

報 文

高速原子衝撃質量分析法を用いる血清中グルコースの
同位体希釈質量分析高津 章子[®], 西 末雄^{*}

(1992 年 10 月 19 日受理)

高速原子衝撃質量分析法 (FABMS) を用いる血清中グルコースの同位体希釈質量分析を試みた。同位体グルコースとしては D-グルコース- $^{13}\text{C}_6$ を用い、血清試料に同位体を加えた後、高速液体クロマトグラフィーを用いて試料中のグルコースを分離・分取した。分取したグルコースフラクションを濃縮し、グリセリンをマトリックスとして通常の FABMS 測定を行った。定量には $(\text{M}+\text{G}+\text{H}-\text{H}_2\text{O})^+$ イオンのピーク強度比を用いたが、バックグラウンドの寄与が高かったため、近傍のピークを用いて補正を行った。その結果 1% 程度のばらつきでの測定が可能となった。

1 結 言

同位体希釈質量分析法 (IDMS) は、分析対象物の同位体化合物を内標準物質とする定量法で、原理的に系統誤差が抑制されるため、信頼性が極めて高く、基準分析法になり得る方法である¹⁾。ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) による IDMS は米国 NIST を中心に標準血清のグルコースなどの標準値決定に用いられてきた^{2)~5)}。しかし、生体成分の多くを占める不揮発性化合物を GC/MS で分析するためには誘導体化が必要である。もし、誘導体化せずに測定が可能となれば、分析操作が一段階簡便になるうえ、誘導体の安定性や、反応の際の同位体効果などを問題にする必要もなく、測定できる化合物も大幅に広がると考えられる。

生体成分の分離分析には HPLC が有効な手段である。又、質量分析法の分野では高速原子衝撃法 (FAB) などの難揮発性試料に適したイオン化法も開発されている。こうした方法を組み合わせた IDMS で、従来の方法では測定できなかった化合物を対象とすることや、より簡便で信頼性の高い測定が行える可能性がある。又、IDMS の結果の信頼性という立場からも新しい方法を開発し、結果を比較することも必要と考えられる。

当研究所では、グルコースについて標準値を決定し得る基準分析法の確立を目指して GC/MS やオンライン

ン、オフライン LC/MS を用いる IDMS を検討してきた^{6)~8)}。HPLC では化合物の分取も容易なため、本報告では HPLC での分離・分取と高速原子衝撃質量分析法とを組み合わせ、はん用型の質量分析計を用いた血清中グルコースの新しい IDMS の確立を目指し、検討を行った結果について述べる。

2 実 験

2.1 試 薬

D-グルコース標準溶液は NIST SRM 917 D-グルコース (99.9%) を用いて作製した。正確に質量を測定した SRM グルコースを精ひょうした水に溶かし、濃度約 2 mg/g の標準溶液とした。

同位体グルコースとしては D-グルコース- $^{13}\text{C}_6$ (98.8 atom% ^{13}C , MSD Isotopes, Canada 製) を用い、水溶液とした。

ピーク強度比と質量比との関係を求めるために、標準液と同位体化合物の溶液とから天然グルコースと同位体グルコースの質量混合比既知の溶液を作製した。それぞれ重量比が 0.8 から 1.2 の間で数個調製した。作製した溶液の一定量を凍結乾燥し、グルコース濃度約 1% となるように 50% メタノールで溶解したものを測定試料とした。

2.2 血清試料の前処理方法

ヒトプール血清試料は共同分析のため日本臨床化学会より提供されたものを用いた。分析までは -20°C で保

* 工業技術院物質工学工業技術研究所: 305 茨城県つくば市東 1-1

存した。

それぞれグルコースが約 1 mg となるように血清試料と同位体グルコースを正確に質量を量って混合し、アジ化ナトリウムを加え、平衡に達するように室温に一夜放置した後、20% スルホサリチル酸水溶液 0.1 ml を加え、遠心分離して除タンパクし、上澄みをとって試料とした。

2.3 HPLC による分離

液体クロマトグラフは島津製作所製 LC-6A と昭和電工製示差屈折 (RI) 検出器 SE-51 を用いた。

まず、カラムとして東洋曹達製 TSK-gel-NH₂-60, 移動相としてアセトニトリル-水 (4/1 vol.) を用い、除タンパク後の血清試料 50 μ l を注入し、グルコースフラクションを分取した。フラクションを濃縮した後、再びカラムに昭和電工製 Shodex Sugar SP-1010, カラム温度 80°C, 移動相として水 (流速 1 ml/min) を用いて分離を行い、再度分取を繰り返した。これらの操作を繰り返し、集めたフラクションを凍結乾燥し、残留物をグルコース濃度約 1% となるように 50% メタノールで溶解した。

2.4 質量分析

質量分析計は日本電子製 HX-100 及び DA-5000 データ処理システムを用いた。ステンレス製ターゲット上

に、試料約 1 μ l とマトリックスとしてメタノールで 50% に希釈したグリセリン約 0.5 μ l を載せ、よく混合した後、3 kV で加速されたキセノンガスの中性高速粒子ビームを照射し、イオン化を行った。装置の質量分解能は通常の低分解能 ($R=1000$) に設定し、 m/z 200~300 の質量範囲を 1 秒で走査した。グルコースのピークがある程度減衰するまで (約 5 分) の平均スペクトルからピーク強度比を計算した。

2.5 濃度の計算

得られたピーク強度比から濃度の計算方法は既報^{6,7)}と同様である。すなわち、測定の日ごとに質量混合比既知の溶液でピーク強度比と質量比の関係を求め、試料のピーク強度比から質量比を算出した。

血清試料の質量を M , 添加した同位体化合物の質量を L , 上記の質量比を R_M とすると、血清中グルコース濃度 C は、 $C=(R_M \times L)/M$ の関係式から求めた。

3 結果及び考察

3.1 HPLC による分離

HPLC によるグルコースの分離法としてアミノプロピルカラム, Sugar カラムを用いる二つの条件を検討したが、除タンパク後の血清を HPLC に注入し、RI 検出器で検出したクロマトグラムではいずれの条件下でもグルコースと分離しない成分が認められた。そこで、一度

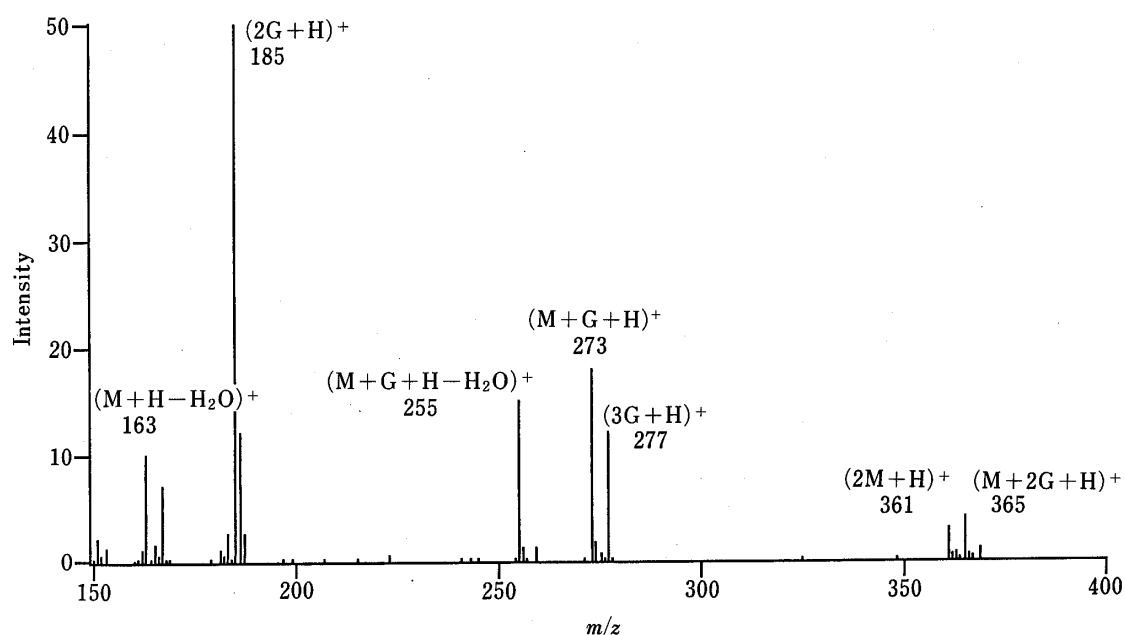


Fig. 1 Fast atom bombardment (FAB) mass spectrum of D-glucose

分取したフラクションを凍結乾燥した後, 再度異なる条件でクロマトグラフ分離した。

ヒト血清中に存在する他のヘキソース (フルクトース, マンノース, ガラクトース) は Shodex Sugar SP-1010 カラムを用いた HPLC の条件下でグルコースと完全に分離することを確認した。

3・2 質量分析

Fig. 1 に 10% グルコース水溶液で測定した FABMS によるグルコースの質量スペクトルを示す。グリセリンのピーク m/z 185($2G+H$)⁺ がベースピークとなっているが, 比較的高質量数側で強度の大きいグルコースのピークとして m/z 255 ($M+G+H-H_2O$)⁺, m/z 273 ($M+G+H$)⁺ が観測された。

通常の FABMS ではサンプルのピークはだらだらと減少し, 鋭いピークとしては現れないため, GC/MS の

場合のように, 選択イオン検出法などを用いるのは困難と考えられた。そこで, 測定した平均スペクトルからピーク強度比を求めることを検討した。

Fig. 2 にピーク比測定の際に得られた (A) 標準溶液と同位体化合物溶液との混合溶液, (B) 同位体化合物を加えた血清試料, (C) ブランクのスペクトルを示した。測定試料のグルコース濃度 (1%) では, グリセリンなどによるバックグラウンドピークがグルコースピークに数% の強度で重なっており, ピーク強度比の再現性に影響すると考えられた。

各測定においてマトリックスのグリセリン量をほぼ一定に保つためグリセリンをメタノールで 50% に希釈して粘性を下げ, シリンジで一定量加えることにした。しかし, m/z 273 では近傍にグリセリンの大きなピーク m/z 277($3G+H$)⁺ があり, グリセリンピークの変動により m/z 273 のバックグラウンドピーク強度が大きく変動するのが観測された。このため測定には ($M+G+H-H_2O$)⁺ イオンを用いることが適当と考えられた。しかし, 近傍に大きなバックグラウンドピークのない m/z 256, 261 のグルコースのピークに関して, そのまま m/z 255 と m/z 261 の強度比をとったのでは繰り返し精度は数% と悪かった。これは, たとえばバックグラウンドピークを反映していると考えられる m/z 257 とグルコースの m/z 255 のピークの比をとると, そのばらつきは 20~50% にも及んでおりこのことから, m/z 255 や m/z 261 に数% の割合で寄与しているバックグラウンドピークも同様に変動しているためと考えられた。このため, ピーク強度比を 1% 程度の再現性で測定するためには, 重なっているバックグラウンドの影響を除くことが必要であると考え, 質量分解能を 5000 まで上げたが, グルコースとバックグラウンドピークとの十分な分離は得られなかった。そこでバックグラウンドピークの大きさを 1 回ごとの測定において見積もり, 差し引くことを検討した。

バックグラウンドピークはマトリックスのグリセリンや試料と共に存在し, 試料の消失と共に弱くなっていくものと, 試料のあるなしにかかわらず常に存在するものの和からなると考えられ, 試料消失後のスペクトルをバックグラウンドとして用いることもできない。そこでまずグリセリンのみのブランクスペクトル (Fig. 2-C) より測定質量 (m/z 255 と m/z 261) のピークと相関のある近傍のピークを捜し, 実際のグルコース測定で得られた 1 回ごとのスペクトルについてこのピークを指標としてその測定における測定質量のバックグラウンドの寄与を推定することにした。

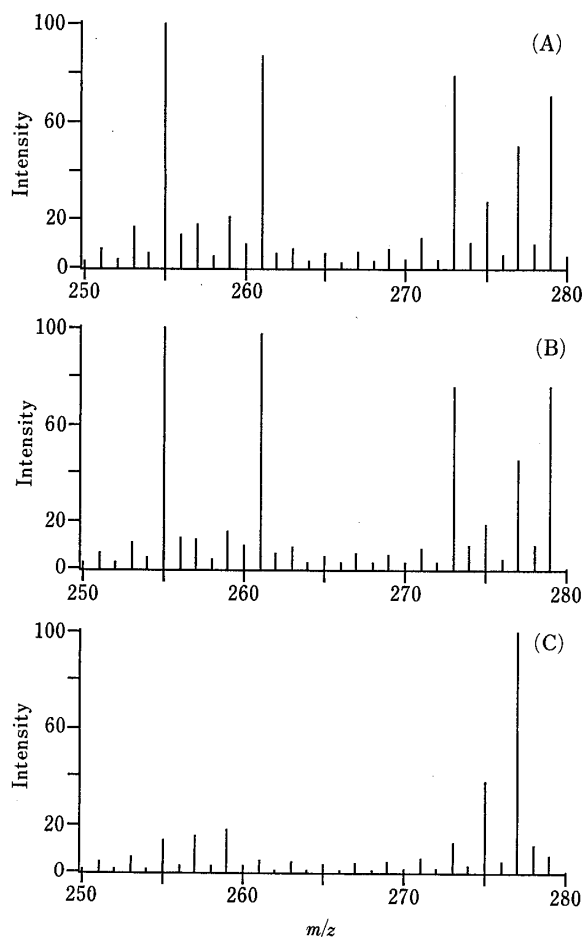


Fig. 2 FAB mass spectra for serum glucose determination

(A) calibration mixture; (B) serum sample spiked with labeled glucose; (C) blank

グリセリンのみのスペクトルより以下の結果を得た。

1. ピーク強度は一般に奇数の質量のものが高い。
2. m/z 255, m/z 257 のピークは m/z 259 の小さなグリセリンピークと相関があると考えられた。すなわちこのピークはグリセリンの消失と共に強度も減少する。又、ピーク強度は 259, 257, 255 の順に減少する。
3. m/z 261 から m/z 265 のバックグラウンドピークはピークの消失によらず、比較的小さく、又、ほぼ一定の強度比であった。

同位体グルコースのピークが m/z 261 であることも考慮し、 m/z 255 のバックグラウンドピークは m/z 257 のピーク強度 I_{257} から求めた。すなわち、 $0.8 \times I_{257}$ を m/z 255 のピーク強度から差し引いたものをグルコースによる m/z 255 のピーク強度とした。又、 m/z 261 については m/z 265 I_{265} の強度にほぼ等しいと考え、 m/z 261 のピーク強度から I_{265} を差し引いたものを同位体グルコースによる m/z 261 のピーク強度とした。すなわち、ピーク強度比 $R_1 = (I_{255} - 0.8 \times I_{257}) / (I_{261} - I_{265})$ として濃度の計算を行った。その結果、ピーク強度比測定の繰り返しの再現性として 1% 程度の測定が可能と

なった。

ピーク強度比を R_1 、重量比を R_M とすると、ピーク強度比 (R_1) と質量比 (R_M) の関係の回帰式は $R_1 = 1.003 \times R_M + 0.0086$ であり、相関係数も 0.999 以上と、直線性も満足すべきものであった。

3・3 血清試料の分析結果

3 種類のヒトプール血清について FABMS で得られた分析結果をそれぞれ Table 1 に示した。同一の血清から試料処理は独立に 4~5 回行い、クロマトグラフ分離したものを、FABMS で測定した。質量分析によるピーク比の測定はそれぞれ 2~4 回繰り返した。全体のばらつきは 1~1.2% であり、ピーク比測定の再現性が全体のばらつきに大きく寄与していると考えられた。

GC/MS での測定のばらつきは 0.5% 程度であり⁷⁾、FABMS での測定結果は GC/MS に比べるとばらつきは多かったが、両法での測定結果は Table 1 に示したように 1% 以内で一致した。

以上オフラインでの HPLC 分離と FABMS を組み合

Table 1 Analytical results for glucose in human serum by IDMS (off-line LC/FABMS) method (mg g^{-1})

	Sample pretreatment replicate				
	1	2	3	4	5
Serum A					
Measurement replicate 1	1.111	1.144	1.107	1.108	1.141
2	1.127	1.132	1.112	1.124	1.118
3	1.140	1.102	1.121	1.130	1.130
4					1.113
Average	1.126	1.126	1.113	1.130	1.125
Average of averages (rsd)			1.122±0.006 (0.49%)		
Difference from GC/MS result			1.132±0.006 (−0.88%)		
Serum B					
Measurement replicate 1	2.108	2.128	2.080	2.166	
2	2.143	2.131	2.101	2.142	
3			2.097		
Average	2.125	2.130	2.093	2.154	
Average of averages (rsd)			2.125±0.025 (1.17%)		
Difference from GC/MS result			2.110±0.009 (+0.71%)		
Serum C					
Measurement replicate 1	3.118	3.100	3.113	3.086	3.090
2	3.142	3.091	3.176	3.138	3.076
3	3.124	3.121	3.195	3.143	3.134
Average	3.128	3.104	3.161	3.122	3.100
Average of averages (rsd)			3.123±0.024 (0.78%)		
Difference from GC/MS result			3.139±0.011 (−0.51%)		

わせる IDMS によるグルコース測定を検討した。一見ランダムに見えるバックグラウンドであるが、詳しくみると再現性もあり、ある程度のバックグラウンド補正は可能と考えられた。誘導体化などが必要ないこうした方法は生体成分に広く応用できる可能性もある。

しかし、こうした補正法には限界もあると考えられ、FABMS が 1 回ごとに測定条件が異なる測定法である以上、同位体希釈法が系統誤差を打ち消せる方法であるとはいえ、高精度が要求される定量に用いるにはまだ検討の余地も多いと考えられる。最近試料を連続的に導入できる FABMS 装置も一般的になりつつある。更に信頼性の高い測定のためには、こうした装置の導入も一つの可能性と思われる。

本測定に当たっては物質工学工業技術研究所丹羽吉夫博

士の協力並びにご助言を頂きました。ここに感謝します。

文 献

- 1) N. W. Tietz: *Clin. Chem.*, **25**, 833 (1979).
- 2) I. Björkhem, R. Blomstrand, O. Falk, G. Öhman: *Clin. Chim. Acta*, **72**, 353 (1976).
- 3) E. White V, M. J. Welch, T. Sun, L. T. Sniegowski, R. Schaffer, H. S. Hertz, A. Cohen: *Biomed. Mass Spectrom.*, **9**, 395 (1982).
- 4) O. Pelletier, S. Cadieux: *Biomed. Mass Spectrom.*, **10**, 130 (1983).
- 5) O. Pelletier, C. Arratoon: *Clin. Chem.*, **33**, 1397 (1987).
- 6) A. Takatsu, S. Nishi: *Anal. Sci.*, **4**, 487 (1988).
- 7) A. Takatsu, S. Nishi: *Anal. Sci.*, **5**, 13 (1989).
- 8) A. Takatsu, S. Nishi: *Biol. Mass Spectrom.*, **20**, 415 (1991).



Stable isotope dilution method for the determination of serum glucose using fast atom bombardment mass spectrometry. Akiko TAKATSU and Sueo NISHI (National Institute of Materials and Chemical Research, 1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki 305)

Isotope dilution mass spectrometry (IDMS) has been considered a reliable analytical method which can be used as a definitive method in clinical chemistry. In the present paper the IDMS method for serum glucose determination using off-line liquid chromatography/fast atom bombardment mass spectrometry (FABMS) has been developed. Uniformly labeled glucose was used as an internal standard and deproteinized serum samples were separated using high performance liquid chromatography (HPLC) under two different conditions and the collected glucose fraction was concentrated. Measurements were performed using standard FABMS with a glycerol matrix. Quantification was performed by measuring the peak intensity ratio of m/z 255 and 261 corresponding to $(M+G+H-H_2O)^+$ ions of unlabeled and labeled glucose in FAB mass spectra. Since a relatively large peak was observed in the blank spectrum, the blank was subtracted and finally about 1% precision was obtained.

(Received October 19, 1992)

Keyword phrases

serum glucose determination; isotope dilution mass spectrometry; fast atom bombardment mass spectrometry.