

オンライン固相脱水誘導体化-GC/MS法を用いた生体試料中 ダイゼイン、ゲニステイン、エクオールの分析法の開発

Development of an analytical method for daidzein, genistein, and equol in biological samples using on-line solid-phase dehydration derivatization GC/MS.

佐々野 僚一¹、丸山 千明¹、新川 翔也¹、宗川 ちひろ²、濱口 真英²

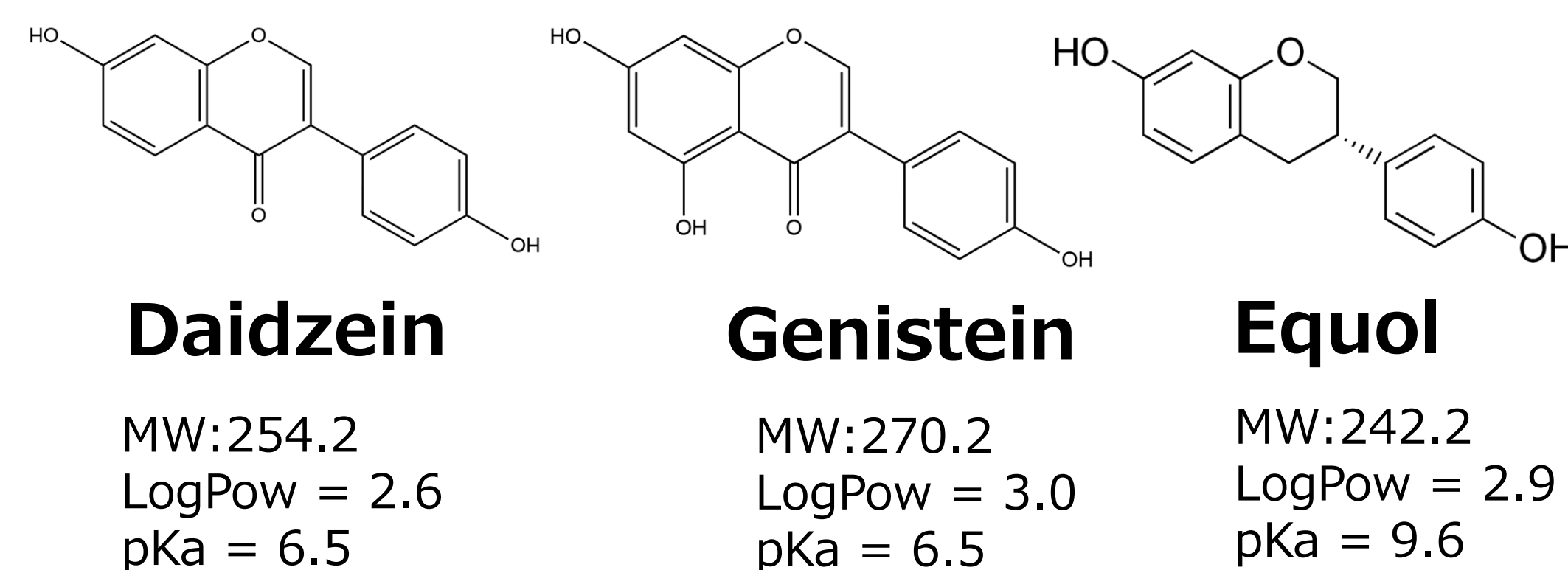
¹株式会社アイスティサイエンス、²京都府立医科大学

Ryoichi Sasano¹, Chiaki Maruyama¹, Shoya Arakawa¹, Chihiro Munekawa², Masahide Hamaguchi²

¹ AiSTI Science, ² Kyoto Prefectural University of Medicine

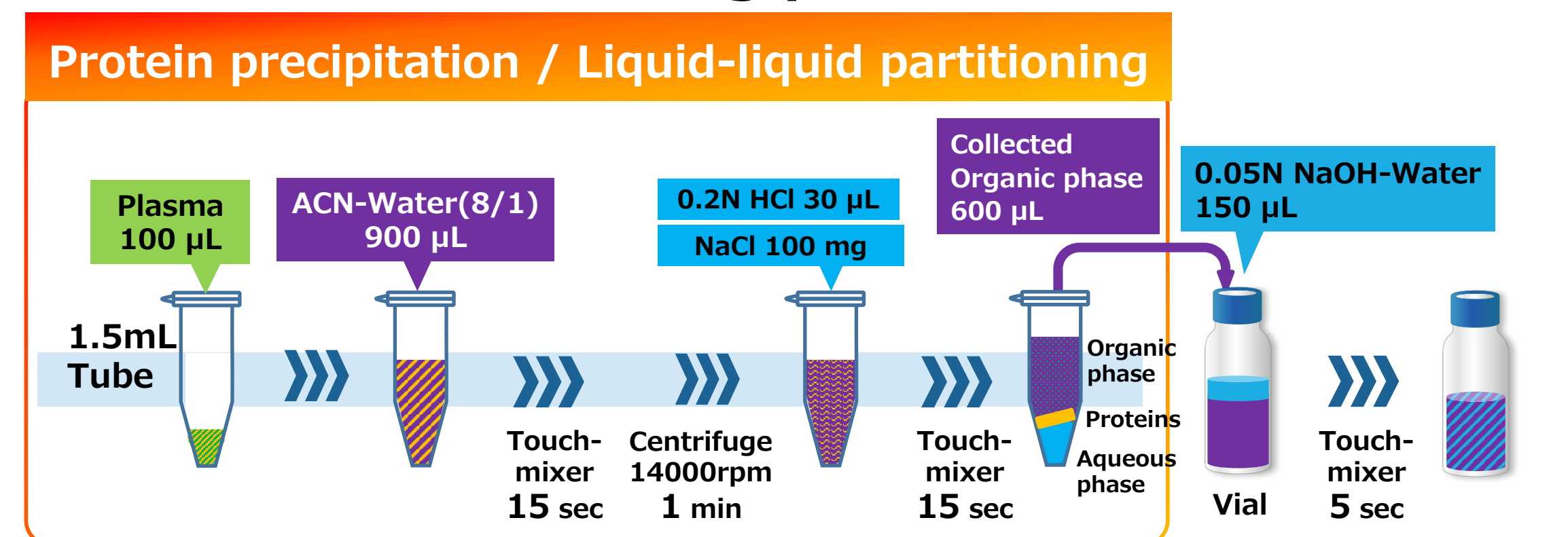
目的

ダイゼインおよびゲニステインは大豆イソフラボンの主要成分であり、その腸内細菌代謝物であるエクオールは、肥満予防効果、血糖値低下効果、骨粗鬆症・乳がんリスク低減効果、抗酸化効果などとの関連が報告されている。そのため、生体試料中におけるこれら化合物の高感度かつ高精度な分析法の確立が求められている。しかし、従来のGC/MS分析では誘導体化が必要であり、前処理が煩雑であることや再現性が課題となっている。本研究では、オンライン固相脱水誘導体化（Solid Phase Dehydration Derivatization：SPDhD）技術を用い、生体試料中のダイゼイン、ゲニステインおよびエクオールを迅速かつ高感度に測定するGC/MS分析法の開発を目的とした。

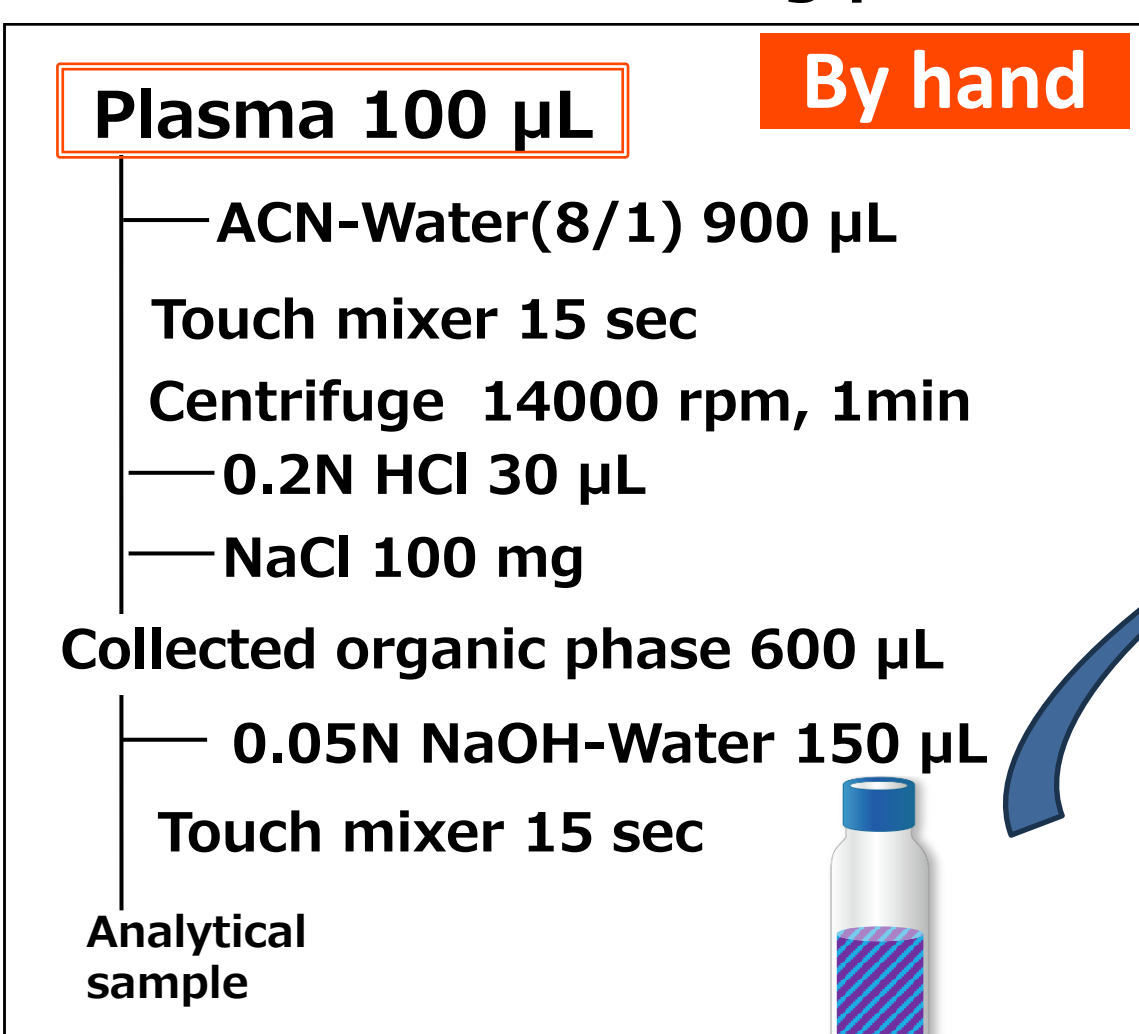


実験方法

■ Method for extracting plasma



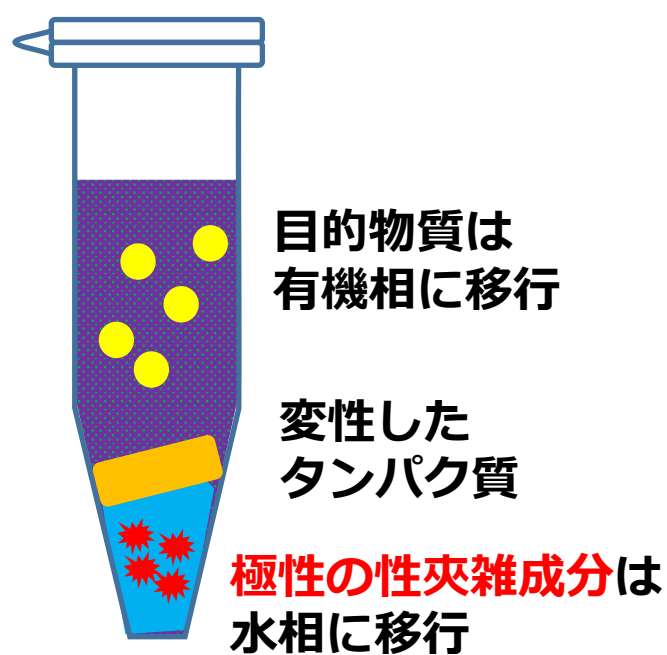
■ Method for extracting plasma



結果と考察

除タンパクおよび液液分配を兼ねた抽出方法の検討

始めに除タンパクを先に行い、その後、液液分配を行うようにした。アセトニトリル（ACN）と水の比率が4：1になるように血漿100 µLに対して、ACN-水（8/1）を900 µLを添加した。遠心分離して除タンパクしながら、目的物質を抽出した。続けて、塩酸とNaClを添加して、液液分配を行った。この液液分配により、目的物質は有機相に移行し、極性の夾雑成分は水相に移行したと考えられ、特に固相に負担のかかるイオン性の極性夾雑成分を取り除くことができたと考えられる。また、変性したタンパク質が水相と有機相の狭間に浮遊することで、分取がしやすくなった。



液液分配時のpH調整について

液液分配では、目的物質を有機相に移行させるために、水相のpHを下げて目的物質を非乖離の状態にして疎水性を高める必要がある。そこで、pH調整剤として、塩酸を添加した。

固相に負荷する前のpH調整剤について

目的物質を強陰イオン交換の固相に保持させるためには、pHを上げて目的物質を乖離させて、陰イオン性にする必要がある。

そこで、分取した有機相の抽出液に0.05N NaOH水溶液を添加して、pH上げて、測定検液とした。

オンライン固相脱水誘導体化法（SPDhD)の条件

本法の抽出方法は油系も含んでいることが考えられるため、洗浄および脱水にはアセトニトリルを選定した。誘導体化試薬の希釈溶媒にはトルエンを用いて、MSTFA-トルエン（1/1）とした。誘導体化は誘導体化溶液を固相に含浸させて、室温で反応時間は1分で行った。

そして、そのまま溶出しながらGC/MSへ導入して、測定した。

本法の固相脱水誘導体化法はその処理時間が15分でかつ全自動で処理することができた。また、GC/MSで測定（平衡時間を含めて20分）している間に次の検体を処理することで、入スルーットを成し、多検体にも適用可能であることが分かった。

添加回収試験

血漿に目的物質の濃度が1 µMになるように標準溶液を添加して、本法による添加回収試験を行った。

●定量イオンクロマトグラム

標準溶液および血漿に添加した時のそれぞれの定量イオンクロマトグラムをFig.1に示す。夾雑成分の影響のない定量イオンクロマトグラムを得られた。

●回収率について

血漿を用いて、添加回収試験を行った結果、ダイゼイン、ゲニステインおよびエクオールのそれぞれの回収率が100%，116%，82%であった。

●再現性について

本法のn=6による再現性はRSD が3.8%，9.6%，4.2%であった。本法での人による作業は簡単な抽出操作のみで、抽出後の固相誘導体化から測定までを全自動で行っていることが寄与していると思われる。

まとめ

本法では、除タンパク後に液液分配を行うことで、生体試料中の極性陰イオン性夾雑成分をあらかじめ除去し、固相への試料負荷量を増加させることができた。さらに、オンライン固相脱水誘導体化を適用することで前処理から誘導体化までを自動化し、血漿中のダイゼイン、ゲニステインおよびエクオールを高い再現性で測定することが可能となった。以上より、迅速かつ高感度・高精度な自動分析法を確立した。

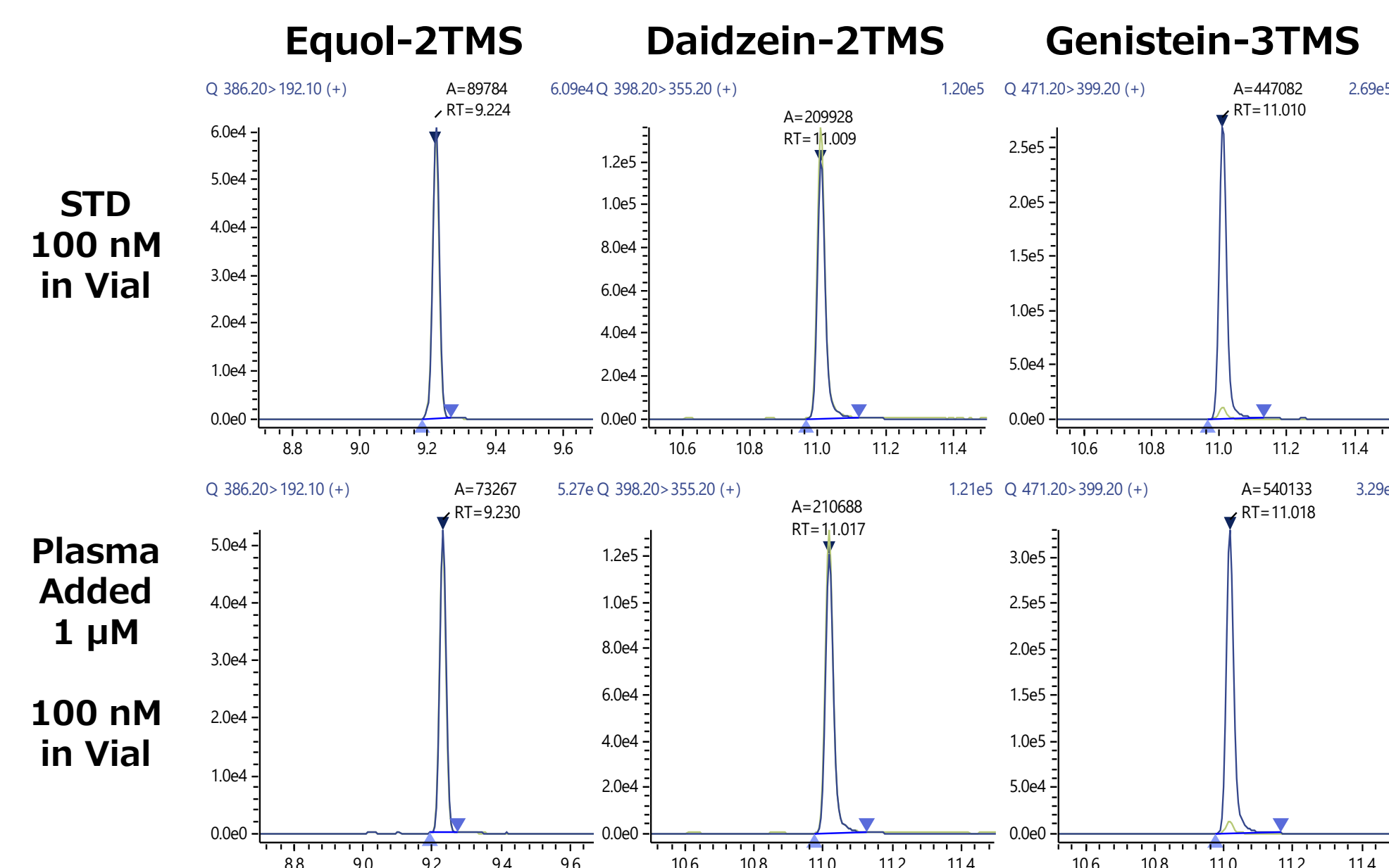
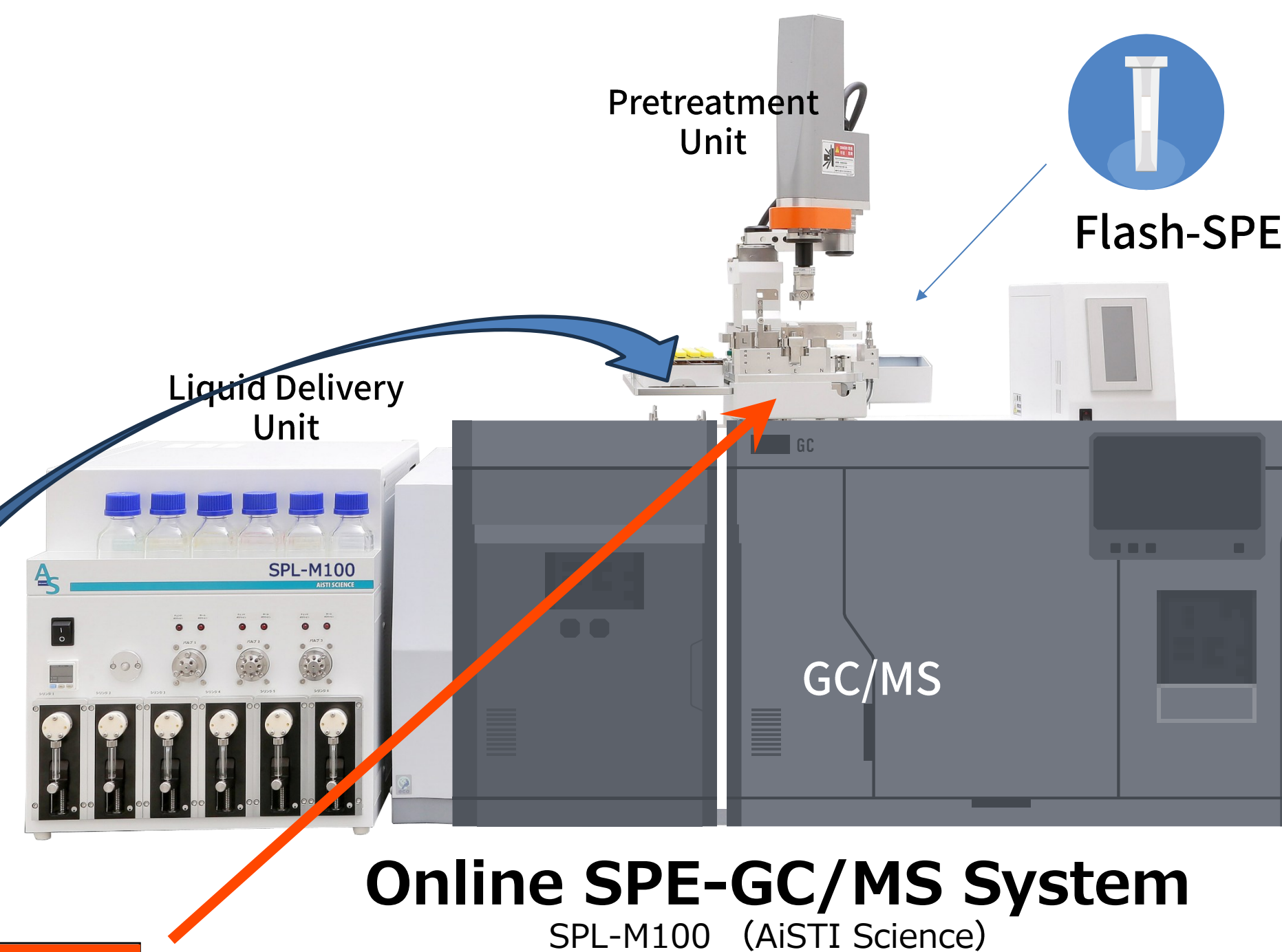
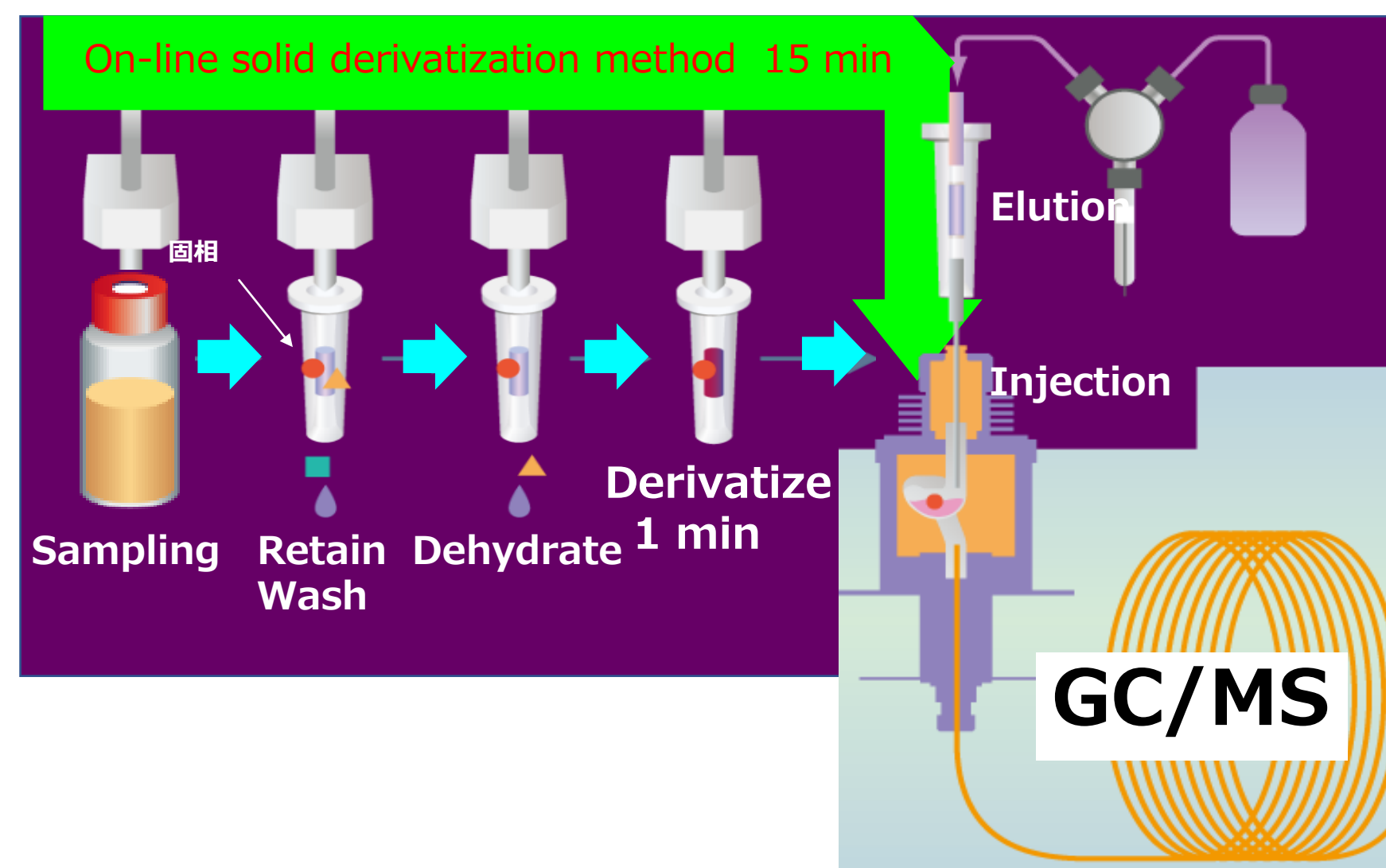


Fig. 1. Comparison of Quantitative Ion Chromatograms

※血漿はドナーから口頭および書面によるインフォームド・コンセントが適切に取得されている。



Online SPE-GC/MS System



GC/MSの条件について

●大量注入-スプリット法（LVI-Split）の検討

注入口の初期温度を110℃として、固相から溶出しながら注入した溶出液（30µL）をスパイラルインサート内で留めながら、スプリット比1:150で大部分の溶出溶媒を輩出し、その後、スプリット比1:5にして、注入口の温度を300℃まで上げて、目的物質をGC/MSに導入することができた。これにより大幅な高感度かを達成できた。

●GCオープン温度の条件

目的物質の誘導体化物のGC溶出温度が高いことから、初期温度を170℃に設定して、330℃まで昇温した。GCカラムは最高使用温度が高いInertCap 5HT（ジーエルサイエンス社）を使用した。

Table 1. Online SPE-GC/MS Method

SPE-GC Interface	SPL-M100 (AiSTI Science)
SPE Cartridge	Flash-Axis
Sampling Volume	100 µL
PTV Injector	LVI-S250 (AiSTI Science)
Insert Type	Spiral Insert
Injector Temp.	110℃(0.3min)-120℃/min-300℃(12min)
GC	LVI-Split 1:5
Inlet Mode	Constant Flow, 1 ml/min
Flow Mode	5HT, 0.25mm i.d. x 1m
Pre-Column	0.25mm i.d. x 30m, df;0.25µm
Column	170℃(3min)-30℃/min-270℃-10℃/min-330℃(2min)
Oven Temp.	
Trans. Line Temp.	320℃
MS	
MS Method	MRM

Table 2. Results of Spike-Recovery Tests. (Peak Area)

Smple	ID	Equol	Daidzein	Genistein
STD, 100 nM	ST	89,784	209,928	447,082
Plasma	U1	82	344	1,464
	U2	64	331	1,168
	Ave.	73	338	1,316
Plasma Added 1 µM (100 nM in Vial)	A1	73,437	211,657	538,134
	A2	76,190	214,963	554,631
	A3	74,353	213,562	542,670
	A4	68,101	194,293	419,673
	A5	72,906	211,404	525,873
	A6	76,867	215,066	535,108
	Ave.	73,642	210,158	519,348
	RSD, %	4.2	3.8	9.6
	回収率, %	82	100	116

※本発表に関して、開示すべき利益相反（COI）はありません。