

# 水素をキャリアガスとして用いる Agilent Intuvo 9000 GC/MSによる がん細胞のメタボローム解析



## Authors

早坂亮祐<sup>1</sup>, 平山明由<sup>1</sup>,  
杉立久仁代<sup>2</sup>, 曽我朋義<sup>1</sup>

1.慶應義塾大学先端生命科学研究所

2.アジレント・テクノロジー株式会社

## 要旨

GC/MS はアミノ酸や有機酸、脂質などの多様な化合物を同時に測定できることから、メタボローム解析において汎用的に使用されている分析手法です。GC/MS のキャリアガスとして一般的に用いられるヘリウムと比べ、水素は速い線速度領域で効率的に化合物を分離することができます。今回は、水素をキャリアガスに用いることによるイオン源の汚れ抑止効果、ならびに測定時間の短縮効果について検討を行いましたので、ご紹介いたします。

Key word : 水素キャリアガス, メタボロミクス, イオン源, GC/MS

## 1.はじめに

GC/MSに用いるキャリアガスは、一般的にヘリウムが使用されています。例えば、Agilent社が提供しているAgilent Fiehn GC/MSメタボロミクスRTLライブラリは、カリフォルニア大学UC Davis校のOliver Fiehn研究室で開発されたメソッドで、キャリアガスにヘリウムを用い、37.5分の分析時間で測定したデータが採用されています。

一方、理論段相当高さと線速度の関係を示したVan Deemter曲線によると、理論段相当高さが最低になる（分離効率が最大となる）値はヘリウムの場合は20~30cm/sであるのに対し、水素の場合は35~40cm/sになります。すなわち、キャリアガスに水素を用いた場合、速い線速度領域で効率的に化合物を分離し、結果として分析時間を短縮できることを示唆しています。また、Agilent社のJetCleanセルフクリーニングイオン源は、イオン源に微量の水素を流すことによって、イオン源の汚れを低減させる機構がありますが、キャリアガスに水素を用いた際も同様の効果が期待されます。

しかしながら、水素は可燃性ガスであり取り扱いに注意を要するため、これまで国内のメタボロミクスの分野ではほとんど使用されておりませんでした。

本アプリケーションノートでは、キャリアガスとして水素発生装置から水素を供給し、通常の2倍の昇温速度で測定した際の有用性について、マススペクトル及びイオン源の汚れの影響の観点から検討いたしました。

## 2.条件

### サンプル調製

標品及び細胞サンプルは、1.5 mLチューブに移し、減圧濃縮しました。その後、10 $\mu$ Lのメトキシアミン塩酸塩(20mg/mL、ピリジン溶液)を添加し、37°Cで90分反応させました。その後、45 $\mu$ LのMSTFA+1%TMCSを添加し、37°Cで30分反応させ、測定サンプルとしました。

### 分析条件

GC-MSシステム: Agilent Intuvo 9000 GC/5977B MSD  
カラム: DB-5ms Intuvo GC カラムモジュール (30 m × 0.25 mm, 膜厚 0.25  $\mu$ m) (P/N: 122-5532-INT)

注入量: 1  $\mu$ L

注入口温度: 250°C

ライナー: ウルトラライナー (P/N: 5190-3169)

注入: スプリット 10:1

イオン源: エクストラクティオソース

イオン源温度: 250°C

四重極温度: 150°C

MS モード: Scan ( $m/z$ : 50-600)

※水素キャリアガス時の設定

水素ガス供給元: Precision Hydrogen Trace 500 cc for Agilent (Peak Scientific instruments Ltd.)

オープン: 60°C(0.5 min)-20°C/min-325°C(5 min)

流量: 1.2 mL/min

※ヘリウムキャリアガス時の設定

ヘリウムガス供給元: ガスボンベ

オープン: 60°C(1 min)-10°C/min-325°C(10 min)

流量: 0.6 mL/min

MSライブラリ: Agilent Fiehn GC/MSメタボロミクスRTLライブラリ (製品番号: G1676AA)

## 3.結果

### 実験1

アミノ酸、有機酸、糖リン酸をはじめとするイオン性代謝物質のうちAgilent Fiehn GC/MSメタボロミクスRTLライブラリに掲載されている76代謝物質に関して標品混合溶液を作成しました。この標準溶液を測定し、キャリアガスの違いによるTICC (Total Current Ion Chromatogram)への影響を調べました(図1)。水素においてはヘリウムと比べて約半分の時間で測定を行っておりますが、両者のTICCのパターンに大きな違いは見られませんでした。

また、アミノ酸、有機酸、糖アルコールについてマススペクトルを取得した結果、水素キャリアガスで測定した場合においてもほとんど同一のマススペクトルが得られ(図2)、既存のメタボロミクスライブラリのマススペクトル情報を使用可能でした。分離に関しても、分析時間が短いためにピークが近接する傾向はありますが、分析条件の最適化で対応可能であると考えられます(図3)。

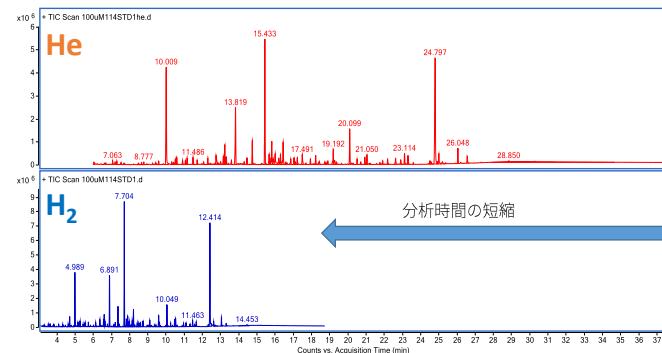


図1 キャリアガスの違いによるTICCへの影響

(上:ヘリウム 下:水素。ピーク上の数字は保持時間を表す。)

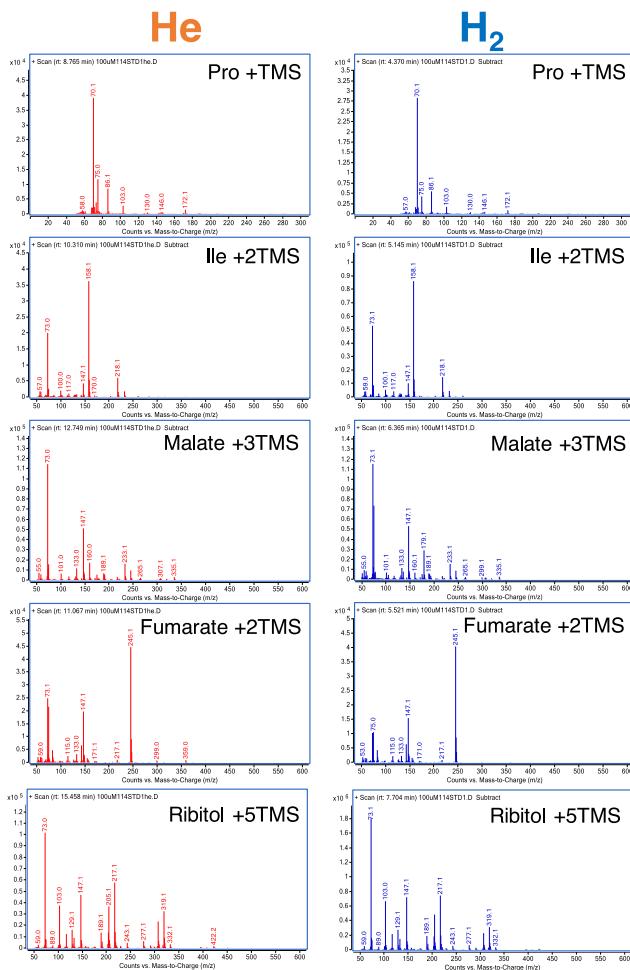


図2 キャリアガスの違いによるマススペクトルの比較  
(左：ヘリウム，右：水素)

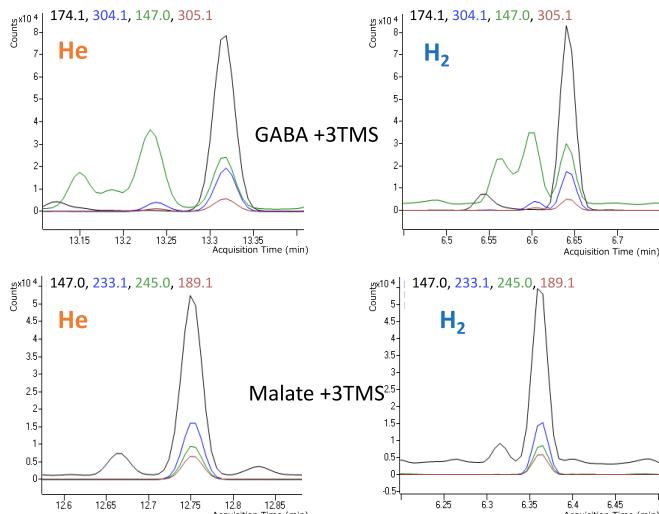


図3 キャリアガスの違いによる分離の影響  
(左がヘリウム、右が水素で測定した際のGABA+3TMS(上)とMalate(下)のピーク形状。グラフの上の数字はm/zを示し、黒字がquantifier、その他の色はqualifierを表す)

## 実験2

実サンプルとして、ヒトすい臓がん細胞株であるPanc-1細胞とAsPc1細胞中に含まれる代謝物質について水素キャリアガスを用いて測定を実施しました。各細胞を $2.0 \times 10^6$ 細胞で10 cm dishに播種し、2日間培養しました。PBSで洗浄後、Ribitolと2-Isopropylmalate（内標）を含むメタノール溶液を添加しました。セルスクレーバーで細胞を剥ぎ取り、サンプルは新しいチューブに移しました。遠心分離後、上清をさらに新しいチューブに移し、クロロホルムおよび超純水を添加、10分間攪拌した後、さらに超純水を添加し、遠心分離を行いました。3層に分離した水層部分を新しいチューブに移し、30°Cで2時間乾固、その後、実験1と同様の手順で誘導体化を行いました。

標準溶液を測定して自作した水素キャリアガスライブラリを用い同定し、主成分分析を行った結果を図4に示します。Panc-1細胞とAsPc1細胞では細胞内の代謝物質プロファイルが異なることが示唆されました。

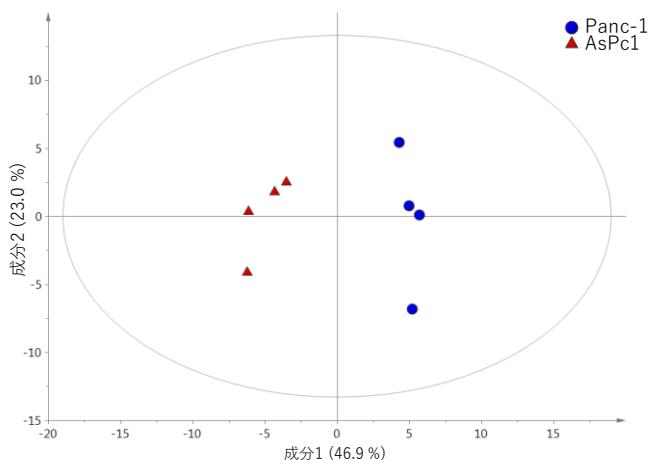


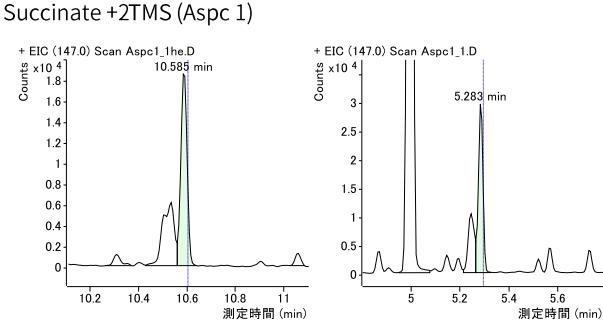
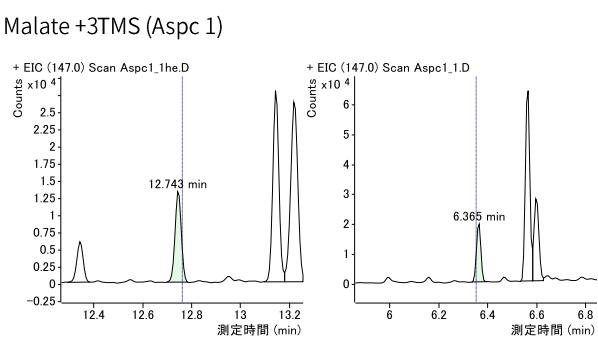
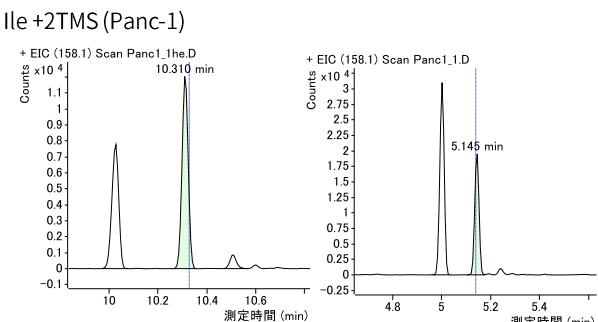
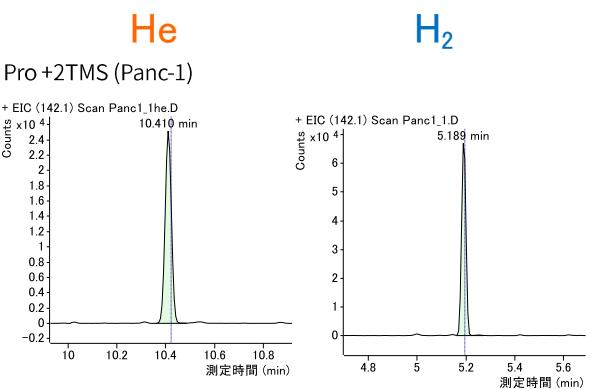
図4 実サンプル(すい臓がん細胞株)の主成分分析の結果  
(主成分分析のスコアプロットを示し、1つのプロットが1サンプルを表す。濃度をZ-scoreで正規化を実施した。横軸が主成分1、縦軸が主成分2を示し、括弧内の数字は寄与率を表す。青：Panc-1細胞、赤：AsPc1細胞)

ヒトすい臓がん細胞株に含まれる代表的な代謝物質について、内標との相対レスポンス( $n=4$ の平均)を表1に示しました。また、ヘリウムと水素キャリアガスの相関を確認( $\text{He}/\text{H}_2$ )したところ、良好な結果が得られました。

表1 ヒトすい臓がん細胞株に含まれる代表的代謝物の内標との相対レスポンスおよび相関（但し、Ribitolは添加）

Compound Name	He	$\text{H}_2$	$\text{He}/\text{H}_2$
Met +2TMS	1.69	1.81	0.93
Pro +2TMS	0.26	0.36	0.71
Citrate +4TMS	1.56	0.65	2.40
Thr +3TMS	1.29	1.37	0.94
Ala +2TMS	2.47	2.35	1.05
Pro +TMS	0.3	0.37	0.81

Leu +TMS	1.36	1.21	1.12
Leu +2TMS	1.11	1.17	0.95
Ile +2TMS	1.04	1.11	0.94
Succinate +2TMS	2.71	2.69	1.01
Ser +3TMS	1.82	1.79	1.01
Malate +3TMS	1.8	1.55	1.16
Asp +3TMS	11.76	15.08	0.78
Gly +3TMS	0.43	0.44	0.97
Glu +3TMS	1.19	1.05	1.14
Ribitol +5TMS	0.99	1.01	0.98



### 実験3

キャリアガスにヘリウムガスもしくは水素ガスを使用し、それぞれ500回測定した際のイオン源の汚れを比較しました。サンプルは血清を対象とし、アイスティサイエンス社の*Press-SPE ACX*を用いて固相誘導体化し、スプリットレスで注入しました。ヘリウムガスを使用した際には、全ての部品において、レンズに黒い焦げ付きが観察されました(図5上)。一方で、水素キャリアガスを使用した際には、全ての部品において、汚れが抑制されており、レンズでは汚れは目視で観察されませんでした(図5下)。水素キャリアガスを用いることでイオン源レンズのメンテナンス頻度の減少が期待されます。

#### ヘリウム



#### 水素



図5 500回測定後のイオン源の汚れ

(上；ヘリウム, 下；水素)

## 4.まとめ

今回、私たちはGC/MSを用いたメタボローム測定において、キャリアガスに水素ガスを用いた場合の影響について検討しました。通常用いられているヘリウムと比べ、水素をキャリアガスとして用いた場合、分離効率を損なうことなく短時間での分析が可能でした。また、水素を用いることでイオン源の汚れを抑制することが可能でした。さらに両者のマススペクトルについてもほとんど差が無く、既存のデータベースが適用可能であることが確認されました。多検体を測定するメタボローム解析において、水素キャリアガスを用いた測定時間の短縮はスループットの向上につながる有用な手段であると考えられます。

※本アプリケーションノートは、第12回メタボロームシンポジウム（鶴岡）で発表したものです。

## 参考文献

- 1) 早坂ら、第12回メタボロームシンポジウム (2018)
- 2) GC/MSによるメタボロミクス分析におけるJetCleanセルフクリーニングイオン源の有効性、アジレント・テクノロジーアプリケーションノート Pub No.GC-MS-201712AZ-001
- 3) GC/MS システムと Agilent Fiehn GC/MSメタボロミクス RTL ライブラリによる血漿中の代謝物同定、アジレン

ト・テクノロジーアプリケーションノートPub  
No.low\_5990-3638JAJP

- 4) 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 Pub No. GC-MS-201802SG-002
- 5) E. Takeo et al., Solid-phase analytical derivatization for gas-chromatography-mass-spectrometry-based metabolomics, *J Biosci Bioeng.* 2017 Dec, 24(6), 700-706

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. 2019

Printed in Japan, February 7, 2019

GC-MS-201902HR-001

