

演題 GC/MS 基盤メタボローム分析に資する誘導体化法の検討

大崎秀介 1* 松本明弘 1 佐々野僚一 2 馬場健史 3 山下俊幸 4 福崎英一郎 4

1. 和歌山県工技セ 2.(株)アイスティサイエンス 3.九大・生医研 4.阪大・工

セッション/計測技術・融合領域 ポスター発表

[緒言] 一般的なGC-MS基盤メタボローム分析では、GC/MS注入に先立ち、溶媒抽出、遠心濃縮、凍結乾燥、誘導体化等の多段階の前処理が必要であり、長時間にわたる煩雑な操作を伴うため、時として除去不能の系統誤差が含まれる。当該問題解決のために、我々は、固相カートリッジ中の充填剤に検体を濃縮・保持した状態で行う誘導体化反応を検討した。結果として、従来のメタボローム分析における煩雑な操作を必要としないGC/MS分析を開発した¹⁾。本発表では、従来までの溶液での誘導体化法と本法を比較することで、その有用性を検証したので報告する。

[実験] 測定装置として、大量注入口装置 (LVI-S200, (株)アイスティサイエンス製) を備えたGC/MS (GC: 6890N, Agilent製、MS: K-9, JEOL製) を用いた。また、種々のアミノ酸と有機酸を任意濃度の水溶液に調製し、測定試料とした。固相カートリッジには、(株)アイスティサイエンス製の強イオン交換作用の固相抽出カートリッジ(アミノ酸: CXi3, 有機酸: AXi) を用いた。誘導体化法の手順は、固相カートリッジに水、アセトニトリルの順にコンディショニングした後に、試料溶液とアセトニトリルの混合溶液を通液した。その後、脱水のためにアセトニトリルを流し、*N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA)を固相上に直接添加することで誘導体化を行い、アセトン/ヘキサン混合溶液で溶出し測定溶液とした。

[結果] アミノ酸、有機酸に対し固相抽出用担体を用いた誘導体化法による GC/MS 測定を行った。その結果、トリメチルシリル(TMS)化された各化合物に由来するピークが再現性良く検出され、種々のアミノ酸、有機酸に対し従来の誘導体化法と同等のデータが取得可能であることが確認された。また、本法での誘導体化に必要な操作は約6分で完了するため、前処理に要する時間の大幅な効率化が可能となった。

1) R. Sasano et al., "Development of in-SPE derivatization Method for GC-MS Metabolome Analysis", *Metabolomics 2015 11th International Conference of the Metabolomics Society*, P-408, California, USA, 2015.

GC/MS基盤メタボローム分析に資する誘導体化法の検討

大崎 秀介^{1*} 松本 明弘¹ 佐々野 僚一² 馬場 健史³ 山下 俊幸⁴ 福崎 英一郎⁴

1. 和歌山県工技セ 2. (株)アイスティサイエンス 3. 九大・生医研 4. 阪大・工

目的

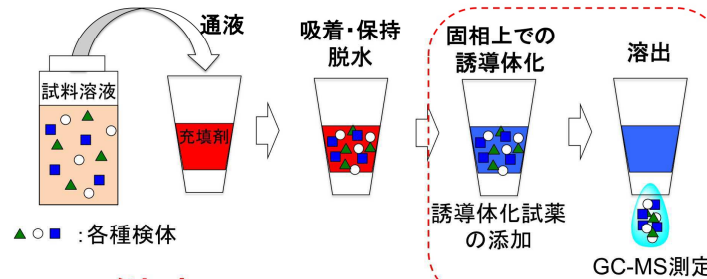
一般的なGC-MS基盤メタボローム分析では、GC/MS注入に先立ち、溶媒抽出、遠心濃縮、凍結乾燥、誘導体化等の多段階の前処理が必要であり、長時間にわたる煩雑な操作を伴うため、時として除去不能の系統誤差が含まれる。当該問題解決のために、我々は、固相カートリッジ中の充填剤に検体を濃縮・保持した状態で行う誘導体化反応を検討した。結果として、従来のメタボローム分析における煩雑な操作を必要としないGC/MS分析を開発した¹⁾。本発表では、従来の溶液での誘導体化法と本法を比較することで、その有用性を検証したので報告する。

1) R. Sasano et al., "Development of in-SPE derivatization Method for GC-MS Metabolome Analysis", *Metabolomics 2015 11th International Conference of the Metabolomics Society*, P-408, California, USA, 2015.

固相誘導体化法

・固相カートリッジに検体を保持した状態で、誘導体化(TMS化)反応を行う。

試料溶液を固相カートリッジに通液



メリット

- ・煩雑な操作が不要
- ・処理時間の短縮
- ・コンタミの低減
- ・系統誤差の抑制

水分除去・誘導体化反応

約 6 分

水分除去・誘導体化反応

約 19 時間

実験

・用いた試薬

固相カートリッジ (株)アイスティサイエンス製

・AiSTI-SPE CXI3: アニオン性充填剤 2 mg

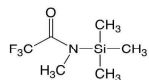


・AiSTI-SPE AXI3: カチオン性充填剤 2 mg



誘導体化試薬

N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA)



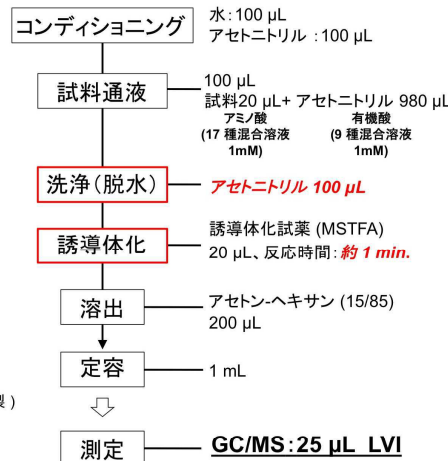
・測定条件



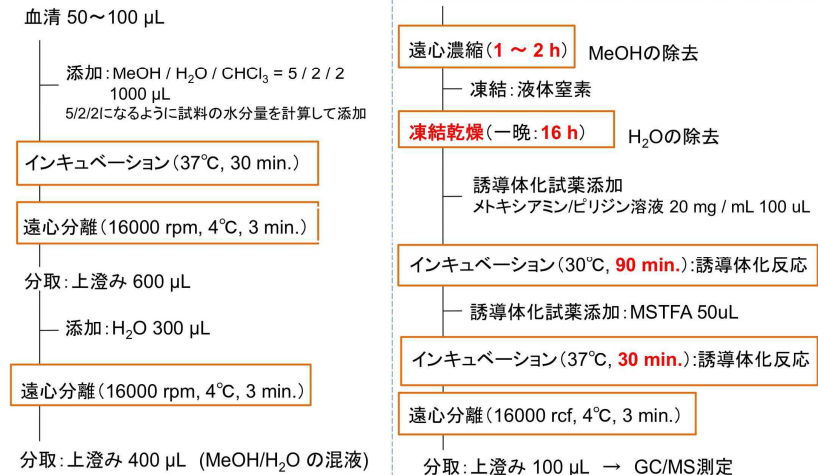
・GC (6890N, Agilent製)
カラム: DB-5MS (30m, 250µm, 0.25µm)
オープン: 60°C (5 min.) → 20°C/min. → 300°C (3 min.)
キャリアガス流量(He): 1.2 mL/min.

・MS (JMS K-9, JEOL製) ・LVI (LVI-S200, (株)アイスティサイエンス製)
イオン化: EI
イオン化電流: 200 µA
イオン化エネルギー: 70 eV
検出器電圧: -1100 Volt
イオン源温度: 250°C
GCITF温度: 260°C
注入量 25µL
温度
60°C (0.6 min.) → 120°C/min.
→ 240°C → 50°C/min.
→ 290°C (13 min.)

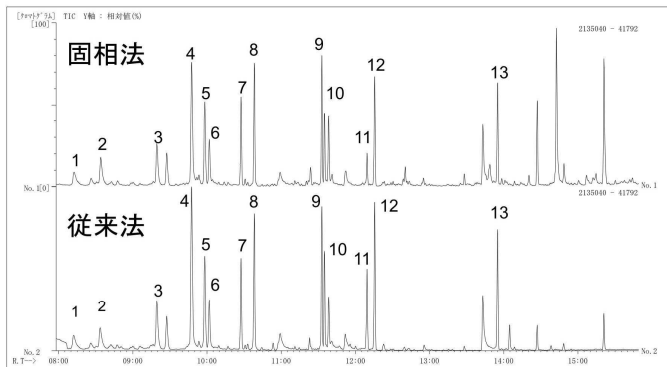
・前処理操作フロー



従来の誘導体化前処理法

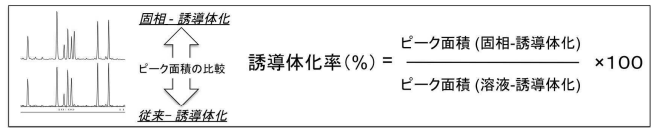
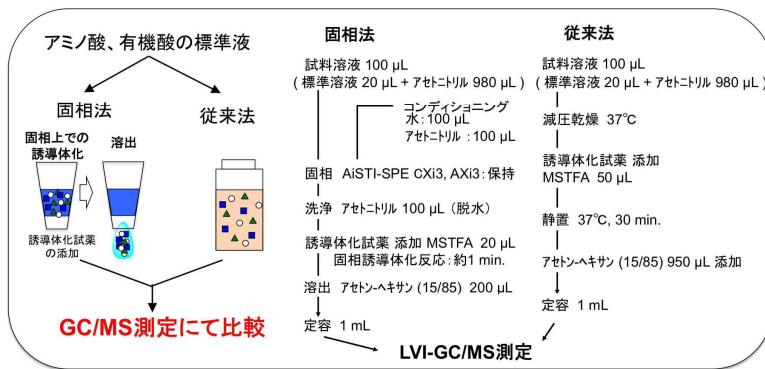


アミノ酸 - クロマトグラム

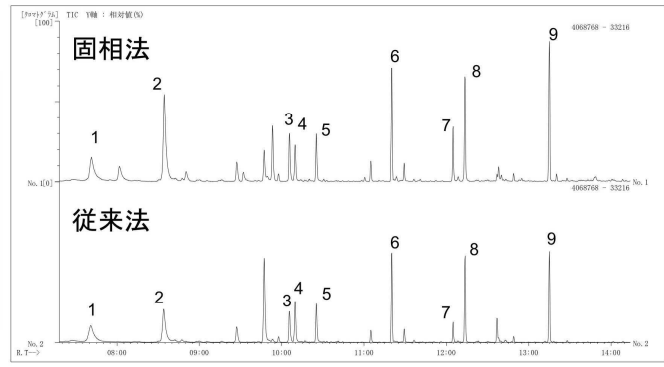


- 1. アラニン -2TMS 2. グリシン -3TMS 3. バリン -2TMS 4. ロイシン -2TMS
- 5. イソロイシン -2TMS 6. プロリン -2TMS 7. セリン -3TMS 8. トレオニン -3TMS
- 9. アスパラギン酸 -3TMS 10. メチオニン -3TMS 11. グルタミン酸 -3TMS 12. フェニルアラニン -2TMS
- 13. チロシン -3TMS

前処理方法の比較 (固相法 - 従来法)

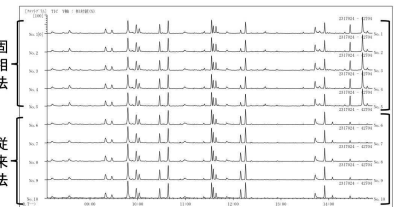


有機酸 - クロマトグラム



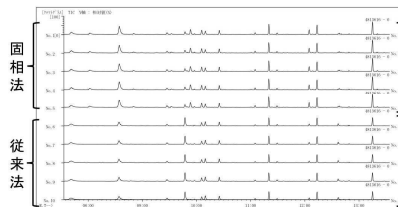
- 1. 乳酸 -2TMS 2. シュウ酸 -2TMS 3. マレイン酸 -2TMS 4. コハク酸 -2TMS
- 5. フマル酸 -2TMS 6. リンゴ酸 -3TMS 7. α-ケトグルタル酸 -2TMS 8. 酒石酸 -4TMS
- 9. クエン酸 -4TMS

再現性の確認 (アミノ酸)



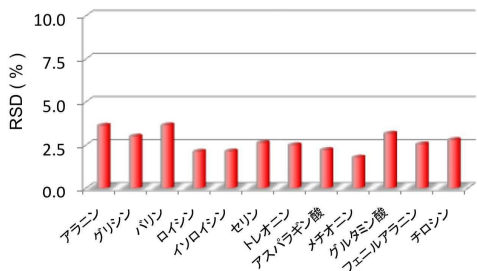
	アラニン	グリシン	バリン	ロイシン	イソロイシン	セリン	トレオニン	アスパラギン酸	メチオニン	グルタミン酸	フェニルアラニン	チロシン
固相法	1037384	1375755	1846549	4897688	2728938	2458696	3258757	2941972	1547764	800058	2731709	2416485
従来法	1166251	1535819	1951086	5116690	2966058	2615692	3513809	3149882	1651011	828143	2688370	2460084
平均	1223447	1542079	1964688	5162271	2862462	2657050	3606644	3204346	1609899	838197	2968781	2526702
RSD%	3.6	3.0	3.6	2.1	2.1	2.6	2.5	2.2	1.8	3.2	2.5	2.8
誘導体化率	109	126	91	83	94	104	94	93	78	39	79	83

再現性の確認 (有機酸)

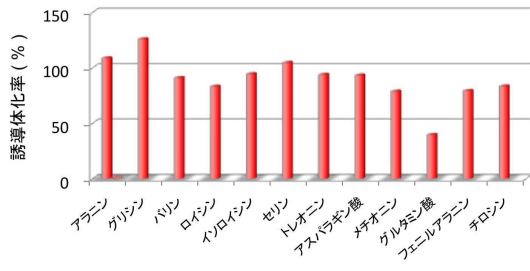


	乳酸	シュウ酸	マレイン酸	コハク酸	フマル酸	リンゴ酸	α-ケトグルタル酸	酒石酸	クエン酸
固相法	4315474	9305607	2666784	1971587	2368265	4425396	1506141	5037500	6645186
従来法	4191074	9309705	2675671	1961934	2334861	4518022	1514933	5097782	6739032
平均	4262167	9539917	2759900	2047038	2427915	4573539	1494670	5144555	6739545
RSD%	4.2	2.2	3.1	3.1	3.0	2.7	2.0	1.9	1.5
誘導体化率	111	197	124	91	108	115	198	124	150

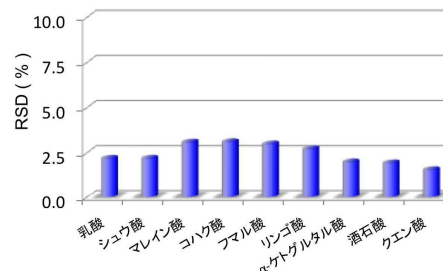
相対標準偏差 / 固相誘導体化



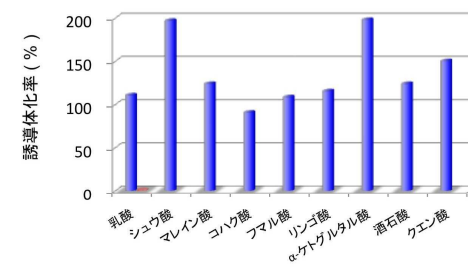
アミノ酸での誘導体化率



相対標準偏差 / 固相誘導体化



有機酸での誘導体化率



- まとめ -

アミノ酸、有機酸に対する煩雑な操作を必要としないGC/MSのための前処理法として、固相カートリッジ中の充填剤に検体を濃縮・保持した状態で誘導体化 (TMS化) 反応を行うことを検討した。

- ・アミノ酸や有機酸に対し、**約6分の処理時間**で、水溶液の状態からGC/MS測定が可能となった。
- ・各化合物に対し、良好な再現性を示した。(ピーク面積の **RSD: 5%未満**)
- ・従来の誘導体化法と比較し、同様の化合物が検出され、幾つかの化合物※を除き同等の誘導体化挙動を示した。(※グルタミン酸、シュウ酸、α-ケトグルタル酸)

従来のメタボローム分析における煩雑な操作を必要としない、GC/MS分析のための前処理法を開発した。