

Application News

No. G309

ガスクロマトグラフィー

GC-FID による食品メタボロミクス

食品をはじめとした生物由来の試料は極めて多くの成分を含有しており、それらを包括的に解析することでロットや製法の違いが試料に与える影響を明らかにしたり、成分パターンから未知サンプルの特徴を予測したりする研究開発が、昨今食品分野を中心に盛んに行われています。これは一般にメタボロミクスと呼ばれ、多変量解析や機械学習などの解析手法と併せて非常に需要の高い分析手法の一つとなっています。

メタボロミクスには、LC-MS や GC-MS などの質量分析計が必須のツールとされてきました。質量分析計は優れた定性能力を持ち、検出された成分の同定において非常に大きな威力を発揮します。一方で、装置に汚れが蓄積しやすい／装置のチューニング情報を更新するとその前後でデータの質が大きく変わってしまうという特徴があり、長期間にわたって大量のデータを取るには適さないとする向きもあります。特に GC-MS では代謝物をトリメチルシリル化 (TMS 化) して測定を行うことが一般的ですが、TMS 化した化合物のピークは、誘導体化のあと時間が経つにつれ強度が減衰していくものが多く、よい測定結果を得るためには、誘導体化後なるべく早く分析を終えることが重要なポイントとなる場合があります。

本稿では、このような GC-MS によるメタボロミクスが、GC-FID で代替可能であるかを検討し、GC-MS と相当数の化合物ピークを検出できること、それらのピーク強度が、時間単位／日単位ともに GC-MS よりも安定であることを見出しました。このような GC-FID の安定性は、メタボロミクスにおいて長期間にわたって大量のデータを取得する際に、極めて有効なツールとなる可能性が示唆されました。

T. Sakai, Y. Takemori

■ 試料の前処理と分析

試料として市販のビールを用意し、下記のとおり抽出／誘導体化を行いました。

ソニケータにかけて炭酸を抜いたビールを 50 μ L 取り、1.5 mL 容量マイクロチューブに採取しました。内部標準として 2-イソプロピルリンゴ酸水溶液 (0.5 mg/mL) を 10 μ L 添加したのち、メタノール：水：クロロホルム = 2.5 : 1 : 1 溶液を 250 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間振盪しました。16,000 G で 3 分間遠心したのち、上清を 225 μ L 採取し、そこへ超純水 200 μ L を加えました。よく混和した後、再度 16,000 G で 3 分間遠心したうえ上清を 250 μ L 回収し、濃縮遠心機で一晩乾燥させました。

乾燥後の試料に、メトキシアミン塩酸塩ピリジン溶液 (20 mg/mL) を 80 μ L 加え、30 $^{\circ}$ C で 90 分間振盪しました。続いて N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド (MSTFA) を 40 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間振盪しました。16,000 G で 3 分間遠心して溶液中の残滓を沈殿させ、上清 100 μ L を GC-MS パイアルに回収しました。

この試料をそれぞれ同じ GC 条件にて、GC-FID および GC-MS で分析し、結果を比較しました。

■ 分析条件

表 1 に分析条件を示します。GC の条件は当社 GC-MS のソフトウェア製品である Smart Metabolites Database™ に準拠しました。

表 1 測定条件

- GC -	
Column	: DB-5 (30 m \times 0.25 mm, 1 μ m)
Inj. Mode	: Splitless
Inj. Port Temp.	: 250 $^{\circ}$ C
Oven Program	: (1) 100 $^{\circ}$ C (4 min) \rightarrow (10 $^{\circ}$ C/min) \rightarrow 320 $^{\circ}$ C (11 min) : (2) 100 $^{\circ}$ C (4 min) \rightarrow (4 $^{\circ}$ C/min) \rightarrow 320 $^{\circ}$ C (11 min)
Carrier Gas Flow	: Linear Velocity (39.0 cm/sec)
Purge Flow	: 3.0 mL/min
- FID -	
Temperature	: 330 $^{\circ}$ C
Sampling Rate	: 40 msec
FID H ₂ Flow Rate	: 32.0 mL/min
FID Makeup Flow Rate	: 24.0 mL/min
FID Air Flow Rate	: 200.0 mL/min
- MS -	
Analysis Mode	: Scan (m/z 35 - 500)
Ion Source Temp.	: 200 $^{\circ}$ C
Interface Temp.	: 280 $^{\circ}$ C
Loop Time	: 0.3 sec

■ 誘導体化後時間での安定性

GC-FID のクロマトグラムと GC-MS のトータルイオンクロマトグラムを図 1 に示します。各ピークの時間的安定性を調べるため、まずは赤で記したピークについて、時間的な強度の推移をプロットしました (図 2)。

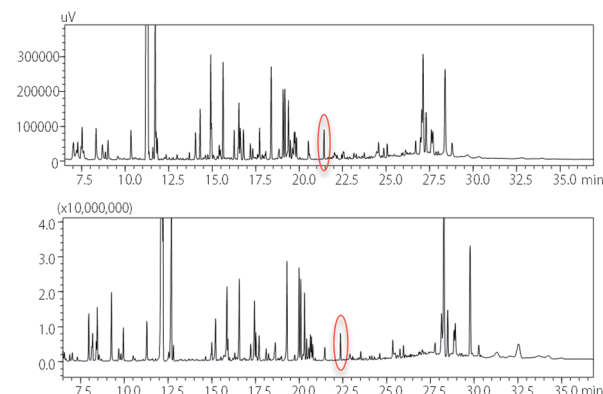


図 1 GC-FID のクロマトグラムと GC-MS のトータルイオンクロマトグラム (昇温プログラム (1) で分析)

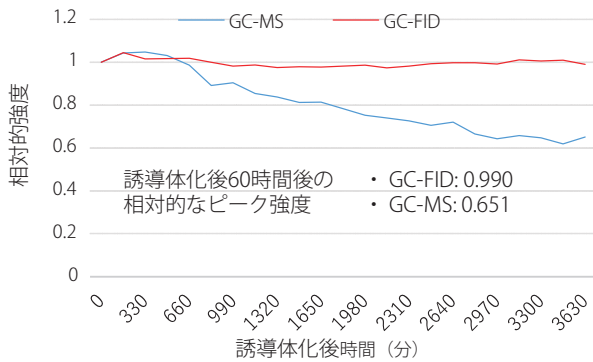


図2 図1で赤く記したピークの強度値の推移 (誘導体化後時間=0の強度値を1としたときの相対値)

図1に赤で記したピークは、GC-MSでは60時間後に強度値が相対値で0.65まで下がったのに対し、GC-FIDでは0.99と、ほぼ60時間前と変わらず安定でした。

続いて、同様の検証を他の全てのピークに関して行った結果、GC-MSでは約80%のピークが60時間後までに0.65程度まで下がったのに対し、GC-FIDでは約80%のピークで0.8-1.2程度を維持しており、時間的に安定なピークが多いことがわかりました(図3)。

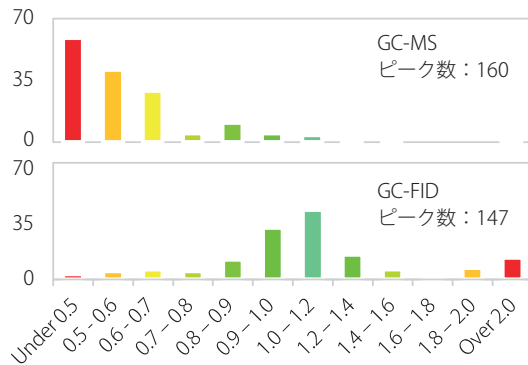


図3 GC-MSおよびGC-FIDで検出した全ピークにおける、60時間後の相対的なピーク強度の分布

■ 日間での安定性

ビールサンプルを前述の通り前処理して乾燥状態にしたものを一部保管しておき、その日の測定と11日後に同様に誘導体化して測定し、結果を比較しました。図4にクロマトグラムを示します。GC-FIDでは全体的にピークの高さは11日前とほぼ同じ高さであるのに対し、GC-MSではわずかに低く出ている傾向が見取れます。

全ピークの高さをまとめたものを図5に示しました。GC-MSでは過半数を超えるピークで大きさが変わる傾向があるのに対し、GC-FIDでは過半数を超えるピークで0.9-1.2程度の値を維持していることがわかりました。

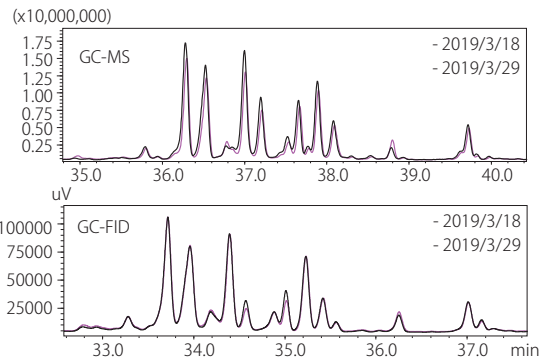


図4 11日後に同じサンプルを誘導体化し、分析した時のGC-FIDおよびGC-MSのクロマトグラム (昇温プログラム(2)で分析)

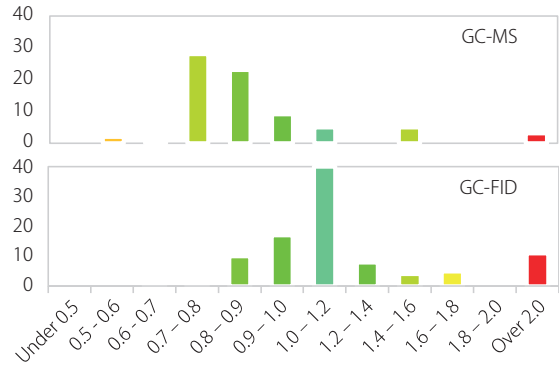


図5 GC-MSおよびGC-FIDで検出した全ピークにおける、11日後の相対的なピーク強度の分布

■ GC-FIDによるメタボロミクス

市販されているビールのうち、同じ製品で製造工場の異なるものを5種類準備し、それぞれ前述の通り前処理して、GC-FID、GC-MSで測定しました。それぞれのデータでピークのピッキングを行い、主成分分析を行いました。そのスコアプロットを図6に示します。GC-FIDとGC-MSのスコアプロットは比較的近い形に分布することが確認できました。

GC-FIDによるメタボロミクスでは、定性面以外ではGC-MSと同等の結果を得ることができる場合があり、なおかつデータの安定性面でGC-MSよりも良好な結果が得られる場合があることが示されました。

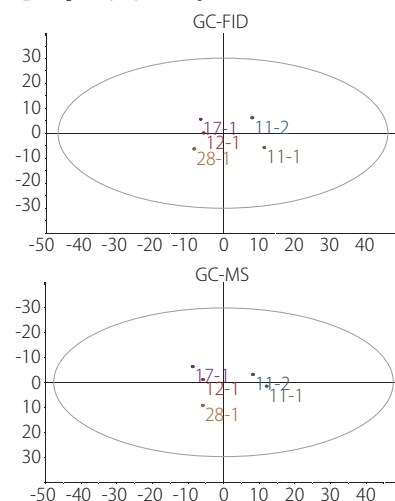


図6 別工場で製造された5種類のビールのスコアプロット (11-1、11-2、12-1、17-1、26-1は各サンプルを表す。)

Smart Metabolites Databaseは、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 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

初版発行：2019年8月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。