

## オンライン SPE-GC システムを用いた固相脱水誘導体化法 (SPDhD) による尿中有機酸分析法の検討

○新川翔也<sup>1</sup>, 佐々野僚一<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 株式会社アイスティサイエンス

### Validation of an analytical method for organic acids in urine by solid phase dehydration derivatization using online SPE-GC system

○Shoya Arakawa<sup>1</sup>, Ryoichi Sasano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> AiSTI Science Co., Ltd.

【目的】有機酸代謝異常症の化学診断法として尿中有機酸を対象としたトリメチルシリル化処理と GC/MS 分析の組み合わせが頻用されている。当該分析法は GC の高いピーク分離能と EI-MS の豊富なマススペクトルライブラリによる定性により多くの尿中成分を検出可能であるが、親水性成分である有機酸を揮発性の高い成分に変換するためにシリル化処理が必須である。また、シリル化処理前に抽出液を凍結乾燥処理する必要があるためスループットを下げる一因となっている。

本発表では、固相脱水誘導体化法によって迅速に脱水処理と誘導体化処理を実施可能であり GC/MS 分析までを一貫して行うオンライン SPE-GC システムを用いて尿中有機酸分析法を検討した結果について報告する。

【方法】市販ヒト正常尿をサンプルとし、抽出操作後に水酸化ナトリウム溶液で pH 8 前後に調整したものをメタボローム分析用オンライン SPE-GC システム SPL-M100 (アイスティサイエンス) にセットした。前処理 (試料負荷、洗浄、脱水、乾燥、誘導体化) および溶出から GC への注入と分析まで全自動で実施された。

【結果】内部標準物質として採用したノルロイシン、アジピン酸による添加回収試験 (1 点検量) では、100%に近い回収率が得られた。主な内在性成分についても RSD 7%以下 (n=5) と良好な繰り返し精度が得られている。

【考察】通常、誘導体化反応はバッチ分析で行われるが処理後でも反応は進むことから精度低下の原因となっていると考えられる。本手法では GC 分析の直前に誘導体化が行われるため全サンプルで誘導体化反応時間を統一できる利点があり、繰り返し精度に反映されていると考えられる。今後は ERNDIM 尿有機酸定量スキームに挙げられている有機酸 26 成分に着目し、分析法の妥当性について評価していく。

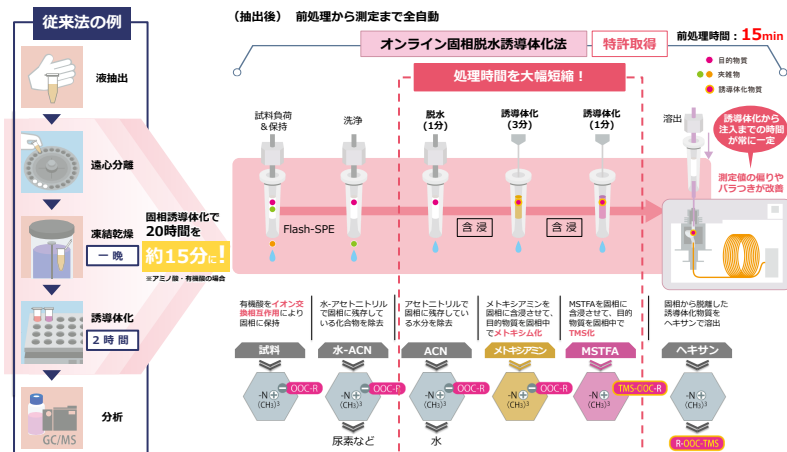
# オンラインSPE-GCシステムを用いた固相脱水誘導体化法(SPDhD)による尿中有機酸分析法の検討

Validation of an analytical method for organic acids in urine by solid phase dehydration derivatization using online SPE-GC system

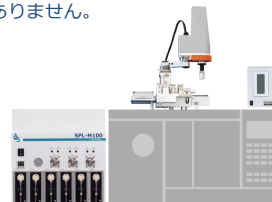
○新川翔也, 佐々野僚一 (株式会社アイスティサイエンス)

本演題に関連して、筆頭著者に開示すべきCOIはありません。

## 1. オンラインSPE-GCシステムによる固相脱水誘導体化法



オンラインSPE-GCシステムによる尿中アミノ酸・有機酸同時分析において、尿や血清など種々の生体試料で良好な結果が得られている。本発表では代謝異常症の化学診断で分析される尿中有機酸について、本システムを用い前処理の検討を行ったため報告する。



オンラインSPE-GCシステム装着図

■ 内蔵による添加回収試験の結果

| 試料        | No. | Nonfluorescent 2TMS | Adipic acid 2TMS |
|-----------|-----|---------------------|------------------|
| 内蔵        | S2  | 1,243,248           | 77,955           |
| STD       | S3  | 1,169,708           | 73,754           |
| バイアル中20μL | S4  | 1,183,814           | 73,366           |
|           | S5  | 1,131,803           | 73,641           |
|           |     | 7,307,658           | 76,525           |
| 回収率       |     | 8.7                 | 6.0              |

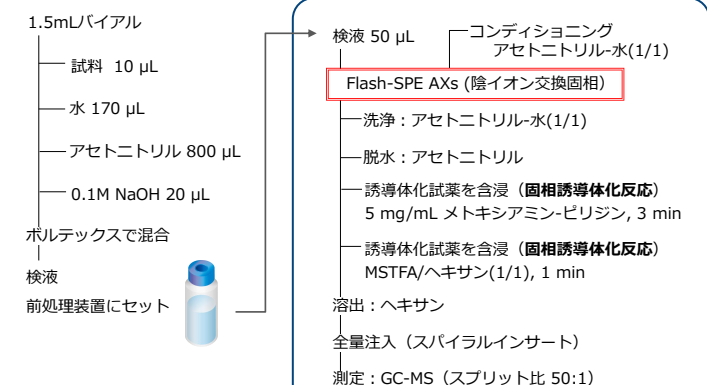
■ 尿から検出された主成分のピーク面積とその再現性 (n=5; RSD, %)

| No. | 化合物名                       | ピーク1    | ピーク2    | ピーク3    | ピーク4    | ピーク5    | Ave     | RSD % |
|-----|----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|
| 1   | Alanine_2TMS               | 180,999 | 180,241 | 182,938 | 187,113 | 183,349 | 182,628 | 1.7   |
| 2   | Ethanolamine_3TMS          | 480,231 | 489,319 | 511,776 | 491,099 | 499,867 | 497,658 | 2.0   |
| 3   | Glycine_3TMS               | 113,691 | 111,586 | 113,681 | 113,661 | 115,306 | 113,545 | 1.2   |
| 4   | Serine_3TMS                | 137,104 | 142,004 | 135,803 | 142,205 | 140,908 | 139,605 | 2.1   |
| 5   | Threonine_3TMS             | 12,057  | 13,193  | 12,284  | 12,865  | 12,957  | 12,673  | 3.8   |
| 6   | 3-Aminoisobutyric acid_3   | 35,108  | 34,875  | 34,061  | 39,005  | 35,149  | 35,644  | 5.4   |
| 7   | Threonine acid_4TMS        | 46,558  | 43,938  | 43,553  | 46,164  | 45,096  | 45,067  | 2.9   |
| 8   | Creatine_3TMS              | 71,004  | 68,064  | 69,480  | 69,156  | 73,484  | 70,254  | 3.0   |
| 9   | p-Hydroxyphenylacetic acid | 7,510   | 7,593   | 7,418   | 7,995   | 8,074   | 7,718   | 3.8   |
| 10  | Acetic acid_3TMS           | 18,000  | 17,740  | 18,623  | 18,335  | 17,708  | 18,093  | 2.2   |
| 11  | Citric acid_4TMS           | 319,348 | 313,843 | 327,899 | 328,974 | 324,024 | 322,772 | 1.8   |
| 12  | L-Lysine_4TMS              | 26,531  | 26,314  | 27,691  | 26,908  | 27,728  | 26,834  | 3.1   |
| 13  | Tyrosine_3TMS              | 67,041  | 67,289  | 65,806  | 67,529  | 66,123  | 66,758  | 1.1   |
| 14  | Gluconic acid_5TMS         | 23,901  | 21,094  | 22,881  | 23,351  | 20,520  | 22,349  | 6.6   |
| 15  | Glucopentonic acid_5       | 59,468  | 57,764  | 51,691  | 59,144  | 53,550  | 56,527  | 4.9   |
| 16  | Uric acid_4TMS             | 358,265 | 365,984 | 362,302 | 356,388 | 382,576 | 365,107 | 2.9   |

参考データ: アミノ酸有機酸同時分析メソッドによる尿中代謝物の分析結果

## 2. 実験方法

前処理フロー



GC-MS条件

注入口条件

注入口温度 220℃(0.5 min)-125℃/min-290℃

セパタムバージ流量 3 mL/min

スプリット比 50:1

GC条件

カラム DB-5ms UI, 0.25mm i.d. x 30m, df;0.25μm

制御モード コンスタントフロー

カラム流量 1 mL/min

オープン温度 80℃(1 min)-20℃/min-220℃-30℃/min-310℃(3 min)

Total 14 min

MS条件

トランスファライン温度 290℃

イオン源温度 250℃

取得モード Scan (m/z 70-470)

## 4. 添加回収試験

妥当性評価の一つとして添加回収試験を行った。対象成分はERNDIM有機酸定量スキームの分析対象有機酸からピックアップし、添加濃度は尿中濃度1mM (バイアル中0.01mM)とした。

Table 2. Peak area of spiked compounds and these recovery rates

| RT<br>(min) | Quant<br>mass | Metabolite name          | Standard solution (0.01 mM in vial) |         |         |         |         |         |         | Urine         |               |       |       | Spiked urine (0.01 mM in vial) |               |         |         |         |         |         | Recov<br>(%) |         |               |               |
|-------------|---------------|--------------------------|-------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------------|---------------|-------|-------|--------------------------------|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|--------------|---------|---------------|---------------|
|             |               |                          | 1                                   | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | Ave.<br>(n=7) | RSD%<br>(n=7) | 1     | 2     | 3                              | Ave.<br>(n=3) | 1       | 2       | 3       | 4       | 5       |              | 6       | Ave.<br>(n=6) | RSD%<br>(n=6) |
| 4.755       | 219           | 3-OH-propanoic acid_2TMS | 5,741                               | 4,918   | 5,181   | 4,677   | 5,634   | 5,283   | 4,713   | 5,164         | 8.2           | 635   | 551   | 718                            | 635           | 5,118   | 4,943   | 5,587   | 4,775   | 5,695   | 5,909        | 5,338   | 8.5           | 91            |
| 4.877       | 191           | 3-OH-Butyric acid_2TMS   | 43,683                              | 43,636  | 48,393  | 42,089  | 52,672  | 48,149  | 41,517  | 45,734        | 9.0           | 2,965 | 2,703 | 3,101                          | 2,923         | 44,957  | 40,253  | 48,520  | 41,584  | 55,189  | 59,498       | 48,333  | 15.9          | 99            |
| 5.299       | 147           | Methylmalonic acid_2TMS  | 185,489                             | 179,287 | 176,565 | 158,482 | 187,650 | 171,943 | 167,847 | 175,323       | 5.8           | 1,990 | 1,443 | 1,304                          | 1,579         | 203,090 | 182,843 | 200,616 | 174,325 | 195,054 | 207,241      | 193,861 | 6.6           | 110           |
| 5.788       | 147           | Ethylmalonic acid_2TMS   | 168,240                             | 145,107 | 157,968 | 138,629 | 172,852 | 156,418 | 150,284 | 155,643       | 7.8           | 3,534 | 3,558 | 3,537                          | 3,543         | 188,453 | 176,591 | 184,709 | 163,389 | 183,098 | 193,889      | 181,688 | 5.9           | 114           |
| 6.297       | 245           | Fumaric acid_2TMS        | 113,255                             | 96,838  | 110,286 | 97,880  | 121,117 | 111,755 | 103,835 | 107,852       | 8.1           | 876   | 669   | 707                            | 751           | 134,646 | 129,050 | 132,942 | 117,551 | 129,343 | 137,906      | 130,240 | 5.4           | 120           |
| 6.678       | 147           | Glutaric acid_2TMS       | 84,383                              | 74,537  | 82,627  | 75,487  | 94,639  | 88,981  | 80,549  | 83,029        | 8.6           | 4,723 | 4,421 | 4,754                          | 4,633         | 102,799 | 99,197  | 105,465 | 95,658  | 101,802 | 112,543      | 102,911 | 5.6           | 118           |
| 7.341       | 73            | Adipic acid_2TMS         | 50,653                              | 46,470  | 50,805  | 48,180  | 59,242  | 56,860  | 50,977  | 51,884        | 8.8           | 2,665 | 2,842 | 9,426                          | 4,978         | 69,539  | 68,196  | 70,187  | 63,632  | 67,048  | 75,086       | 68,948  | 5.5           | 123           |

## 4. まとめ

オンラインSPE-GCシステムを用いた固相脱水誘導体化による尿中有機酸分析法の検討を行った。本手法を用いて市販尿を分析した結果、主要なピークとしてリン酸およびクエン酸が見出された一方で、尿素については検出されなかったことから固相による精製効果により除去されたと考えられる。本分析法はウレアーゼ処理が不要であり、抽出操作以降の自動前処理が可能であることから既存手法と比較してハイスループットな分析法といえる。

## 4. 展望

今回は7成分でのみの添加回収試験であったが、ケトン酸など対象成分を増やしてERNDIMの尿分析精度管理スキームに耐えうる手法として確立していきたい。オンラインSPE-GCシステムでは固相と前処理メソッドの切り替えによって他の成分にも対応できる汎用性があるため、有機酸分析のみならずアミノ酸などの成分についても検討していく予定である。