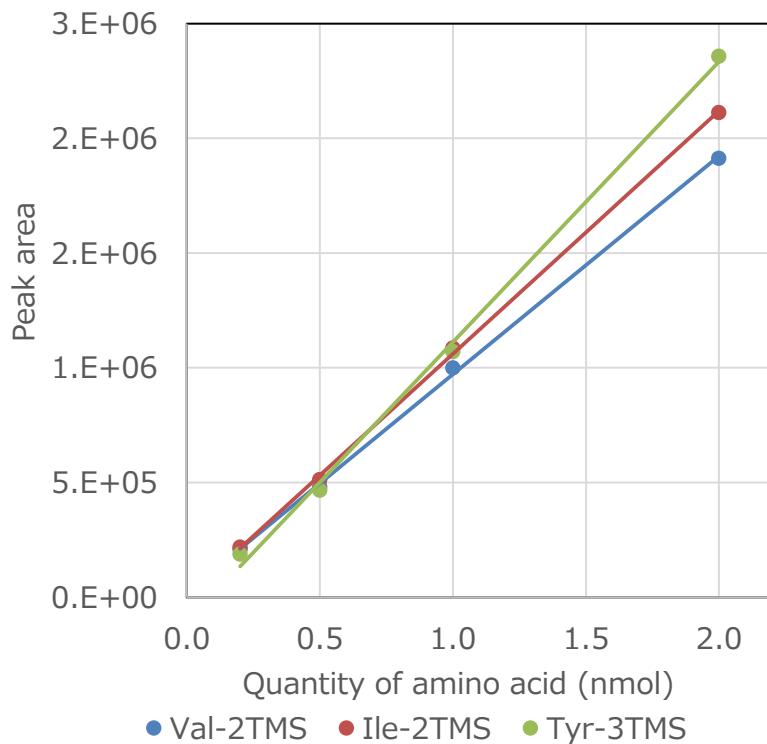
2. Arabinose-4TMS
6. Fructose2-5TMS
10. Sucrose-8TMS

3. Rhamnose-4TMS
7. Mannose-5TMS
11. Lactose-8TMS

4. Fucose-4TMS
8. Galactose-5TMS
12. Maltose-8TMS

SCANトータルイオンクロマトグラム

CX固相誘導体化前処理法（アミノ酸）の評価



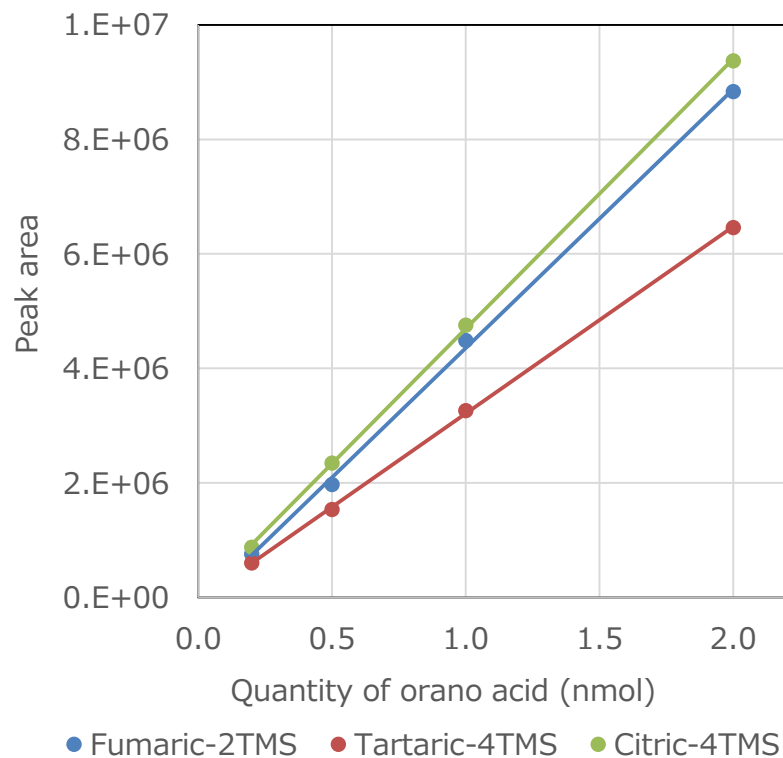
アミノ酸量とピーク面積値の関係

直線性 (R2) と再現性 (RSD, n=6)

No.	Amino acid	R2	RSD n=6, %
1	Ala-2TMS	0.9996	7.4
2	Gly-2TMS	0.9958	13.1
3	Val-2TMS	0.9993	7.5
4	Leu-2TMS	0.9992	6.7
5	Ile-2TMS	0.9995	6.2
6	Pro-2TMS	0.9982	12.5
7	Ser-3TMS	0.9988	5.5
8	Thr-3TMS	0.9990	4.7
9	Asp-3TMS	0.9989	4.9
10	Met-2TMS	0.9991	7.5
11	Glt-3TMS	0.9911	8.8
12	Phe-2TMS	0.9996	5.6
13	Lys-3TMS	0.9927	32.2
14	Tyr-3TMS	0.9977	4.8
15	Cys-4TMS	0.9950	29.2

AX固相誘導体化前処理法（有機酸）の評価

直線性（R²）と再現性（RSD, n=6）

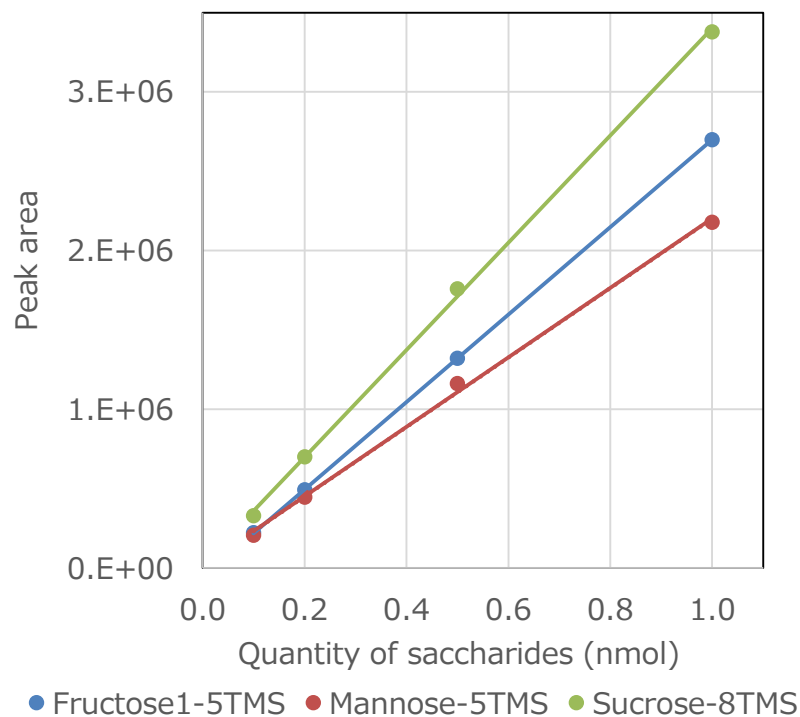


有機酸量とピーク面積値の関係

No.	Organic acid	R2	RSD
			n=6, %
1	Pyruvate-2TMS	0.9998	15.1
2	Oxalic-2TMS	0.9946	6.2
3	Maleic-2TMS	0.9991	1.8
4	Succinic-2TMS	0.9588	22.0
5	Fumaric-2TMS	0.9991	2.2
6	Malic-3TMS	0.9997	2.1
7	Tartaric-4TMS	0.9998	1.9
8	Citric-4TMS	0.9998	2.5

AX固相誘導体化前処理法（糖類）の評価

直線性（R2）と再現性（RSD, n=6）



糖類量とピーク面積値の関係

No.	Saccharides	R2	RSD
			n=6, %
1	Xylose-4TMS	0.9998	5.4
2	Arabinose-4TMS	0.9996	7.5
3	Rhamnose-4TMS	0.9974	10.8
4	Fucose-4TMS	0.9988	9.8
5	Fructose1-5TMS	1.0000	3.3
6	Fructose2-5TMS	0.9998	3.2
7	Mannose-5TMS	0.9982	2.5
8	Galactose-5TMS	0.9995	1.8
9	Glucose-5TMS	0.9778	2.3
10	Sucrose-8TMS	0.9993	2.9
11	Lactose-8TMS	0.9997	7.2
12	Maltose-8TMS	0.9999	6.5