

Application Data Sheet

No. 88

GC-MS

Gas Chromatograph Mass Spectrometer

GC-MS/MSを用いたヒト標準血清中の代謝物分析

Analysis of Metabolites in Serum using GC-MS/MS

シングル四重極GC-MSは優れたクロマトグラフィー分離能を有し、安定した測定が可能であるため、生体内代謝物の網羅的な解析を行うメタボローム解析に広く用いられています。しかしながら、生体試料には、多くの代謝物や多様なマトリックスが含まれているため、シングル四重極GC-MSでは分離が困難な場合があります。トリプル四重極GC-MS/MSのMRMは四重極Q1と四重極Q3で2回、MS分離をするため、一つの四重極でMS分離するスキャンモードでの測定より妨害成分によるピークの重なりの影響を除去でき、高感度かつ正確な定量結果を取得することが可能です。

本アプリケーションデータシートでは、ヒト標準血清中の代謝物をGC/MS代謝成分データベース Ver.2に含まれるスキャンおよびMRMメソッドで測定し、得られた結果を比較しました。

分析条件

前処理は50ulのヒト標準血清に内部標準物質として2-Isopropylmalic acidを添加した後、メタノール/水/クロロホルム溶液(2.5:1:1)で代謝物を抽出し、メキシムとトリメチルシリル誘導体化を行い、サンプルとしました[1]。それらのサンプルをGC/MS代謝成分データベース Ver.2のメソッドを用いて、スキャンおよびMRMをそれぞれ6回ずつ測定しました。Table 1に分析条件を示します。

Table 1 分析条件

GC-MS	:GCMS-TQ8030		
カラム	:DB-5 (長さ30m, 0.25mm I.D., df=1.00 μm)		
ガラスインサート	:スプリットレスインサート ウール入り (PN:221-48876-03)		
[GC]		[MS]	
気化室温度	:280°C	インターフェース温度	:280°C
カラムオープン温度	:100°C(4分)→(4°C/分)→320°C(8分)	イオン源温度	:200°C
注入モード	:スプリットレス		
キャリアガス制御	:線速度 (39.0 cm/秒)	測定モード	:スキャン
注入量	:1 μL	質量範囲	:m/z 45-600
		イベント時間	:0.3 秒
		測定モード	:MRM
		ループタイム	:0.3 秒

MRMモニタリング m/z (スキャンと比較した4代謝物と内部標準物質(I.S.))

Compound name	RT (min)	Quantitative Transition		Qualitative Transition	
		Precursor>Product	CE (V)	Precursor>Product	CE (V)
3-Hydroxyisovaleric acid-2TMS	15.480	131.10> 73.00	12	247.10> 73.00	18
Homocysteine-3TMS	30.360	234.10> 73.00	27	234.10>128.10	9
Aconitic acid-3TMS	32.490	285.10>147.10	15	375.10>147.10	15
Kynurenine-3TMS	43.890	307.10>218.10	9	307.10>192.10	18
2-Isopropylmalic acid-3TMS (I.S.)	27.930	349.10>259.10	6	349.10>147.10	24

[1] S. Nishiumi, M. Shinohara, A. Ikeda, T. Yoshie, N. Hatano, S. Kakuyama, S. Mizuno, T. Sanuki, H. Kutsumi, E. Fukusaki, T. Azuma, T. Takenawa, M. Yoshida, *Metabolomics* 6 (2010) 518-528

分析結果

Fig. 1にスキャンおよびMRMによる血清中代謝物のマスプロトグラムを示します。ここに示します4成分は、スキャンでは妨害成分の影響や、感度が不十分のため、検出されなかったり繰り返し分析精度が14%以上でした。一方、MRMでは妨害成分の影響が取り除かれ、高感度に測定することができ、繰り返し分析精度は6.5%以下という良好な結果を得ることができました(Table 2)。

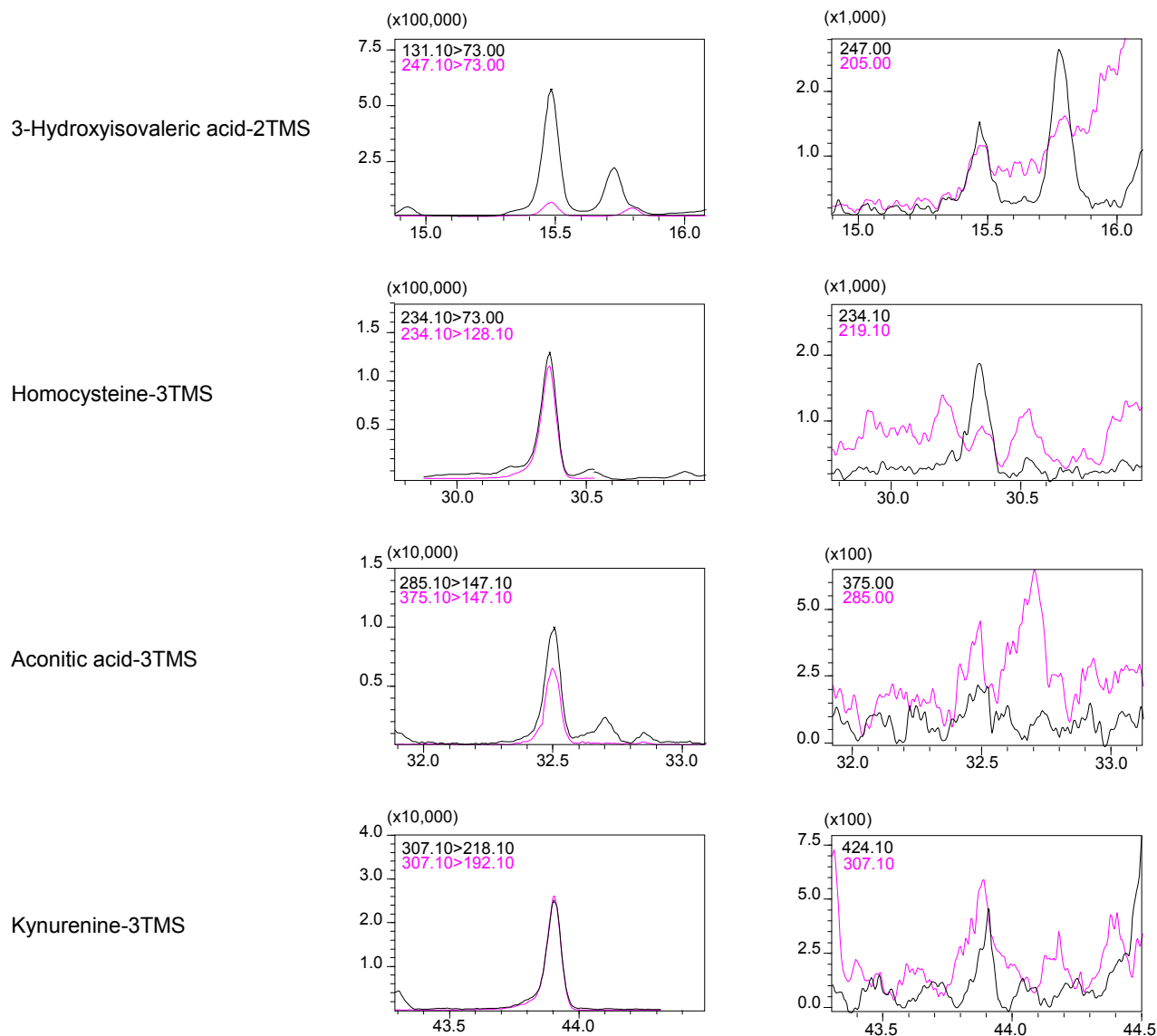


Fig. 1 標準血清中の代謝物のMRM(左)とScan(右)マスプロトグラム比較

Table 2 スキャンとMRMの繰り返し分析精度 (内部標準補正)

Compound name	%RSD (n=6)	
	MRM	Scan
3-Hydroxyisovaleric acid-2TMS	3.99	14.0
Homocysteine-3TMS	5.04	23.4
Aconitic acid-3TMS	5.98	N/A
Kynurenine-3TMS	6.48	24.5