

## 演題 GC/MS 基盤メタボローム分析に資する固相誘導体化法の応用

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

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

セッション／計測技術・融合領域 口頭発表

[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。また、試料によっては高濃度の糖類がアミノ酸や有機酸の分析を困難にすることがある。そこで当該問題解決のため、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、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。本発表では固相抽出の技術を応用し、糖類を多く含む検体中のアミノ酸と有機酸の迅速な分析を目的として、糖類を固相に保持せずにアミノ酸と有機酸を固相に保持させた状態で誘導体化を試み、有用な結果を得たので報告する。

[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/MS (GC: 7890B, MS: 7000C, Agilent製) を用いた。測定試料はアミノ酸と有機酸と糖類を水-アセトニトリル混合溶液に調製した。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(CXi/AXi)を用いた。前処理の手順は、固相カートリッジをコンディショニングした後に、試料溶液を通液し、水-アセトニトリル混合溶媒で糖類を洗浄し、脱水のためにアセトニトリルを流した。その後、誘導体化試薬MSTFAを固相上に直接添加することで誘導体化を行い、ヘキサンで溶出し測定溶液とした。

[結果] アミノ酸を保持させる陽イオン交換樹脂 (CXi) と有機酸を保持させる陰イオン交換樹脂 (AXi) を積層にした固相カートリッジを開発した。この固相カートリッジにおいて、糖類は固相に保持せずアミノ酸と有機酸を固相に保持させるための通液時の水-アセトニトリル比率の最適化を図った。その結果、糖類を多く含む検体においてもその影響を受けずアミノ酸と有機酸のトリメチルシリル(TMS)化されたピークが再現性良く検出された。また、誘導体化に要する時間の大幅な短縮が可能となった。

# GC/MS基盤メタボローム分析に資する 固相誘導体化法の応用

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

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

第9回メタボロームシンポジウム  
2015年10月01-02日, 三島市

Beyond your Imagination



**AiSTI SCIENCE**

# はじめに

## 【経緯】

これまでに、従来のメタボローム分析における長時間にわたる操作を必要としない迅速な前処理法を目的として、固相に目的成分を濃縮・保持した状態で誘導体化する**固相誘導体化法**を開発した。

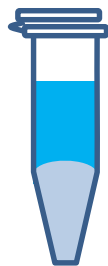
## 【本研究の課題】

一般的なGC-MS基盤メタボローム分析において、試料によっては高濃度の糖類が測定および解析時にアミノ酸や有機酸の分析を困難にすることがある。

## 【目的】

先の固相抽出の技術を応用し、**糖類は固相に保持させず、アミノ酸と有機酸を固相に保持させた状態で誘導体化する**アミノ酸と有機酸の迅速分析法の開発

# 従来の誘導体化前処理法と課題



減圧濃縮遠心分離 (1600rcf, 4°C, 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°C, 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°C, 30min) : 誘導体化反応

遠心分離 (16000 rcf, 4°C, 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)

誘導体化  
前処理時間

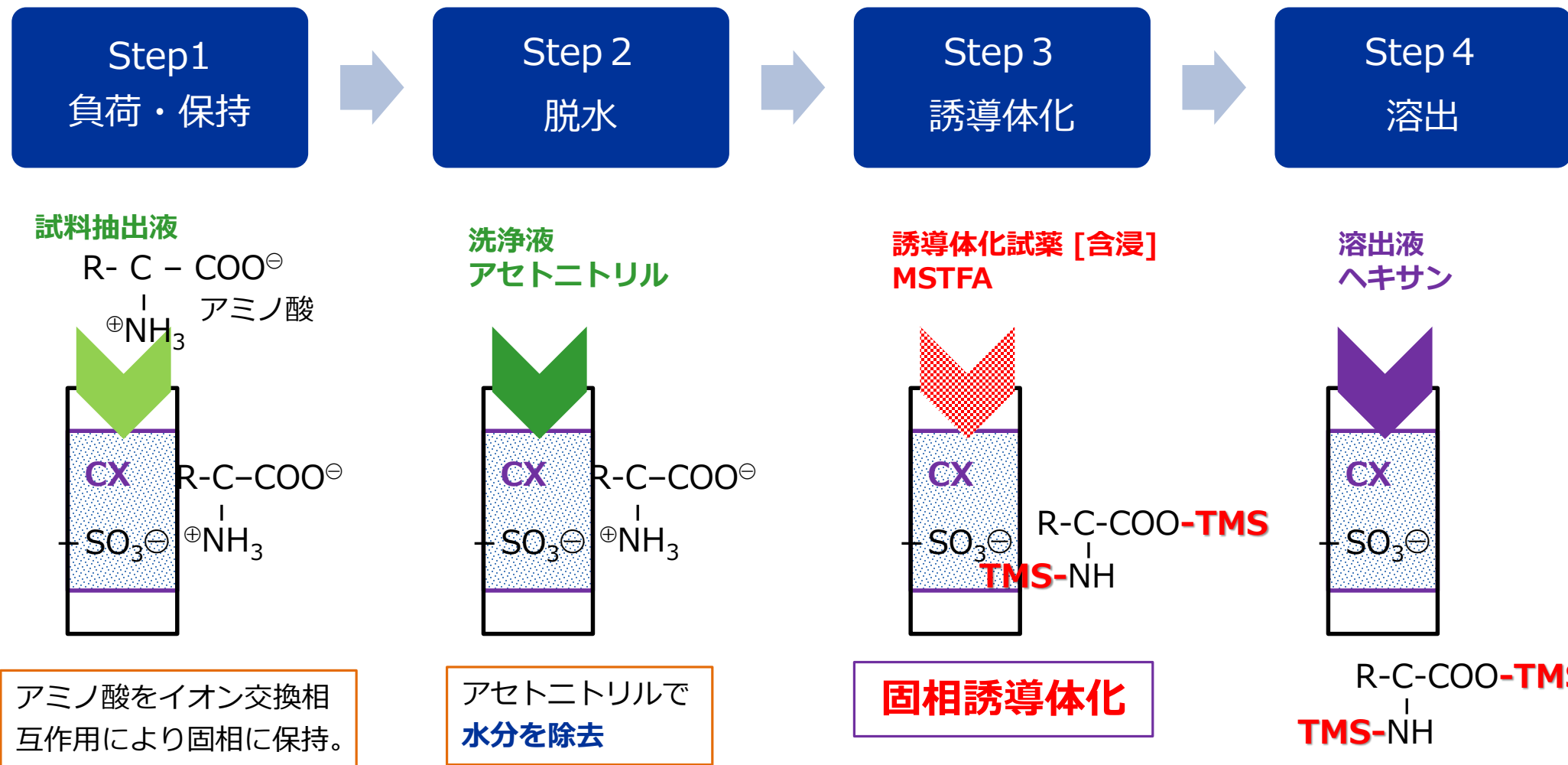
**9~19時間**

水分除去操作と誘導体化反応に  
長時間を有している。

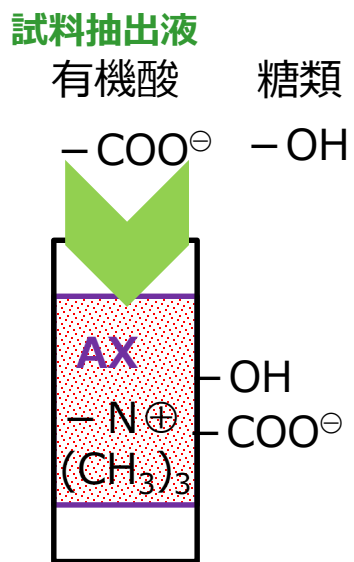


**固相抽出技術**を用いて水分除去  
と誘導体化反応を行うことで前  
処理の迅速化を試みた。

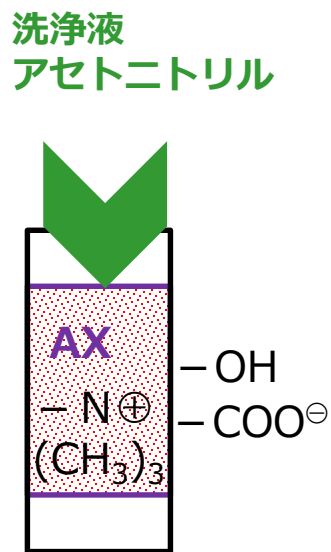
# アミノ酸のCX固相を用いた誘導体化



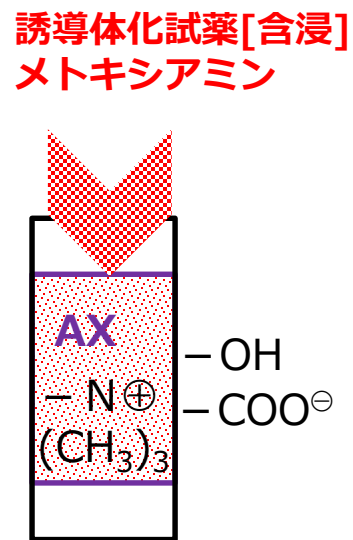
# 有機酸・糖類のAX固相を用いた誘導体化



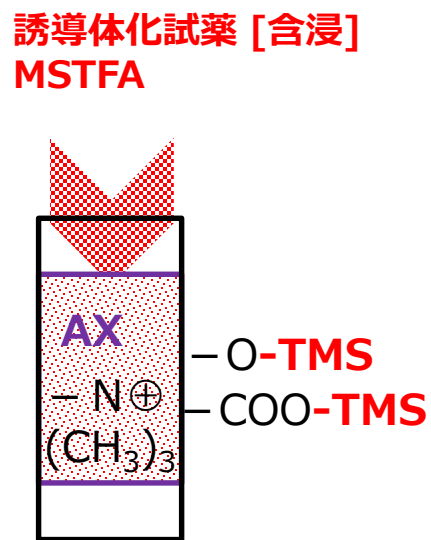
有機酸をイオン交換相互作用により固相に保持。  
糖類を極性相互作用により固相に保持。



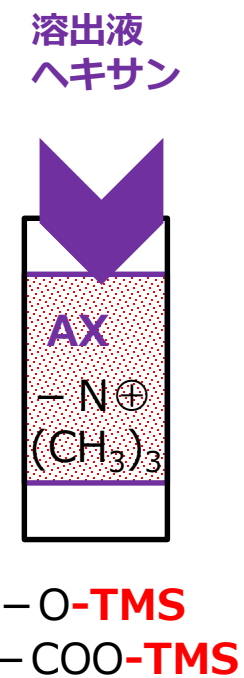
アセトニトリルで  
水分を除去



固相誘導体化

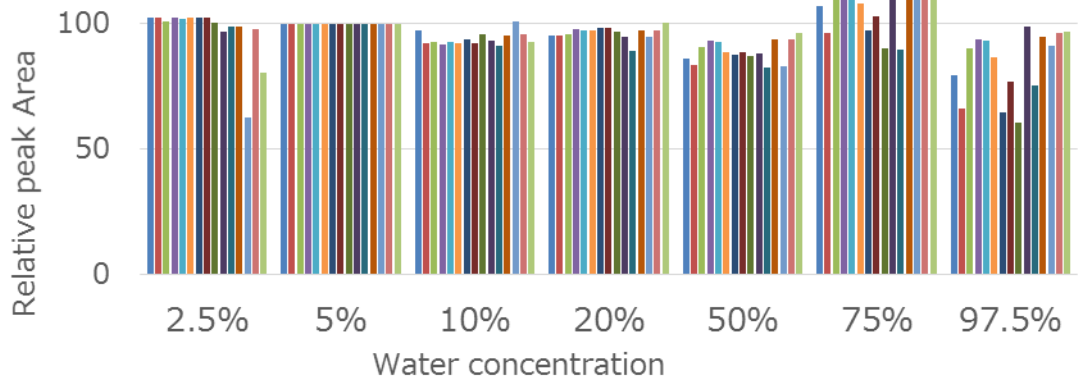


固相誘導体化

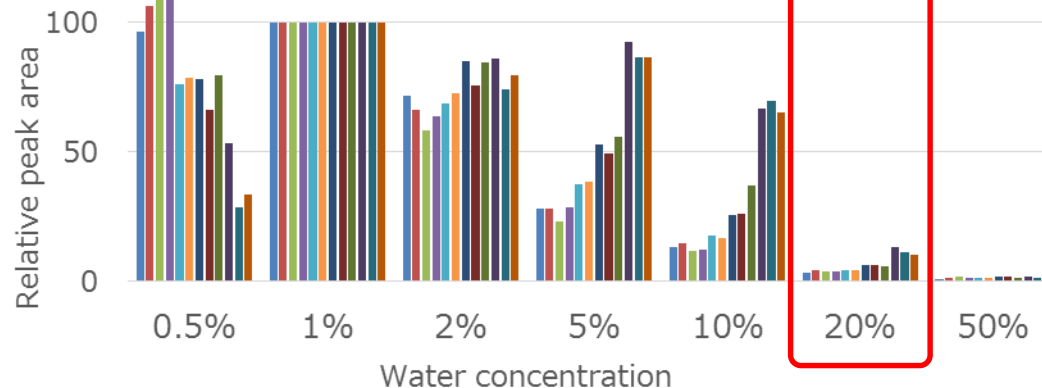


# 試料負荷時の水濃度と固相への保持について

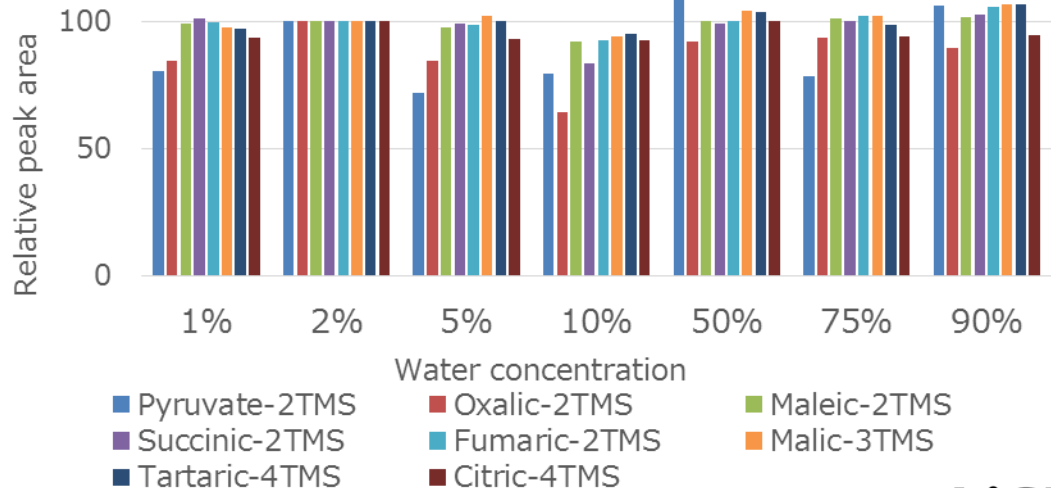
【アミノ酸とCX固相】



【糖とAX固相】

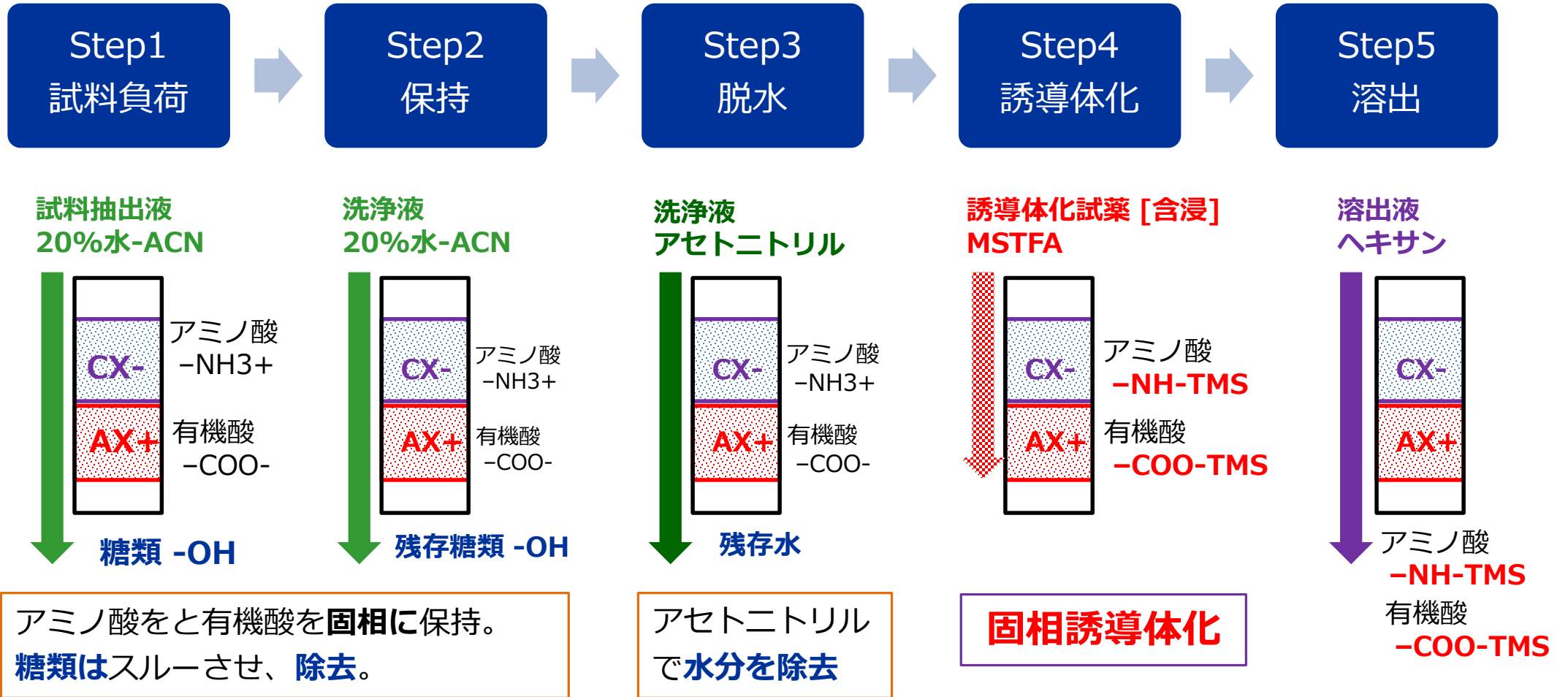


【有機酸とAX固相】



20%水-アセトニトリル溶液では  
糖類を除去して、  
アミノ酸と有機酸を保持することが可能。

# 糖類を除去する固相誘導体化前処理法の工程





# 検討および評価項目

- A. 固相誘導体化前処理法の最適条件の検討
  - 1. 洗浄液量について
  - 2. 誘導体化反応時間について
  
- B. 実試料を用いた本法の評価
  - 1. 糖類の除去効果
  - 2. 抽出後の固相誘導体化前処理法の再現性

# 実験に用いた試料

試料：市販のフルーツジュース  
(果汁100%)

品名：果実ミックス飲料

原材料：

果実（リンゴ、オレンジ、バナナ、パイナップル、うんしゅうみかん、キウイフルーツ、ぶどう、パッションフルーツ、アサイー、マンゴー、もも、レモン、プルーン、アセロラ、etc.）

香料、クエン酸、ビタミンC

## 栄養成分表示

タンパク質	0.8g
脂質	0g
<b>糖質</b>	<b>23.2g</b>
食物繊維	0.1-1.0g
ナトリウム	2mg
カリウム	320mg
ビタミンC	110mg
ビタミンK	0-6μg
葉酸	5-40μg
<b>ブドウ糖</b>	<b>5.2g</b>
クエン酸	820mg

(1本/200mL当たり)

# 固相誘導体化前処理法 (アミノ酸と有機酸)

抽出後の固相誘導体化前処理時間

**6分**

試料 50 $\mu$ L

— 添加 : 水 150 $\mu$ L

— 添加 : ACN 800 $\mu$ L

インキュベーション (37 $^{\circ}$ C, 30min)

遠心分離 (14000rpm, 5min)

試料抽出液

(20%水-アセトニトリル)



試料抽出液分取 **50 $\mu$ L**

AiSTI-SPE **ACX-3mg**

— 洗浄 : 20%水-ACN 50 $\mu$ L (糖類を洗浄)

— 洗浄 : ACN 100 $\mu$ L (脱水効果)

— 誘導体化試薬を含浸 **MSTFA** 25 $\mu$ L

**固相誘導体化反応**

— 溶出 : ヘキサン 100 $\mu$ L

— 添加 : ヘキサン 400 $\mu$ L

検液

GC/MS : 大量注入10 $\mu$ L

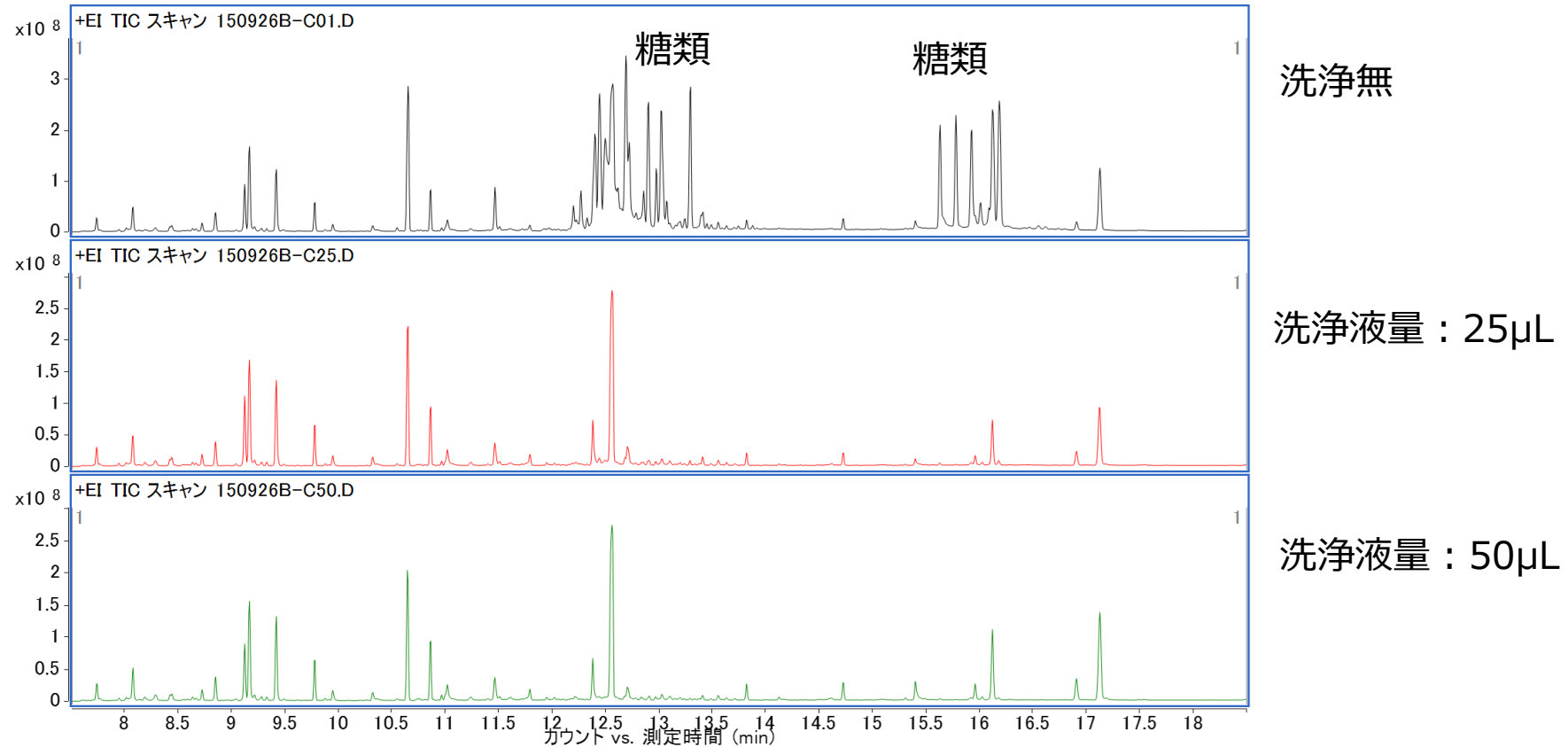
# GC/MS条件

---

<b>PTV Injector</b>	<b>LVI-S200 (AiSTI Science) : <b>Spiral Insert</b></b>
Injectoin Temp.	70°C(0.1min)-120°C/min-240°C(0.5min)-50°C/min-280°C(15min)
Solvent Purge Time	0.1min
Injection Volume	<b>10μL</b>
<b>GC</b>	<b>Agilent 7890B</b>
Pre-column	Deactivated silica capillary tube 0.25mm×0.3m
Column	BPX5, 0.25mm i.d.× 30m, df0.25μm (SGE)
Column Oven Temp.	60°C(4min)-20°C/min-290°C(4min)
Splitpurge Flow	150mL/min(0.10min)-0mL/min(3.9min)-50mL/min(6min)-20mL/min
Splitless Time	4min
<b>MS</b>	<b>Agilent 7000C</b>
Detector Temp.	280°C
MS Method	SCAN : 50-4 5 0

---

# 洗浄液量と糖類の除去効果

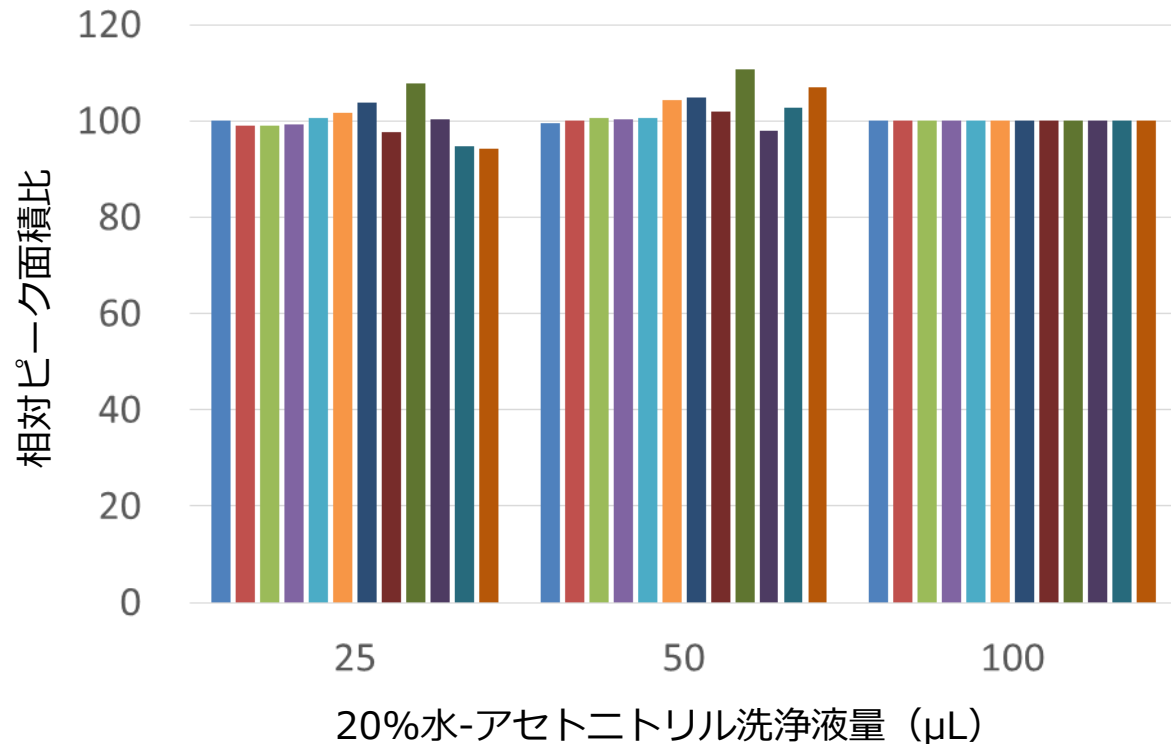


SCANトータルイオンクロマトグラム比較

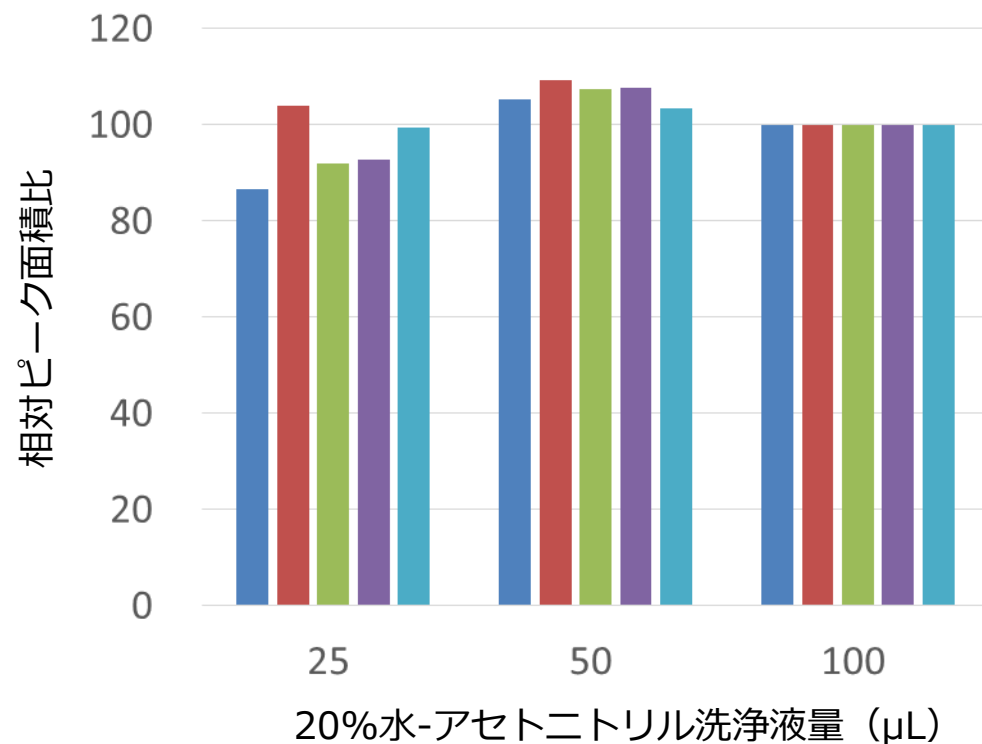
20%水-アセトニトリル50µLで洗浄することで固相に残存している糖類を十分に除去できることが分かった。

# 20%水-アセトニトリル洗浄液量について

【アミノ酸】



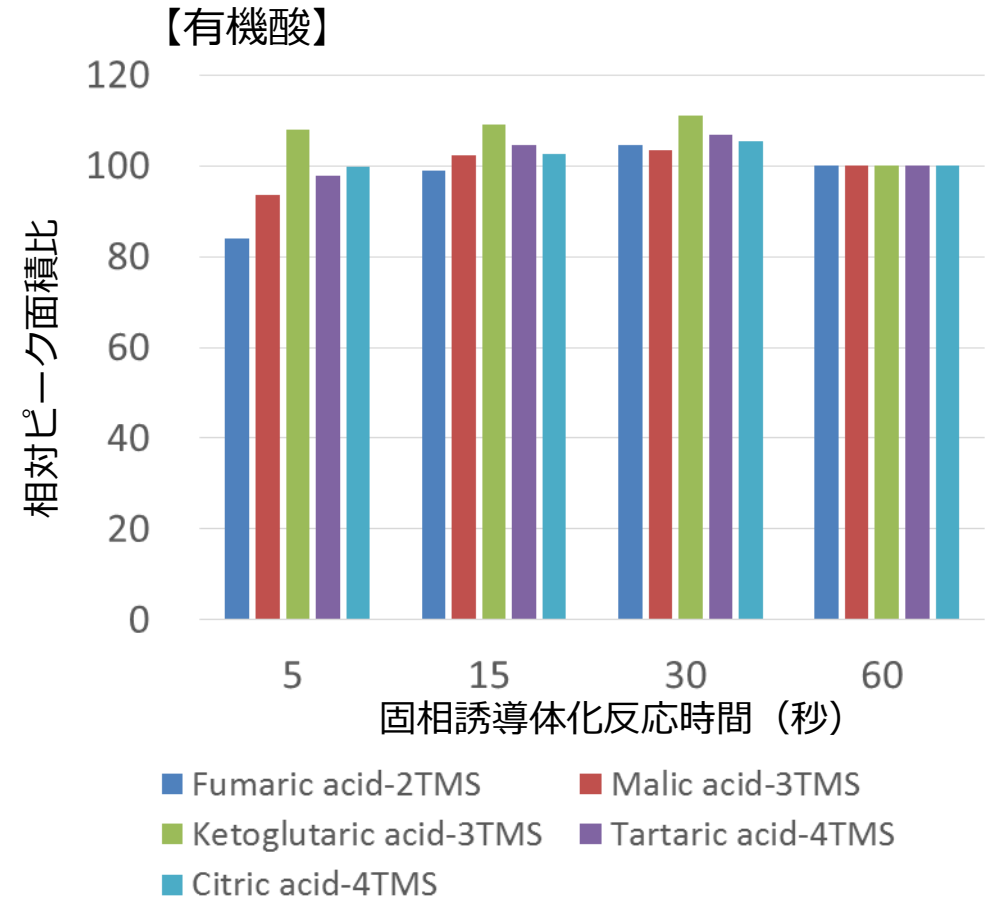
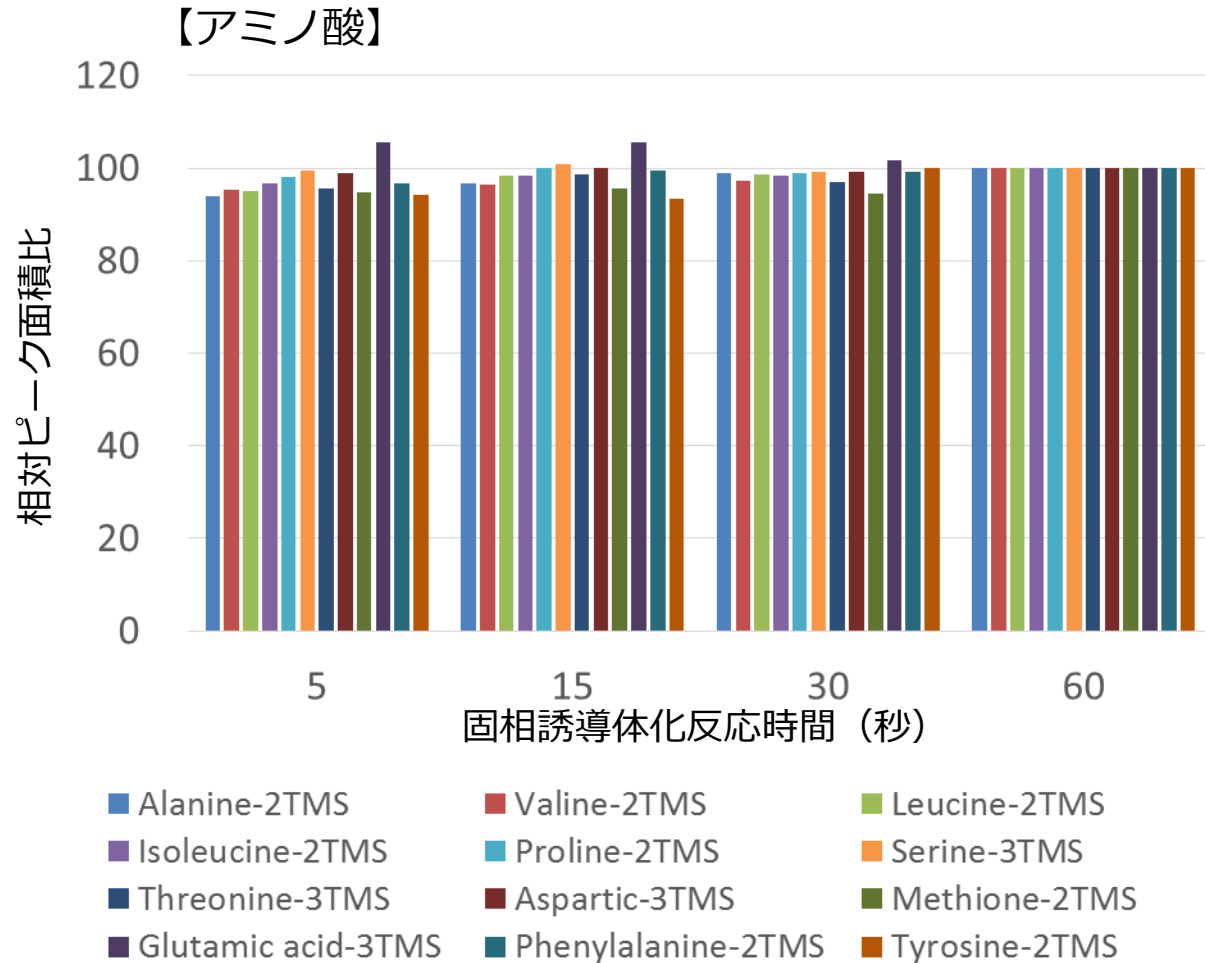
【有機酸】



- Alanine-2TMS
- Isoleucine-2TMS
- Threonine-3TMS
- Glutamic acid-3TMS
- Valine-2TMS
- Proline-2TMS
- Aspartic-3TMS
- Phenylalanine-2TMS
- Leucine-2TMS
- Serine-3TMS
- Methionine-2TMS
- Tyrosine-2TMS

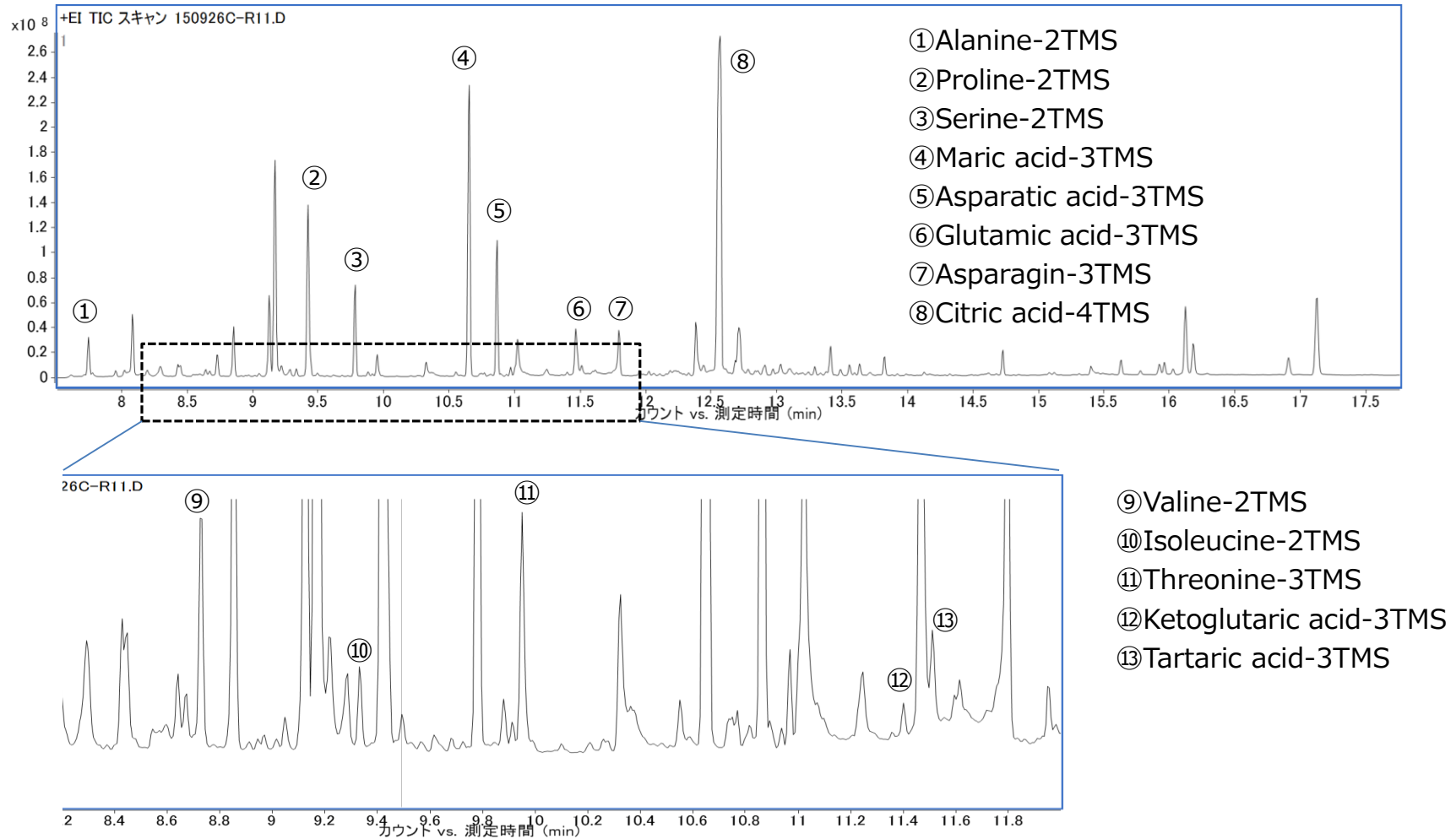
- Fumaric acid-2TMS
- Ketoglutaric acid-3TMS
- Citric acid-4TMS
- Malic acid-3TMS
- Tartaric acid-4TMS

# 固相誘導体化反応時間について



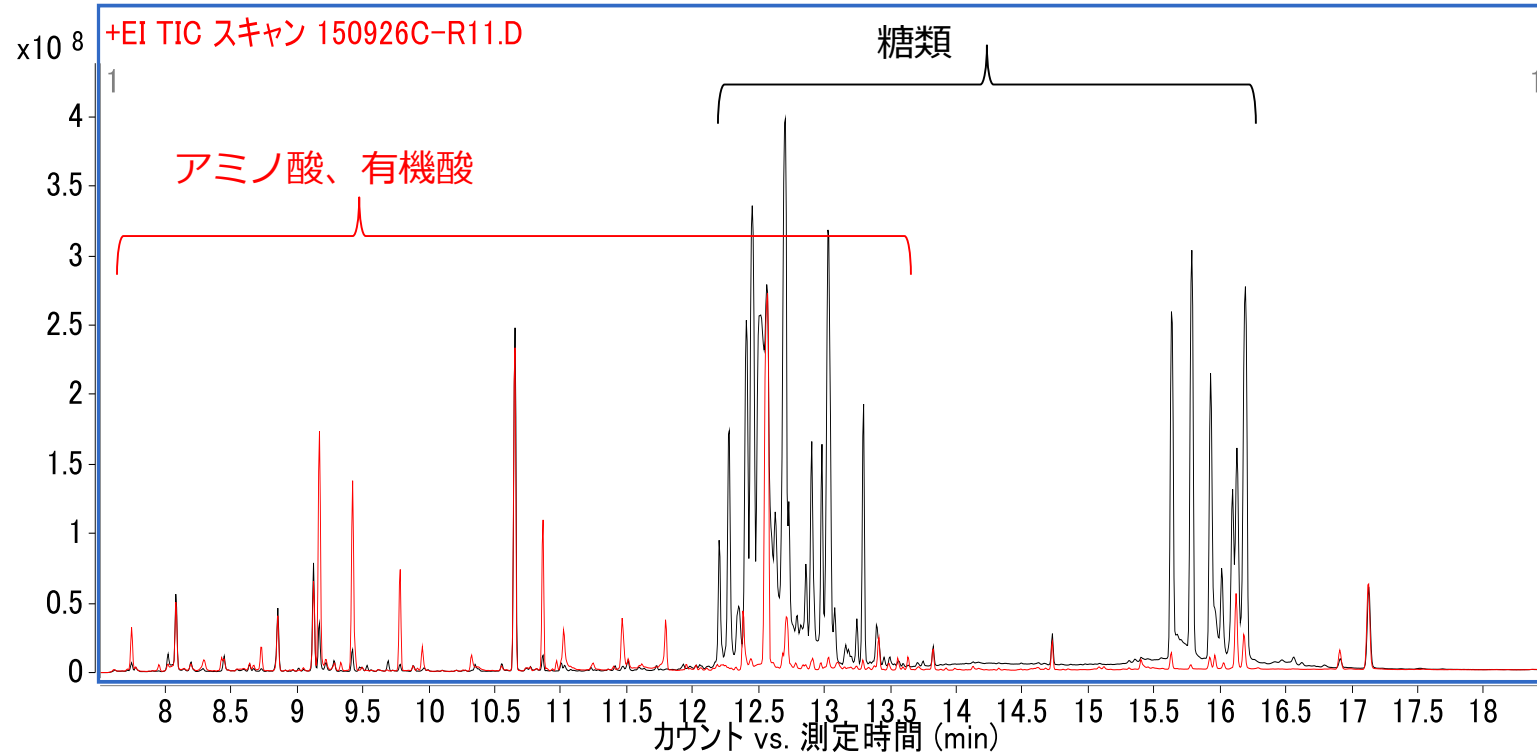
固相上で誘導体化することで速やかにTMS化反応していることが考えられ、誘導体化試薬を固相に含浸する時間は15秒で十分であった。

# フルーツジュースの本法による SCANトータルイオンクロマトグラム





# 固相抽出技術による糖類の除去効果



—黒線：  
試料抽出液量：**10uL**  
2%水-アセトニトリル

—赤線：  
試料抽出液量：**50uL**  
20%水-アセトニトリル

SCANトータルイオンクロマトグラム重ね描き

20%水-アセトニトリルで固相に負荷して、洗浄することで糖類をほとんど除去できた。

# フルーツジュースの固相誘導体化法の再現性

No.	Compound	Peak Area						Ave.	RSD (%)
		1	2	3	4	5	6		
<i>Amino group</i>									
101	Alanine-2TMS	922,366	896,338	900,613	924,316	893,251	907,292	907,363	<b>1.5</b>
102	Valine-2TMS	2,280,757	2,199,247	2,175,089	2,249,300	2,179,606	2,188,250	2,212,042	<b>1.9</b>
103	Leucine-2TMS	8,238,086	7,993,113	7,807,302	8,156,037	7,842,769	8,070,694	8,018,000	<b>2.1</b>
104	Isoleucine-2TMS	3,152,605	2,931,310	2,878,507	3,061,404	2,924,058	3,027,144	2,995,838	<b>3.4</b>
105	Proline-2TMS	7,153,058	6,916,459	7,114,867	7,343,125	6,908,478	7,208,605	7,107,432	<b>2.4</b>
106	Serine-3TMS	1,630,455	1,578,066	1,539,055	1,604,529	1,547,032	1,574,444	1,578,930	<b>2.2</b>
107	Threonine-3TMS	223,434	214,033	204,897	206,024	204,772	212,917	211,013	<b>3.5</b>
108	Aspartic acid-3TMS	1,440,509	1,416,698	1,390,517	1,410,988	1,407,988	1,403,984	1,411,781	<b>1.2</b>
109	Methionine-2TMS	72,919	73,207	67,574	72,118	71,737	73,063	71,770	<b>3.0</b>
110	Glutamic acid-3TMS	379,603	359,315	366,787	352,375	366,416	353,280	362,963	<b>2.8</b>
111	Phenylalanine-2TMS	1,623,907	1,607,477	1,546,167	1,633,851	1,590,592	1,625,657	1,604,609	<b>2.0</b>
112	Tyrosine-2TMS	180,343	168,369	154,763	172,856	165,834	169,786	168,658	<b>5.0</b>
<i>Organo acid group</i>									
201	Fumaric acid-2TMS	393,542	355,299	303,190	396,236	369,866	377,538	365,945	<b>9.4</b>
202	Malic acid-3TMS	31,836,205	31,114,777	27,480,877	33,665,359	31,651,902	32,598,864	31,391,331	<b>6.7</b>
203	Ketoglutaric acid-3TMS	485,776	545,080	445,816	477,290	461,074	479,614	482,441	<b>7.0</b>
204	Tartaric acid-4TMS	202,387	196,159	178,516	202,680	194,985	204,069	196,466	<b>4.9</b>
205	Citric acid-4TMS	118,149,126	116,573,721	109,788,429	119,169,130	117,325,701	117,454,095	116,410,034	<b>2.9</b>

# まとめ

- アミノ酸を保持させる陽イオン交換樹脂（CXi）と有機酸を保持させる陰イオン交換樹脂（AXi）を積層にした固相カートリッジを開発した。
- 糖類は固相に保持せずアミノ酸と有機酸を固相に保持させるための通液時の水-アセトニトリル比率の最適化を行い、アミノ酸と有機酸の迅速な分析法を開発した。
- 糖類を多く含む検体においてもその影響を受けずアミノ酸と有機酸のトリメチルシリル(TMS)化されたピークが再現性良く検出された。
- 固相誘導体化法を用いることで誘導体化前処理に要する時間の大幅な短縮が可能となった。



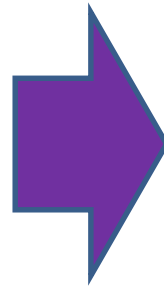
# 高濃度の糖類が分析に及ぼす影響

## 【測定機器について】

- ・ 注入口が汚れる
- ・ フィラメントが切れやすくなる
- ・ 感度低下
- ・ メンテナンス頻度が高い
- ・ GCへの注入量を増やせない。

## 【解析について】

- ・ 定量イオンが限定される。
- ・ ピーク形状が崩れる。
- ・ 低濃度の目的成分が分析できない。
- ・ 解析に時間が掛かる。
- ・ リテンションタイムが重なると解析できなくなる。
- ・ リテンションタイムが重なる物質は測定対象から除外する。
- ・ リテンションタイムがずれる。



## 糖類を除いた

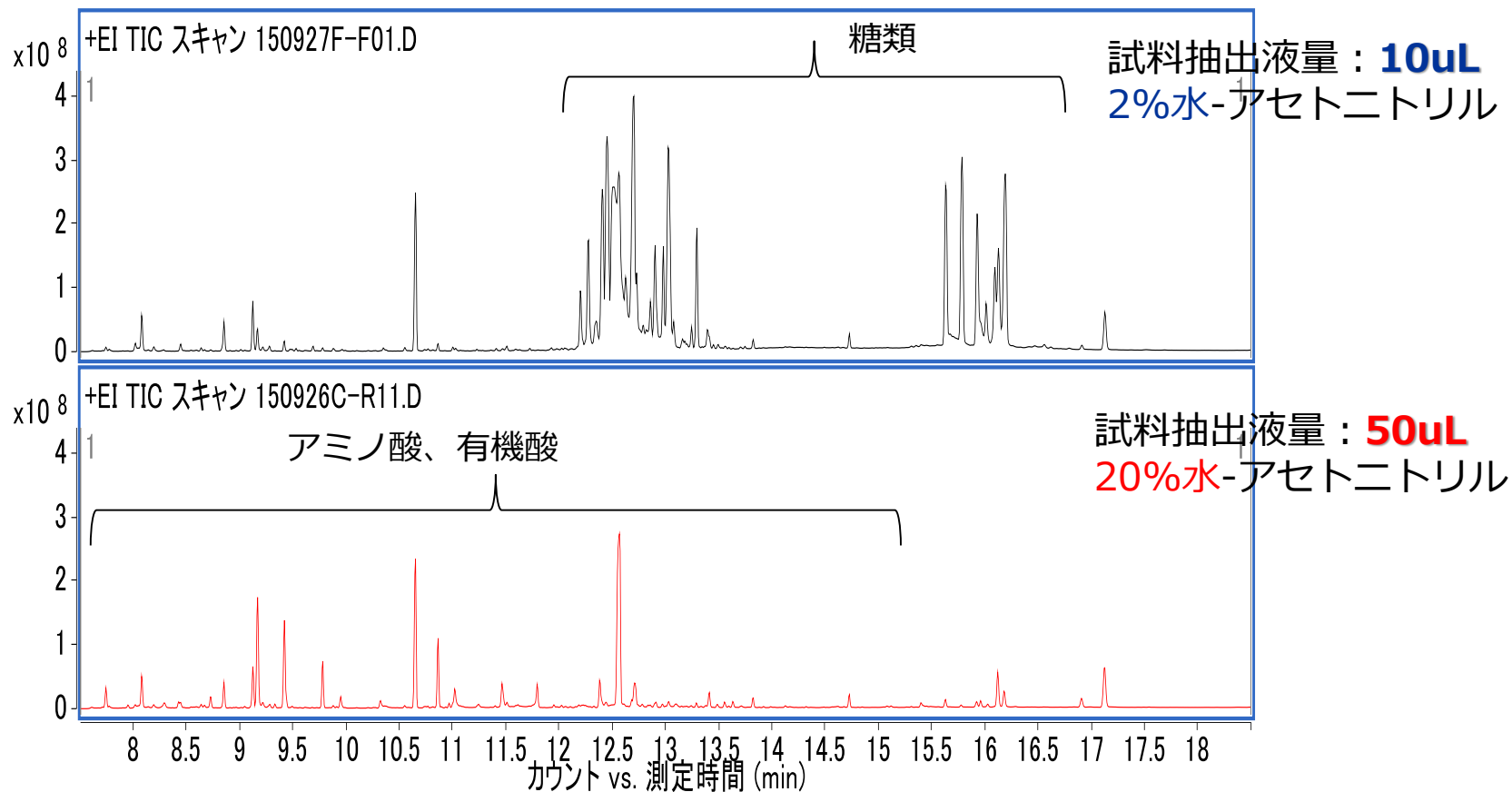
「アミノ酸」と「有機酸」の分析

測定機器を安定に保ち、メンテナンス頻度を下げられ、短時間分析が可能となる。

解析の時間短縮が図れ、精度の高い分析が可能となる。

低濃度のアミノ酸や有機酸が測定できるようになり、アミノ酸や有機酸の網羅的な分析枠が広がる可能性がある。

# 固相抽出技術による糖類の除去効果



測定機器を安定に保ち、メンテナンス頻度を下げられ、短時間分析が可能となる。

解析の時間短縮が図れ、精度の高い解析が可能となる。

低濃度のアミノ酸や有機酸が測定できるようになり、アミノ酸や有機酸の網羅的な分析枠が広がる可能性がある。

SCANトータルイオンクロマトグラム比較