

固相誘導体化によるメタボローム分析

株式会社 アイスティサイエンス
佐々野僚一

Metabolomics 2015 (国際学会)

「Development of in-SPE derivatization for GC-MS metabolome analysis」

○Ryoichi SASANO¹, Yoko KOJIMA¹, Shusuke OSAKI², Yoshie TANAKA², Akihiro MATSUMOTO², Toshiyuki YAMASHITA³, Takeshi BAMBA³, Eiichiro FUKUSAKI³ 1;AiSTI, 2;Wakayama prefecture, 3;Osaka University

第9回メタボロームシンポジウム

「GC/MS基盤メタボローム分析に資する固相誘導体化法の応用」

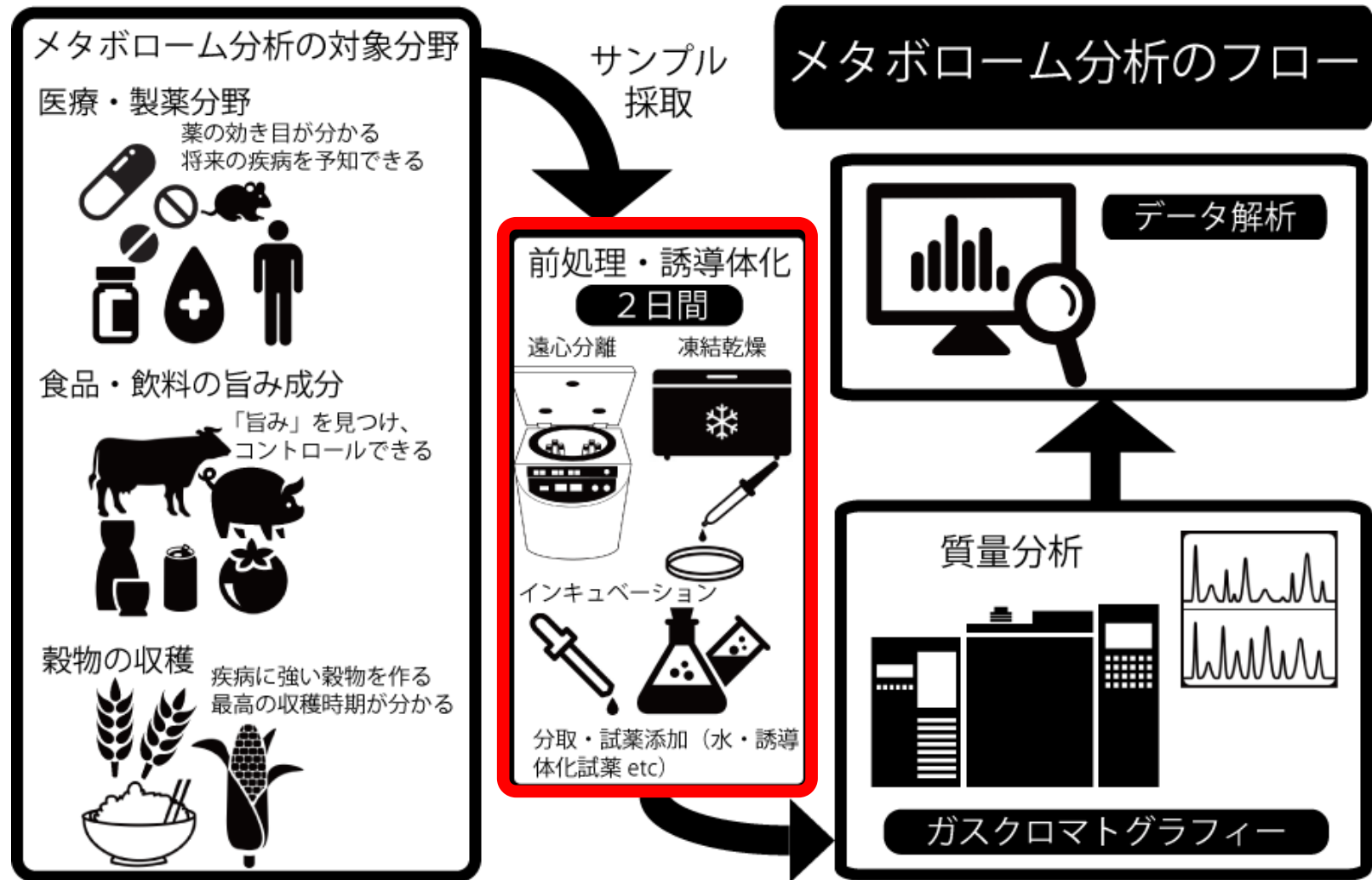
○佐々野僚一 1* 大崎秀介 2 松本明弘 2 馬場健史 3 山下俊幸 4 福崎英一郎 4

1. アイスティ 2.和歌山県工技セ 3.九大・生医研 4.阪大・工



Beyond your Imagination

メタボロミクスの現状と課題



従来の前処理法の課題

現在のメタボローム分析法

減圧濃縮遠心分離 (1600rcf, 4°C, 3min)

— 凍結：液体窒素

凍結乾燥 (一晚：16時間)

— 誘導体化試薬添加
メトキシアミン/ピリジン溶液 20mg/mL 100uL

インキュベーション (30°C, 90min) : 誘導体化反応

— 誘導体化試薬添加 : MSTFA 50uL

インキュベーション (37°C, 30min) : 誘導体化反応

遠心分離 (16000 rcf, 4°C, 3min)

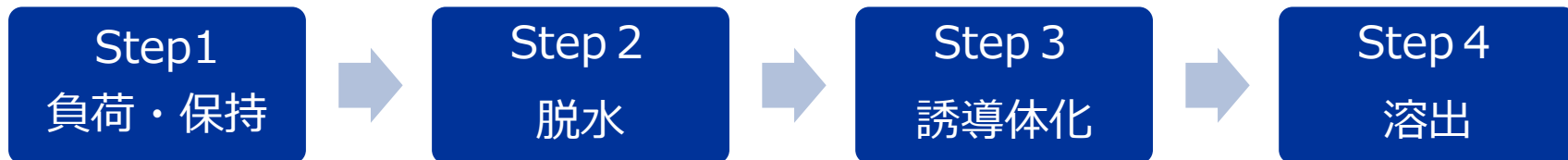
分取：上澄み 100μL → バイアル瓶

測定：GC/MS：注入1μL (スプリット 25:1)

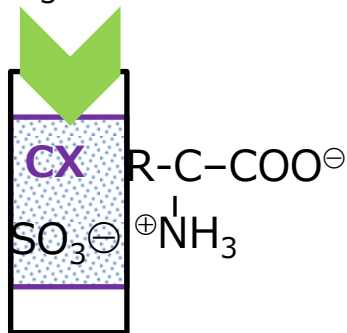
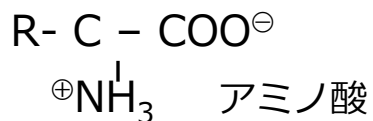
▲ 脱水に一晚(16時間) !!

▲ 誘導体化に2時間 !!

アミノ酸のCX固相を用いた誘導体化

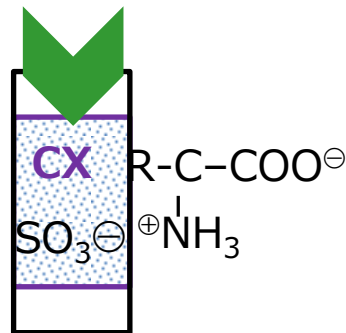


試料抽出液



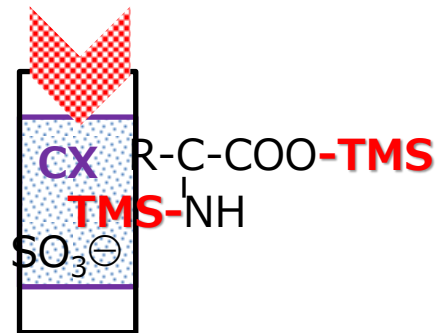
アミノ酸をイオン交換相互作用により固相に保持。

洗浄液
アセトニトリル



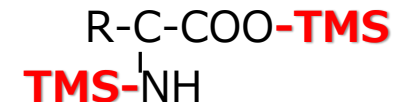
アセトニトリルで
水分を除去

誘導体化試薬 [含浸]
MSTFA



固相誘導体化

溶出液
ヘキサン

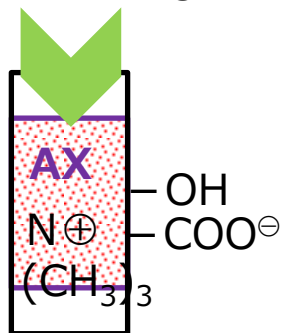


有機酸・糖類のAX固相を用いた誘導体化

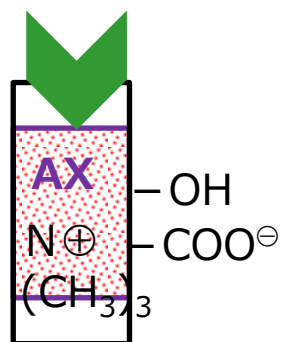


試料抽出液

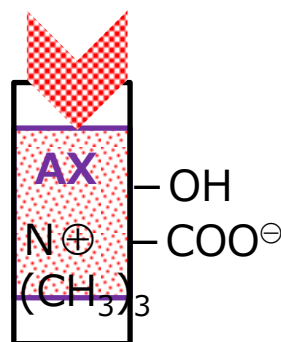
有機酸 糖類
-COO[⊖] -OH



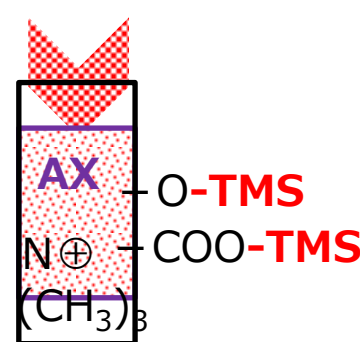
洗浄液
アセトニトリル



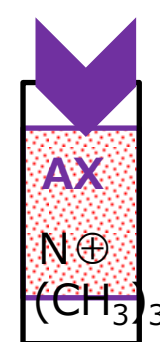
誘導体化試薬[含浸]
メトキシアミン



誘導体化試薬 [含浸]
MSTFA



溶出液
ヘキサン



有機酸をイオン交換相互作用により固相に保持。
糖類を極性相互作用により固相に保持。

アセトニトリルで
水分を除去

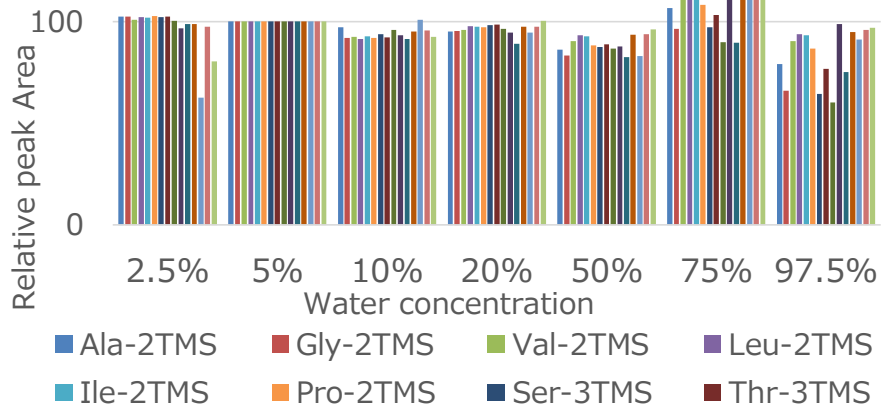
固相誘導体化

固相誘導体化

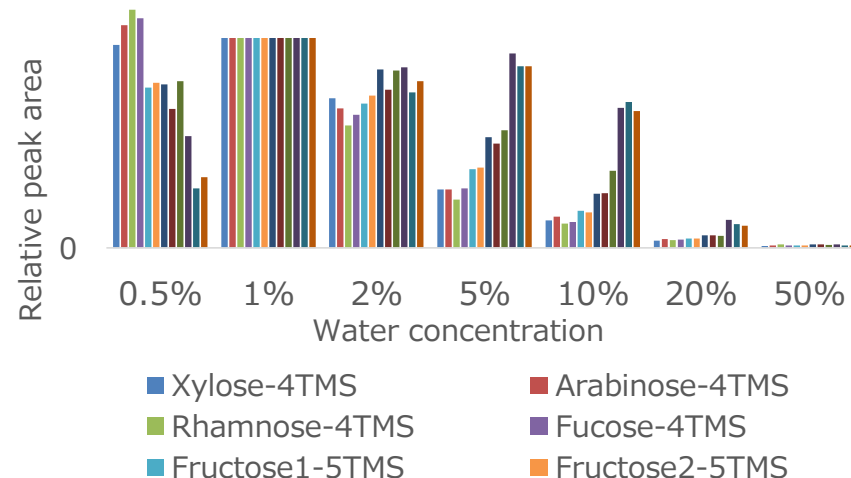
-O-TMS
-COO-TMS

試料負荷時の水濃度と固相への保持について

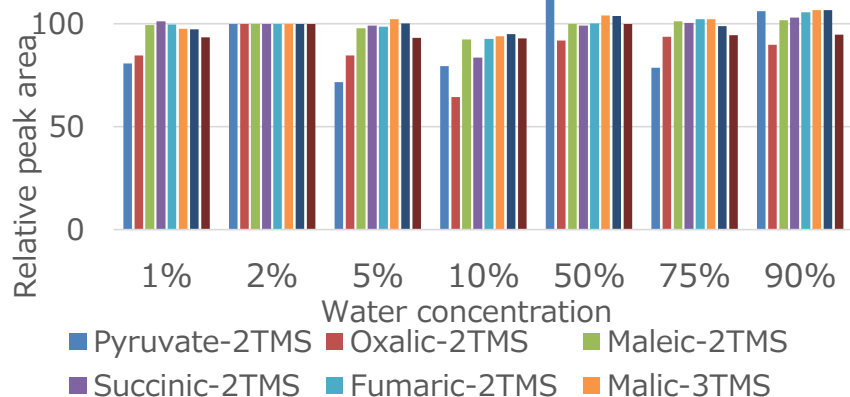
【アミノ酸とCX固相】



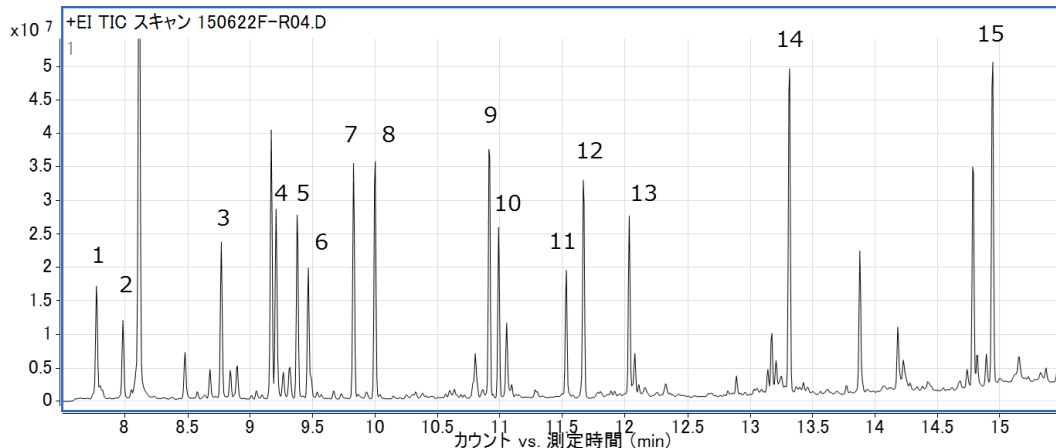
【糖とAX固相】



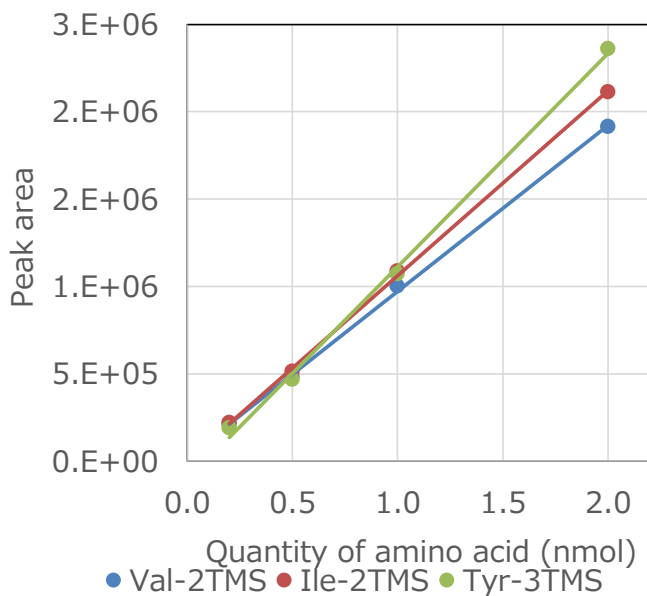
【有機酸とAX固相】



CX固相誘導体化前処理法（アミノ酸）の評価



SCANトータルイオンクロマトグラム



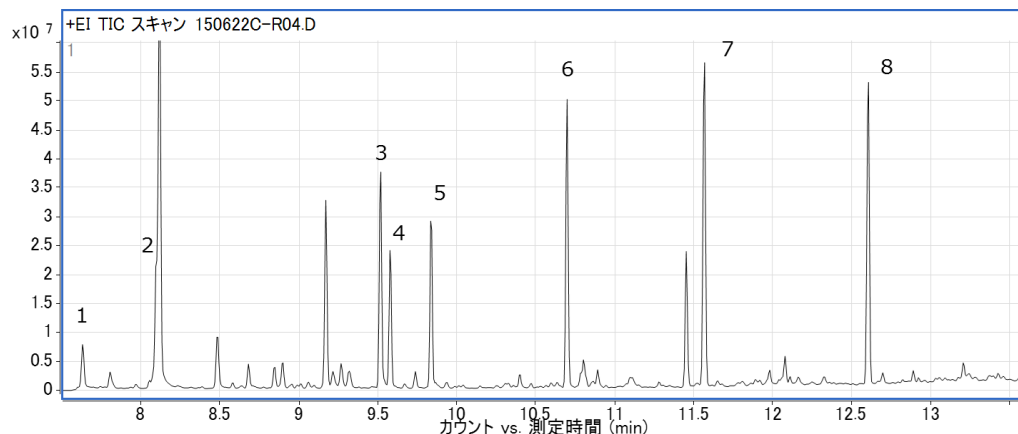
アミノ酸量とピーク面積値の関係

目的成分量
0.2, 0.5, 1.0, 2.0 nmol

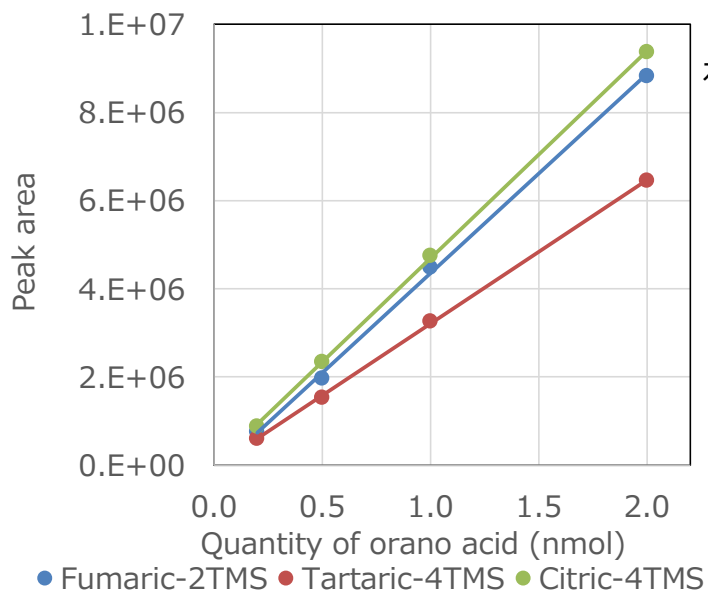
直線性 (R2) と再現性 (RSD, n=6)

No.	Amino acid	R2	RSD n=6, %
1	Ala-2TMS	0.9996	7.4
2	Gly-2TMS	0.9958	13.1
3	Val-2TMS	0.9993	7.5
4	Leu-2TMS	0.9992	6.7
5	Ile-2TMS	0.9995	6.2
6	Pro-2TMS	0.9982	12.5
7	Ser-3TMS	0.9988	5.5
8	Thr-3TMS	0.9990	4.7
9	Asp-3TMS	0.9989	4.9
10	Met-2TMS	0.9991	7.5
11	Glt-3TMS	0.9911	8.8
12	Phe-2TMS	0.9996	5.6
13	Lys-3TMS	0.9927	32.2
14	Tyr-3TMS	0.9977	4.8
15	Cys-4TMS	0.9950	29.2

AX固相誘導体化前処理法（有機酸）の評価



SCANトータルイオンクロマトグラム



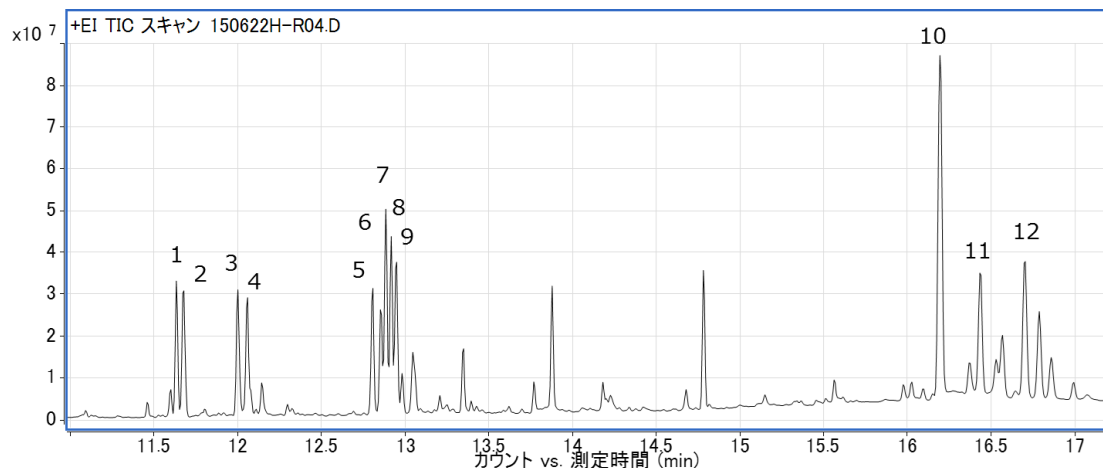
有機酸量とピーク面積値の関係

目的成分量
0.2, 0.5, 1.0, 2.0 nmol

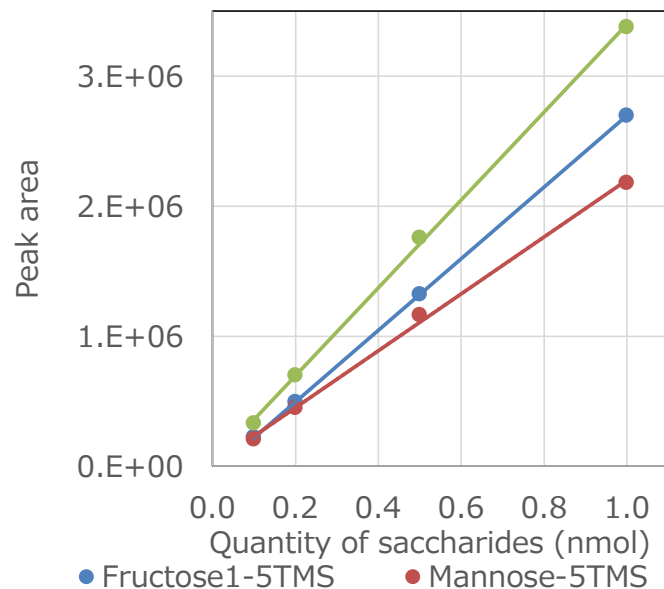
直線性 (R2) と再現性 (RSD, n=6)

No.	Organic acid	R2	RSD n=6, %
1	Pyruvate-2TMS	0.9998	15.1
2	Oxalic-2TMS	0.9946	6.2
3	Maleic-2TMS	0.9991	1.8
4	Succinic-2TMS	0.9588	22.0
5	Fumaric-2TMS	0.9991	2.2
6	Malic-3TMS	0.9997	2.1
7	Tartaric-4TMS	0.9998	1.9
8	Citric-4TMS	0.9998	2.5

AX固相誘導体化前処理法（糖類）の評価



SCANトータルイオンクロマトグラム



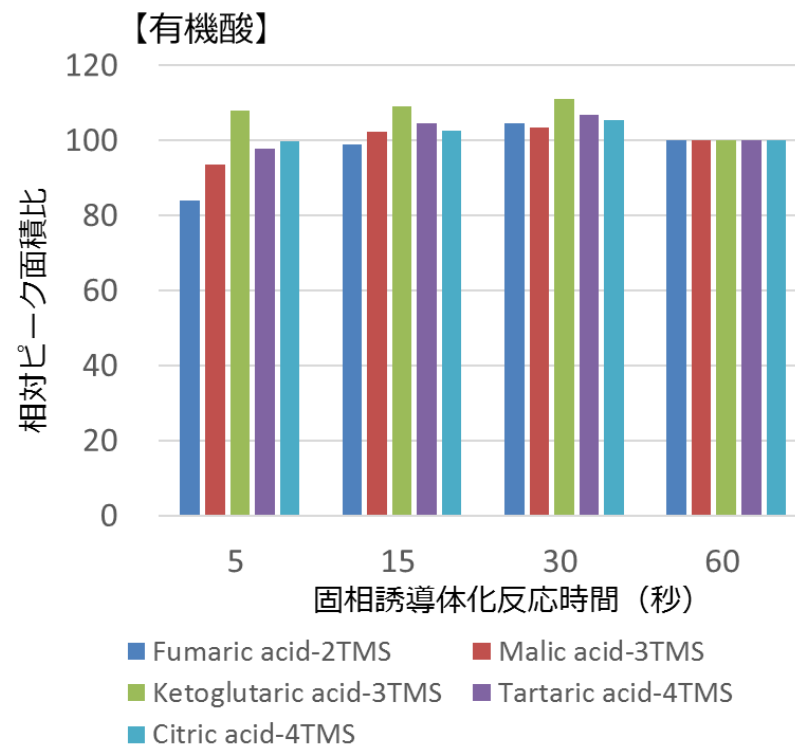
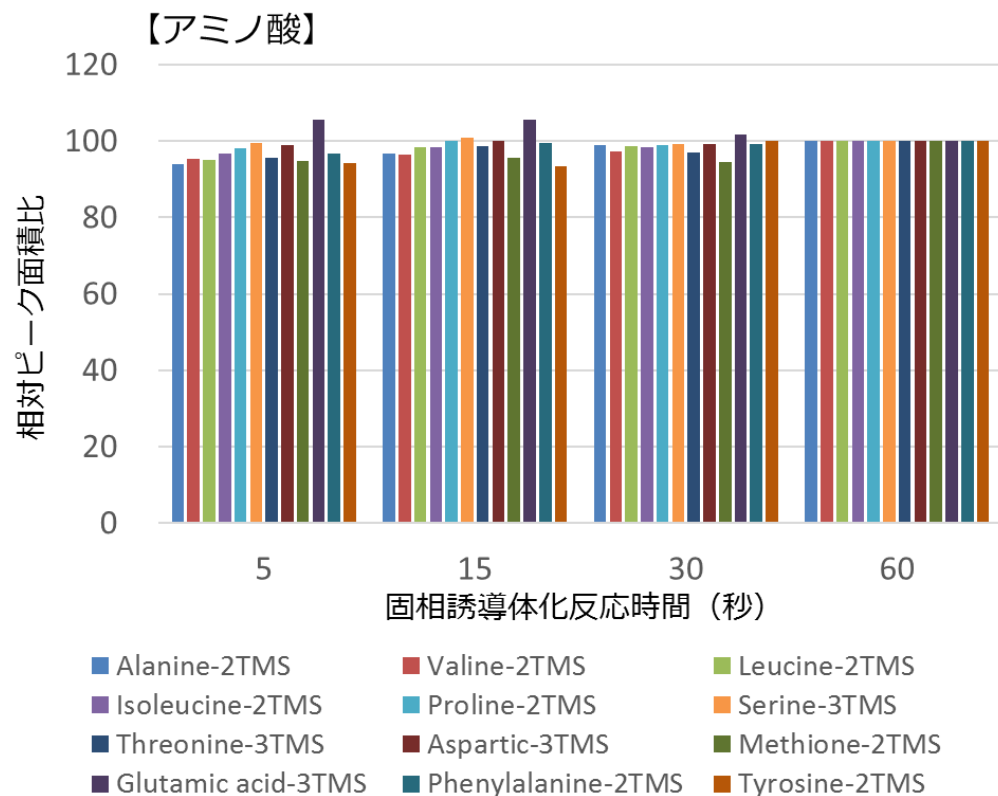
糖類量とピーク面積値の関係

目的成分量
0.1, 0.2, 0.5, 1.0 nmol

直線性 (R2) と再現性 (RSD, n=6)

No.	Saccharides	R2	RSD n=6, %
1	Xylose-4TMS	0.9998	5.4
2	Arabinose-4TMS	0.9996	7.5
3	Rhamnose-4TMS	0.9974	10.8
4	Fucose-4TMS	0.9988	9.8
5	Fructose1-5TMS	1.0000	3.3
6	Fructose2-5TMS	0.9998	3.2
7	Mannose-5TMS	0.9982	2.5
8	Galactose-5TMS	0.9995	1.8
9	Glucose-5TMS	0.9778	2.3
10	Sucrose-8TMS	0.9993	2.9
11	Lactose-8TMS	0.9997	7.2
12	Maltose-8TMS	0.9999	6.5

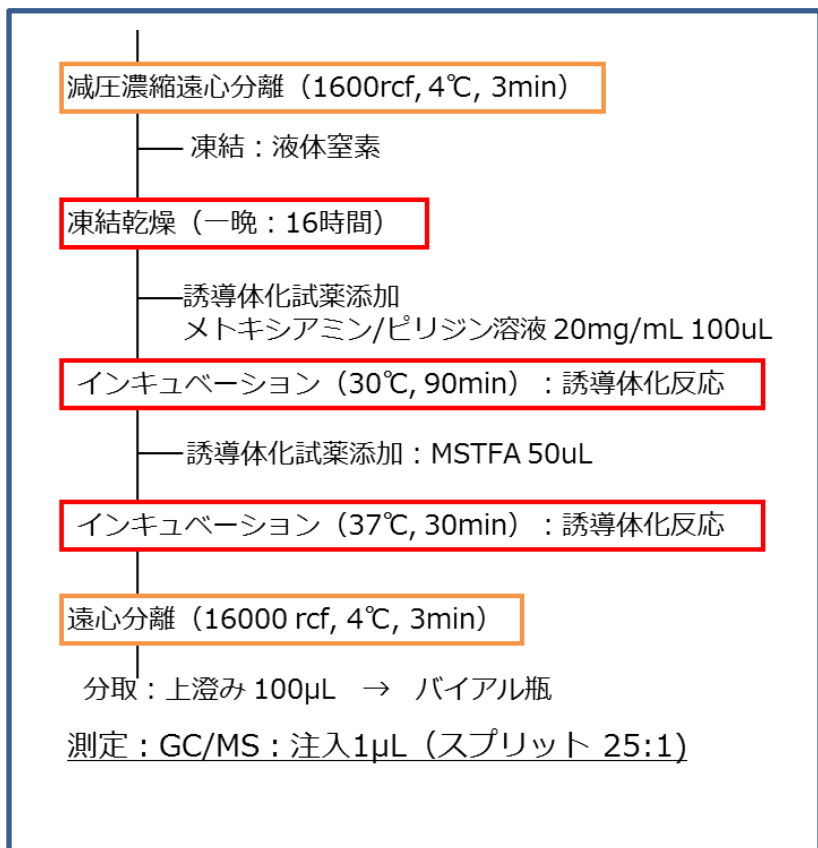
固相誘導体化反応時間について



従来法と本法の前処理時間の比較

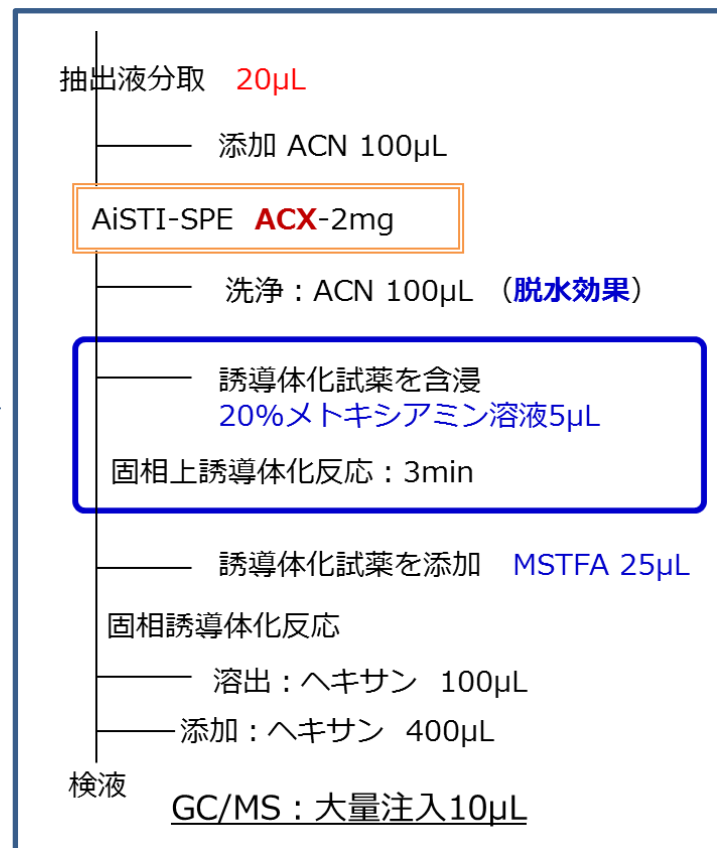
現在のメタボローム分析法

19時間



固相誘導体化法 (新技術)

10分



メタボローム分析用固相誘導体化法キット

特許登録

まとめ

固相カートリッジを用いた新規GC/MSメタボローム解析用試料調製法を開発した。

当該**固相誘導体化法**を用いることで

1. 固相に対象物質を保持させて、洗浄することで、脱水操作を簡易かつ迅速に行うことが可能となった。
2. 対象物質を保持した強イオン交換系固相に誘導体化試薬メトキシアミン溶液およびMSTFA誘導体化試薬を直接添加して含浸させることにより、固相上で速やかに誘導体化反応が進んだ。
3. 水分除去及び誘導体化の操作時間は10分と従来法(19時間)に比べて大きく短縮された。

はじめに

【経緯】

これまでに、従来のメタボローム分析における長時間にわたる操作を必要としない迅速な前処理法を目的として、固相に目的成分を濃縮・保持した状態で誘導体化する**固相誘導体化法**を開発した。

【本研究の課題】

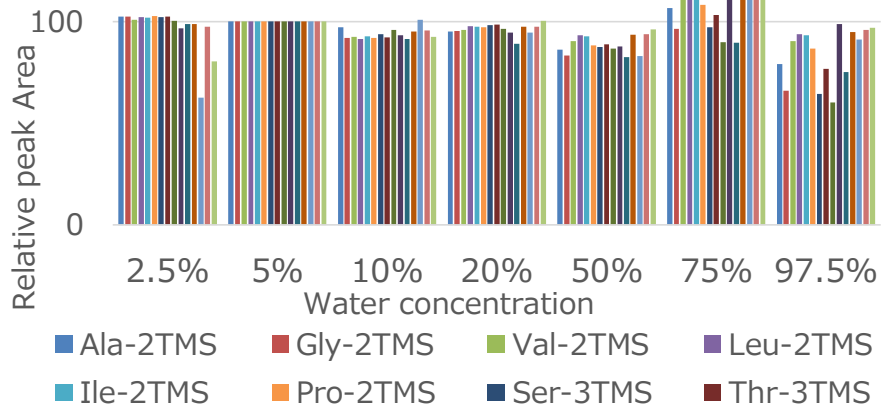
一般的なGC-MS基盤メタボローム分析において、試料によっては高濃度の糖類が測定および解析時にアミノ酸や有機酸の分析を困難にすることがある。

【目的】

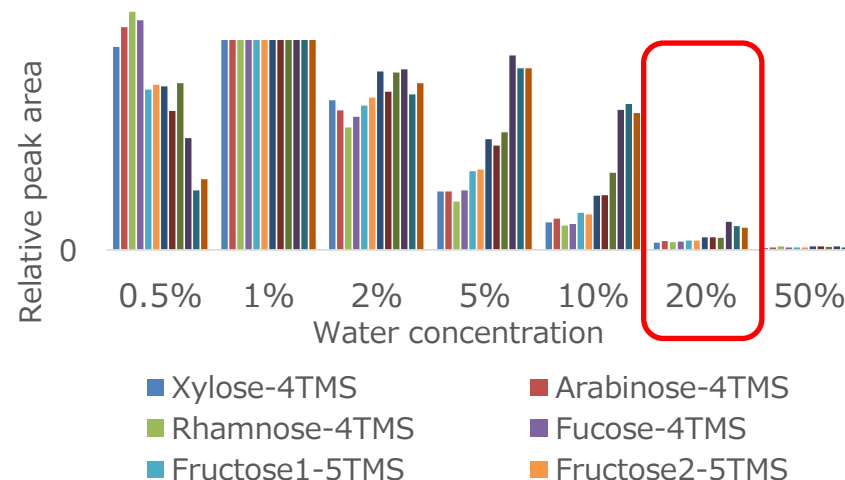
先の固相抽出の技術を応用し、**糖類は固相に保持させず、アミノ酸と有機酸を固相に保持させた状態で誘導体化する**アミノ酸と有機酸の迅速分析法の開発

試料負荷時の水濃度と固相への保持について

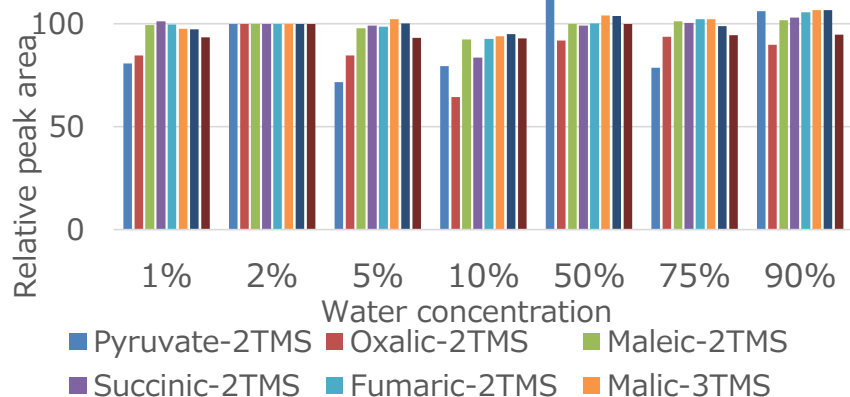
【アミノ酸とCX固相】



【糖とAX固相】

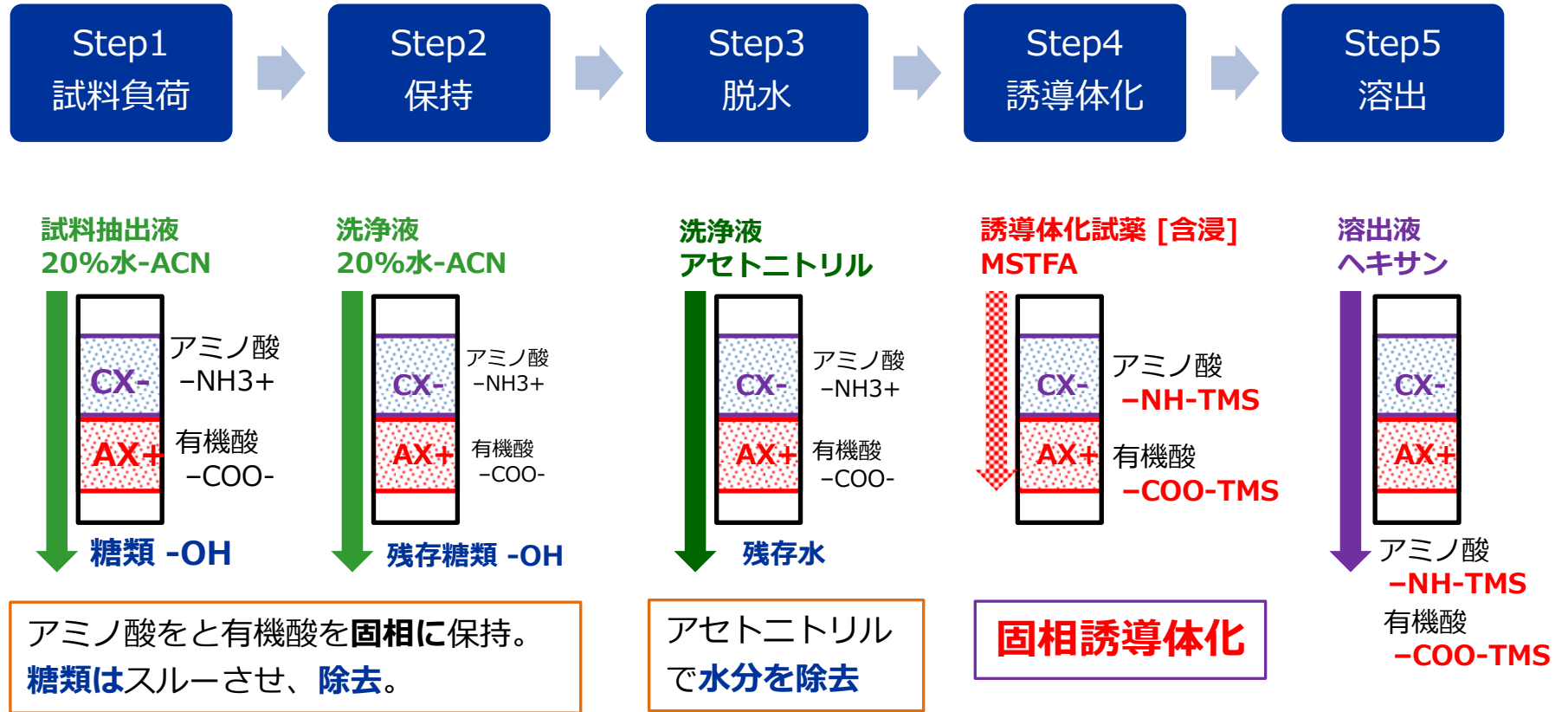


【有機酸とAX固相】



20%水-アセトニトリル溶液では
糖類を除去して、
アミノ酸と有機酸を保持することが可能。

糖類を除去する固相誘導体化前処理法の工程



固相誘導体化前処理法 (アミノ酸と有機酸)

抽出後の固相誘導体化前処理時間

試料 50 μ L

— 添加 : 水 150 μ L

— 添加 : ACN 800 μ L

インキュベーション (37 $^{\circ}$ C, 30min)

遠心分離 (14000rpm, 5min)

試料抽出液

(20%水-アセトニトリル)



試料抽出液分取 **50 μ L**

6分

AiSTI-SPE **ACX-3mg**

— 洗浄 : 20%水-ACN 50 μ L (糖類を洗浄)

— 洗浄 : ACN 100 μ L (脱水効果)

— 誘導体化試薬を含浸 **MSTFA** 25 μ L

固相誘導体化反応

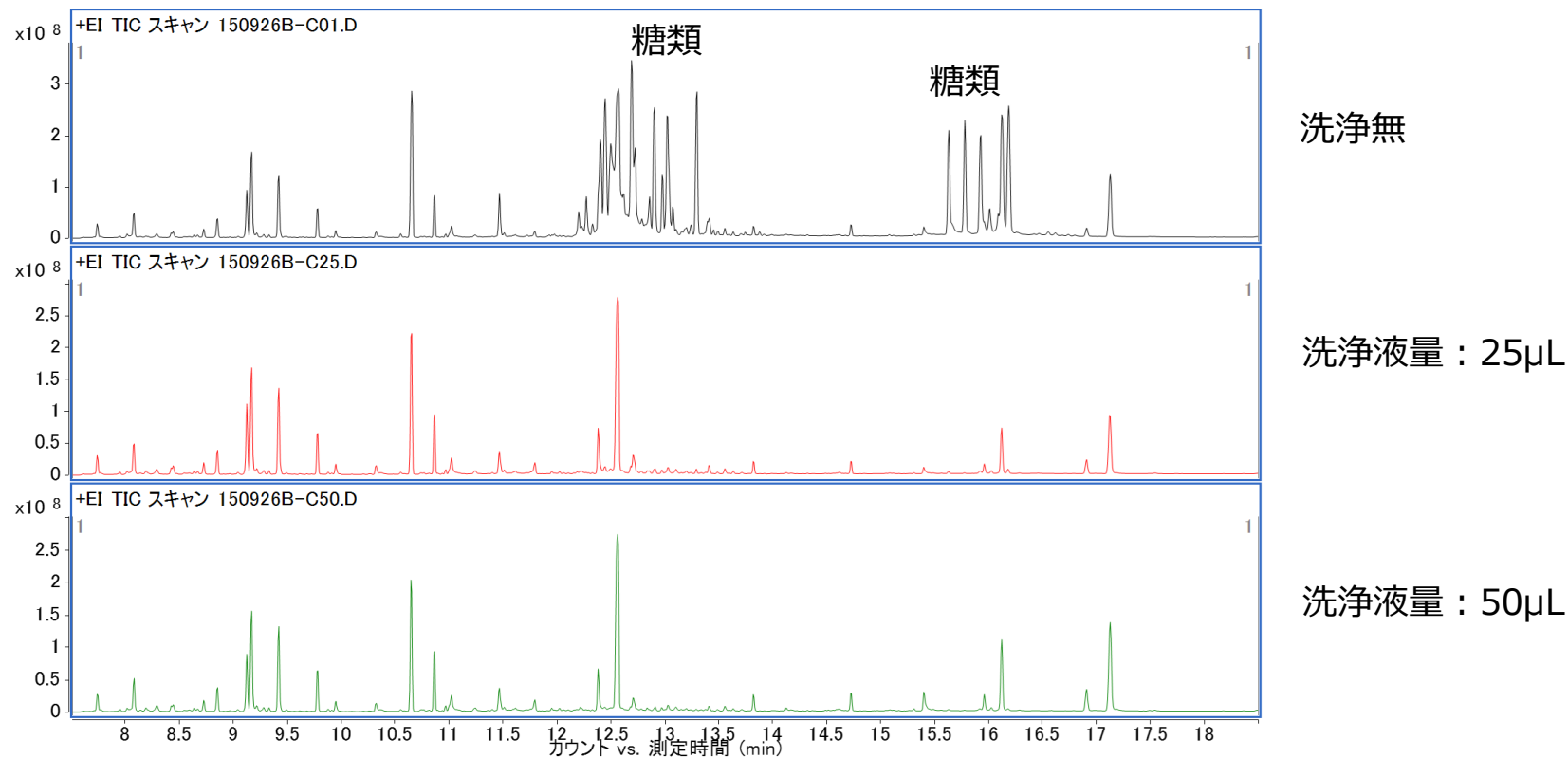
— 溶出 : ヘキサン 100 μ L

— 添加 : ヘキサン 400 μ L

検液

GC/MS : 大量注入10 μ L

洗浄液量と糖類の除去効果

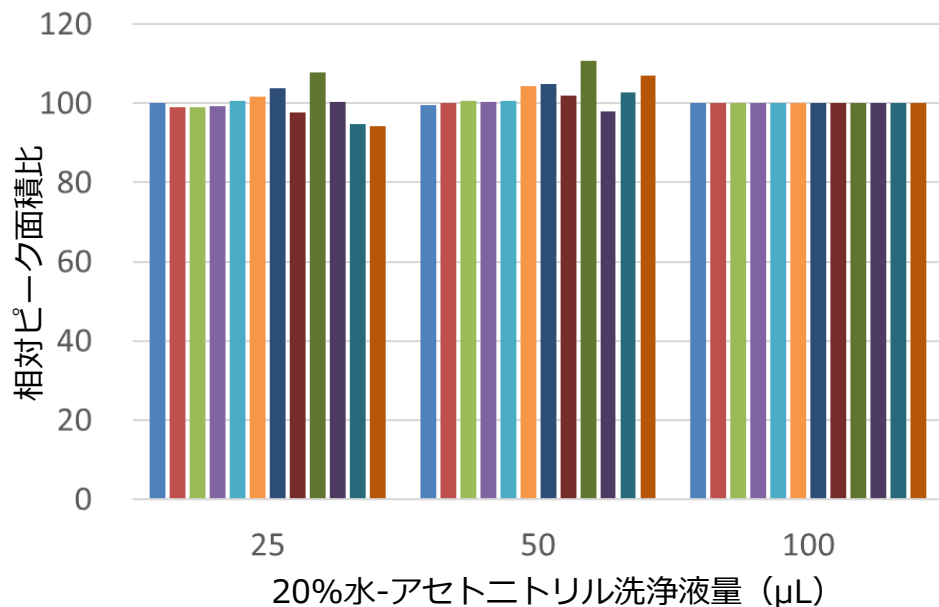


SCANトータルイオンクロマトグラム比較

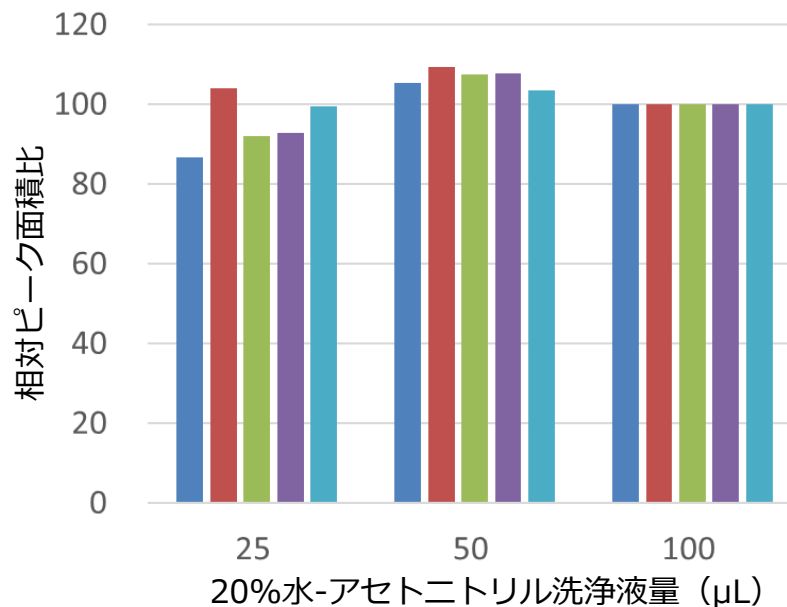
20%水-アセトニトリル50μLで洗浄することで固相に残存している糖類を除去できることが分かった。

20%水-アセトニトリル洗浄液量について

【アミノ酸】



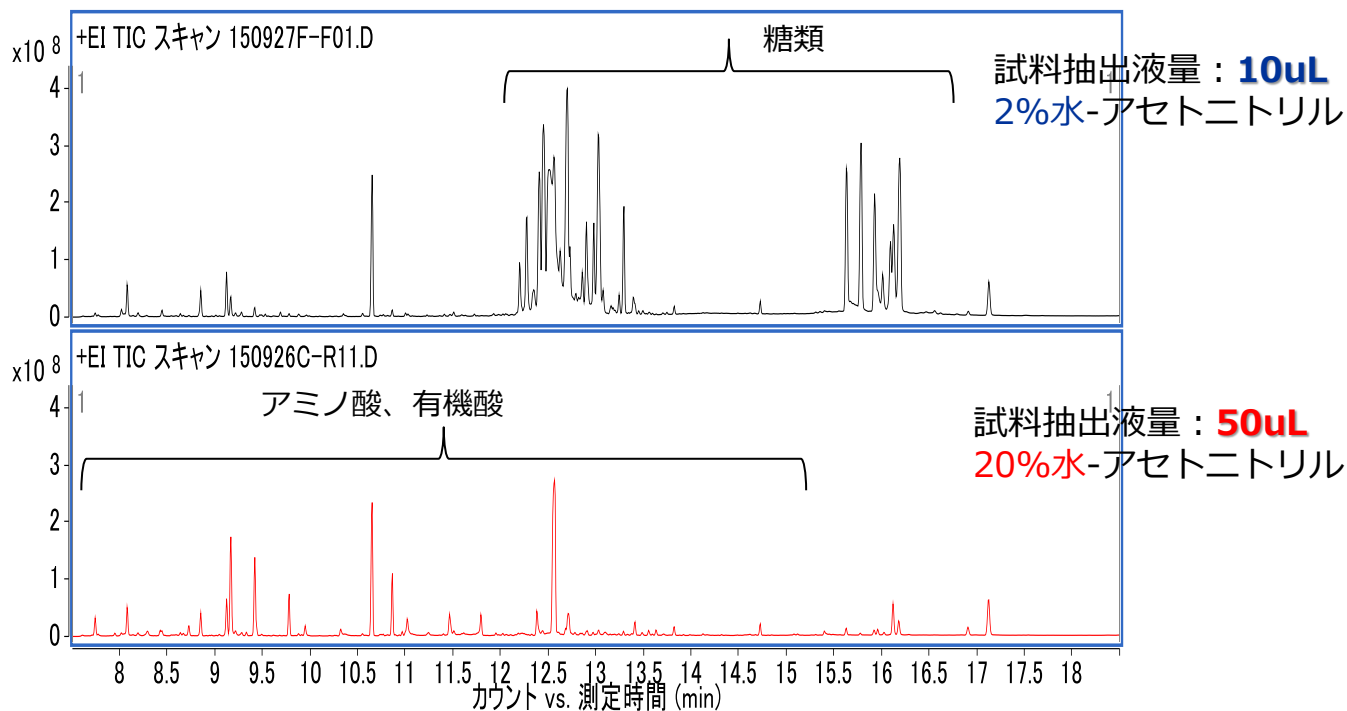
【有機酸】



- Alanine-2TMS
- Isoleucine-2TMS
- Threonine-3TMS
- Glutamic acid-3TMS
- Valine-2TMS
- Proline-2TMS
- Aspartic-3TMS
- Phenylalanine-2TMS
- Leucine-2TMS
- Serine-3TMS
- Methionine-2TMS
- Tyrosine-2TMS

- Fumaric acid-2TMS
- Ketoglutaric acid-3TMS
- Citric acid-4TMS
- Malic acid-3TMS
- Tartaric acid-4TMS

固相抽出技術による糖類の除去効果



測定機器を安定に保ち、メンテナンス頻度を下げられ、短時間分析が可能となる。

解析の時間短縮が図れ、精度の高い解析が可能となる。

低濃度のアミノ酸や有機酸が測定できるようになり、アミノ酸や有機酸の網羅的な分析枠が広がる可能性がある。

SCANトータルイオンクロマトグラム比較

フルーツジュースによる固相誘導体化法の再現性

No.	Compound	Peak Area						Ave.	RSD (%)
		1	2	3	4	5	6		
<i>Amino group</i>									
101	Alanine-2TMS	922,366	896,338	900,613	924,316	893,251	907,292	907,363	1.5
102	Valine-2TMS	2,280,757	2,199,247	2,175,089	2,249,300	2,179,606	2,188,250	2,212,042	1.9
103	Leucine-2TMS	8,238,086	7,993,113	7,807,302	8,156,037	7,842,769	8,070,694	8,018,000	2.1
104	Isoleucine-2TMS	3,152,605	2,931,310	2,878,507	3,061,404	2,924,058	3,027,144	2,995,838	3.4
105	Proline-2TMS	7,153,058	6,916,459	7,114,867	7,343,125	6,908,478	7,208,605	7,107,432	2.4
106	Serine-3TMS	1,630,455	1,578,066	1,539,055	1,604,529	1,547,032	1,574,444	1,578,930	2.2
107	Threonine-3TMS	223,434	214,033	204,897	206,024	204,772	212,917	211,013	3.5
108	Aspartic acid-3TMS	1,440,509	1,416,698	1,390,517	1,410,988	1,407,988	1,403,984	1,411,781	1.2
109	Methione-2TMS	72,919	73,207	67,574	72,118	71,737	73,063	71,770	3.0
110	Glutamic acid-3TMS	379,603	359,315	366,787	352,375	366,416	353,280	362,963	2.8
111	Phenylalanine-2TMS	1,623,907	1,607,477	1,546,167	1,633,851	1,590,592	1,625,657	1,604,609	2.0
112	Tyrosine-2TMS	180,343	168,369	154,763	172,856	165,834	169,786	168,658	5.0
<i>Organo acid group</i>									
201	Fumaric acid-2TMS	393,542	355,299	303,190	396,236	369,866	377,538	365,945	9.4
202	Malic acid-3TMS	31,836,205	31,114,777	27,480,877	33,665,359	31,651,902	32,598,864	31,391,331	6.7
203	Ketoglutaric acid-3TMS	485,776	545,080	445,816	477,290	461,074	479,614	482,441	7.0
204	Tartaric acid-4TMS	202,387	196,159	178,516	202,680	194,985	204,069	196,466	4.9
205	Citric acid-4TMS	118,149,126	116,573,721	109,788,429	119,169,130	117,325,701	117,454,095	116,410,034	2.9

高濃度の糖類が分析に及ぼす影響

【測定機器について】

- ・ 注入口が汚れる
- ・ フィラメントが切れやすくなる
- ・ 感度低下
- ・ メンテナンス頻度が高い
- ・ GCへの注入量を増やせない。

【解析について】

- ・ 定量イオンが限定される。
- ・ ピーク形状が崩れる。
- ・ 低濃度の目的成分が分析できない。
- ・ 解析に時間が掛かる。
- ・ リテンションタイムが重なると解析できなくなる。
- ・ リテンションタイムが重なる物質は測定対象から除外する。
- ・ リテンションタイムがずれる。



糖類を除いた

「アミノ酸」と「有機酸」の分析

測定機器を安定に保ち、メンテナンス頻度を下げられ、短時間分析が可能となる。

解析の時間短縮が図れ、精度の高い分析が可能となる。

低濃度のアミノ酸や有機酸が測定できるようになり、アミノ酸や有機酸の網羅的な分析枠が広がる可能性がある。

まとめ

- アミノ酸を保持させる陽イオン交換樹脂（CXi）と有機酸を保持させる陰イオン交換樹脂（AXi）を積層にした固相カートリッジを開発した。
- 糖類は固相に保持せずアミノ酸と有機酸を固相に保持させるための通液時の水-アセトニトリル比率の最適化を行い、アミノ酸と有機酸の迅速な分析法を開発した。
- 糖類を多く含む検体においてもその影響を受けずアミノ酸と有機酸のトリメチルシリル(TMS)化されたピークが再現性良く検出された。
- 固相誘導体化法を用いることで誘導体化前処理に要する時間の大幅な短縮が可能となった。

研究開発の概要および背景

■ 社会環境の変化

健康社会の構築

- ◆ 予防医学の確立、疾病の早期発見、機能性食品／飲料の創出
- ◆ 代謝物の分析・解析を通して疾病の発見、食品の機能性把握、創薬・治療の発展

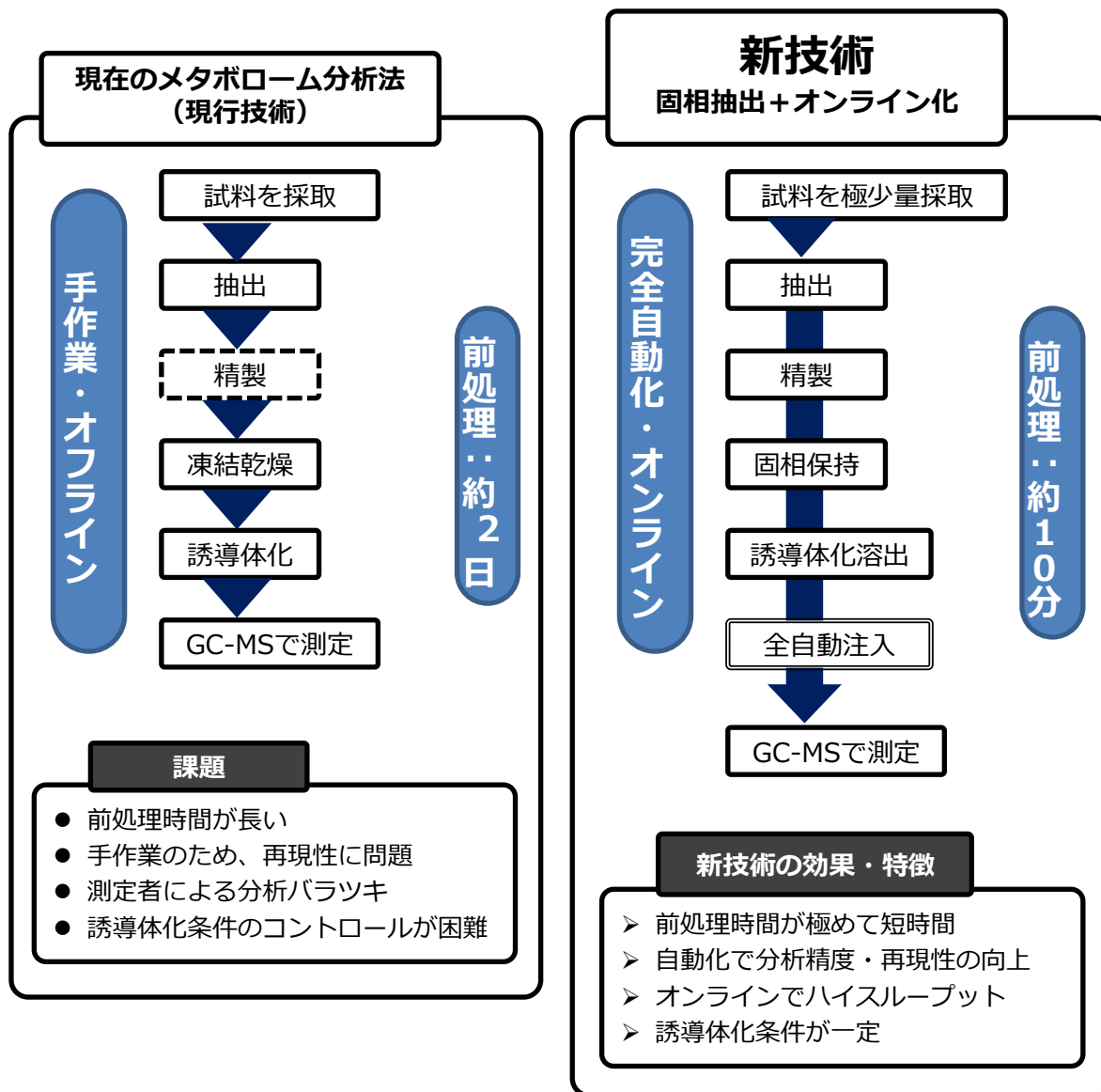
➢ **メタボローム分析技術が必須技術に！**

分析手段：GC-MS LC-MS
解析手段：データの多変量解析

■ 分析現場のニーズ

メタボローム分析の課題

- **ごく少量での血液等の試料の分析**
・患者の身体的負担を低減
- **分析精度、再現性の向上**
・測定者によるバラツキ低減
- **分析の迅速化**
・前処理の時間を短くしたい
・多検体対応



オンラインSPE-GCシステムの展開

