

GC/MS および GC/MS/MS による メタボロミクス解析



<要旨> 生物の代謝物は脂質のような非極性化合物から、アミノ酸・有機酸のような極性化合物までの多くの化合物を含みます。これらの化合物は誘導体化を施すことで、GC/MS での一斉分析が可能です。本アプリケーションノートでは GC/MS を用いて、アミノ酸・有機酸・糖・脂肪酸・ステロール類などの代表的な代謝物を測定しましたので、ご紹介いたします。また GC/MS/MS による高感度分析、オートサンプラによる前処理の自動化についてもご紹介いたします。

Key Words: メタボロミクス、代謝物、GC/MS、GC/MS/MS、誘導体化、自動化

* * * * *

1. はじめに

メタボロミクスは、動物・植物・微生物等の代謝物を網羅的に解析する手法であり、近年、質量分析計の発達に伴い飛躍的な進歩を遂げています。その応用例は幅広く、病気の診断から農産物の品種改良、そして近年ではバイオ燃料の分野や食品の機能性研究でも用いられるようになりました。

GC/MS で代謝物を網羅的に分析するためには、オキシム化、トリメチルシリル化等の誘導体化が必要ですが、誘導体化を行うことで、再現性よく測定することができるのが大きな特徴です。さらに、煩雑になりがちな誘導体化もオートサンプラの自動前処理機能を利用することにより、測定が簡単に行えるようになりましたので、ご紹介させていただきます。

2. 測定条件

装置: 7890 GC/5975C MSD with
7693 自動前処理機能付きオートサンプラ
カラム: DB-5ms + Duragurd (10m) 30m, 0.25mm, 0.25 μ m
注入量: 1 μ L
注入法 : スプリット, 10:1
注入口温度: 250 $^{\circ}$ C
オープン : 60 $^{\circ}$ C (7min)-10 $^{\circ}$ C/min-325 $^{\circ}$ C (10min)
カラム流量: 1.1ml/min (定流量モード)
インターフェース温度 : 290 $^{\circ}$ C
イオン源温度 : 250 $^{\circ}$ C
測定モード: スキャン測定, 質量範囲, m/z 50-600

3. 誘導体化

オキシム化: メトキシアミン塩酸塩 40 mg/mL 10 μ L 添加、30 $^{\circ}$ C 90 分間反応
トリメチルシリル化: MSTFA + 1%TMCS を 90 μ L 添加、37 $^{\circ}$ C 30 分間反応

トリメチルシリル化後は 24 時間以内の測定が望ましいとされており、Agilent 7693 自動前処理付きオートサンプラを使うことで、サンプルを測定中に次のサンプルの誘導体化を行うことができます。



オートサンプラ 7693A は、内標添加、加熱/攪拌、溶媒抽出などの機能があります。パラメータは自由に設定することが可能です。

4. GC/MS による測定

Fig. 1~4 に代表的な代謝物のクロマトグラム (TICC) を示します。極性化合物からステロールまで誘導体化を行うことにより網羅的な測定ができることが分かりました。

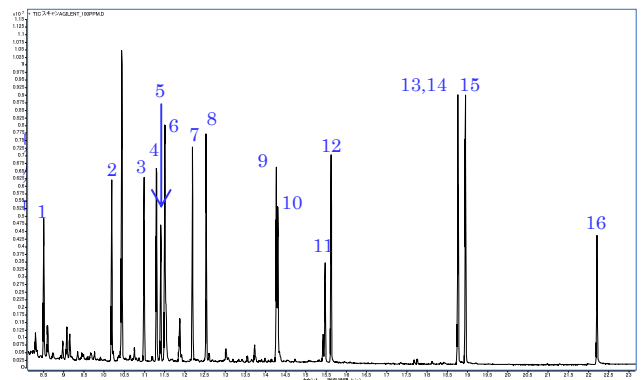


Fig. 1 GC/MS によるアミノ酸分析例

1. アラニン, 2. バリン, 3. ロイシン, 4. イソロイシン, 5. プロリン, 6. グリシン, 7. セリン, 8. スレオニン, 9. アスパラギン酸, 10. メチオン, 11. グルタミン酸, 12. フェニルアラニン, 13. ヒスチジン, 14. リジン, 15. チロシン, 16. システイン



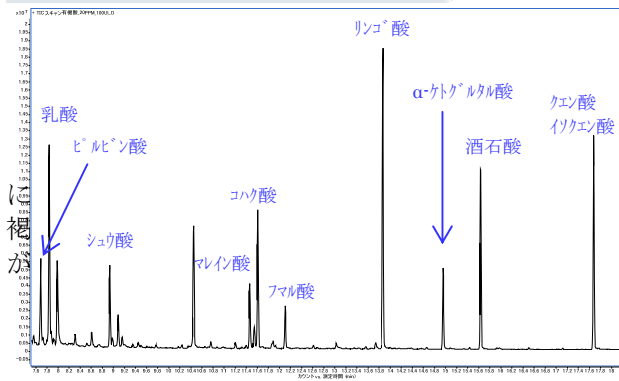


Fig. 2 GC/MS による有機酸分析例

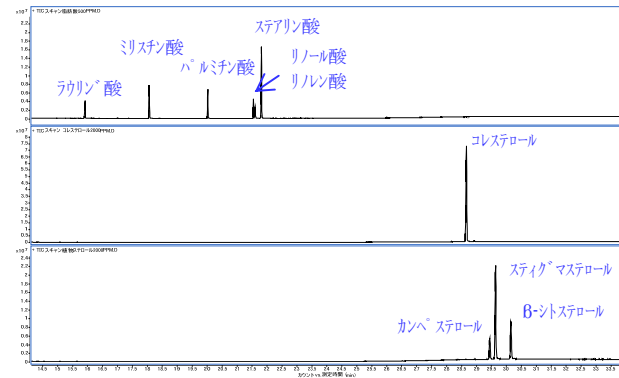


Fig. 3 GC/MS による脂肪酸、ステロール分析例

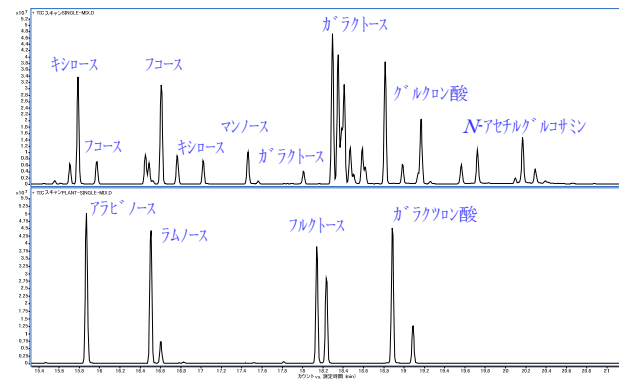


Fig. 4 GC/MS による単糖分析例

5. GC/MS/MS による測定

メタボロミクスの網羅的解析には GC/MS のスキャン分析や GC/TOFMS が一般的に使用されていますが、ターゲットを絞った MRM 分析を行うことで、より選択性を上げた分析を行うことが可能です。

MRM データベースは Agilent より無償で提供しております。

Fig. 5 にアミノ酸 0.083 nmol/μL (測定検液中) をスキャンと MRM で測定した比較結果を示します。また、Fig. 6 に発酵食品中の L-ロイシンをスキャンと MRM で比較した結果を示します。これらのクロマトグラムから明らかなように、MRM 測定は選択性に優れることが分かります。

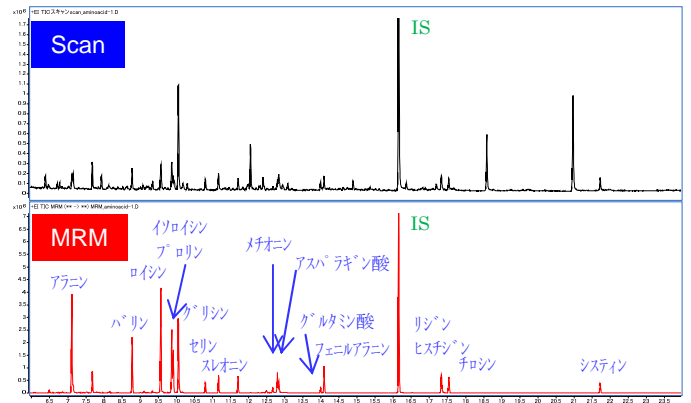
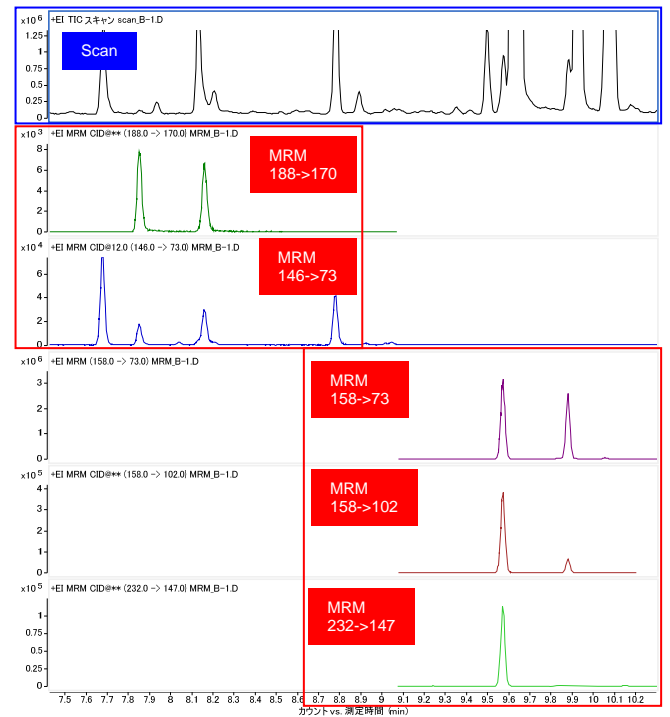


Fig. 5 アミノ酸分析、スキャンと MRM の比較



6. まとめ

誘導体化することで、GC/MS を用いた代謝物の網羅的な分析が可能でした。また、GC/MS/MS を用いることで、選択性を向上させた測定が可能でした。

※アジレントは、リテンションタイムロッキング(RTL)を使用した Fiehn メタボロミクスライブラリ (AMDIS 使用方法、メソッド、誘導体化法などのユーザーマニュアル) を提供しております。

【GCMS-201111SG-001】

本資料に記載の情報、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