

オンライン固相誘導体化SPE-GC/MSによる マウス血清の分析の評価

はじめに

従来のメタボロームにおけるGC/MS分析において、抽出・凍結乾燥・誘導体化に煩雑かつ長時間を要し得られるデータのばらつきも大きい傾向があった。そこで当社は独自技術「**固相誘導体化**」により劇的に時短・簡易・高精度を実現した。代謝物等をイオン交換相互作用で固相に保持し、アセトニトリルで通液することで脱水・洗浄効果が得られ、その後、**固相に保持状態で誘導体化試薬**を含浸させることで誘導体化し溶出液をGC/MSで測定する。今回はこれらの工程を完全自動化したシステムSGI-M100を用いマウス血清の代謝物分析を試みた。

前処理フロー

試料採取 50 μ L マウス血清

添加 水 150 μ L

添加 ACN 800 μ L

振とう 37 $^{\circ}$ C, 30 min

遠心分離 14000 rpm, 3 min

分取 上澄液 500 μ L

添加 水 500 μ L

添加 0.1N NaOH

抽出上澄液

オンライン固相誘導体化SPE-GC : SGI-M100

バイアル

Automation

前処理 : 15分

Flash-SPE ACXs

コンディショニング
ACN-水(1/1)
ACN

負荷[保持] 抽出上澄液 50 μ L 分取

洗浄 ACN-水(1/1)

脱水 ACN

含浸 メトキシアミン/ピリジン

固相誘導体化反応 メトキシム化, 3 min

含浸 MSTFA-Toluene(3/1)

固相誘導体化反応 TMS化, 1 min

溶出 ヘキサン

GC-MS スプリット 1:50

測定条件

PTV Injector LVI-S250 (AiSTI Science)

Insert Type Spiral Insert

Injector Temp. 220 $^{\circ}$ C(0.5min)-50 $^{\circ}$ C/min-290 $^{\circ}$ C(16min)

GC-MS

Inlet Mode Split 1:50

Flow Mode Constant Flow, 1 ml/min

Pre-Column 0.25mm i.d. x 1m

Column VF-5ms, 0.25mm i.d. x 30m, df;0.25 μ m

Oven Temp. 100 $^{\circ}$ C(2min)-10 $^{\circ}$ C/min-220 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C/min-320 $^{\circ}$ C

Trans. Temp. 290 $^{\circ}$ C

MS Method SCAN, m/z;70-470



メタボローム分析用SPE-GC-MSシステム

SGI-M100 / GCMS-TQ8040NX

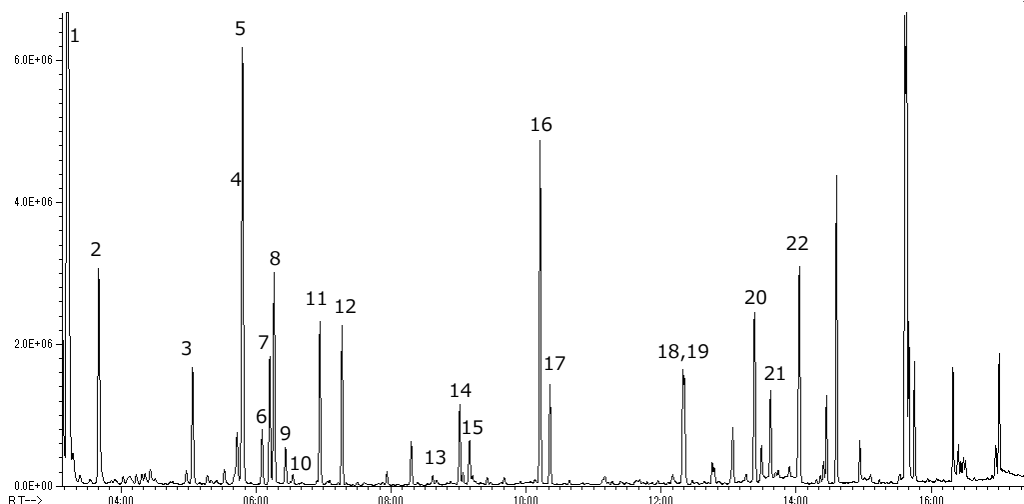


図1 本法によるマウス血清のSCANトータルイオンクロマトグラム



SGI-M100
for SPE-GC system

Sample



マウス血清

Information

【試料】

・マウス血清

【対象成分】

・アミノ酸
・アミン
・有機酸

AiSTI SCIENCE

Product

オンラインSPE-GC
SGI-M100

固相カートリッジ
Flash-SPE

GC大量注入装置
LVI-S250

株式会社アイスティサイエンス

TEL: 073-475-0033

E-mail : as@aisti.co.jp

www.aisti.co.jp

AiSTI Application Note

表1 本システムによるマウス血清の添加回収試験

No.	成分名	Standard	操作Blank	マウス血清	マウス血清 + ST	回収率,% (A-M)/(ST-B)
		ST	B	M	A	
1	Lactic acid-2TMS	2,641,331	2,044,267	14,805,790	11,895,241	-
2	Alanine-2TMS	2,526,424	84,451	4,971,432	6,847,093	77
6	Valine-2TMS	3,223,917	8,177	2,224,994	5,182,605	92
9	Leucine-2TMS	3,806,169	9,760	3,940,497	7,217,079	86
10	Isoleucine-2TMS	3,483,014	5,009	958,681	4,444,077	100
11	Proline-2TMS	3,349,273	6,613	3,008,108	5,928,827	87
12	Glycine-3TMS	2,822,020	38,903	3,192,716	5,175,424	71
14	Succinic acid-2TMS	5,442,569	51,260	607,407	6,159,930	103
15	Fumaric acid-2TMS	1,886,256	3,365	11,533	1,967,128	104
16	Serine-3TMS	1,763,290	19,550	1,451,277	3,032,036	91
17	Threonine-3TMS	584,437	2,454	484,176	957,064	81
18	Malic acid-3TMS	610,728	1,773	18,302	629,151	100
20	Aspartic acid-3TMS	2,929,674	5,116	784,543	3,822,406	104
21	Methionine-2TMS	321,403	1,578	77,627	321,294	76
22	4-Hydroxyproline-3TMS	2,400,683	122	54,733	1,997,473	81
23	GABA-3TMS	808,381	5,804	9,875	776,441	96
25	Threonic acid-4TMS	331,448	417	27,125	202,330	53
27	Glutamic acid-3TMS	2,350,172	2,555	3,437,586	6,150,075	116
28	Phenylalanine-2TMS	1,457,813	1,404	690,541	2,098,341	97
31	Putrescine-4TMS	4,356,542	1,610	9,512	4,597,459	105
33	Citric acid-4TMS	911,581	660	216,437	1,160,422	104
36	Lysine-4TMS	1,587,702	1,259	940,190	2,675,748	109
37	Histidine-3TMS	2,194,472		10,446	3,240,581	147
38	Tyrosine-3TMS	4,650,501	1,959	1,175,034	5,939,201	102
41	Tryptophan-3TMS	230,794	0	29,096	398,017	160
43	Cystine-4TMS	2,142,088	0	14,728	2,196,172	102

表2 本システムによるマウス血清の再現性

No.	成分名	U1	U2	U3	U4	U5	Ave.	RSD,%
1	Lactic acid-2TMS	14,649,682	15,089,600	13,841,394	15,639,698	14,808,578	14,805,790	4.4
2	Alanine-2TMS	5,118,252	4,719,988	4,790,287	5,126,762	5,101,869	4,971,432	4.0
6	Valine-2TMS	2,261,504	2,125,119	2,152,889	2,285,552	2,299,904	2,224,994	3.6
9	Leucine-2TMS	4,005,604	3,817,067	3,780,734	4,039,212	4,059,866	3,940,497	3.3
10	Isoleucine-2TMS	971,384	928,534	931,475	980,243	981,767	958,681	2.8
11	Proline-2TMS	3,078,401	2,818,958	2,910,867	3,100,657	3,131,659	3,008,108	4.5
12	Glycine-3TMS	3,243,322	2,973,200	3,083,005	3,312,366	3,351,687	3,192,716	5.0
14	Succinic acid-2TMS	609,722	610,940	585,493	627,168	603,713	607,407	2.5
15	Fumaric acid-2TMS	11,626	11,149	10,691	11,947	12,254	11,533	5.4
16	Serine-3TMS	1,466,003	1,327,848	1,366,049	1,533,536	1,562,951	1,451,277	7.1
17	Threonine-3TMS	497,778	441,900	461,299	506,740	513,163	484,176	6.4
18	Malic acid-3TMS	19,076	18,062	17,173	18,728	18,470	18,302	4.0
20	Aspartic acid-3TMS	745,837	821,214	711,854	825,260	818,549	784,543	6.7
21	Methionine-2TMS	71,255	66,983	76,059	92,889	80,950	77,627	12.9
22	4-Hydroxyproline-3TMS	54,583	47,943	51,238	58,569	61,333	54,733	9.9
23	GABA-3TMS	10,265	8,742	9,675	10,265	10,430	9,875	7.0
25	Threonic acid-4TMS	28,177	28,501	22,545	29,638	26,765	27,125	10.2
27	Glutamic acid-3TMS	3,365,311	3,486,693	3,156,198	3,603,886	3,575,843	3,437,586	5.3
28	Phenylalanine-2TMS	682,545	669,938	666,324	718,207	715,692	690,541	3.6
31	Putrescine-4TMS	9,970	9,716	9,256	8,922	9,694	9,512	4.4
33	Citric acid-4TMS	212,800	218,960	209,116	224,337	216,971	216,437	2.7
36	Lysine-4TMS	926,298	906,996	922,350	974,013	971,295	940,190	3.2
37	Histidine-3TMS	10,802	9,595	9,636	10,237	11,959	10,446	9.4
38	Tyrosine-3TMS	1,192,371	1,093,010	1,123,091	1,241,557	1,225,141	1,175,034	5.5
41	Tryptophan-3TMS	29,187	29,591	28,393	29,027	29,282	29,096	1.5
43	Cystine-4TMS	15,113	14,209	13,349	15,634	15,333	14,728	6.4

【結果と考察】各成分のRSD. (再現性)は13%未満となり高精度といえる。また、26成分中22成分で添加回収率が70~120%、残る4成分も50~200%に収まった。TICではピーク形状および分離も良好であった。これらの結果から固相抽出による洗浄・脱水が機能的に働き、固相内で効率的に誘導体化が行われている事が推察できる。脂質等が多く含まれるサンプルでも良好な結果が得られた事からGC/MSメンテナンス労力の軽減となる。当分析法は固相誘導体化により精度の向上や時間短縮という効果が得られ、自動化による効率化も見込める。弱点だった前処理の煩雑・長時間を克服したことでGC/MSのメリットである高分離・高い定性能力・データベースの充実などを最大限に生かせる手法となると考えられ、今後の生体試料中の代謝物分析への適用に期待できる。