

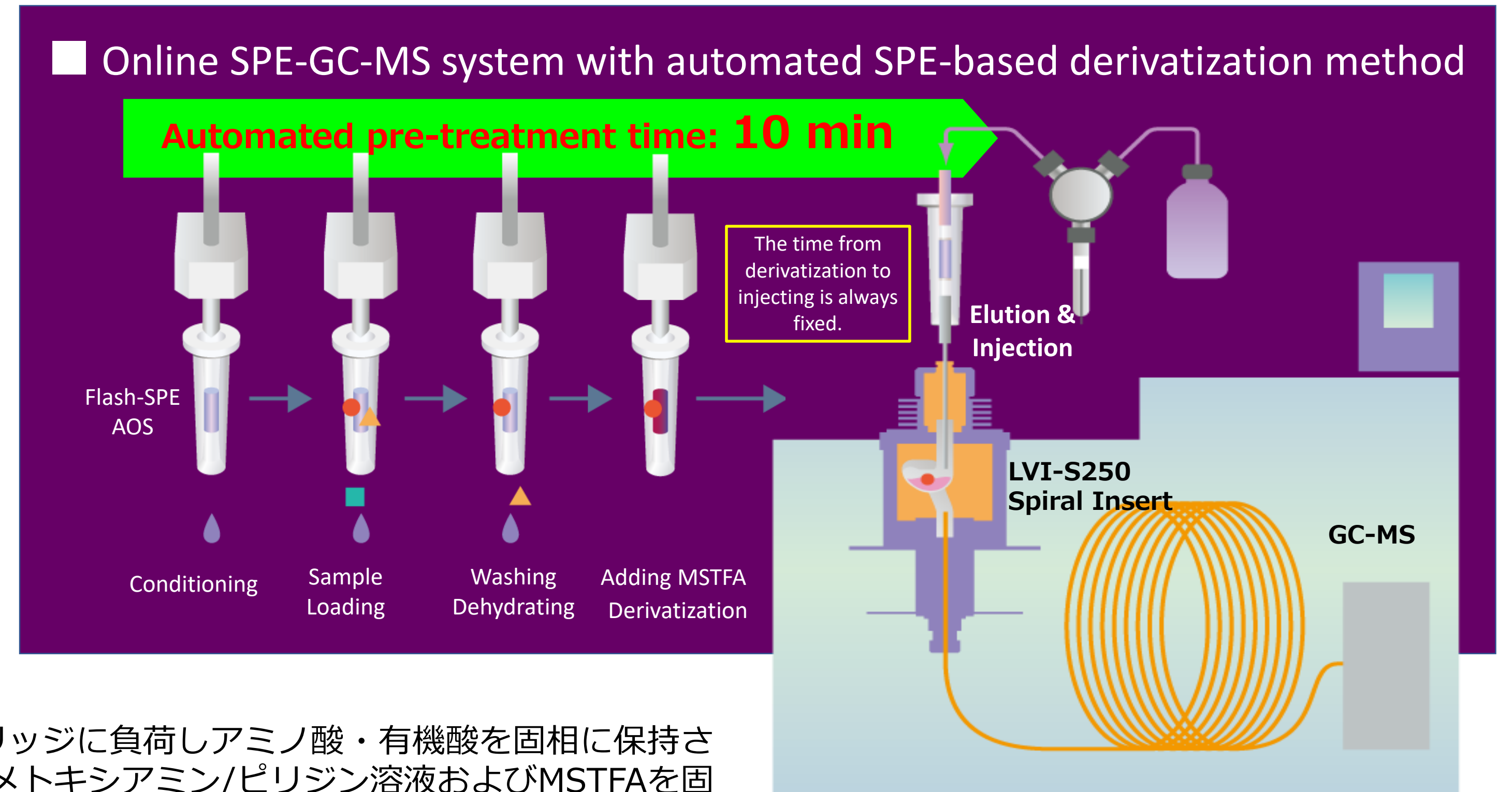
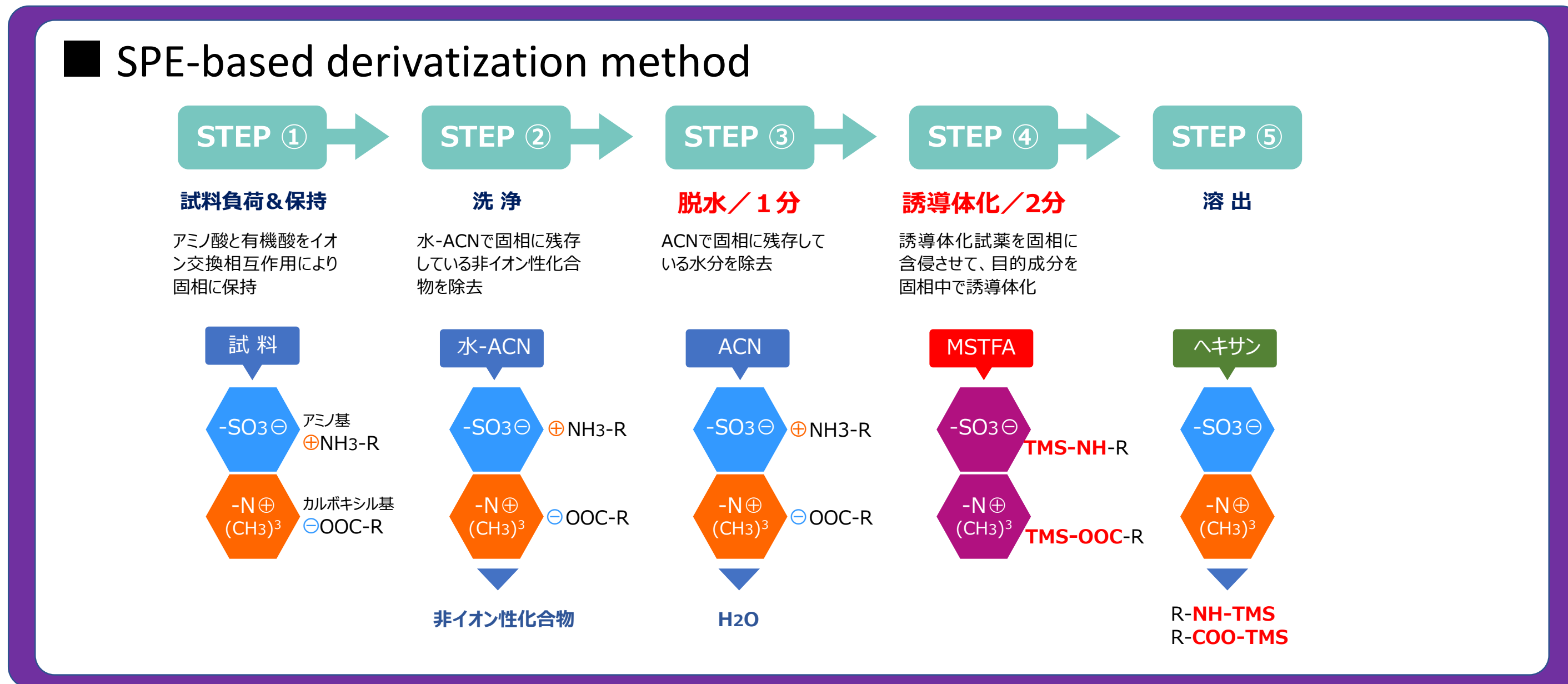
メタボローム解析に資する固相誘導体化法を用いた オンラインSPE-GC-MSの開発

○佐々野僚一¹、古野正浩²、大森一生³、山本裕一³、片上直人³、下村伊一郎³、福崎英一郎^{2,4}
(¹アイスティサイエンス, ²阪大院・工, ³阪大院・医, ⁴AMED-CREST)

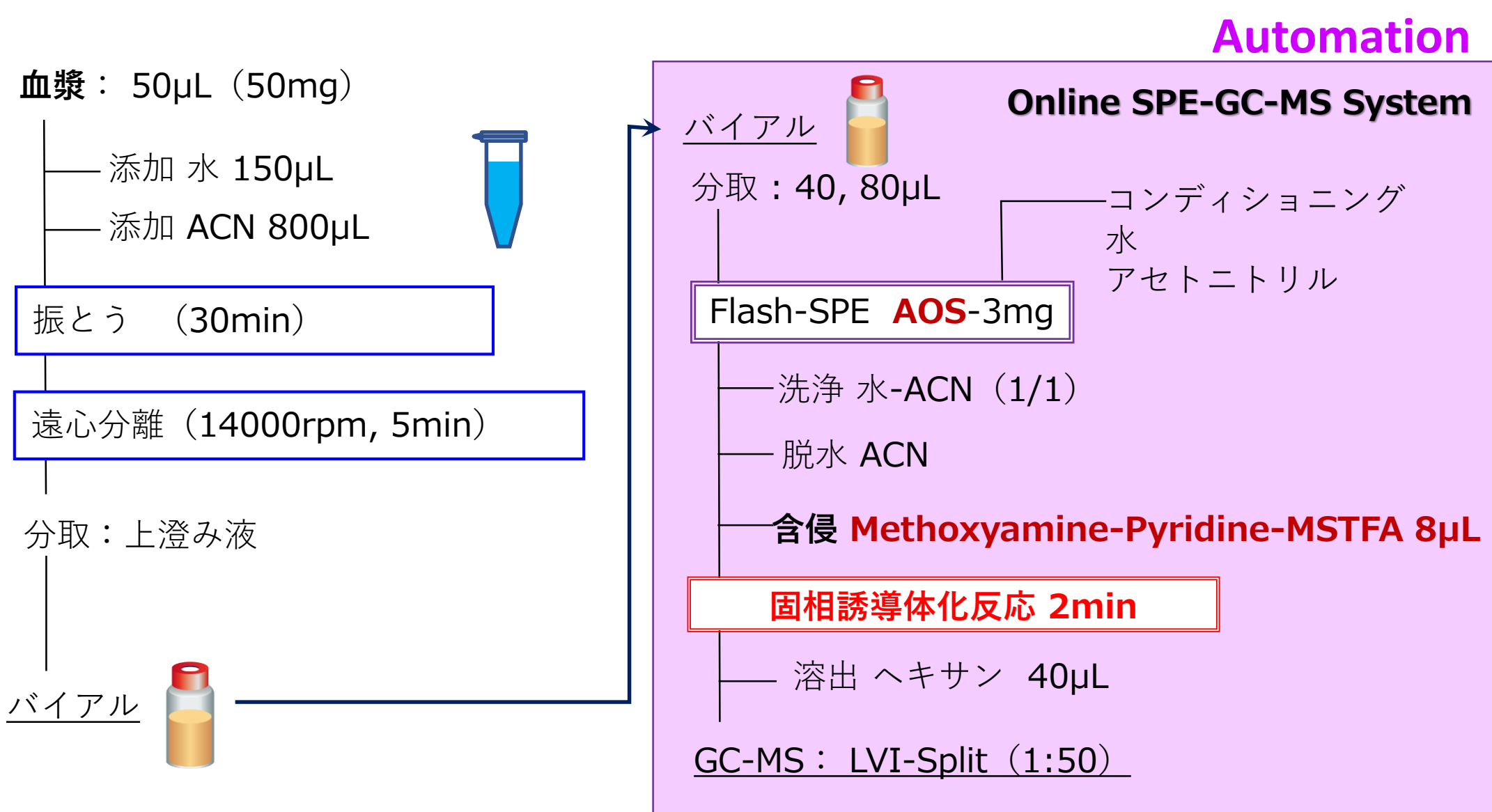
【Abstract】

従来のメタボローム分析は、採取した試料を溶媒抽出、遠心濃縮、凍結乾燥、誘導体化等の前処理工程が煩雑であるため、長時間を要するとともに熟練された技術が必須となる。また、多検体の前処理をバッチ処理した場合、GC-MSでの測定はそれらの検体を順次測定していくため、それらの検体において誘導体化後から測定までの時間が異なってしまう。これらは分析バッチ間の系統誤差の要因となり、多サンプルのメタボローム解析を遂行する上で致命的な短所である。そこで、本研究では、迅速な自動誘導体化とその誘導体化からGCMSへの直接試料導入を目指して、アミノ酸・有機酸の固相誘導体化法を用いたオンラインSPE-GC-MSシステムの開発を行ったので報告する。

【Experimental】

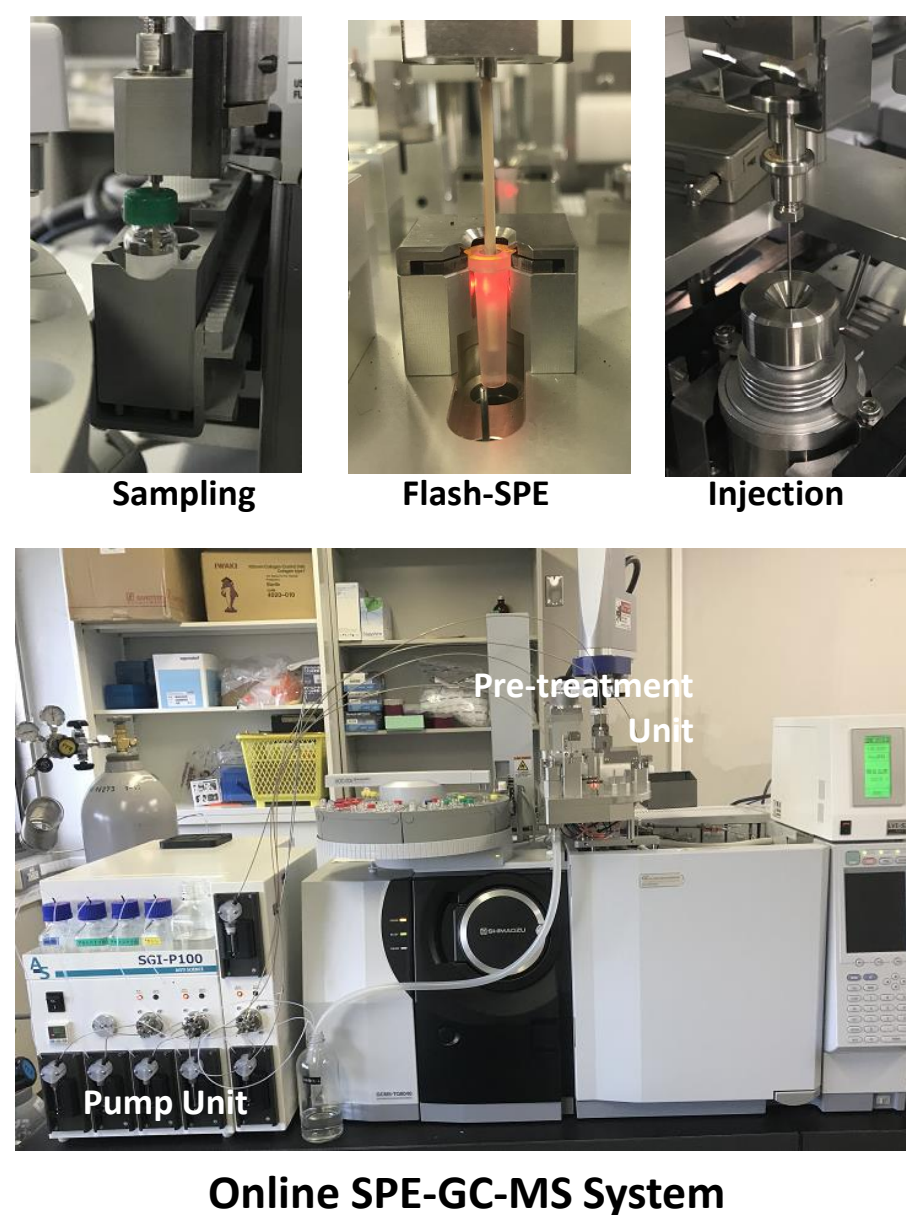


開発したオンライン固相誘導体化SPE-GC-MSシステムを用いて、抽出した試料を固相抽出カートリッジに負荷しアミノ酸・有機酸を固相に保持させた。そして、アセトニトリル水で洗浄後、固相に残存している水をアセトニトリルで除去した。メトキシアミン/ピリジン溶液およびMSTFAを固相カートリッジに適宜直接添加し、固相にそれぞれの誘導体化試薬を浸漬させて、固相上で誘導体化反応させ、アミノ酸および有機酸をTMS化した。その固相カートリッジにニードルを連結し、注入口へ挿入した。そして、固相から脱離したTMS化誘導体化物をヘキサンで溶出しながら、そのまま肩袋型インサートを備えた大量注入口装置に直接注入し、GC-MSにて測定した。

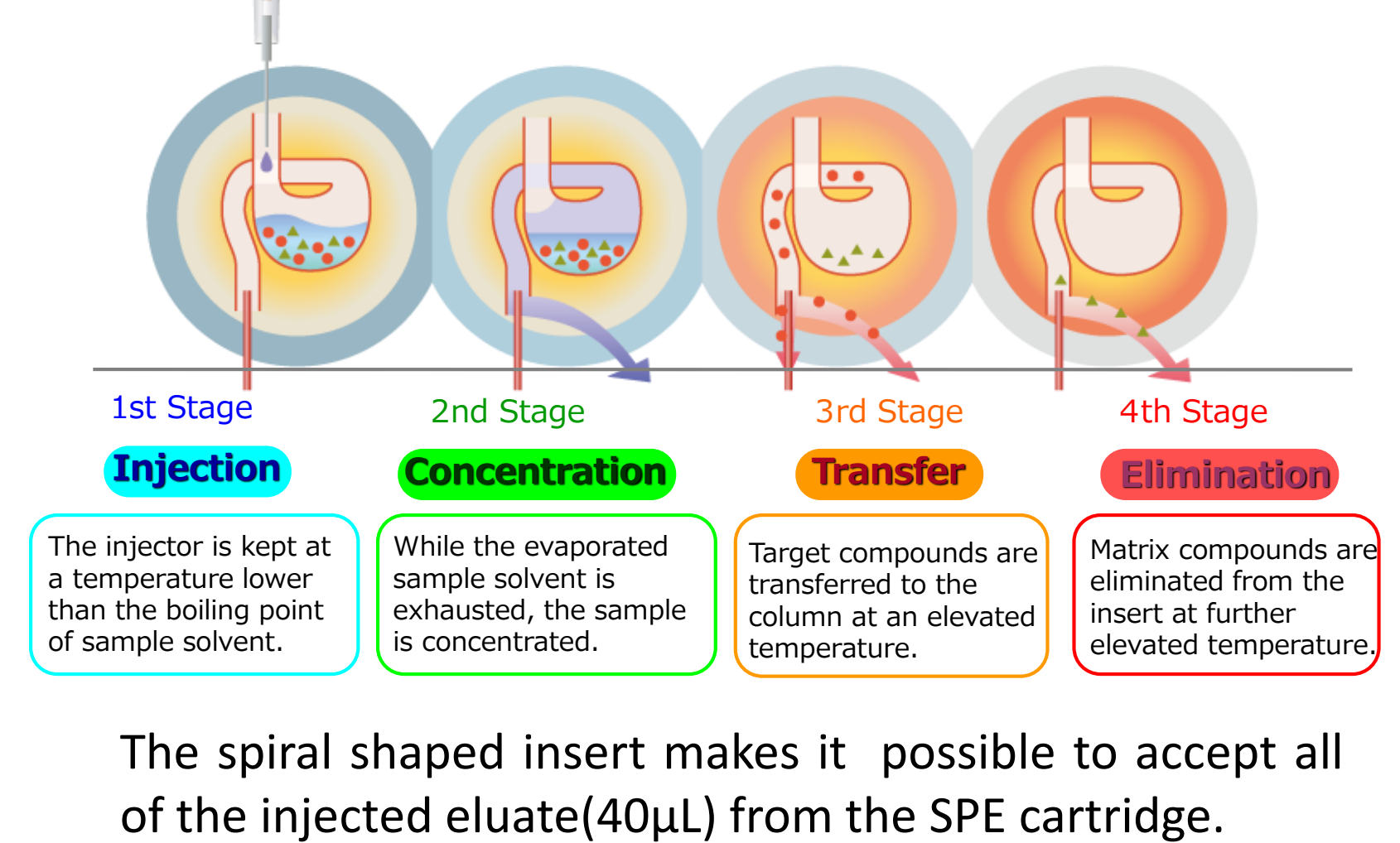


Condition of SPE-GC-MS System

SPE-GC Interface	SGI-M100; AiSTI Science
SPE Cartridge	Flash-SPE AOS; AiSTI Science
PTV Injector	LVI-S250(AiSTI Science)
Insert Type	Spiral Insert
Injector Temp.	80°C(0.1min)-50°C/min-290°C
GC/MS	GC2010 Plus
Inlet Mode	Split
Split Flow	50mL/min
Flow Mode	Constant Flow, 1.1mL/min
Column	InertCap-5ms/NP, 0.25mm i.d. X 30m, df.0.25µm
Oven Temp.	80°C(2min)-15°C/min-250°C-20°C/min-310°C
Trans. Line Temp.	290°C
MS	TQ8040
Ion Source Temp.	230°C
MS Method	SCAN, m/z:70-470



Large Volume Injection-Split mode



【Results】

スタンダードによる評価

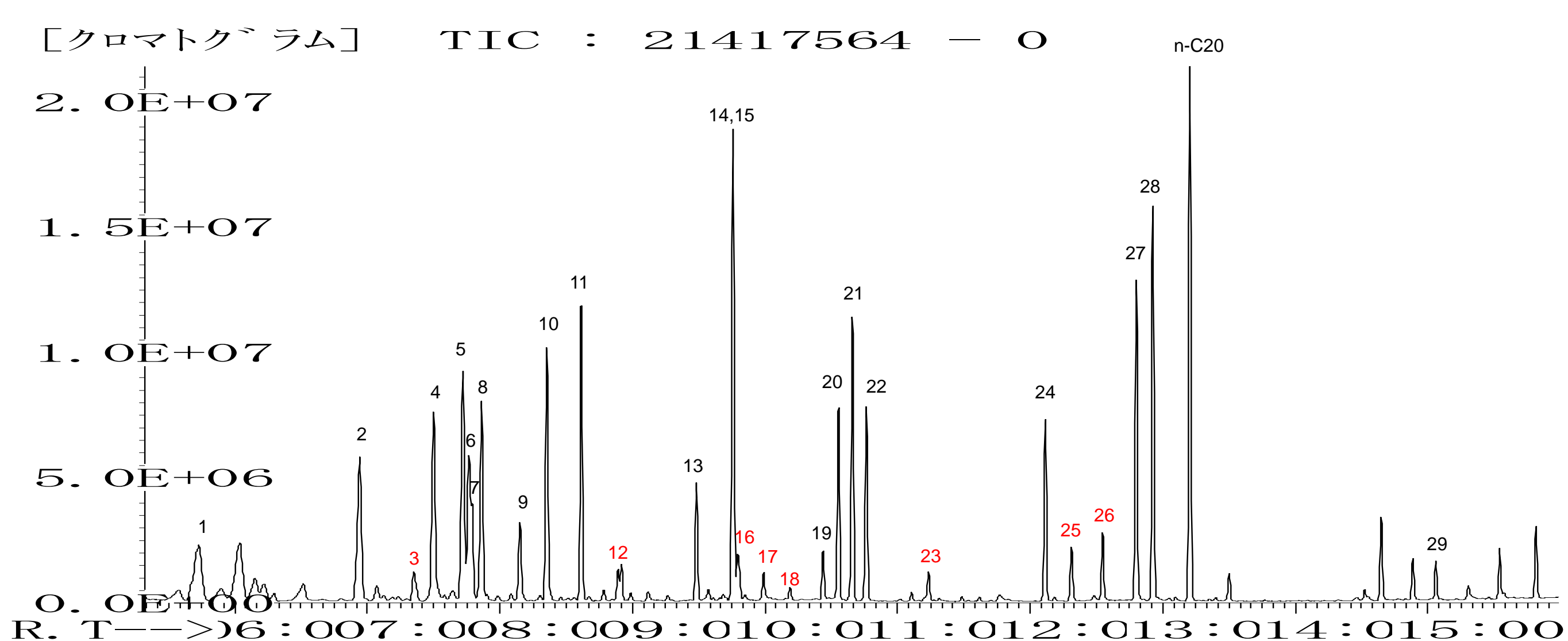
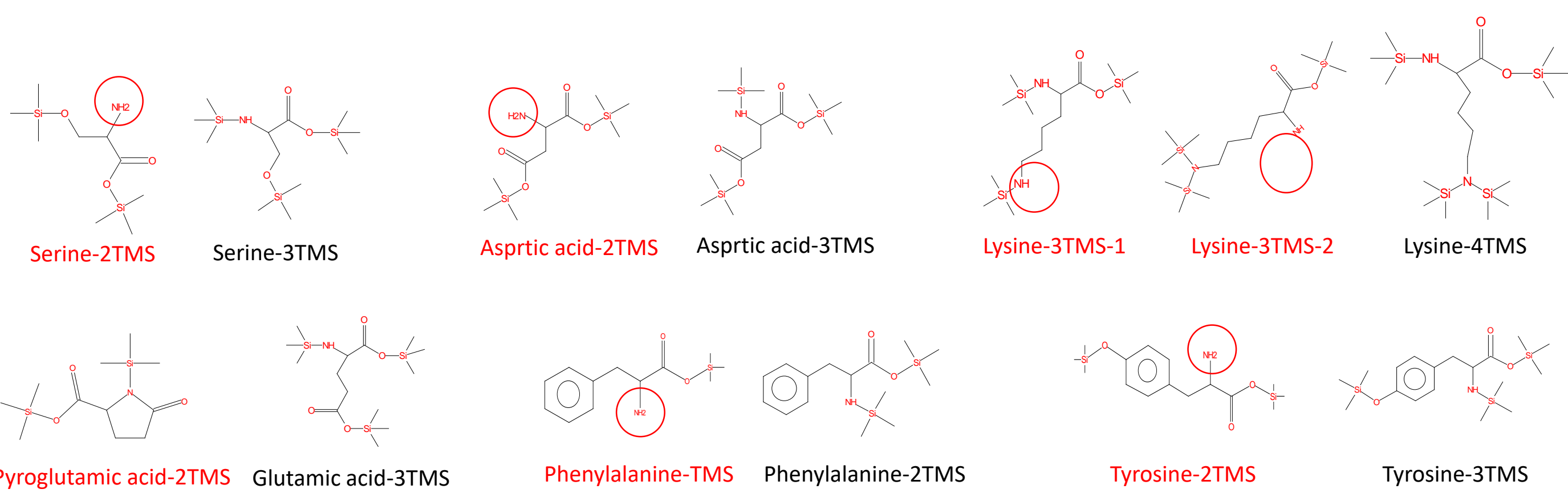


Fig. 1. The SCAN total ion chromatogram of standard solution using SPE-GC-MS system with automated SPE-based derivatization method. * Concentration of standard solution is 0.01, 0.02nmol/µL



ヒト血漿による評価

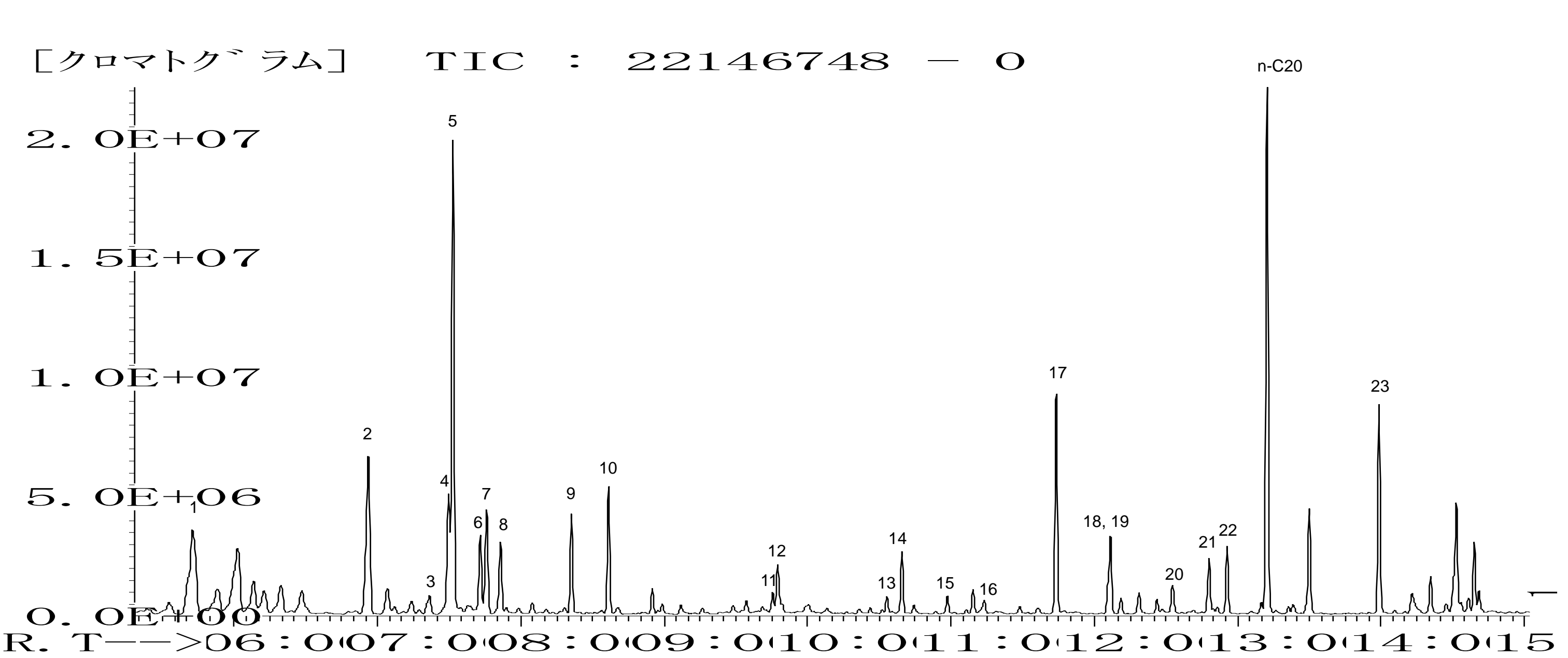


Fig. 2. The SCAN total ion chromatogram of the human plasma using SPE-GC-MS system with automated SPE-based derivatization method.

◆ Reproducibility

Table 1. Reproducibility of peak area with the human plasma using SPE-GC-MS system.

No.	化合物名	R.T.	1	2	3	4	5	6	Ave.	R.S.D. (%)
1	Alanine-2TMS	5.74	8,633,301	8,424,530	8,470,442	8,813,727	9,000,933	8,769,671	8,685,434	2.5
2	Valine-2TMS	6.95	8,416,978	8,354,932	8,527,405	8,622,590	8,842,365	8,580,669	8,597,490	2.0
3	Serine-2TMS	7.35	146,333	254,431	241,331	247,570	243,287	192,714	220,944	19.3
4	Leucine-2TMS	7.50	5,688,755	5,589,834	5,633,904	5,673,684	5,763,540	5,741,602	5,681,887	1.1
5	Phosphate-3TMS	7.54	1,532,993	1,374,189	1,444,839	1,563,735	1,600,848	1,617,307	1,522,319	6.2
6	Isoleucine-2TMS	7.72	2,893,660	2,826,312	2,853,509	2,861,420	2,926,974	2,929,822	2,881,950	1.5
7	Proline-2TMS	7.77	5,780,501	5,087,064	5,391,122	5,448,195	5,542,415	5,852,003	5,516,883	5.0
8	Maleic acid-2TMS	7.77	566,106	468,276	387,623	472,954	524,265	566,714	497,656	13.8
9	Glycine-3TMS	7.87	2,248,062	2,384,697	3,029,933	3,119,386	3,536,835	2,521,247	2,806,693	17.8
10	Fumaric acid-2TMS	8.15	24,420	26,859	25,862	26,281	22,541	24,200	25,027	6.4
11	Serine-3TMS	8.35	1,769,507	1,699,878	1,864,172	1,887,997	1,928,784	1,787,516	1,822,976	4.7
12	Threonine-3TMS	8.61	2,470,842	2,278,645	2,442,888	2,499,770	2,509,920	2,609,086	2,468,525	4.4
13	Malic acid-3TMS	9.48	19,975	23,841	22,395	23,854	21,072	25,435	22,762	8.8
14	Aspartic acid-3TMS	9.75	34,422	48,544	47,229	48,877	50,015	40,601	44,948	13.7
15	Methionine-2TMS	9.75	411,457	382,171	386,590	383,151	394,254	392,280	391,651	2.8
16	Pyroglutamic acid-2TMS	9.79	162,195	396,507	474,141	442,799	460,530	162,295	349,745	42.2
17	Phenylalanine-2TMS	9.99	218,821	300,892	279,601	307,866	298,277	251,776	276,206	12.5
18	Ketoglutaric acid-3TMS	10.43	119,904	124,052	109,443	118,173	101,578	111,507	114,110	7.2
19	Glutamic acid-3TMS	10.55	334,862	529,574	564,421	517,106	535,416	396,173	479,592	19.1
20	Phenylalanine-2TMS	10.65	1,208,420	1,151,445	1,120,208	1,147,962	1,155,375	1,164,611	1,158,004	2.5
21	Asparagine-3TMS	10.97	198,094	144,522	162,130	170,311	173,873	218,463	177,899	14.9
22	Lysine-3TMS-1	11.23	130,569	117,629	113,932	78,295	104,046	99,993	107,411	16.6
23	Glutamine-3TMS	11.73	4,980,285	2,520,597	1,291,832	2,649,685	5,422,322	3,430,607	4,037,282	40.4
24	Ornithine-4TMS	12.09	556,511	358,171	429,547	426,076	473,842	538,421	463,761	16.1
25	Citric acid-4TMS	12.11	278,401	237,903	272,095	287,352	279,074	297,215	275,340	7.4
26	Lysine-3TMS-2	12.31	545,928	471,612	581,221	708,622	708,732	523,934	590,008	16.7
27	Tyrosine-2TMS	12.54	913,515	1,004,181	1,095,639	1,303,850	1,193,180	929,328	1,073,282	14.4
28	Lysine-4TMS	12.79	857,715	589,052	656,856	623,750	722,892	879,955	721,703	17.0
29	Tyrosine-3TMS	12.92	1,964,130	1,887,541	1,773,845	1,584,446	1,816,129	2,058,909	1,847,500	8.9
30	Uric acid-4TMS	13.98	2,992,906	2,950,917	2,078,402	1,682,566	2,155,709	2,706,284	2,427,797	22.0
31	n-C20 (指標)	13.20	10,622,488	10,021,339	10,057,308	10,073,109	10,115,937	10,776,483	10,277,777	3.2

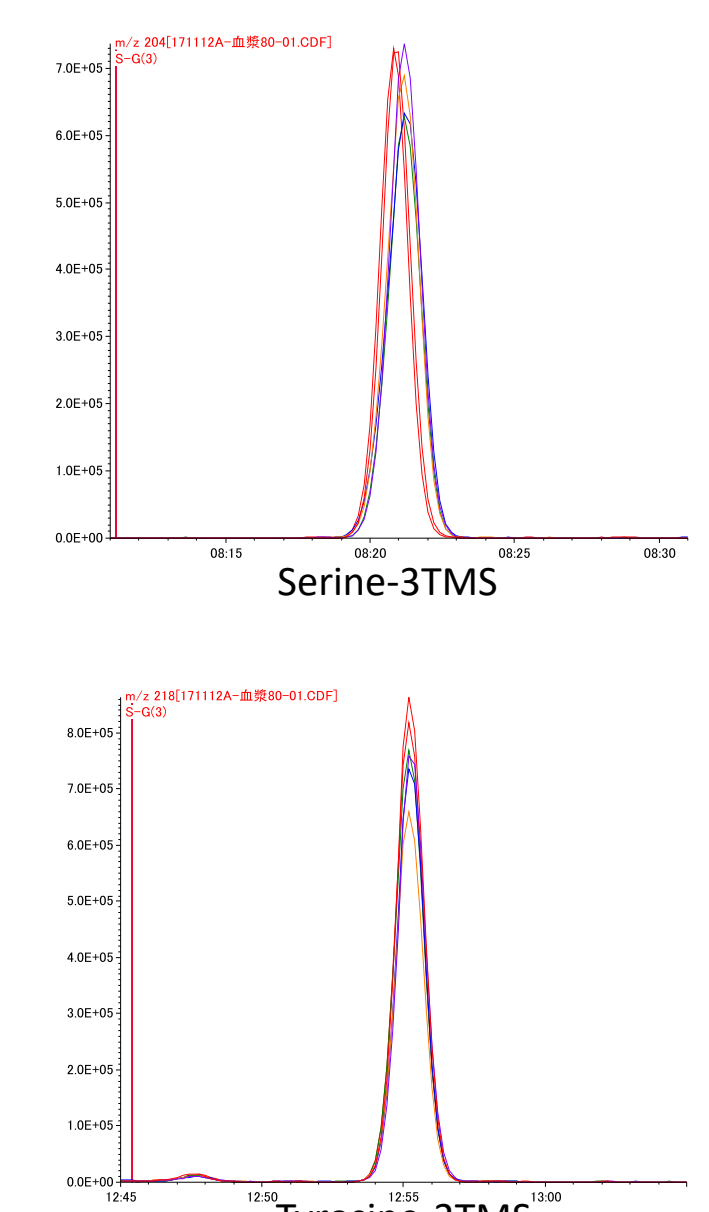


Fig. 3. Reproducibility of ion chromatogram of the human plasma using SPE-GC-MS system (n = 6).

【Conclusion】

本システムによる抽出後の前処理時間は10分だった。本システムを用いて、スタンダードおよび血漿による再現性を評価したところ、共に良好な結果を得た。開発したオンライン自動固相誘導体化SPE-GC-MSシステムはメタボローム分析に有効であることがわかった。