アプリケーションノート
メタボロミクス

オンライン固相誘導体化法と JetClean セルフクリーニングイオン源搭載 GC/MS を用いた醤油のメタボローム解析

Authors

杉立久仁代[1], 穴沢秀峰[1],

中村貞夫[1], 佐々野僚一[2]

1.アジレント・テクノロジー株式会社

2.株式会社アイスティサイエンス

要旨

固相誘導体化法はイオン交換カラムを用いてイオン性の代謝物を保持させ、固相カラム内で脱水、誘導体化を行う手法です。メタボロミクス分析では脱水、誘導体化に長時間を要していましたが、固相誘導体化法によれば、脱水～誘導体化に係る時間が 10 分以内と大幅に短縮されます。またオンライン化することで、誘導体化してから測定までの時間がサンプル毎に一定となり、再現性の高い測定が可能になりました。

Key Words:オンライン固相誘導体化法, メタボロミクス, JetClean セルフクリーニングイオン源

1. はじめに

食品中のアミノ酸や有機酸等の成分を分析する手法はいくつかありますが、誘導体化することで複数成分を同時に測定できるGC/MSは広く使用されています。またGC/MSはカラムや前処理装置を変更することで香気成分を測定できるなど多様な測定ができる点でも食品分析には向いていると言えます。

しかしながら、アミノ酸や有機酸のような水溶性の高い成分をGC/MSで測定するには、水分除去に4〜8時間、誘導体化に2時間といった長時間を要するのが難点です。

本アプリケーションノートでは、固相誘導体化装置をGC/MSに接続したオンラインシステムを用い、その有用性について検討しました。またメタボロミクスではイオンgンのメンテナンス頻度が高いため、自動クリーニング機能を有するJetCleanセルフクリーニングイオン源（以下JetCleanイオン源）を用いました。

2. 装置及び条件

オンラインSPE-GCシステム：SGI-M100 [アイスティサイエンス]
GC用大量注入装置：LVI-S250 [アイスティサイエンス]
GC-MSシステム：Agilent 7890 GC/5977B GC/MS
カラム：DB-5ms (30m×0.25mm I.D. 膜厚0.25μm, P/N 122-5536)
ライナー：スパイラルインサート
注入口温度：150℃(1min)-100℃/min-240℃-50℃/min-300℃(21min)
注入法：大容量スプリット(50:1)
カラム流量：1.1mL/min(He, コンスタントフロー)
オーブン温度：80℃(2min)-10℃/min-310℃(5min)
トランスファーライン温度：290℃
イオン源温度：300℃
四重極温度：150℃
JetCleanイオン源：測定とクリーニング

※通常システムの測定
注入口温度：250℃
ライナー：ウルトライナートライナー（P/N 5190-2295)
注入法：1μL, スプリット10:1
オーブン温度：60℃(1min)-10℃/min-325℃(10min)

図1. オンライン固相誘導体化GC-MSシステム（左）とJtCleanセルフクリーニングイオン源（右）.

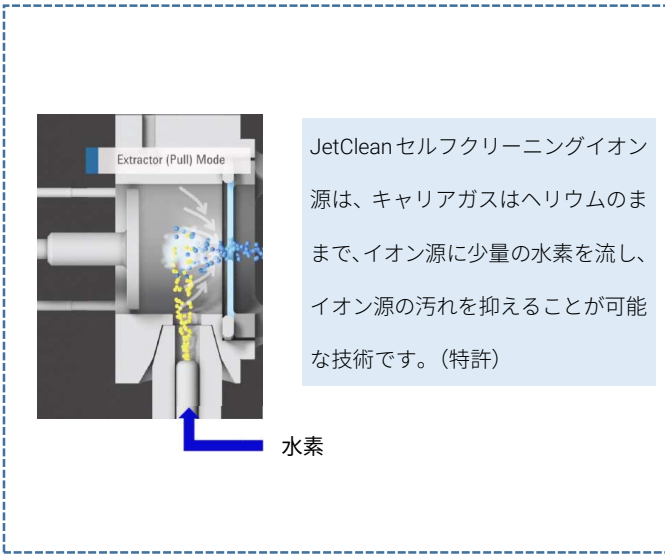
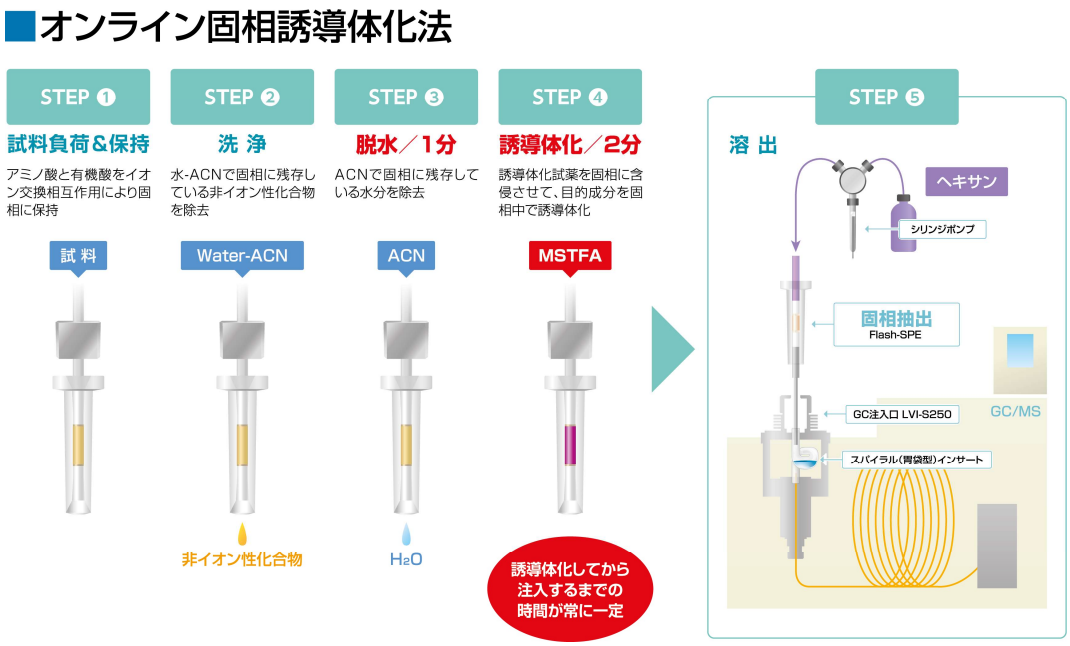


図2. オンライン固相誘導体化法のしくみ



3. 実験結果

1. 試料
濃口醤油（数種類）、いしり、ナンプラー

2. 前処理法
① 従来法（水/メタノール/クロロホルム）
超純水で10倍に希釈→醤油希釈液+メタノール/水/クロロホルム(5/2/2, v/v/v)で除タンパク+脱脂→遠心乾固後、誘導体化（醤油として400倍希釈）
② 従来法（水/アセトニトリル）
超純水で50倍希釈→醤油希釈液/アセトニトリル(1/4,v/v)で除タンパク→遠心乾固後、誘導体化（醤油として250倍希釈）
③ 固相誘導体化法
超純水で50倍希釈→醤油希釈液/アセトニトリル(1/4,v/v)で除タンパク後、超純水でさらに2倍希釈（醤油として500倍希釈）

3. 結果
3-1 従来法との比較
誘導体化する前の試料の抽出及び除タンパクには広く用いられている水/メタノール/クロロホルム法（Bligh&Dyer法）と水/アセトニトリル法を用い比較したところ、ほぼ同等の結果が得られました。そこで固相誘導体化法には、水/アセトニトリル法で抽出および除タンパクを行った検液を使用しました。
固相誘導体化法では、糖類及び非イオン性代謝物は処理されるため検出されず、またグリセロールやリン酸と共溶出するロイシンの検出が容易になりました。（図3）それ以外の代謝物ではアミノ酸のレスポンスバランスは従来法と固相誘導体化法でほぼ同等の結果が得られました。（図4）

図3. 醤油希釈液を誘導体化処理した試料のTICCの比較

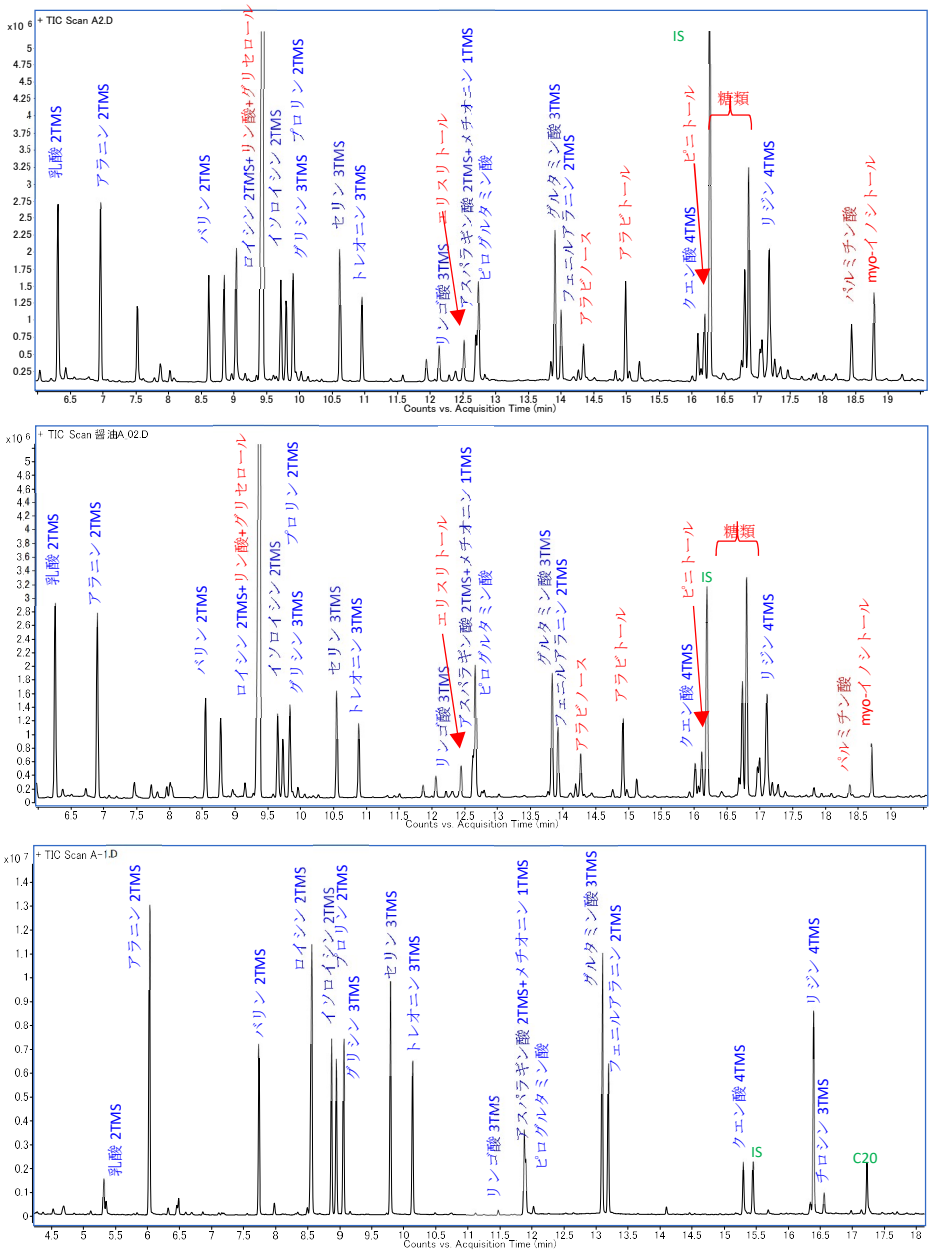
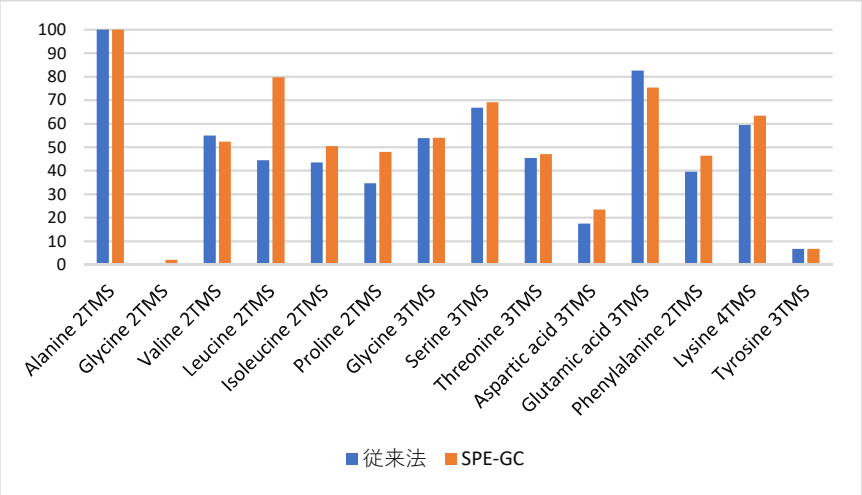


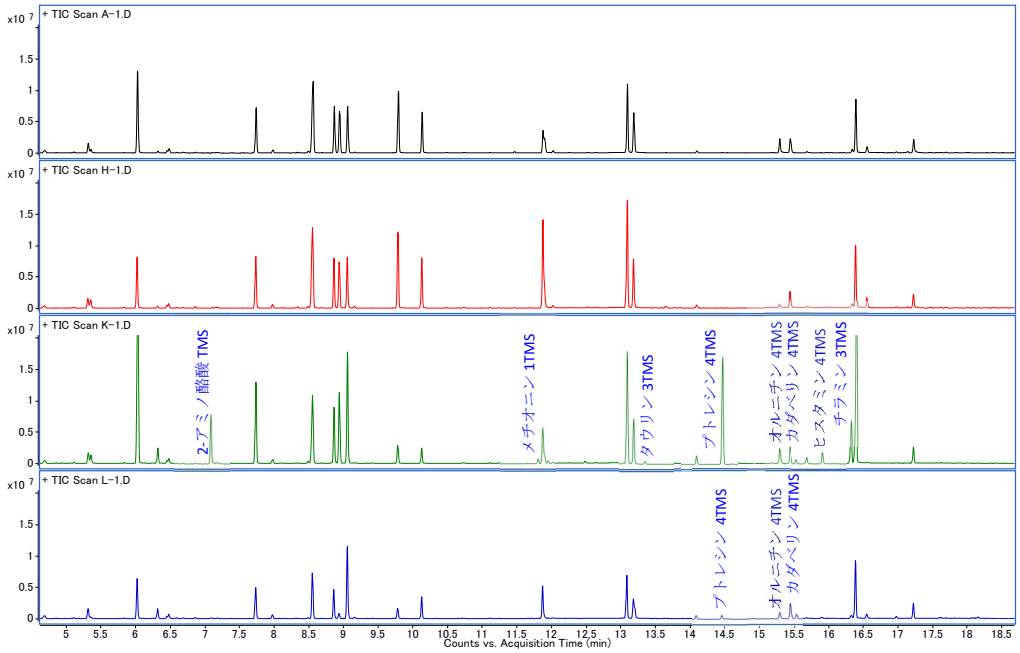
図4. デコンボリューションによる各代謝物の面積相対比（アラニンを100%として）



3-2 各種醤油の比較

複数のメーカーの濃口醤油を比較したところ、アミノ酸はメーカーを問わず似たようなバランスで含まれていました。一方、いしりやナンプラーのような魚醤の場合は、アミノ酸バランスは濃口醤油とは異なりました。いしりからは2-アミノ酪酸の他、プトレシン、チラミン等のアミン類（量によっては腐敗アミン）も検出されました。これらの成分についても従来法と固相誘導体化法では同等の結果が得られました。

図5. 各種醤油の固相誘導体化法の結果（上より濃口醤油、生醤油、いしり、ナンプラー）



3-3 JetCleanイオン源

JetCleanイオン源をオン（水素を流している状態）にして用いると、若干のレスポンスの低下が認められますが、オフ（水素を使わない状態）の場合とに大きな差がないことが分かりました。また、アミノ酸、有機酸において、マススペクトルを取得した結果、JetCleanイオン源がオンの場合でもマススペクトルには全く影響がないことが分かり、既存のRTやRI、マススペクトルを搭載したメタボロミクスライブラリを使用することが可能でした。

図6. アミノ酸、有機酸標準混合溶液のJetCleanオン、オフ時のTICCの比較
上より JetCleanオフ、JetCleanオン、JetCleanオン（水素最大流量）

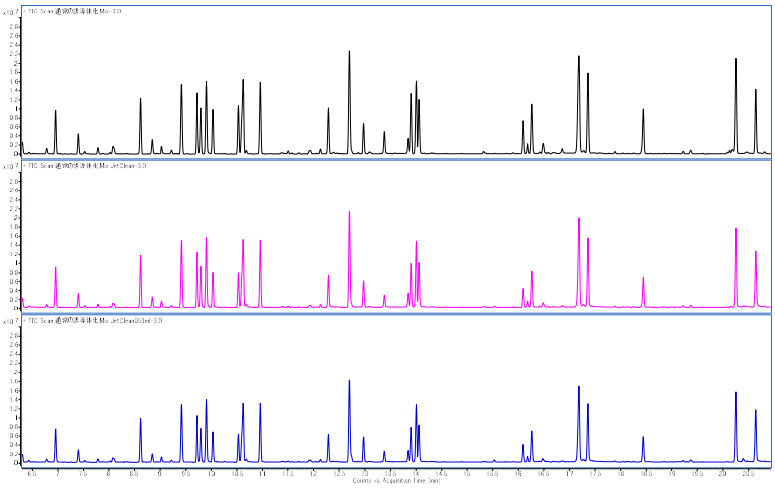
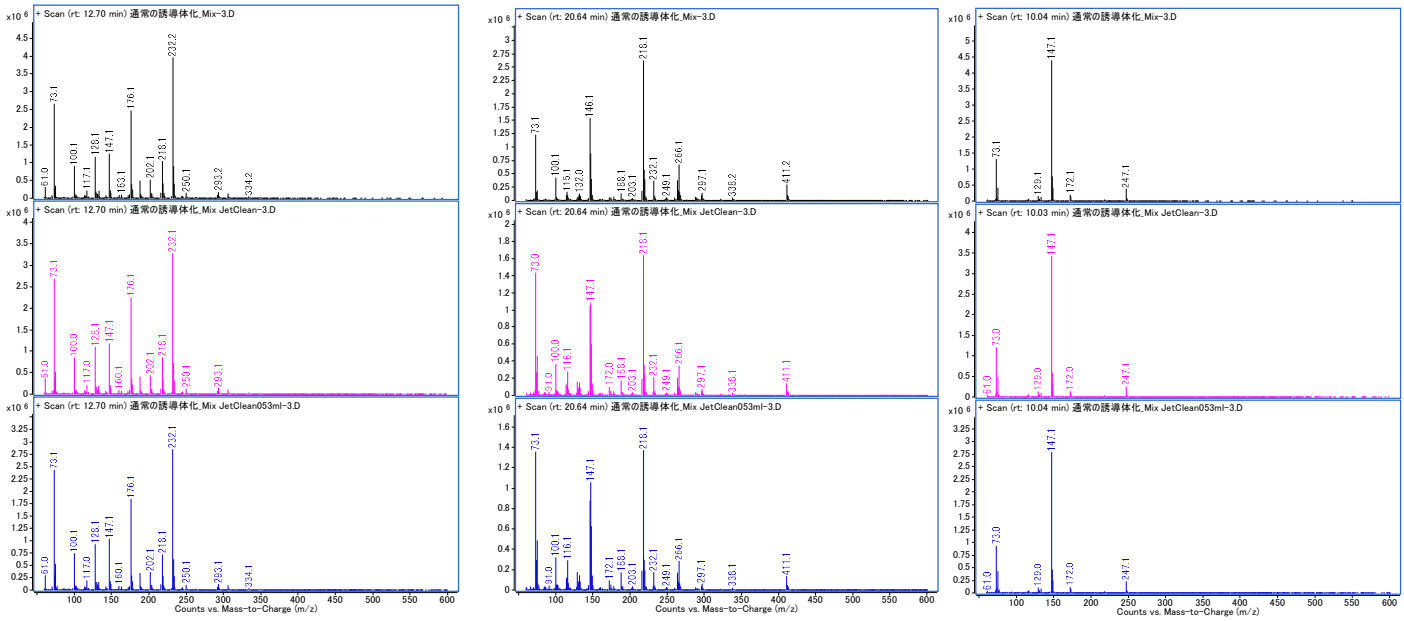


図7. アミノ酸、有機酸標準混合溶液のJetCleanオン、オフ時のマススペクトルの比較
左：アスパラギン酸(3TMS)、中：システン(4TMS)、右：コハク酸(2TMS)
上より JetCleanオフ、JetCleanオン、JetCleanオン（水素最大流量）



4. まとめ

オンライン固相誘導体化を用いることで、抽出以降の前処理装置を自動化できるだけでなく、前処理に係る時間を大幅に短縮することができました。糖類及び非イオン性化合物を除く化合物については従来法と固相誘導体化法でほぼ同等の結果が得られました。また、JetCleanを用いてもマススペクトルの変化や大幅な感度低下は認められず、オンライン固相誘導体化システムとJetClean技術を組み合わせることで、迅速かつ堅牢なメタボロミクス分析が期待できることが分かりました。

※本アプリケーションノートの内容は第11回メタボロームシンポジウムで発表したものです。

【参考文献】

1) 杉立ら、第11回メタボロームシンポジウム（2017）
2) Sasano *et. al.* 15th Metabolomics2017 （2017）
3) Takeo *et. al.* Journal of Bioscience and Bioengineering （2017）
4) 佐々野ら、第9回メタボロームシンポジウム（2015）
5) Sasano *et. al.* 13th Metabolomics2057 （2015）
6) 馬場ら、2015年度農芸化学会大会 （2015）

ホームページ
www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ
0120-477-111
email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2017

Printed in Japan, February 5, 2018
GC-MS-201802SG-002

Agilent
Trusted Answers