

親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィー質量分析法の特性理解と機能拡張

池田, 和輝

<https://hdl.handle.net/2324/7182325>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (工学) , 課程博士
バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)



氏 名	池田和輝		
論 文 名	親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィー質量分析法の特性理解と機能拡張		
論文調査委員	主査	九州大学教授	久保田 浩行
	副査	九州大学准教授	宇留野 武人
	副査	かずさ DNA 研究所生体分子解析グループ	
		グループリーダー	池田 和貴

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、極性代謝物の包括的測定が可能な親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィー質量分析法 (unified-hydrophilic interaction/anion exchange liquid chromatography mass spectrometry, unified-HILIC/AEX/MS) における移動相と固定相条件の重要性、並びに検出感度低下の要因を明らかにすること、そして、unified-HILIC/AEX/MS 分析の観測可能な代謝物のさらなる拡張、すなわち包括的な脂質分子の測定であるリピドーム分析と極性メタボローム分析の同時分析法の開発および前処理法の最適化に取り組んだものである。

比較検証のために、単一メタボローム分析の目的で開発された既報の移動相条件と unified-HILIC/AEX/MS で用いた移動相条件を比較した。また、耐アルカリ性ポリマー基材に対して級数の異なるアミノ基を修飾した 2 種のカラム (Gelpack GL-HilicAex, 第 1-4 級アミン修飾ポリグリセロールジメタクリレートゲル, Asahipak NH2P-50 2D, 第 2 級アミン修飾ポリビニルアルコールゲル) を比較し、保持挙動とクロマト分離性能を評価した。その結果、unified-HILIC/AEX/MS の 2 段階分離・保持機構に必要な要素、特に、アセトニトリルから水へのグラジエントと、40 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 (pH 9.8) を用いたアイソクラティック溶出による AEX の移動相条件が、当該クロマト分離機構に必須であることを再確認した。さらに、耐アルカリ性親水性ポリマーをアミンで修飾した場合、少なくとも 1 つの 2 級アミンが存在すれば unified-HILIC/AEX 分離が再現できることも明らかにした。これらの結果から、unified-HILIC/AEX/MS の AEX モードにおいて、HILIC モードと比較して検出感度を向上させるいくつかの改善を考案していた。具体的には、i) HILIC における水和層形成を維持したまま陰イオン交換容量を低減させた固定相の開発と重炭酸アンモニウム水溶液の濃度低減、ii) カラムブリードの低い固定相開発、が挙げられた。

リピドーム分析と極性メタボローム分析の同時分析法の開発および前処理法の最適化では、はじめに、リピドームと極性メタボロームの単一同時分析を実現するため、unified-HILIC/AEX の移動相条件を検討した。その結果、初期移動相のアセトニトリル比率を 95% から 99% に高めることで、脂質の部分的な極性構造と相互作用が効果的に働き、分析前半の HILIC モードにおいてリピドームのクロマト分離・MS 検出を達成した。その後、40 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 (pH 9.8) の割合を高めたグラジエント溶出を行うことで極性メタボロームのクロマト分離・溶出・MS 検出も問題なく実施できることを見出した。続いて、前処理においては、各種抽出溶媒を用いて、抽出効率・再溶解性の詳細な検討を行った。その結果、イソプロパノールと水を 7:3 の割合で混合した抽出溶媒が低極性から高極性まで最も幅広く脂質・極性代謝物の同時抽出・溶解できることを示した。HepG2 細胞に APAP を曝露した試料への応用では、薬物代謝物、脂質・極性代謝物を含む内生代謝物の一

斉検出に成功した。

改良された unified-HILIC/AEX/MS 法は、メタボロミクス分野において達成されていなかった真の意味での単一メタボローム分析を達成している。今後、本知見に基づいて固定相をさらに改良できれば、リピドームと極性メタボローム分析の網羅性と検出感度がさらに向上し、希少な試料や大規模コホート検体を用いた次世代メタボローム解析へ寄与できる。また、本研究内容は、申請者を筆頭著者とする論文として国際学術誌に発表している。

以上、本研究は博士 (工学) の学位を得る資格を有するものと認める。