

固相誘導体化を用いた低濃度のアミノ酸および有機酸と高濃度の糖類を含む試料の一斉分析法の開発

(株式会社アイスティサイエンス¹・和歌山県工業技術センター²・阪大院工 先端生命工学専攻³)

さ さ の りょういち おおさきしゅうすけ ふるのまさひろ ふくさきいいちろう
○佐々野僚一¹・大崎 秀介²・古野正浩³・福崎英一郎³

Development of simultaneous analysis with in-SPE derivatization method for low concentrated amino acid and organic acid and high concentrated sugar.

(AISTI Science Co.¹, Wakayama prefecture², Dept Biotech, Grad Sch Eng, Osaka Univ.³)

○R.Sasano¹, S.Osaki², M.Furuno³, E.Fukusaki³

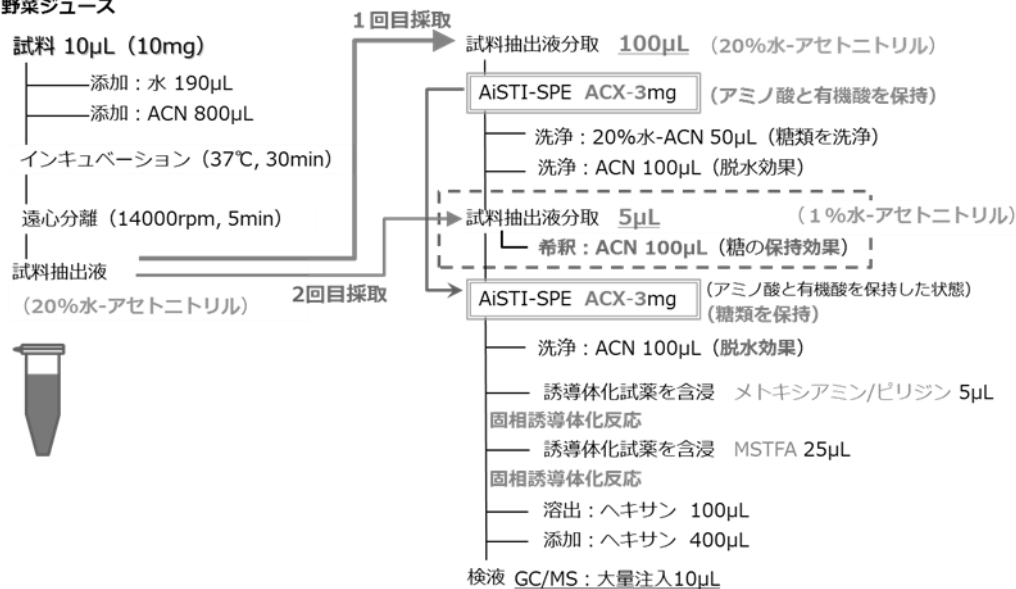
Short Abstract: When the peak of high concentrated sugar is appeared in the chromatogram, it is also difficult to measure both low concentrated amino acids and organic acids. Therefore, by using in-SPE derivatization method technology. At the first sample load, we kept the amino acid and organic acid in SPE cartridge, and the second sample load, less than 1/20 sample amount load into the same SPE cartridge enable to catch the sugar with in the same dynamic range. Thus, we have achieved to analyze for amino acid, organic acid and sugar in simultaneously.

Keywords: Amino acid, Organic acid, Sugar, In-SPE derivatization

緒言: 一般的な GCMS 測定対象のメタボロミクスにおいては、アミノ酸、有機酸、糖類を一斉に分析する必要がある。一方、ヒトなどの生体由来のサンプルや食品由来のサンプルなどには多数の成分が様々な濃度範囲で含有している。しかし、高濃度の糖類が存在すると、そのピークのリテンションタイムに近接する低濃度のアミノ酸や有機酸の測定が困難になるという問題が生じている。また、高濃度の糖類が大量に GCMS に導入されると、分離カラムの液相の保持可能な量を超え、目的成分も含めてリテンションタイムが大きくなり、解析が困難になることがある。さらに、高濃度の糖類が MS に導入されることにより、MS が汚れやすくなり、感度低下につながる。このように低濃度の成分と高濃度の成分が混在するサンプルの一斉分析が難しい要因となっている。

実験: 固相抽出の技術を応用し、第 1 回目の試料負荷では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ておき、第 2 回目の試料負荷では先の試料量の 1/20 以下にして先の固相に糖類を保持させ、アセトニトリルで洗浄することで脱水を行い、アミノ酸と有機酸と糖質が固相に保持された状態で誘導体化試薬を固相に添加含浸させて誘導体化し、その後、一斉にヘキサンで溶出して、大量注入法で 10 μ L 注入し、質量分析装置で SCAN にて測定した。

野菜ジュース



結果と考察: 2段階に分けて試料量および溶媒を調製して固相に負荷することで、低濃度のアミノ酸および有機酸を多く固相に保持させ、高濃度の糖類を同じ固相に少なく保持させることができた。その結果、得られたクロマトグラムは同じダイナミックレンジ内でそれぞれのピーク強度を得ることができた。これにより、GCMS に負荷を与えることなく、低濃度のアミノ酸および有機酸と高濃度の糖類を含む試料の一斉分析が可能になることがわかった。

第65回質量分析総合討論会, ポスター発表
2017年5月17-19日 (つくば市)

固相誘導体化を用いた低濃度のアミノ酸および有機酸と 高濃度の糖類を含む試料の一斉分析法の開発



○佐々野僚一¹・大崎秀介²・古野正浩³・福崎英一郎³
アイスティサイエンス¹・和歌山県工業技術センター²・阪大院工³

Beyond your Imagination

AiSTI SCIENCE

課題と目的

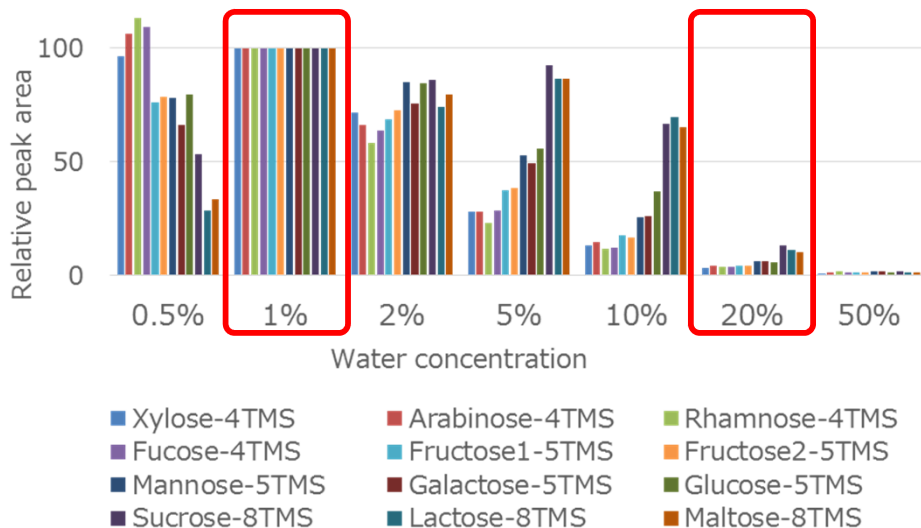
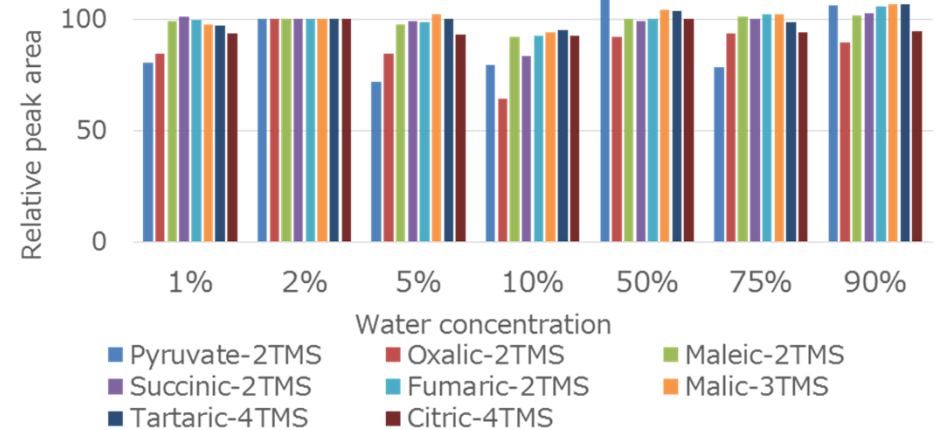
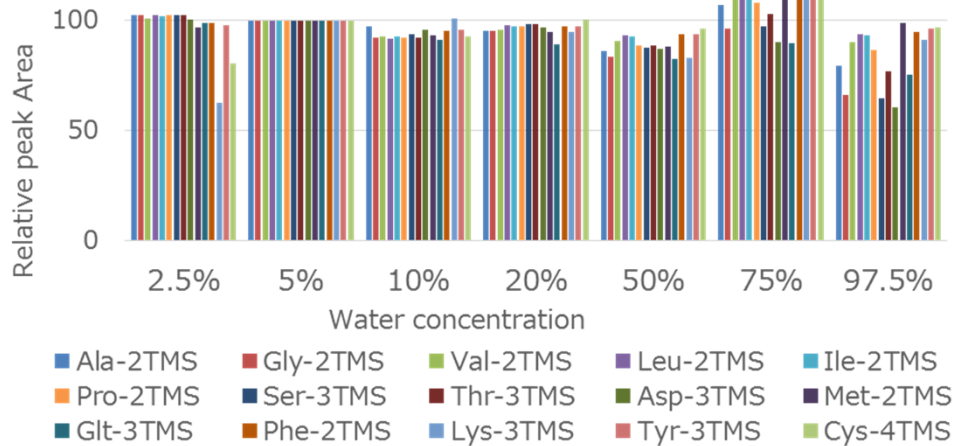
低濃度の成分と高濃度の成分が混在する サンプルの一斉分析の課題

- 高濃度の糖類により、低濃度のアミノ酸や有機酸の測定が困難になる。
- 高濃度の糖類が大量にGCMSに導入されると、分離カラムの液相の保持可能な量を超え、正確な測定が困難になる。
- 高濃度の糖類がMSに導入されることにより、MSが汚れやすくなり、感度低下につながる。

【研究目的】

高濃度の糖類を低濃度のアミノ酸や有機酸の測定値と同じダイナミックレンジ内にすることを目的として、2段階に分けて試料を分取し、それぞれを同じ固相に保持させる2段階試料分取法を開発した。

試料負荷時の水濃度と固相への保持について



ポイント

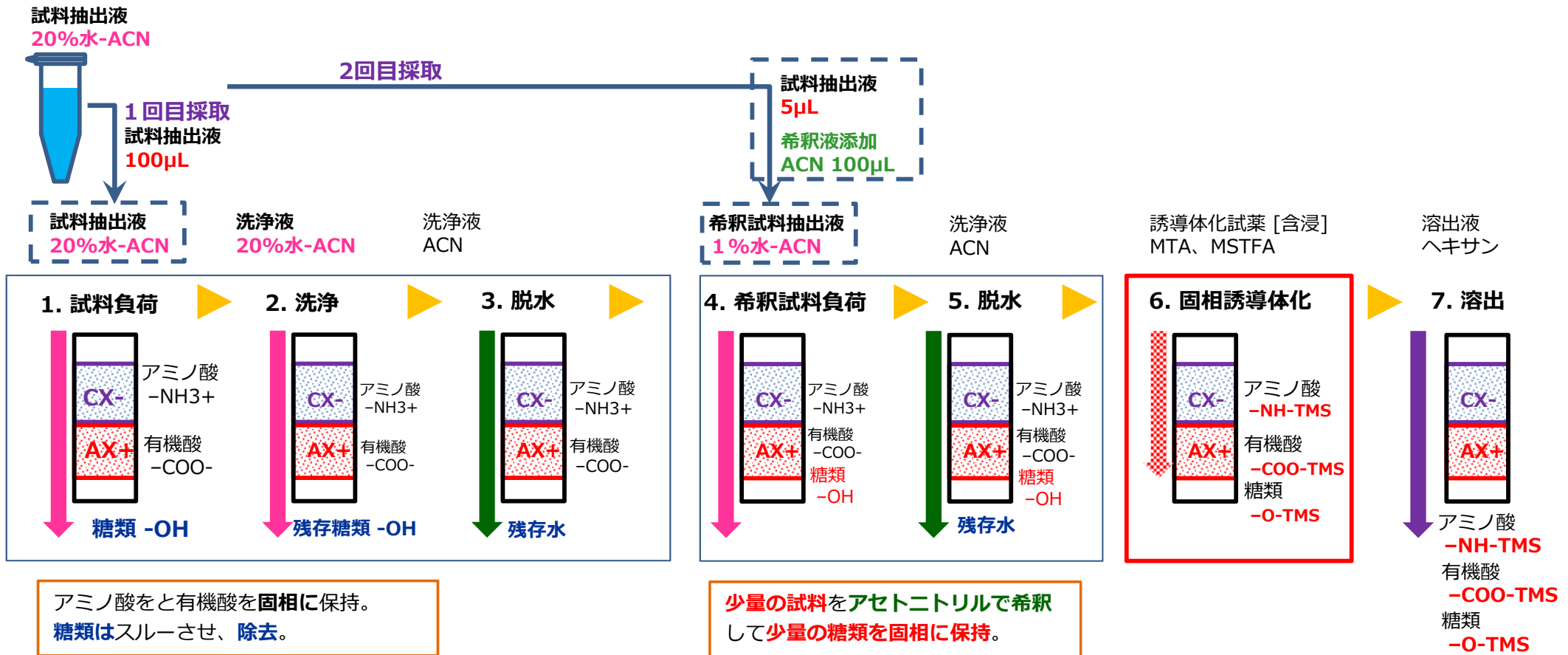
第一溶媒

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。

第二溶媒

1%水-アセトニトリル溶液では
アミノ酸と有機酸と糖類を保持することが可能。

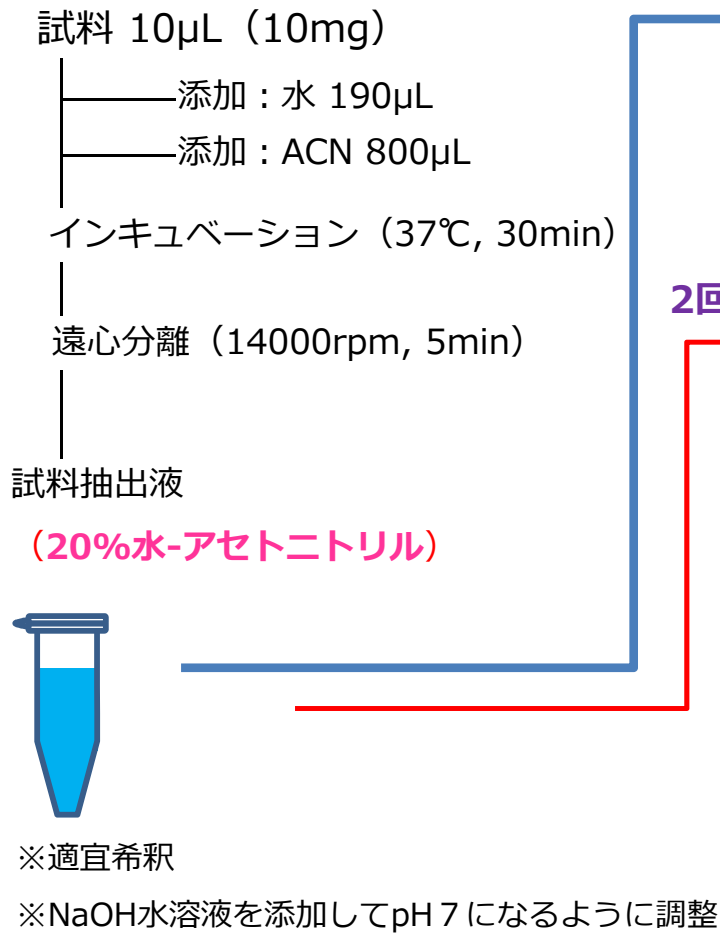
2段階試料分取法：構想



第1回目の試料負荷では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ておき、第2回目の試料負荷では先の試料量の1/20以下にして先の固相に糖類を保持させ、アセトニトリルで洗浄することで脱水を行い、アミノ酸と有機酸と糖質が固相に保持された状態で誘導体化試薬を固相に添加含浸させて誘導体化し、その後、一斉にヘキサンで溶出した。

前処理フロー

野菜ジュース



1回目分取

試料抽出液分取 **100 μ L** (20%水-アセトニトリル)

Presh-SPE **AOS-3mg** (アミノ酸と有機酸を保持)

洗浄：20%水-ACN 50 μ L (糖類を洗浄)

洗浄：ACN 100 μ L (脱水効果)

2回目分取

試料抽出液分取 **5 μ L** (1%水-アセトニトリル)

希釈：ACN 100 μ L (糖の保持効果)

Presh-SPE **AOS-3mg** (アミノ酸と有機酸を保持した状態)
(糖類を保持)

洗浄：ACN 100 μ L (脱水効果)

誘導体化試薬を含浸 **メトキシアミン/ピリジン** 5 μ L

固相誘導体化反応 3min

誘導体化試薬を含浸 **MSTFA** 25 μ L

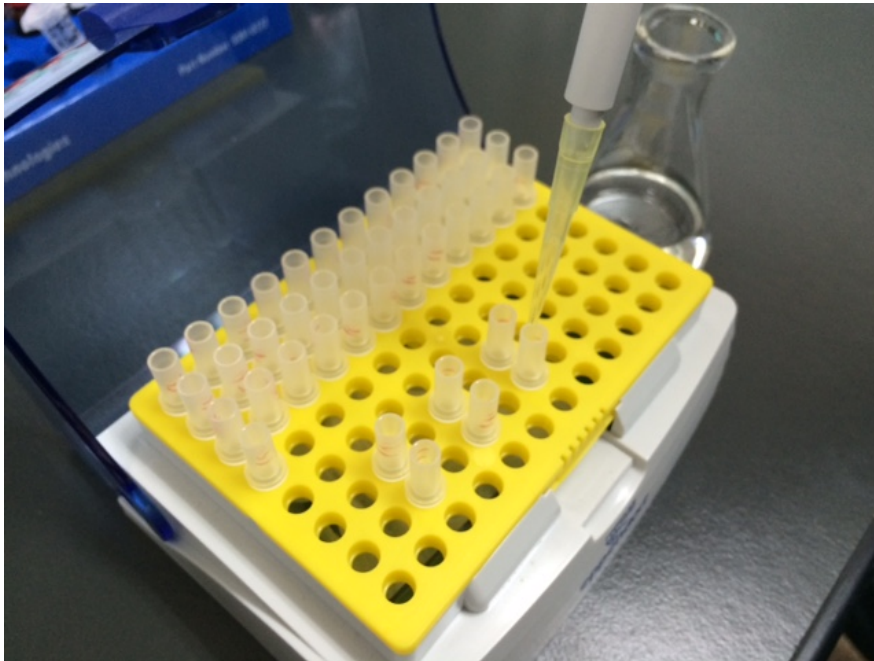
固相誘導体化反応 1min

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

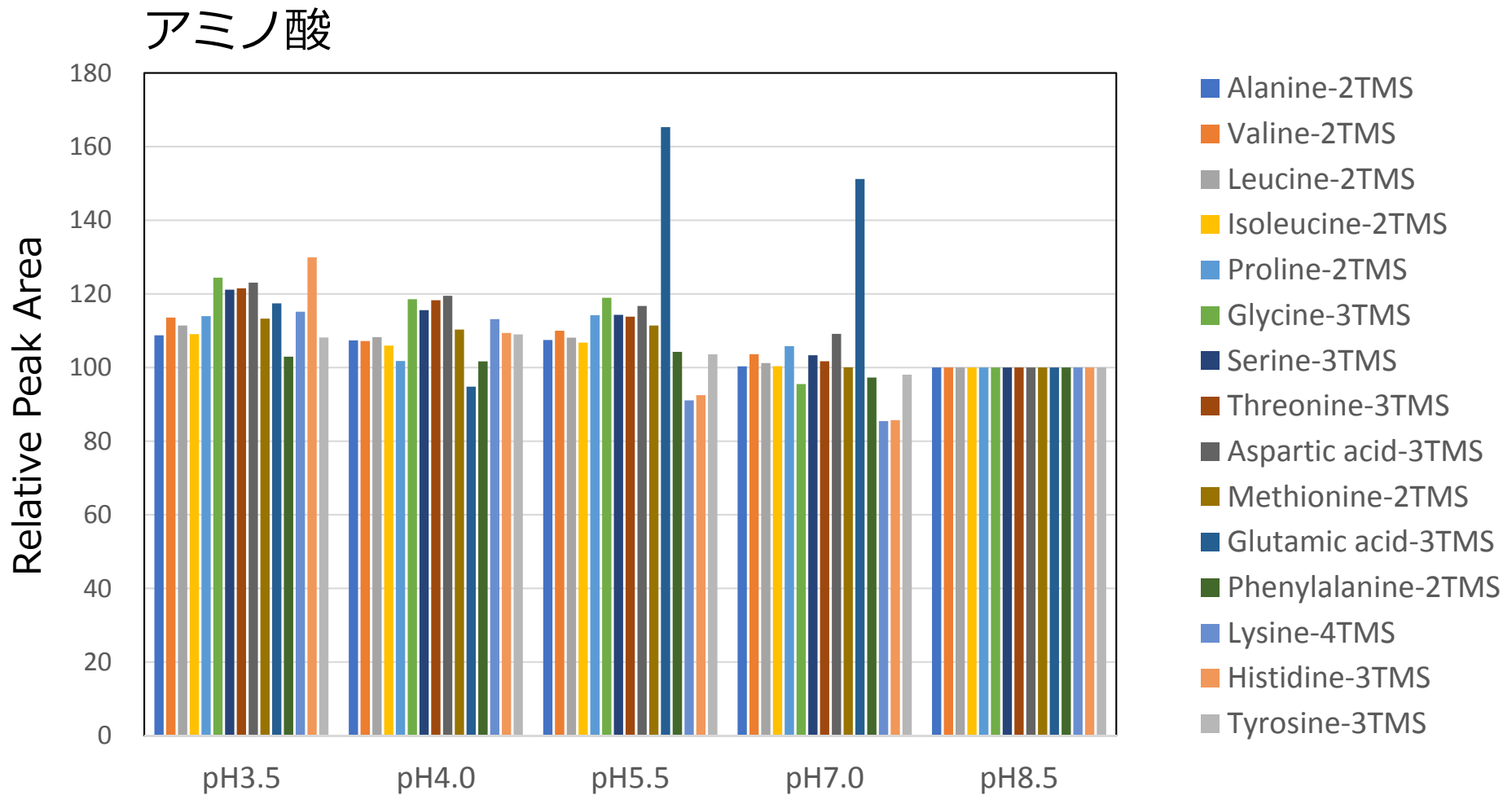
操作写真



測定条件

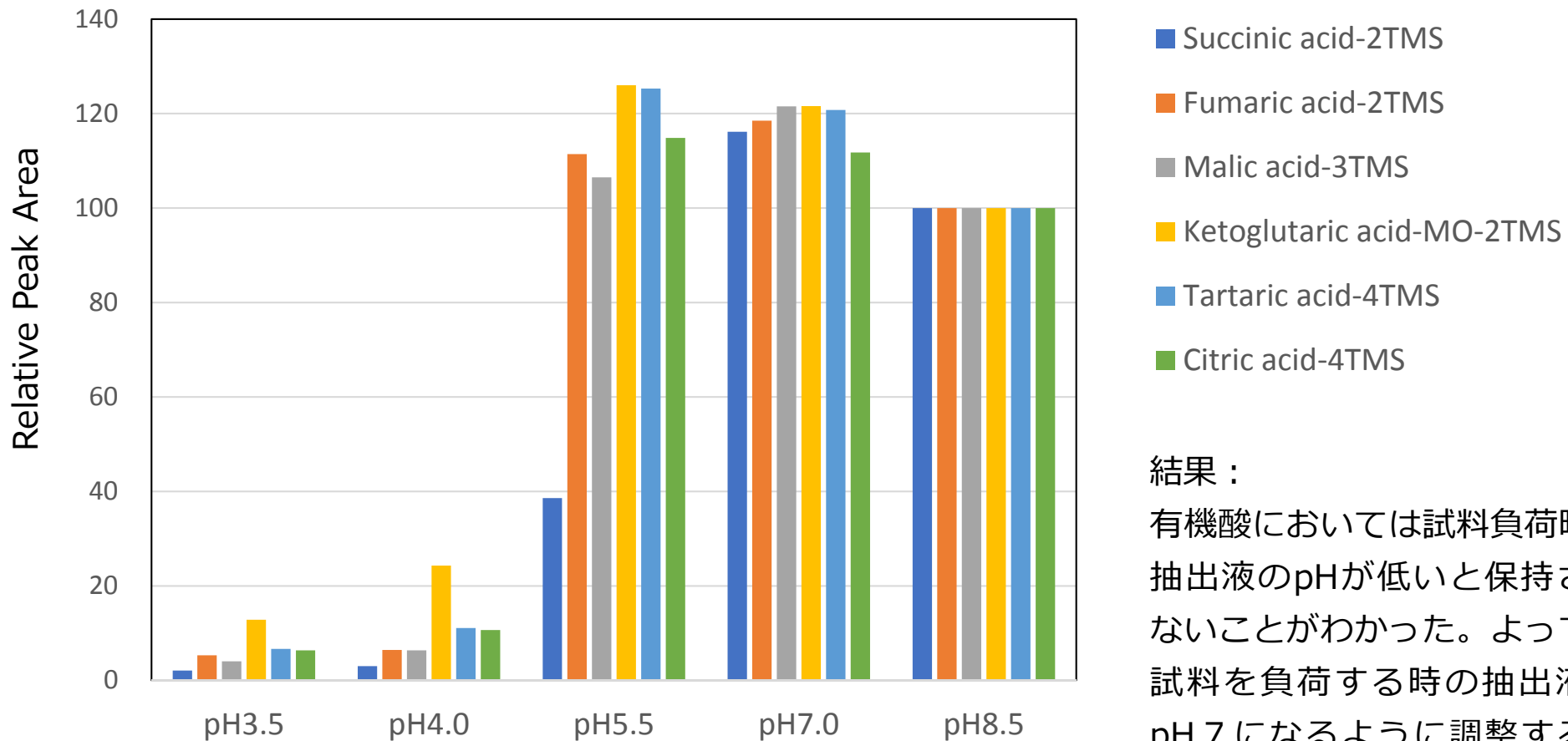
PTV Injector	LVI-S250(AiSTI Science)
Insert Type	Spiral Insert
Injector Temp.	70°C(0.1min)-120°C/min-240°C-50°C/min-300°C(12min)
Auto Samplar	Agilent 7693
Syring	50μL
Injection Volume	10μL
GC	Agilent 7890B
Inlet Mode	Solvent Vent Mode
Vent	150mL/min, 70kPa, 0.06min
Splite Parge Flow	50mL/min, 3min
Flow Mode	Constant Flow, 1.2ml/min
Column	DB-5ms, 0.25mm i.d. X 30m, df;0.25μm
Oven Temp.	60°C(2.5min)-20°C/min-310°C(1min)
Trans. Line Temp.	280°C
MS	Agilent 5977B
Ion Souce Temp.	230°C
MS Method	SCAN, m/z;70-500

試料負荷時の抽出液のpHと保持について



試料負荷時の抽出液のpHと保持について

有機酸



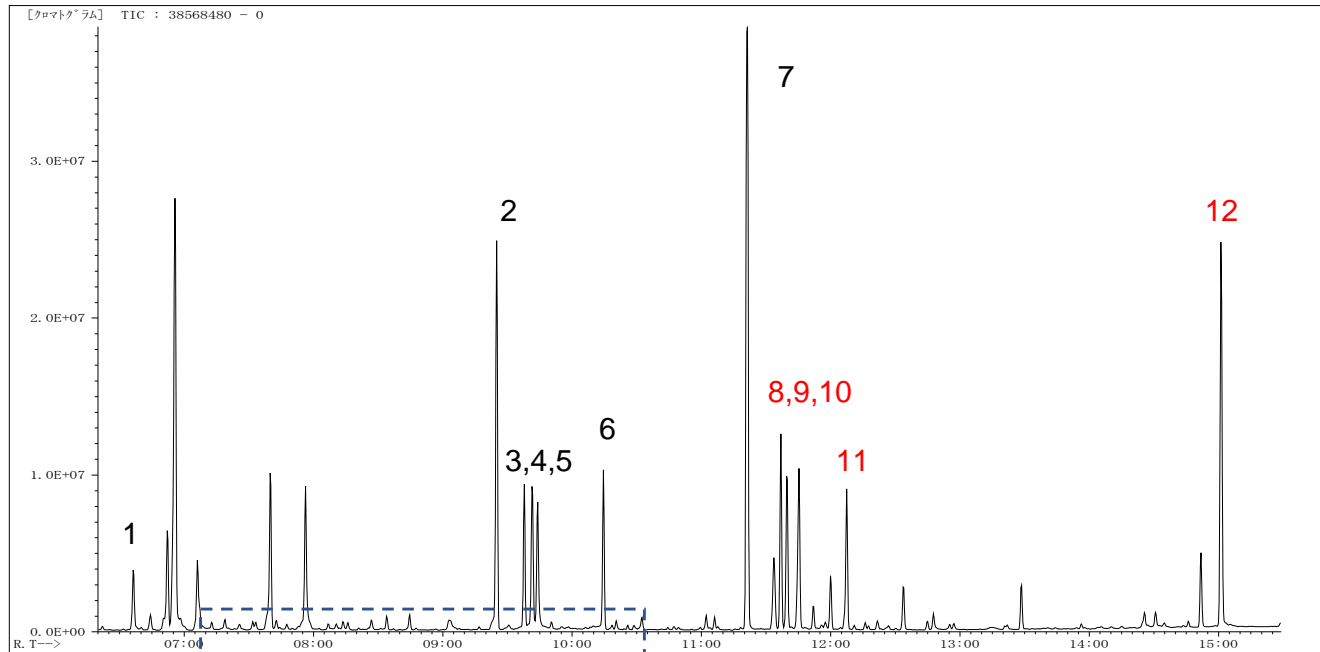
結果：

有機酸においては試料負荷時の抽出液のpHが低いと保持されないことがわかった。よって、試料を負荷する時の抽出液はpH 7になるように調整することとした。

本法による標準溶液を用いた再現性

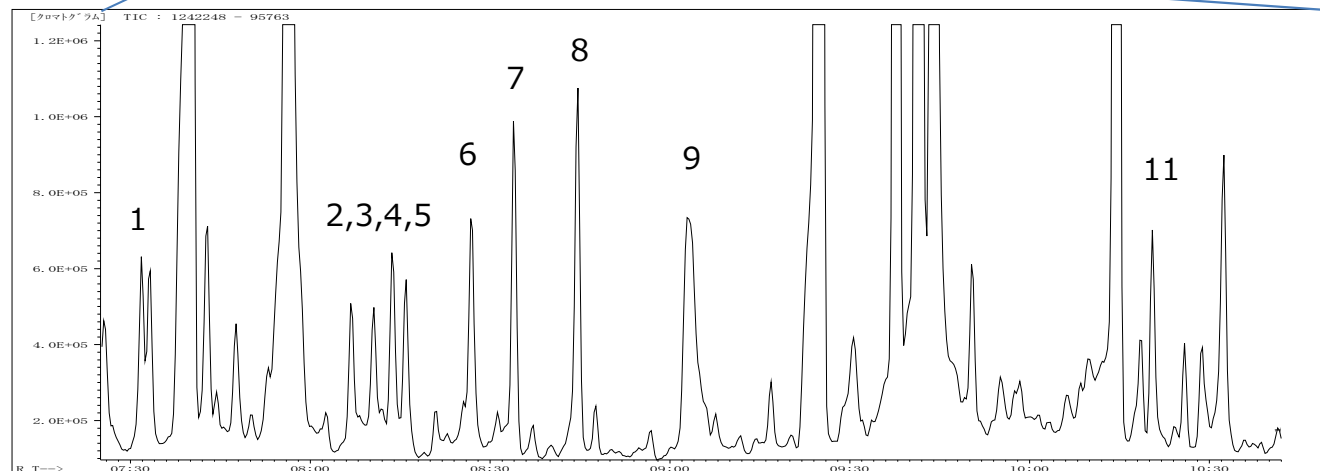
No.	化合物名	アミノ酸および有機酸 0.05nmol/uL 50uL						No.	化合物名	糖類 0.2nmol/uL 5uL					
		ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	Ave	RSD (%)			ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	Ave	RSD (%)
1	Pyruvic acid-M O-TM S	326,078	272,621	255,639	303,726	289,516	10.9	26	Xylose-M O-4TM S	1,829,954	1,697,406	1,884,760	1,854,972	1,816,773	4.6
2	Oxalic acid-2TM S	228,791	247,419	238,435	229,875	236,130	3.7	27	Arabinose-M O-4TM S	2,058,363	1,927,036	2,180,936	2,151,136	2,079,368	5.5
3	Maleic acid-2TM S	2,101,596	2,201,338	2,189,384	2,277,568	2,192,472	3.3	28	Rhamnose-M O-4TM S	1,133,837	1,058,002	1,208,867	1,172,861	1,143,392	5.7
4	Succinic acid-2TM S	1,545,773	1,811,758	1,531,092	1,741,508	1,657,533	8.5	29	Fucose-M O-4TM S	915,640	846,252	950,447	926,120	909,615	4.9
5	Fumaric acid-2TM S	1,736,037	1,888,235	1,729,101	1,903,735	1,814,277	5.2	30	Fructose1-M O-5TM S	2,097,758	2,064,597	2,148,115	2,143,372	2,113,461	1.9
6	Malic acid-3TM S	652,172	715,041	633,750	696,375	674,335	5.6	31	Fructose2-M O-5TM S	1,643,276	1,635,447	1,695,825	1,747,072	1,680,405	3.1
7	Ketoglutaric acid-M-2TM S	1,743,632	1,766,843	1,692,053	1,836,823	1,759,838	3.4	32	Mannose-M O-5TM S	4,836,740	4,851,336	4,937,350	5,090,237	4,928,916	2.4
8	Tartaric acid-4TM S	1,373,960	1,441,944	1,313,024	1,419,340	1,387,067	4.1	33	Galactose-M O-5TM S	3,865,132	3,869,771	3,920,023	3,996,825	3,912,938	1.6
9	Citric acid-4TM S	1,230,029	1,294,887	1,202,971	1,273,394	1,250,320	3.3	34	Glucose-M O-5TM S	3,379,203	3,121,917	3,190,987	3,180,244	3,218,088	3.5
10	Alanine-2TM S	8,640,462	9,028,803	9,243,813	9,480,040	9,098,280	3.9	35	Glucopyranose-5TM S	548,010	654,027	630,117	691,119	630,818	9.6
11	Valine-2TM S	1,643,565	1,598,273	1,795,816	1,983,400	1,755,264	9.9	36	Sucrose-8TM S	2,622,777	2,662,113	2,631,348	2,696,903	2,653,285	1.3
12	Leucine-2TM S	524,794	517,891	555,474	589,075	546,809	6.0	37	Lactose1-M O-8TM S	3,725,973	3,468,644	3,464,426	3,533,066	3,548,027	3.5
13	Isoleucine-2TM S	2,145,613	2,184,722	2,256,030	2,403,115	2,247,370	5.0	38	Lactose2-8TM S	4,602,143	5,581,471	5,268,097	5,638,305	5,272,504	9.0
14	Proline-2TM S	5,966,070	5,815,625	6,337,728	6,947,649	6,266,768	8.0	39	Maltose1-M O-8TM S	4,552,684	4,072,476	4,110,055	4,065,236	4,200,113	5.6
15	Glycine-3TM S	465,546	464,208	486,616	491,786	477,039	3.0	40	Maltose2-8TM S	3,659,795	4,138,740	3,773,779	4,336,212	3,977,132	7.9
16	Serine-3TM S	6,733,940	6,765,371	7,090,181	7,561,905	7,037,849	5.5								
17	Threonine-3TM S	1,638,309	1,692,383	1,725,648	1,806,406	1,715,687	4.1								
18	Aspartic acid-3TM S	7,876,615	7,698,440	8,112,766	8,337,593	8,006,354	3.5								
19	Methionine-2TM S	401,614	403,554	416,804	439,198	415,293	4.2								
20	Glutamic acid-3TM S	1,775,455	1,595,572	1,826,798	1,865,958	1,765,946	6.8								
21	Phenylalanine-2TM S	6,911,026	6,847,395	7,029,301	7,367,841	7,038,891	3.3								
22	Tyrosine-2TM S	5,707,831	5,797,850	5,428,516	6,026,842	5,740,260	4.3								
23	Lysine-4TM S	1,480,711	1,440,106	1,686,430	1,684,583	1,572,958	8.3								
24	Histidine-3TM S	138,428	132,212	152,731	157,374	145,186	8.1								
25	Tyrosine-3TM S	371,747	362,896	416,279	423,004	393,482	7.8								

本法による野菜ジュースのSCANトータルイオンクロマトグラム



1. Alanine-2TMS
2. Malic acid-3TMS
3. Asparatic acid-3TMS
4. Pyroglutamic acid-2TMS
5. GAVA-3TMS
6. Glutamic acid-3TMS
7. Citric acid-4TMS
8. Fructose1-MO-5TMS
9. Fructose2-MO-5TMS
10. Glucose-MO-5TMS
11. Glucopyronose-5TMS
12. Sucrose-8TMS

拡大



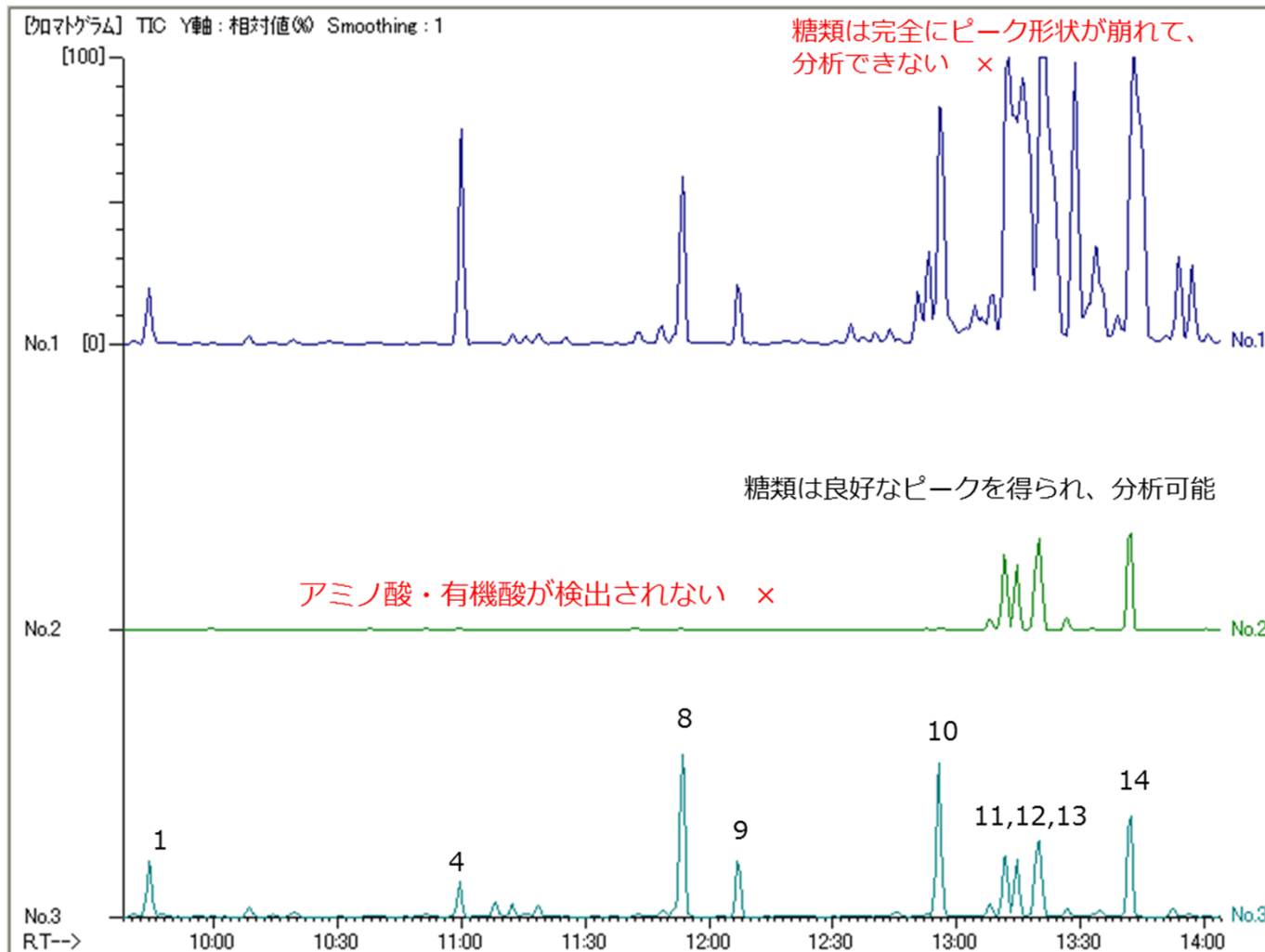
1. Valine-2TMS
2. Isoleucine-2TMS
3. Proline-2TMS
4. Glycine-3TMS
5. Succinic acid-2TMS
6. Fumaric acid-2TMS
7. Serine-3TMS
8. Threonine-3TMS
9. Asparatic acid-3TMS
10. Tartaric acid-4TMS
11. Phenylalanine-2TMS

本法による野菜ジュースを用いた再現性



No.	化合物名	野菜ジュース 10uL/1m L 4倍希釈							Ave	RSD (%)
		PJ-1	PJ-2	PJ-3	PJ-4	PJ-5	PJ-6	PJ-7		
1	Succinic acid-2TM S	53,618	48,219	53,185	55,224	50,265	53,965	51,095	52,224	4.7
2	Fumaric acid-2TM S	13,489	11,865	12,732	12,848	11,804	12,087	13,646	12,639	5.9
3	Malic acid-3TM S	794,415	724,411	793,269	803,023	722,560	788,610	791,110	773,914	4.5
4	Ketoglutaric acid-M O-21	10,287	9,840	10,415	10,414	9,592	10,145	10,393	10,155	3.2
5	Tartaric acid-4TM S	9,313	8,245	8,340	8,706	7,902	8,655	8,584	8,535	5.2
6	Citric acid-4TM S	1,966,814	1,935,224	1,934,789	1,938,684	1,909,637	1,948,231	1,949,949	1,940,475	0.9
7	Alanine-2TM S	2,845,774	2,768,258	2,657,313	2,774,700	2,662,174	2,694,419	2,777,270	2,739,987	2.6
8	Valine-2TM S	101,107	88,755	87,413	92,007	74,199	87,422	102,797	90,529	10.6
9	Leucine-2TM S	15,321	14,916	12,936	14,241	12,279	14,520	14,842	14,151	7.9
10	Isoleucine-2TM S	63,155	50,295	53,582	58,315	47,137	49,470	57,837	54,256	10.6
11	Proline-2TM S	458,672	393,806	425,565	442,178	347,122	412,539	434,530	416,345	8.9
12	Glycine-3TM S	21,668	22,811	20,153	23,835	22,879	21,285	20,946	21,940	5.9
13	Serine-3TM S	476,122	443,964	407,985	449,604	381,791	429,997	474,545	437,715	7.8
14	Threonine-3TM S	78,341	78,139	72,696	78,255	70,169	74,558	77,714	75,696	4.3
15	Aspartic acid-3TM S	4,686,933	4,643,713	4,436,285	4,519,353	4,386,816	4,574,875	4,786,882	4,576,408	3.1
16	Glutamic acid-3TM S	4,736,619	4,882,719	4,744,648	4,812,985	4,716,805	4,689,354	4,954,272	4,791,057	2.0
17	Phenylalanine-2TM S	257,196	257,661	234,500	255,148	244,192	261,769	278,415	255,554	5.4
18	Tyrosine-2TM S	31,487	35,662	32,902	37,777	33,518	39,844	43,109	36,328	11.5
19	Fructose1-M O-5TM S	2,062,980	1,994,412	2,042,655	1,997,072	2,008,716	2,003,833	2,146,394	2,036,580	2.7
20	Fructose2-M O-5TM S	1,711,374	1,647,589	1,673,083	1,650,628	1,653,134	1,638,625	1,689,720	1,666,308	1.6
21	Mannose-M O-5TM S	51,091	49,298	51,429	49,616	49,484	49,335	50,989	50,177	1.9
22	Glucose-M O-5TM S	2,535,728	2,186,072	2,194,972	2,152,255	2,144,596	2,346,947	2,809,710	2,338,611	10.7
23	Glucopyranose-5TM S	742,148	786,844	801,596	816,807	827,676	759,322	625,699	765,727	9.0
24	Sucrose-8TM S	1,847,061	1,746,771	1,728,064	1,720,861	1,710,034	1,725,824	1,789,754	1,752,624	2.8

フルーツジュースを用いた各法による SCANトータルイオンクロマトグラム比較



従来法A
試料量：大
MS導入量
アミノ酸・有機酸・糖類
： **試料40μg相当**

従来法B
試料量：小
MS導入量
アミノ酸・有機酸・糖類
： **試料0.4μg相当**

本法
2段階試料採取法
MS導入量
アミノ酸・有機酸： **試料40.4μg相当**
糖類： **試料0.4μg相当**

- | | | | | |
|-------------------|---------------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|
| 1. Proline-2TMS | 4. Maric acid-3TMS | 7. Glutamic acid-3TMS | 10. Cytric acid-4TMS | 13. Glucose-5TMS |
| 2. Serine-3TMS | 5. Aspartic acid-3TMS | 8. Tartaric acid-4TMS | 11. Fluctose-5TMS | 14. Glucopyranose-5TMS |
| 3. Threonine-3TMS | 6. Aminobutyric acid-3TMS | 9. Asparagine-3TMS | 12. Fluctose-5TMS | |

まとめ

- 2段階に分けて試料量および溶媒を調製して固相に負荷することで、低濃度のアミノ酸および有機酸を多く固相に保持させ、高濃度の糖類を同じ固相に少なく保持させることができた。
- 2段階試料分取法にて得られたクロマトグラムは同じダイナミックレンジ内でそれぞれのピーク強度を得ることができた。
- GCMSに負荷を与えることなく、低濃度のアミノ酸および有機酸と高濃度の糖類を含む試料の一斉分析が可能になることがわかった。