



オンライン SPE-GC/MS システムによる メタボローム分析の自動化

マウス血清中のアミノ酸、有機酸、核酸塩基の分析



＜要旨＞ Agilent GC/MS に、アイスティサイエンス社製 SPE-GC インターフェースを搭載することにより、抽出以降の水分除去、誘導体化、GC/MS 分析のオンライン自動化が可能となりました。

Key Words: 固相誘導体化、オンライン、自動化、アミノ酸、有機酸、核酸塩基、生体試料、食品、メタボローム分析、Flash-SPE

1. はじめに

従来のメタボローム分析は、採取した試料を溶媒抽出、遠心濃縮、凍結乾燥、誘導体化等の前処理工程が煩雑であるため、長時間を要するとともに熟練された技術が必須でした。

また、多検体の前処理をバッチ処理した場合、GC/MS での測定はそれらの検体を順次測定していくため、誘導体化後から測定までの時間が異なります。これらは分析バッチ間の系統誤差の要因となり、多サンプルのメタボローム解析を遂行する上で致命的な短所でした。そこで、迅速な自動誘導体化と GCMS への直接試料導入を目指した、固相誘導体化法を用いたオンライン SPE-GC/MS システム¹⁾をご紹介します。

2. 分析条件

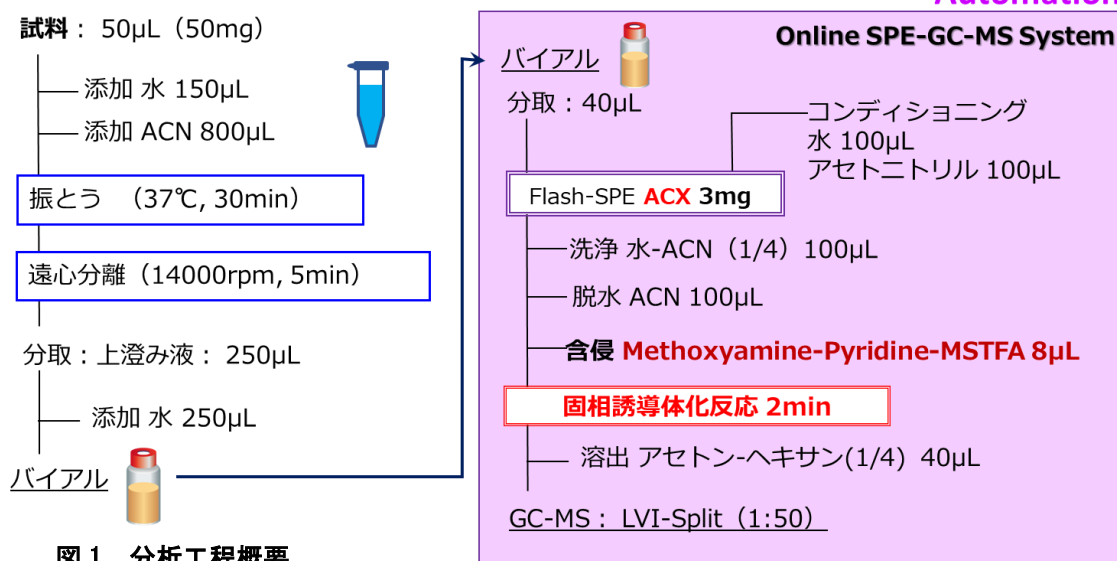
図 1 に分析の全工程、図 2 にオンライン固相抽出・誘導体化工程、表 1 に構成と分析条件を示します。

1) 抽出

試料 50 μ L (固体の場合 50mg) を採取し、水およびアセトニトリルで振とう抽出後遠心分離を行い、上澄み液を測定バイアルに分取し水で希釈します。

2) 固相抽出と固相誘導体化、GC/MS 測定

抽出工程で得られたバイアルを装置にセットするだけで前処理から GC/MS 測定まで自動分析となります。



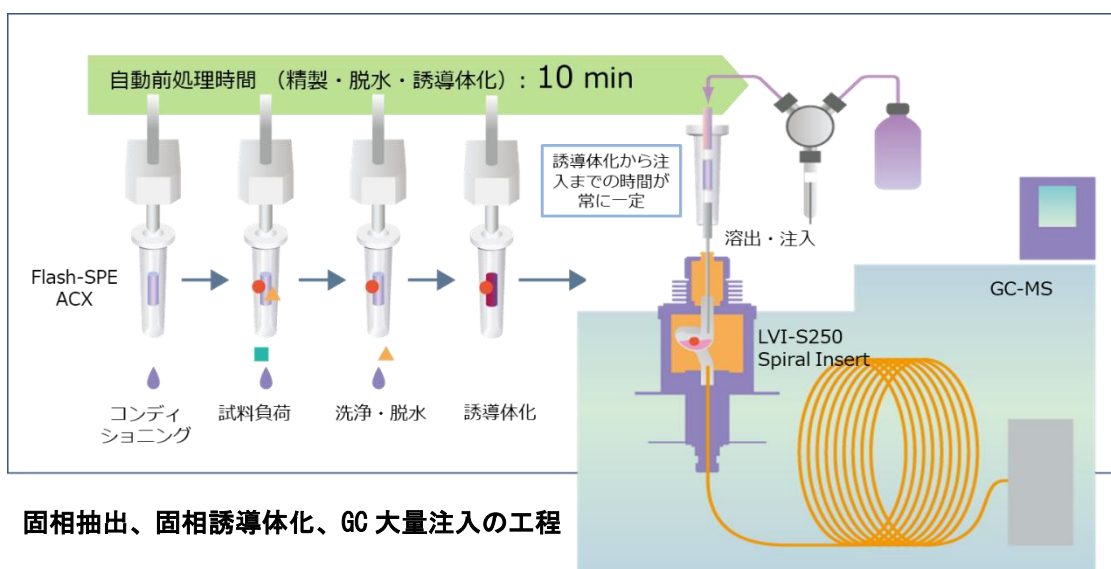


図2 固相抽出、固相誘導体化、GC 大量注入の工程

具体的な自動工程は、固相コンディショニング→試料 40 μ L 分取→抽出液を分取し固相に負荷→水アセトニトリル混液で固相を洗浄→アセトニトリルを通液し脱水→誘導体化試薬を含浸させ誘導体化→アセトンヘキサンで溶出し同時に GC/MS へ注入となります。特徴的なのは「固相抽出」と「固相誘導体化」です。アミノ酸や有機酸等の目的物質をイオン交換作用で固相に保持し、保持された状態で誘導体化試薬を含浸させ、固相内で誘導体化を行います。

表1 溶出および GC/MSD 条件

SPE-GC Interface	SGI-M100 (AiSTI Science)
SPE カートリッジ	Flash-SPE ACX (AiSTI Science)
Sample Volume	40 μ L
PTV Injector	LVI-S250 (AiSTI Science)
インサート	Spiral Insert (AiSTI Science)
注入口温度	80 $^{\circ}$ C (0.2min) - 50 $^{\circ}$ C/min - 290 $^{\circ}$ C (38min)
GC	7890B (Agilent)
プレカラム	Deactivated silica capillary tube, 0.25mm $\times$ 0.3m
分析カラム	DB-5MS, 0.25mm i.d. $\times$ 30m, df: 0.25 μ m
カラムオープン	60 $^{\circ}$ C (2min) - 15 $^{\circ}$ C/min - 240 $^{\circ}$ C - 20 $^{\circ}$ C/min - 310 (1min)
注入モード	スプリット
スプリット比	50
ガスセーバー	注入 6 分後に 15mL/min
MSD 測定モード	SCAN; 70-500m/z

3. 結果

マウス血清中のアミノ酸、有機酸、核酸塩基の定量について、図3にTICのクロマトグラムを示します。自動前処理、大量注入での測定で、分離および

ピーク形状も良好です。表2に実サンプル9回連続測定の再現性を示します。25成分中22成分でRSDが10%未満。3成分で20%未満となりました。表3に添加回収試験結果を示します。実サンプルに標準品を0.01nmol/ μ L（バイアル中濃度）となるように添加したところ、29成分中23成分で70-120%、6成分で150%未満となりました。図4に一部の成分の固相への試料負荷量と面積値の直線性を示します。

4. まとめ

分離、再現性、添加回収試験、直線性で良好な結果が得られたことから、Agilent GC/MSに、アイステイサイエンス社製 SPE-GC インターフェースを搭載した分析システムによりメタボローム分析の自動化が可能であることが確認できました。

また、従来2日間におよんだ前処理が10分程度に短縮可能となりました。

当該分析法では、従来抽出に使用されていたクロロホルムが不要となります。自動化により溶媒暴露が軽減し、安全性も向上します。

5. 参考文献

1) Ryoichi SASANO¹, Koji MACHITANI², Shusuke OSAKI², Masahiro FURUNO³, Eiichiro FUKUSAKI³
1; Aisti Science co., Ltd., 2; Industrial Technology Center of Wakayama prefecture, 3; Osaka University

Development of online SPE-GC-MS system with automated SPE-based derivatization method for metabolome analysis.

Annual Conference of the Metabolomics Society Abstracts, 30 (2017)



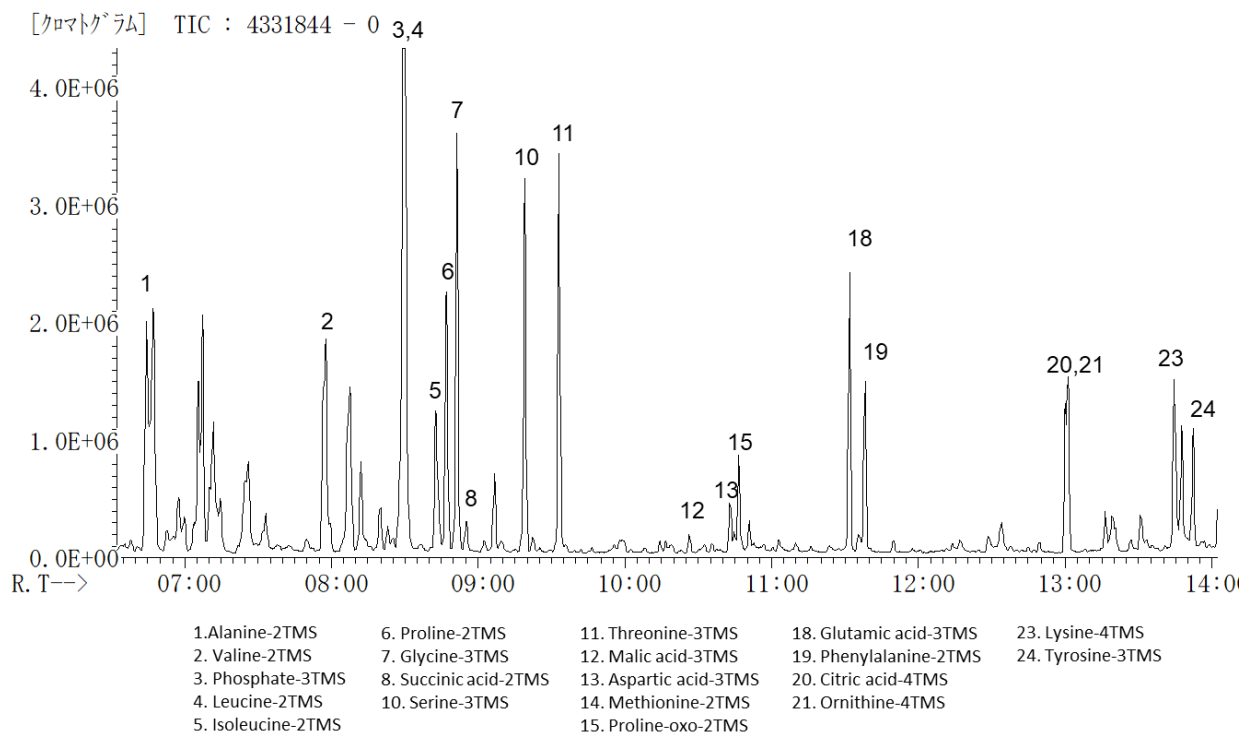


図3 マウス血清のトータルイオンクロマトグラム

表2 マウス血清を9回連続分析した際の再現性

No.	Compound	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Ave.	RSD, %
1	Alanine-2TMS	5,541,262	5,554,574	5,750,943	5,697,229	5,588,344	5,721,789	5,850,742	5,681,853	5,706,369	5,677,012	1.8
2	Valine-2TMS	2,755,712	2,771,037	2,893,545	2,911,101	2,803,596	2,871,371	2,926,797	2,853,359	2,867,084	2,850,400	2.1
3	Phosphate (3:1)-3TMS	4,201,912	4,356,822	4,434,444	4,412,647	4,201,988	4,259,611	4,389,792	4,266,977	4,210,194	4,303,821	2.2
4	Norleucine-2TMS	4,056,211	4,080,919	4,276,463	4,306,038	4,157,663	4,270,224	4,312,737	4,223,433	4,227,870	4,212,395	2.2
5	Isoleucine-2TMS	1,078,007	1,080,660	1,131,523	1,141,625	1,094,518	1,124,087	1,139,671	1,121,838	1,118,968	1,114,544	2.2
6	Proline-2TMS	2,990,521	3,000,081	3,191,334	3,154,192	3,053,991	3,162,046	3,244,535	3,101,102	3,103,402	3,111,245	2.8
7	Glycine-3TMS	3,037,839	2,895,879	3,107,951	3,217,887	3,354,424	3,293,368	3,059,023	3,070,554	3,113,071	3,127,777	4.5
8	Succinic acid-2TMS	29,040	29,234	29,610	29,118	26,403	27,322	28,530	28,003	27,169	28,270	3.9
9	Fumaric acid-2TMS	14,400	13,605	14,528	13,757	13,469	13,211	12,847	12,142	11,996	13,328	6.7
10	Serine-3TMS	1,617,736	1,601,793	1,691,622	1,701,792	1,664,881	1,718,251	1,759,025	1,685,417	1,696,241	1,681,862	2.9
11	Threonine-3TMS	854,196	855,270	914,762	923,062	882,377	911,832	928,177	920,805	914,839	900,591	3.2
12	Malic acid-3TMS	20,457	20,641	21,151	21,808	19,071	20,283	20,751	19,941	19,094	20,355	4.4
13	Aspartic acid-3TMS	195,512	183,707	208,840	210,072	204,684	225,449	240,856	233,191	238,539	215,650	9.3
14	Methionine-2TMS	93,568	94,791	100,427	104,122	101,698	103,386	105,816	97,718	99,320	100,094	4.2
15	Proline-oxo-2TMS	719,078	784,164	740,721	869,323	610,496	641,127	674,841	868,861	839,473	749,787	13.0
16	Cytosine-2TMS	5,878	5,728	5,647	5,592	5,629	5,516	4,974	5,028	5,413	5,489	5.6
17	Aminobutyric acid-3TMS	87,027	83,832	70,197	83,924	75,857	76,002	85,355	82,175	87,546	81,324	7.3
18	Glutamic acid-3TMS	1,268,042	1,206,401	1,296,449	1,342,892	1,281,052	1,393,273	1,513,486	1,405,403	1,516,263	1,358,140	8.0
19	Phenylalanine-2TMS	699,562	714,084	762,498	773,628	724,391	758,118	786,916	753,925	773,827	749,661	4.0
20	Citric acid-4TMS	335,441	333,534	337,541	334,091	312,166	321,946	322,681	314,421	317,960	325,531	3.0
21	Ornithine-4TMS	663,367	673,444	787,729	789,718	771,470	808,655	771,975	652,659	737,745	739,640	8.2
22	Adenine-2TMS	4,077	3,243	3,358	3,410	3,217	2,885	3,216	2,978	3,005	3,265	10.8
23	Lysine-4TMS	384,118	400,505	466,485	466,911	449,562	483,398	450,203	364,748	433,653	433,287	9.5
24	Tyrosine-3TMS	739,551	763,670	838,110	848,309	773,737	850,307	875,807	790,095	852,336	814,658	5.9
25	Guanine-3TMS	3,773	3,789	3,207	3,438	2,485	2,720	2,968	3,136	2,457	3,108	16.1



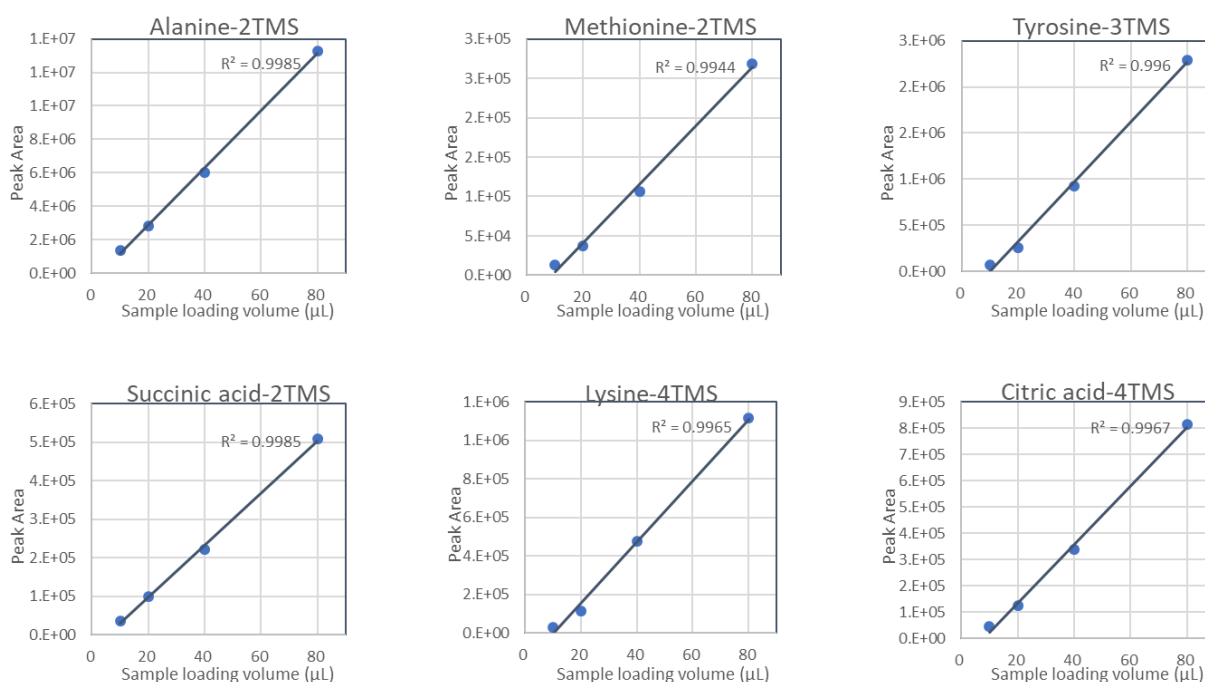


図4 マウス血清の固相負荷量における直線性

表3 添加回収試験結果

No.	Compound	Standard ST	Mause M	Mause +ST A	REC, % (A-M)/ST
1	Alanine-2TMS	2,395,769	5,539,074	7,703,074	90
2	Valine-2TMS	2,857,898	2,759,114	5,744,538	104
3	Phosphate (3:1)-3TMS	1,691,961	4,279,367	6,787,045	148
4	Norleucine-2TMS	3,402,608	4,067,823	7,424,476	99
5	Isoleucine-2TMS	2,801,029	1,086,415	4,096,438	107
6	Proline-2TMS	3,037,141	2,998,133	6,301,408	109
7	Glycine-3TMS	1,800,878	2,966,859	4,603,320	91
8	Succinic acid-2TMS	2,958,640	224,256	3,375,441	107
9	Fumaric acid-2TMS	1,676,379	13,946	1,869,217	111
10	Serine-3TMS	1,769,642	1,608,041	3,632,037	114
11	Threonine-3TMS	900,834	852,911	1,865,424	112
12	Malic acid-3TMS	475,088	20,319	551,360	112
13	Aspartic acid-3TMS	440,006	190,845	795,480	137
14	Methionine-2TMS	1,186,002	93,758	1,417,378	112
15	Proline-oxo-2TMS	1,684,508	740,135	3,085,018	139
16	Cytosine-2TMS	1,069,383	5,948	1,182,673	110
17	Aminobutyric acid-3TMS	1,425,778	82,936	1,774,441	119
18	Ketoglutaric acid-3TMS	162,941		163,614	100
19	Glutamic acid-3TMS	381,767	1,237,713	1,524,345	75
20	Phenylalanine-2TMS	1,361,973	705,325	2,285,882	116
21	Asparagine-3TMS	212,637		291,982	137
22	Putrescine-4TMS	928,721	35,714	1,124,501	117
23	Aconitic acid-3TMS	482,874	3,083	544,525	112
24	Citric acid-4TMS	2,365,829	334,488	3,143,411	119
25	Ornithine-4TMS	741,337	668,406	1,295,449	85
26	Adenine-2TMS	1,710,221	3,660	1,966,746	115
27	Lysine-4TMS	344,472	389,645	680,111	84
28	Tyrosine-3TMS	2,171,566	748,544	3,535,152	128
29	Guanine-3TMS	1,112,060	3,595	1,479,513	133

※添加濃度：0.01 nmol/μL（バイアル中濃度）

【GC-MS-201711MT-001】

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる障害について一切免責とさせていただきます。
また、本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

www.agilent.com/chem/jp



Agilent Technologies