

安定同位体と超高速GC-MS/MSを使用した ヒト血漿中の代謝物の分析

島津製作所分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター
坂井 健朗

GC-MSを用いた代謝物の測定

ガスクロマトグラフィ質量分析計
GCMS-TQ8040



ターゲットメタボロミクス
分析/解析用ソフトウェア

GC/MS代謝物分析用データベース
Smart Metabolites Database

代謝物測定を支援するGC/MS、GC-MS/MSデータベースソフトウェアです。

GCMS-TQ8040

The image shows a screenshot of the Smart Metabolites Database software interface. It features a metabolic pathway diagram with various metabolites connected by arrows. The metabolites listed include Pyruvic acid, Acetyl-CoA, Citric acid, Aconitic acid, Isocitric acid, 2-Ketoglutaric acid, Succinyl-CoA, Succinic acid, Fumaric acid, Malic acid, and Oxaloacetic acid. The background of the software interface shows several test tubes filled with blue liquid. At the bottom right, there is a small image of the GCMS-TQ8040 instrument.

代謝物の一斉網羅的分析が可能

GC-MSを用いた代謝物の測定

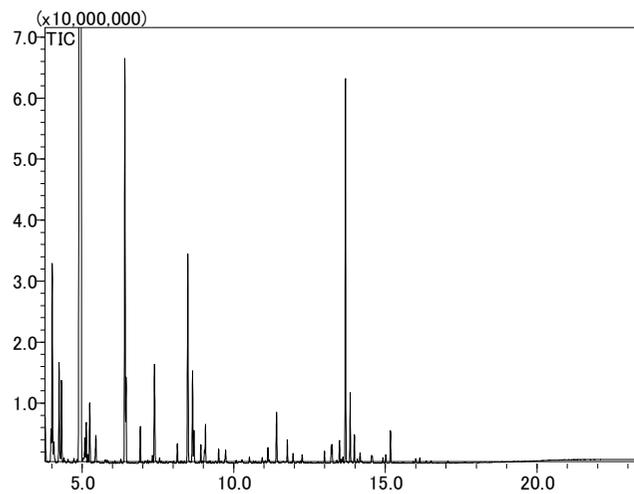
～サンプル例：ヒト標準血漿～

前処理



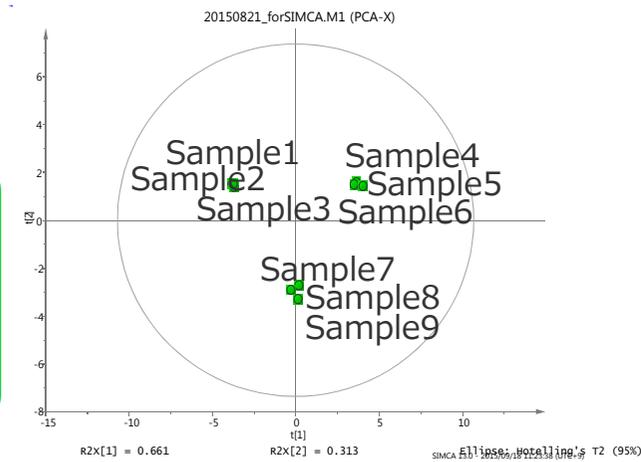
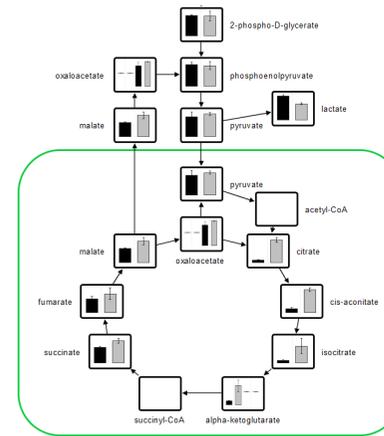
抽出処理・
誘導体化

測定



代謝物の同定

解析



代謝マップや主成分分析による解析
(市販ソフトウェア使用)

今回の実験の概要 (サンプルの前処理)

50 μ L of human plasma

Add 10 μ L of Internal Standard(I.S., 0.5 mg/mL 2-Isopropylmalic acid)

Add 10 μ L of 14 stable Isotopes mixture

* the concentrations of isotopes were calculated roughly based on each metabolites amount in human plasma

従来は内部標準物質として2-Isopropylmalic acidを使い、すべての化合物をこれで標準化している。

Extraction of metabolites

Add 250 μ L of Methanol / Water / Chloroform (2.5 : 1 : 1) mixture, vortex, then centrifuge

Take 225 μ L of supernatant after the 30 min incubation at 37°C with shake

Add 200 μ L of Water to the supernatant, vortex, then centrifuge

Take 250 μ L of supernatant and dry the sample by SpeedVac

Derivatization

Add 40 μ L of 20 mg / mL methoxyamine - Pyridine mixture

Incubate at 30°C for 90 min with shake

Add 20 μ L MSTFA and Incubate at 37°C for 30 min with shake

Measure the metabolites by GCMS-TQ8040

[GC] Inj. Temp. : 280°C
 Column oven Temp. :
 100°C(0.35 min)→(50°C/min)
 →340°C(0.35 min)
 Flow control: 250 kPa
 Split Ratio: 10
 Injection volume: 1 μ L

[MS] Interface Temp. : 280°C
 Ion source Temp. : 200°C
 Data acquisition : Scan or MRM

(MRM
 29 Compounds
 58 Transitions)

従来では23 minの昇温メソッドを用いている。

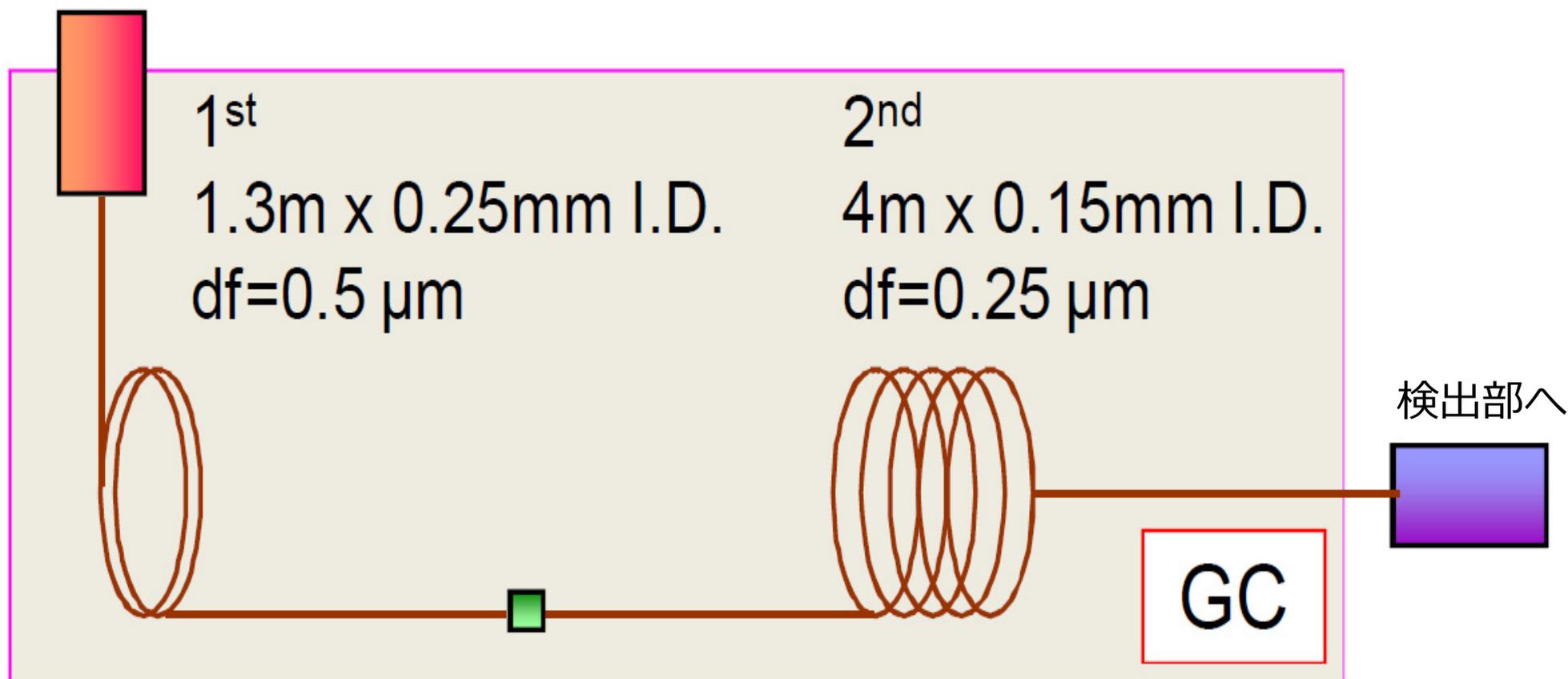
今回の実験の概要 (測定対象化合物)

ID	Compounds	測定イオン
1	Lactic acid-2TMS	Native & Isotope
2	2-Hydroxybutyric acid-2TMS	Native & Isotope
3	Valine-2TMS	Native & Isotope
4	Isoleucine-2TMS	Native & Isotope
5	Fumaric acid-2TMS	Native & Isotope
6	Malic acid-3TMS	Native & Isotope
7	Aspartic acid-3TMS	Native & Isotope
8	2-Isopropylmalic acid-3TMS (I.S.)	Native
9	Glutamic acid-3TMS	Native & Isotope
10	4-Hydroxybenzoic acid-2TMS	Native & Isotope
11	Ornithine-4TMS	Native & Isotope
12	Citric acid-4TMS	Native & Isotope
13	Dopa-4TMS	Native & Isotope
14	Kynurenine-3TMS	Native & Isotope
15	Tryptophan-3TMS	Native & Isotope

14 化合物 + 1 内部標準物質

分析系 (1) カラムと分析時間

注入口



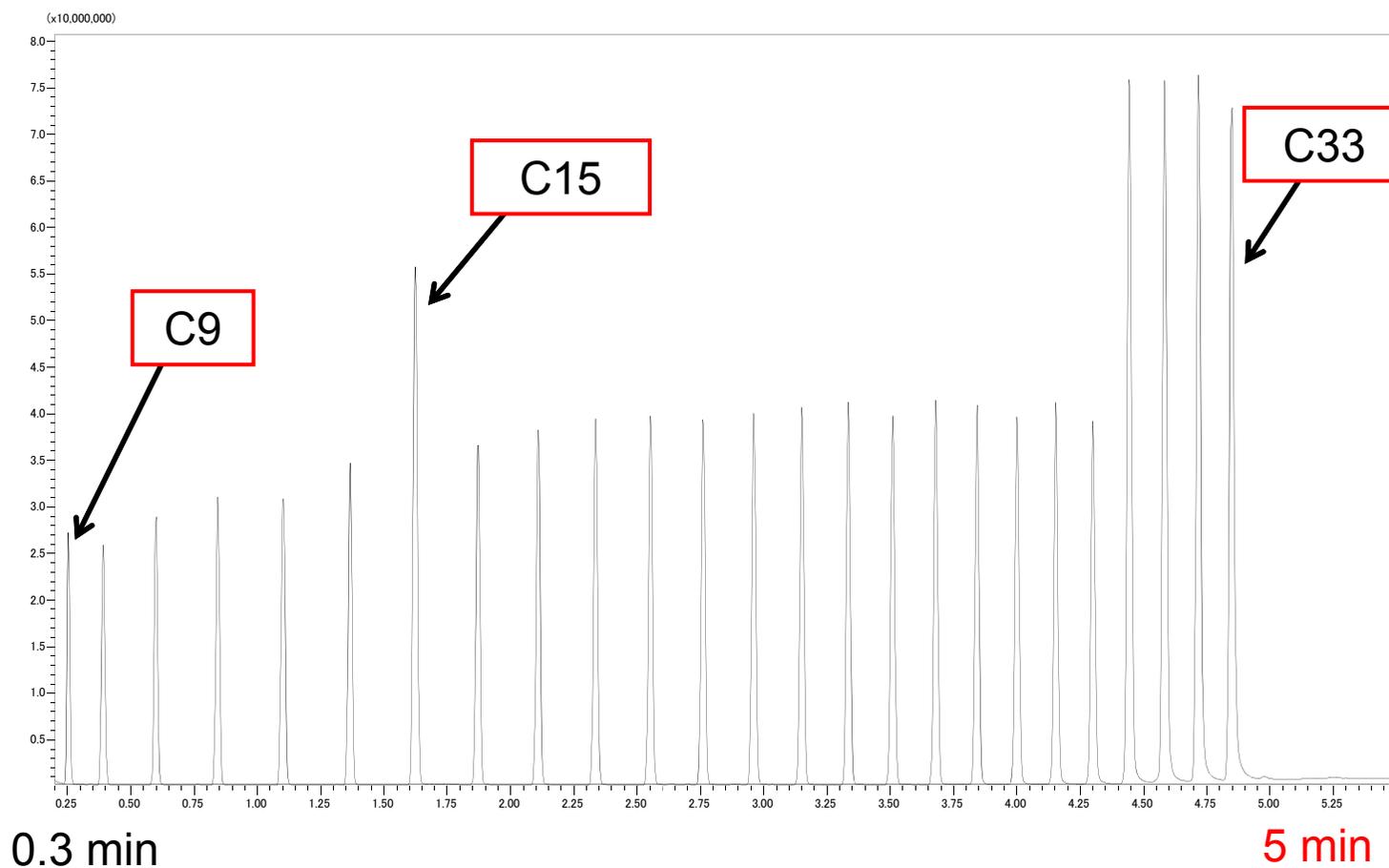
参照文献

B. Waters et al.

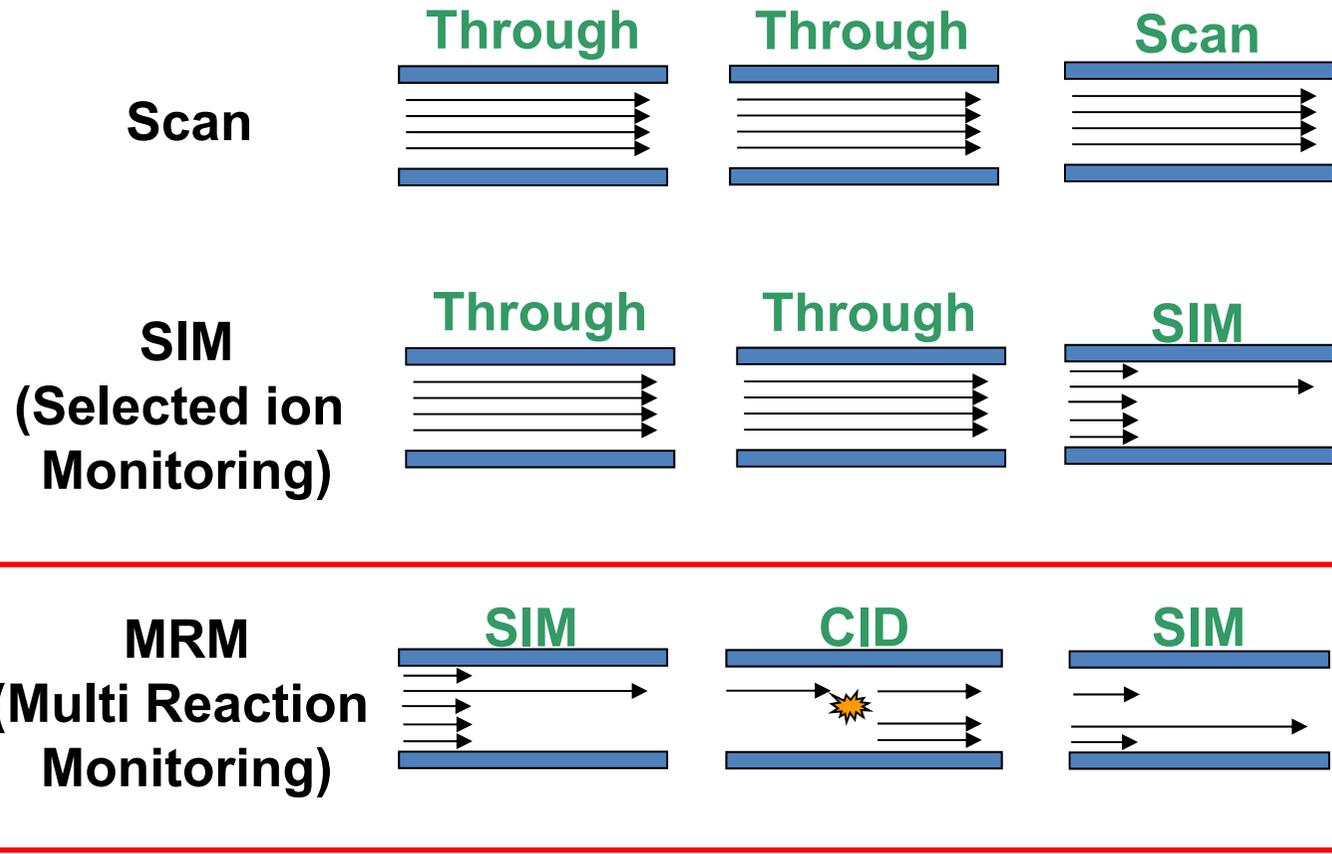
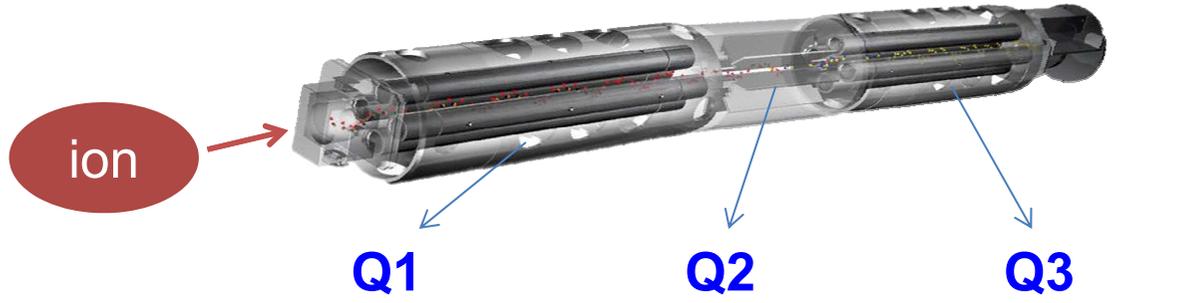
Forensic Toxicology January 2013, Volume 31, Issue 1, pp 67-69

分析系 (1) カラムと分析時間

N-アルカン混合標準品の分析結果 (C9 - C33)



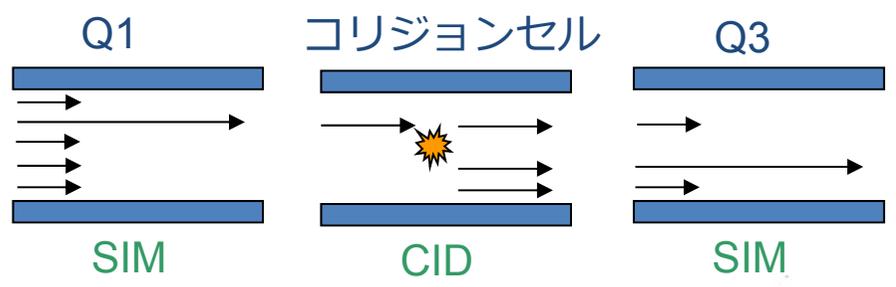
分析系 (2) MSの分離機構(MRMについて)



定性	定量	長所・短所
○	×	長所 ：マススペクトル情報がある、目的成分以外の情報が得られる 短所 ：感度が劣る
×	○	長所 ：感度が良い 短所 ：マススペクトル情報がない、目的成分の情報のみを得られる
△	○	長所 ：質量分離が良く、正確な定量が可能 短所 ：MRMの条件検討が必要

分析系 (2) MSの分離機構(MRMについて)

MRM



高い選択性

食品残留農薬分析
しょうが中の
Isoprothiolane (1ppb)



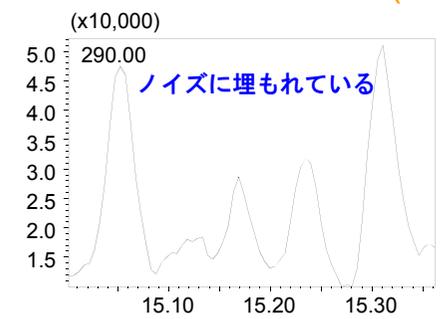
環境分析
底質中のPBDEs分析
(Hexa-BDE (BDE-154)),
100ppb



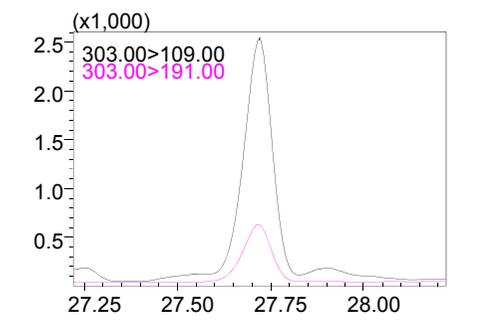
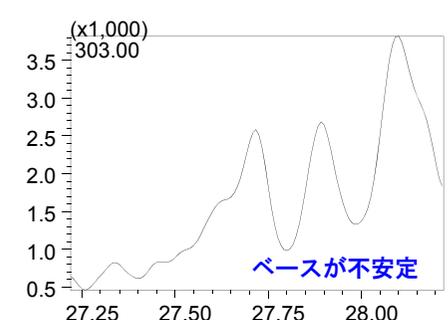
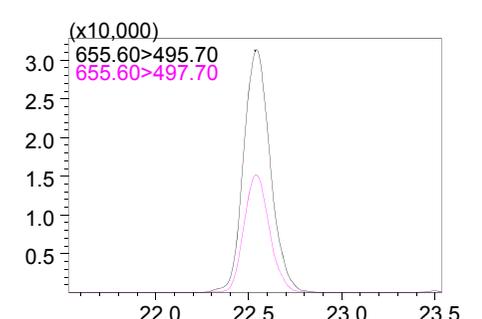
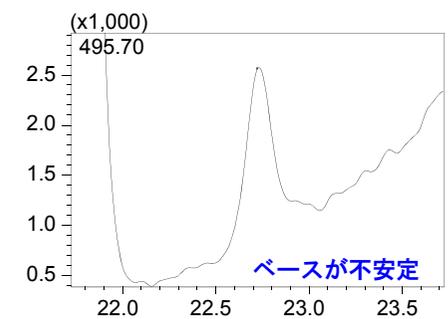
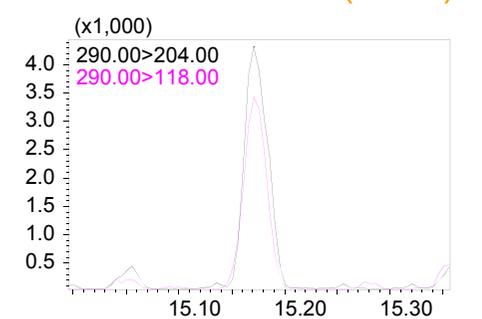
ライフサイエンス
ラット尿における代謝物
分析
(Suberic acid)



GCMS-QP2010Ultra (SIM)

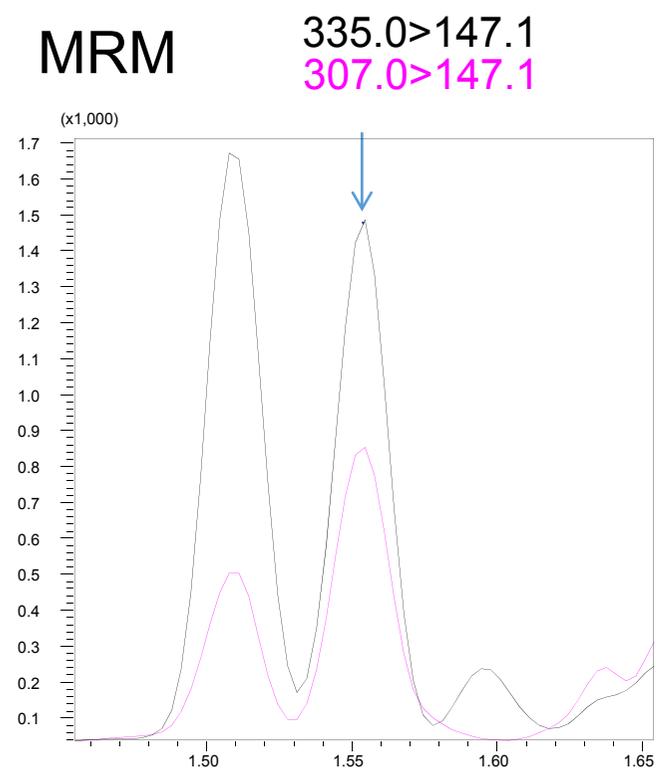
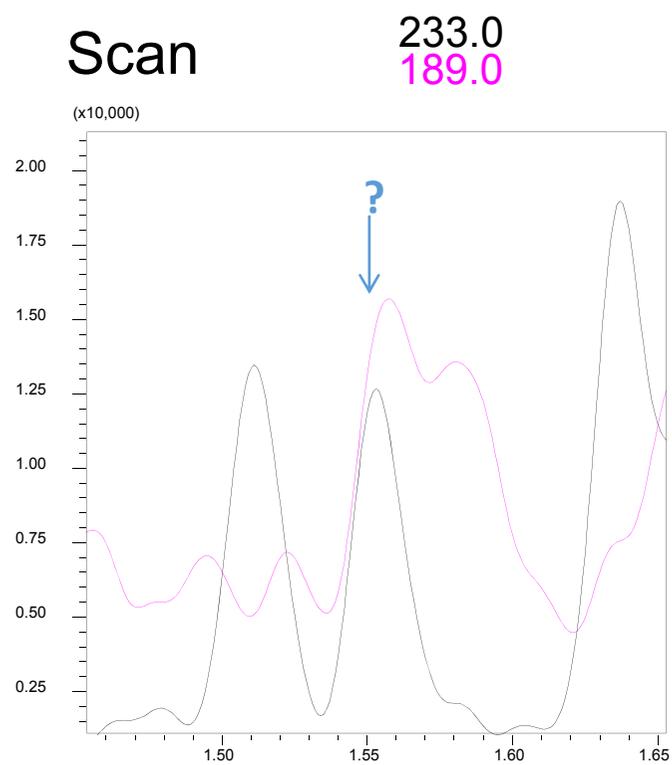


GCMS-TQ8030 (MRM)



分析結果1 (スキャンとMRMの比較)

Malic acid -3TMS



分析結果2 (各化合物ピークの再現性)

ID	Compounds	Normalized with I.S. (% RSD)	Normalized with isotopes (% RSD)
1	Lactic acid-2TMS	4.53	1.64
2	2-Hydroxybutyric acid-2TMS	4.21	2.03
3	Valine-2TMS	11.56	1.81
4	Isoleucine-2TMS	14.13	2.52
5	Fumaric acid-2TMS	4.32	4.34
6	Malic acid-3TMS	3.56	6.13
7	Aspartic acid-3TMS	10.50	3.30
8	2-Isopropylmalic acid-3TMS (I.S.)	-	-
9	Glutamic acid-3TMS	8.40	1.91
10	4-Hydroxybenzoic acid-2TMS	5.22	5.53
11	Ornithine-4TMS	6.86	2.41
12	Citric acid-4TMS	2.90	1.64
13	Dopa-4TMS	11.51	4.22
14	Kynurenine-3TMS	20.18	3.30
15	Tryptophan-3TMS	8.75	1.96

N = 6

分析結果3 (まとめ)

- ・ 高速昇温メソッドを用いることで、分析時間を大幅に短縮しても、化合物を安定的に測定することができた (23 min → 5 min) 。
- ・ 内部標準として、各測定対象物質の安定同位体物質を用いることで、一部の化合物の再現性が大幅に向上した。

謝辞

当研究は、神戸大学神戸大学大学院医学研究科 内科系講座病因病態解析学分野 吉田優先生、内科学講座消化器内科学分野 西海信先生、小林隆先生の全面的なご協力の下で行われました。この場をお借りして、お礼申し上げます。

また当研究は、AMED先端計測分析技術・機器開発事業から支援を受けた事業における成果の一部です。

Smart Metabolites Database

GC/MS DB

568成分(Scan), 475成分(MRM)

(関連する代謝物をほぼ登録)

- 解糖系
- TCAサイクル
- ペントースリン酸経路
- プリンヌクレオチドの分解/サルベージ経路
- ピリミジンヌクレオチドの分解

(経路に関連する一部を登録)

- タウリン/ヒポタウリン代謝
- リジン分解
- トリプトファン代謝
- バリン/ロイシン/イソロイシン分解
- Ureaサイクル
- ポリアミン合成

1. GC-MS (SQ)

GC/MS DB (568成分)



2. GC-MS/MS (TQ)

GC/MS DB (568成分)

GC/MS MRM DB (475成分)

