

【SPL-M100】

【メタボローム/におい/アミノ酸,有機酸,糖類等】

前処理から測定まで全自動分析.精製と誘導体化を併  
せ持つ「固相誘導体化」技術



2022年09月07日  
株式会社アイスティサイエンス  
佐々野僚一

Beyond your Imagination

**AiSTI SCIENCE**

# メタボロミクスの課題と目的

## 従来のメタボローム分析の課題

### ■ 前処理操作について

遠心濃縮・凍結乾燥・誘導体化等  
前処理工程が煩雑で、時間を要し、  
熟練された技術や経験が必須

### ■ 多検体の測定について

多検体の誘導体化をバッチ処理した場合、  
各々の検体において誘導体化後から測定  
までの時間が異なってしまふ。



固相誘導体化法による  
迅速化・自動化

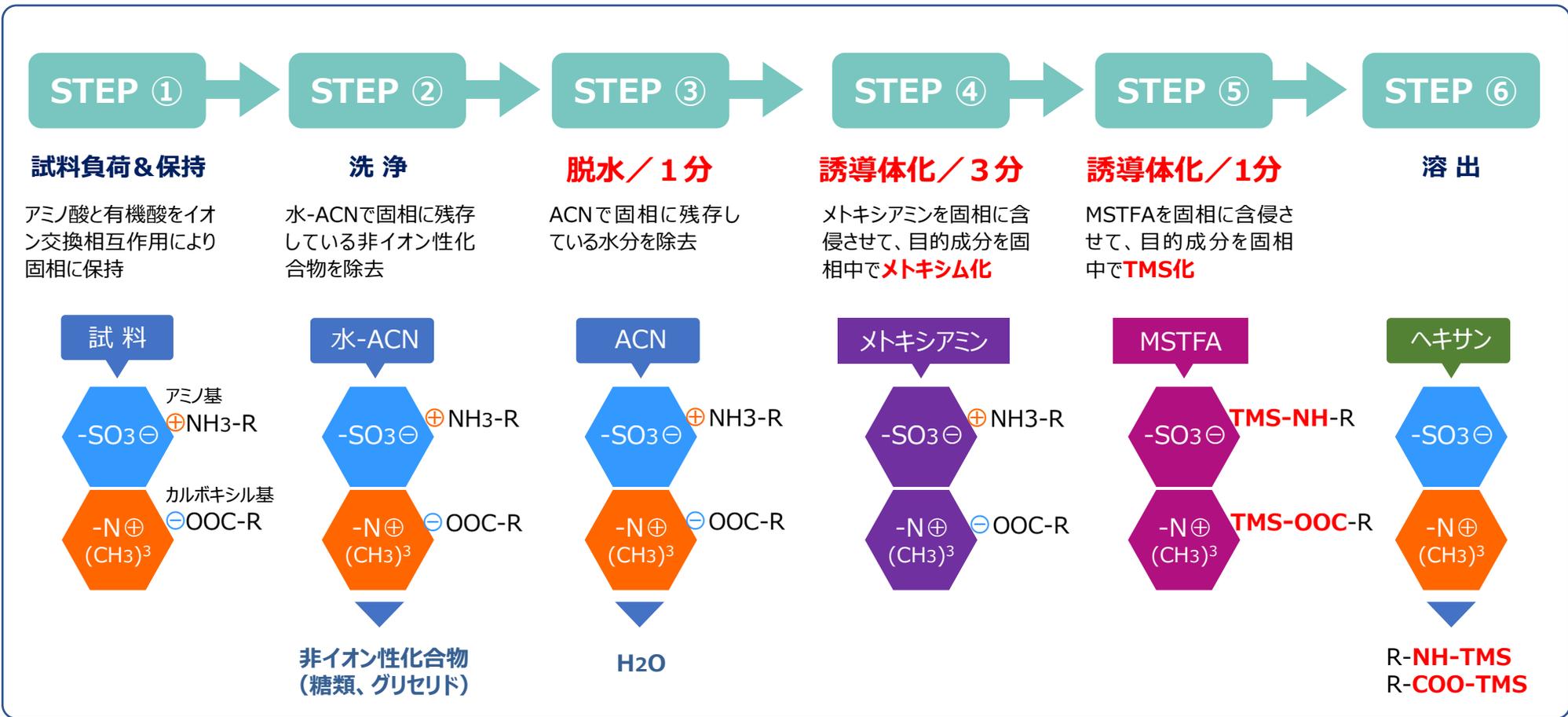


SPE-GCによる誘導体化から測定までの  
オンライン化

## 本研究の目的

**固相誘導体化法を用いたオンラインSPE-GC/MSシステムの開発**

# 固相誘導体化法：アミノ酸/有機酸

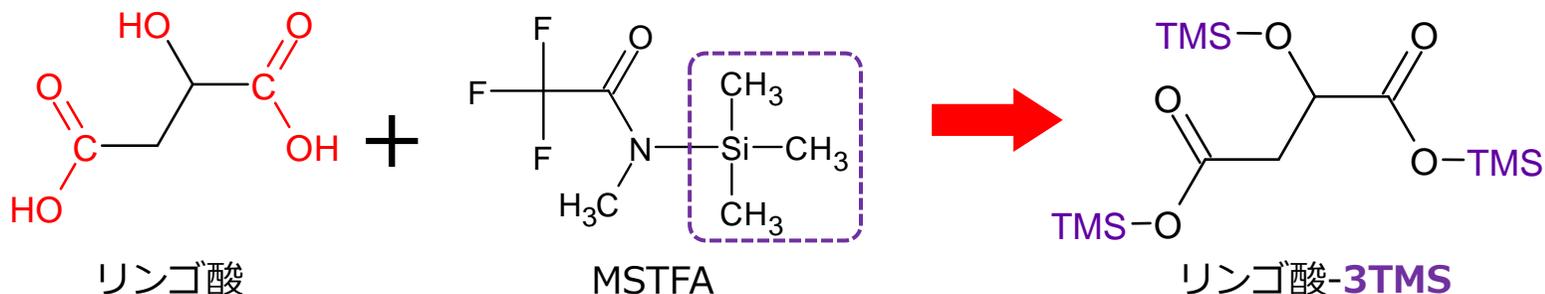
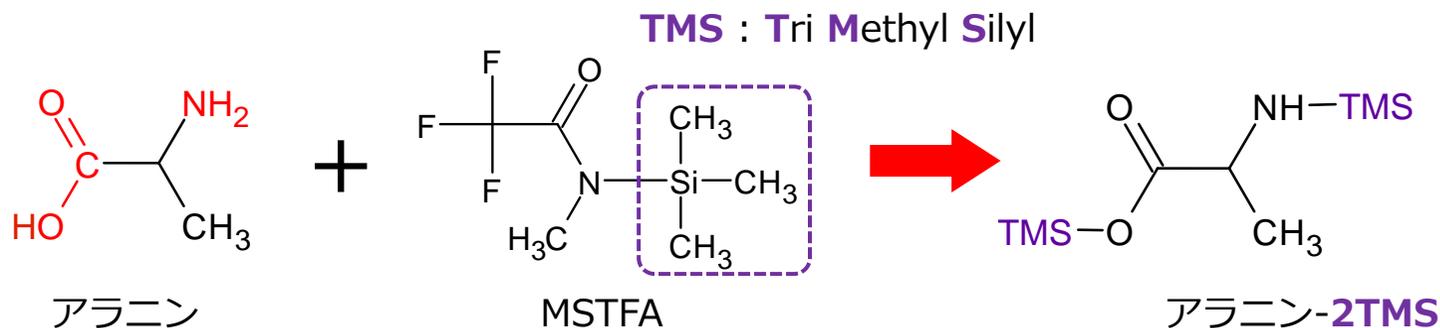


特許登録：(株)アイスティサイエンス

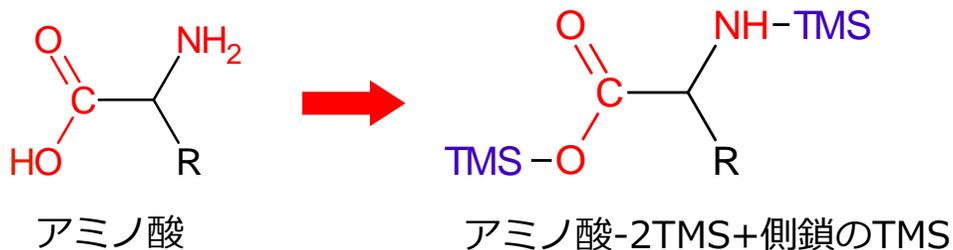
# アミノ酸と有機酸のTMS (Tri Methyl Silyl) 化

**TMS化** : 反応する官能基  $-OH > -Phenol > -COOH > -NH_2$   
 反応するアミンについて :  $R-NH_2 > R-NH-R$

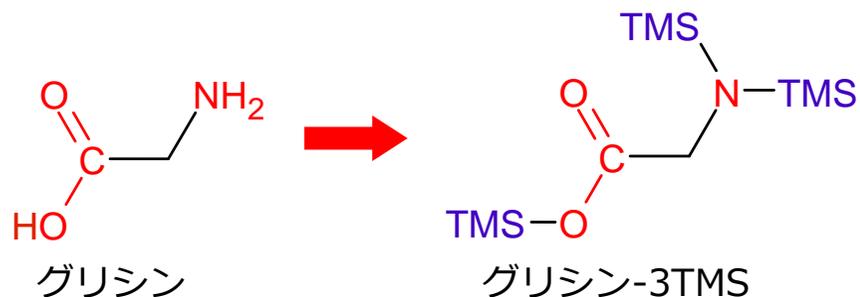
参考文献 :  
 小川茂, ぶんせき, 2006, 7, 332-336



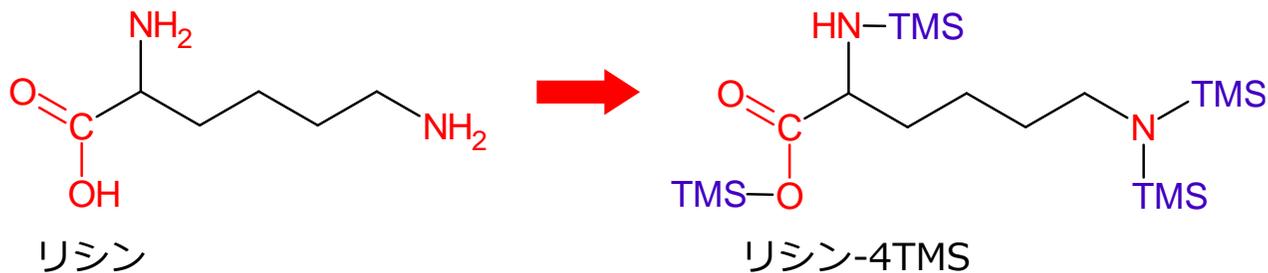
# アミノ酸のTMS化について



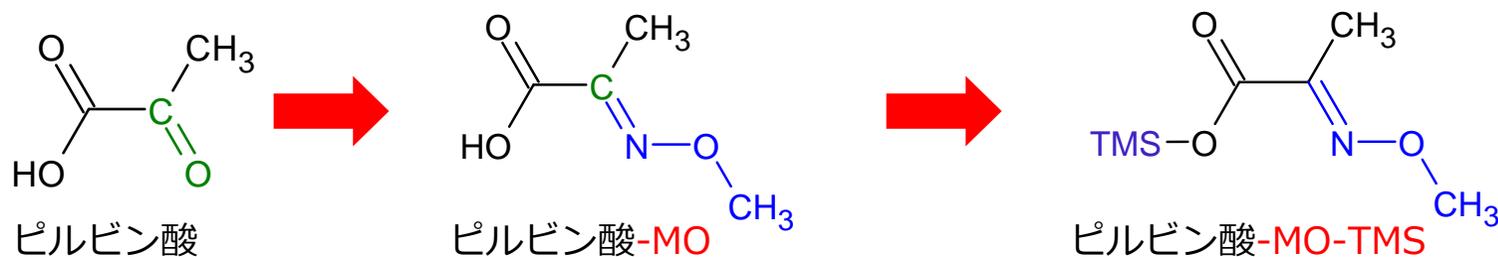
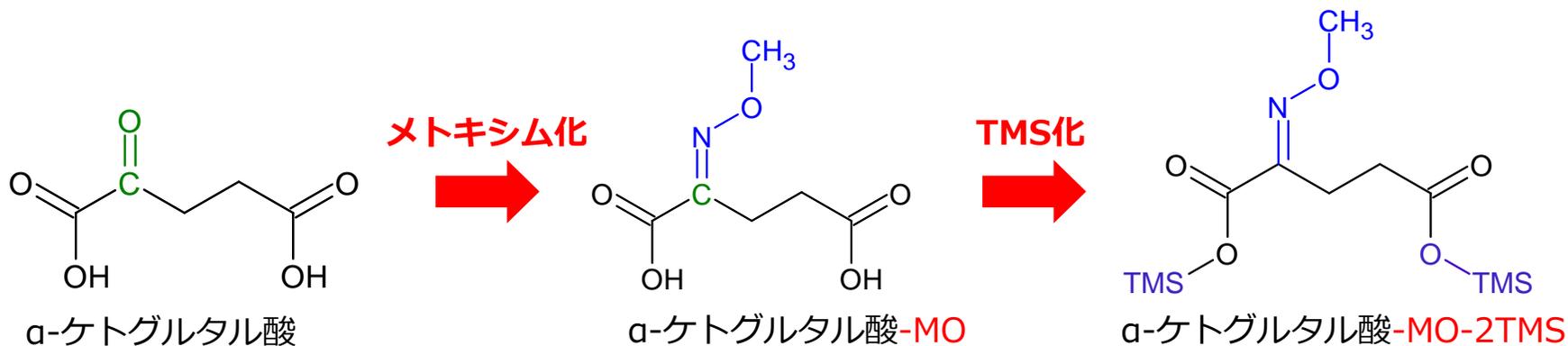
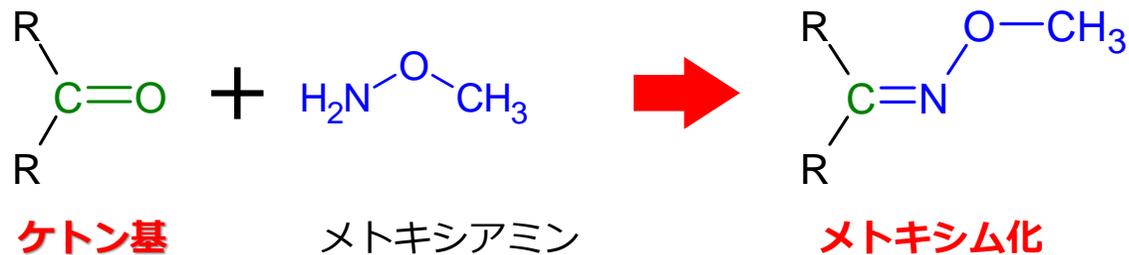
**$\alpha$ 炭素にRが結合している場合**  
 $\alpha$ 炭素に結合しているアミンには  
**1つのTMS**しか結合しない。



**$\alpha$ 炭素にRが結合していない場合**  
 $\alpha$ 炭素に結合しているアミンには  
**2つのTMS**が結合する。



# メトキシシム化について



# 従来法と本法の前処理比較

## ■ 従来法



## ■ 本法

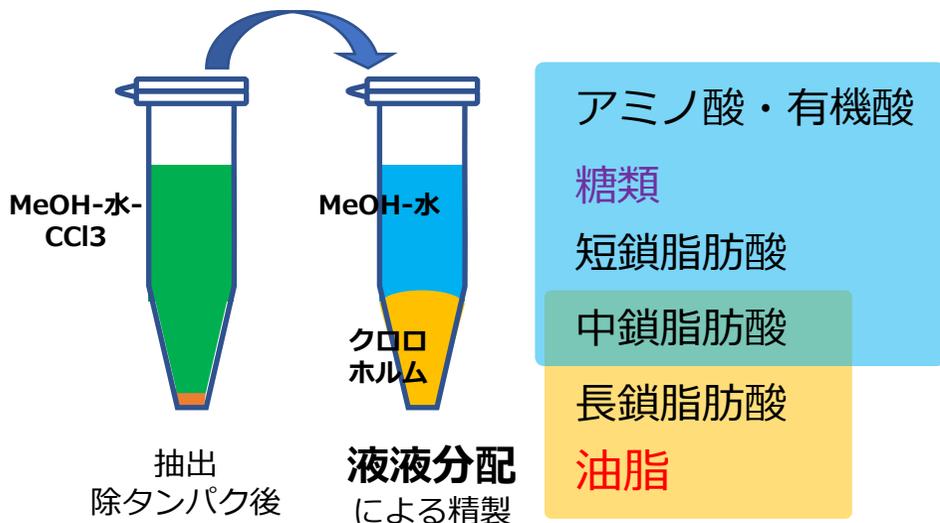


20 時間



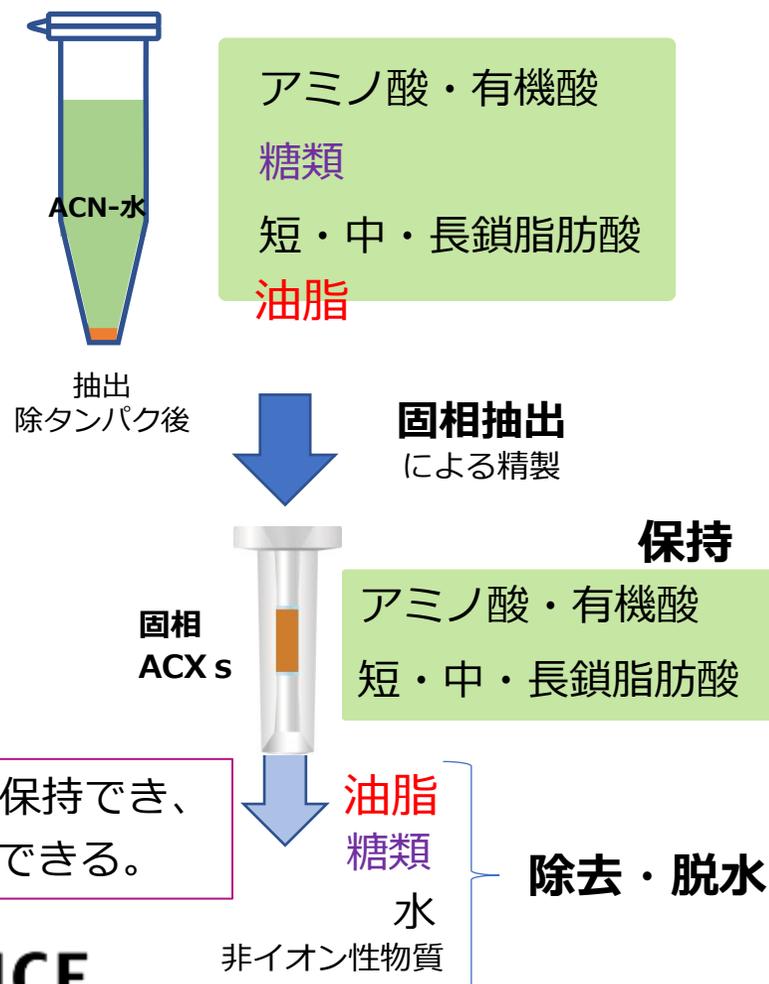
# 抽出と精製について

## メタノール-水-クロロホルム 抽出



- ❑ 中鎖脂肪酸が両方に分配してしまう。
- ❑ MeOH-水には糖類が残る。
- ❑ クロロホルムには油脂が残る。
- ❑ 短鎖脂肪酸は凍結乾固時に気化損失の恐れがある。

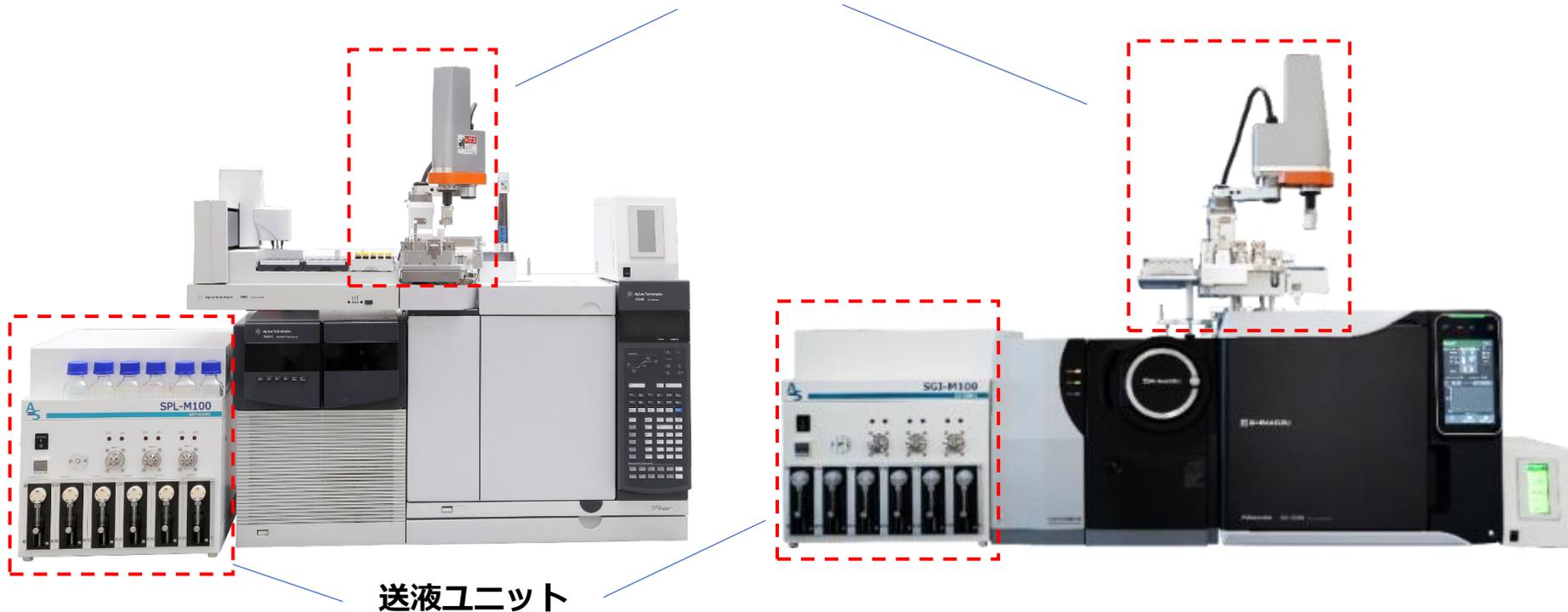
## アセトニトリル-水 抽出 (本法)



本法では目的物質を固相に保持でき、  
油脂や糖類そして水を除去できる。

# オンラインSPE-GC-MSシステム

前処理ユニット



送液ユニット

**SPL-M100とアジレント社製GCMS**

**SPL-M100と島津社製GCMS**

## 測定条件：アミノ酸/有機酸、糖類

---

### **SPE-GC Interface SPL-M100 (AiSTI Science)**

SPE Cartridge Flash-ACX

Sampling Volume 50  $\mu$ L

### **PTV Injector LVI-S250 (AiSTI Science)**

Insert Type Spiral Insert

Injector Temp. **220°C**(0.5min)-50°C/min-290°C(16min)

### **GC**

Inlet Mode **Split 1:50**

Flow Mode Constant Flow, 1 ml/min

Pre-Column 0.25mm i.d. x 1m

Column Vf-5ms, 0.25mm i.d. x 30m, df;0.25 $\mu$ m

Oven Temp. **100°C(2min)**-10°C/min-220°C-30°C/min-310°C(4.7min)

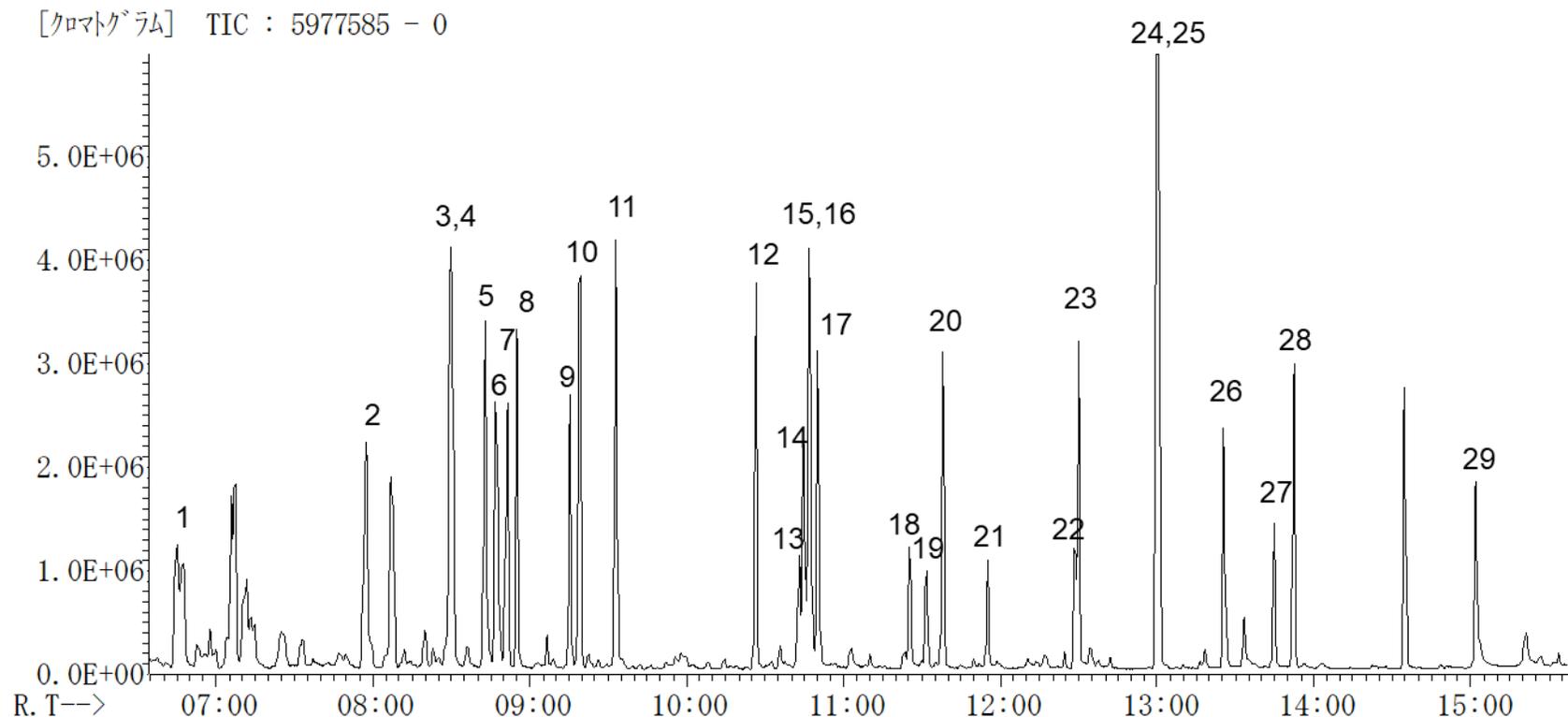
Trans. Line Temp. 290°C

### **MS**

MS Method SCAN, m/z;70-470

---

# 本法による標準溶液のSCANトータルイオンクロマトグラム



- |                    |                       |                        |                            |                        |                   |
|--------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|-------------------|
| 1. Alanine-2TMS    | 6. Proline-2TMS       | 11. Threonine-3TMS     | 16. Cytosine-2TMS          | 21. Asparagine-3TMS    | 26. Adenine-2TMS  |
| 2. Valine-2TMS     | 7. Glycine-3TMS       | 12. Malic acid-3TMS    | 17. Aminobutyric acid-3TMS | 22. Putrescine-4TMS    | 27. Lysine-4TMS   |
| 3. Phosphate-3TMS  | 8. Succinic acid-2TMS | 13. Aspartic acid-3TMS | 18. Ketoglutaric acid-3TMS | 23. Aconitic acid-3TMS | 28. Tyrosine-3TMS |
| 4. Leucine-2TMS    | 9. Fumaric acid-2TMS  | 14. Methionine-2TMS    | 19. Glutamic acid-3TMS     | 24. Citric acid-4TMS   | 29. Guanine-3TMS  |
| 5. Isoleucine-2TMS | 10. Serine-3TMS       | 15. Proline-oxo-2TMS   | 20. Phenylalanine-2TMS     | 25. Ornithine-4TMS     |                   |

Fig. 3. The SCAN total ion chromatogram of standard solution using SPE-GC-MS system with automated SPE-based derivatization method.

\* 標準溶液バイアル中濃度 : 0.01nmol/ $\mu$ L

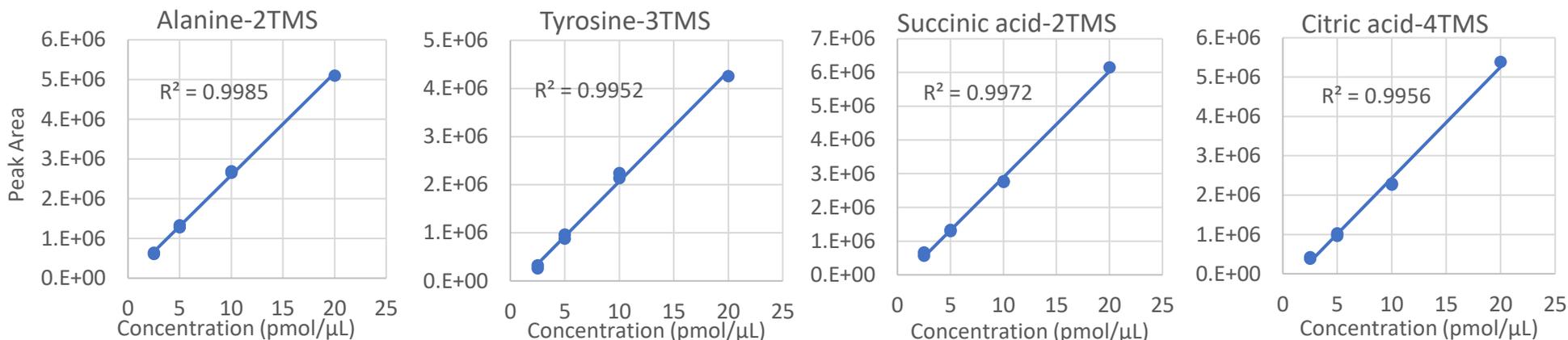
# 本法による標準溶液の再現性

Table Reproducibility of peak area with standard solution using SPE-GC-MS system.

| No. | Compound               | 1         | 2         | 3         | 4         | 5         | 6         | 7         | 8         | 9         | Ave.      | RSD, % |
|-----|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|
| 1   | Alanine-2TMS           | 2,780,202 | 2,814,678 | 2,805,838 | 2,570,446 | 2,663,543 | 2,676,876 | 2,632,581 | 2,692,127 | 2,718,118 | 2,706,045 | 3.0    |
| 2   | Valine-2TMS            | 3,231,804 | 3,290,271 | 3,270,689 | 2,966,049 | 3,107,653 | 3,132,760 | 3,054,963 | 3,085,131 | 3,160,769 | 3,144,454 | 3.4    |
| 3   | Phosphate (3:1)-3TMS   | 1,980,261 | 1,945,488 | 1,842,146 | 1,762,489 | 1,746,163 | 1,658,840 | 1,585,771 | 1,679,471 | 1,991,253 | 1,799,098 | 8.3    |
| 4   | Norleucine-2TMS        | 3,860,754 | 3,995,800 | 3,961,145 | 3,572,341 | 3,750,253 | 3,798,730 | 3,712,869 | 3,729,371 | 3,834,508 | 3,801,752 | 3.4    |
| 5   | Isoleucine-2TMS        | 3,166,213 | 3,281,486 | 3,263,756 | 2,942,720 | 3,112,611 | 3,105,804 | 3,057,182 | 3,062,330 | 3,129,208 | 3,124,590 | 3.4    |
| 6   | Proline-2TMS           | 3,326,569 | 3,445,278 | 3,452,215 | 3,055,493 | 3,264,503 | 3,272,235 | 3,230,054 | 3,247,932 | 3,297,886 | 3,288,018 | 3.6    |
| 7   | Glycine-3TMS           | 2,170,649 | 2,352,541 | 2,219,378 | 2,118,024 | 2,229,077 | 2,288,729 | 2,328,562 | 2,291,359 | 2,432,007 | 2,270,036 | 4.3    |
| 8   | Succinic acid-2TMS     | 3,020,526 | 3,101,538 | 3,047,906 | 2,891,328 | 2,874,284 | 2,677,718 | 2,840,826 | 2,917,558 | 3,180,044 | 2,950,192 | 5.2    |
| 9   | Fumaric acid-2TMS      | 1,768,634 | 1,813,725 | 1,790,816 | 1,626,601 | 1,697,384 | 1,608,388 | 1,635,905 | 1,710,549 | 1,825,272 | 1,719,697 | 4.9    |
| 10  | Serine-3TMS            | 2,012,774 | 2,110,285 | 2,078,505 | 1,857,176 | 1,969,420 | 1,978,512 | 1,918,379 | 1,950,455 | 1,968,792 | 1,982,700 | 3.9    |
| 11  | Threonine-3TMS         | 1,040,407 | 1,085,291 | 1,075,400 | 963,085   | 1,019,290 | 1,028,004 | 988,509   | 997,181   | 1,024,209 | 1,024,597 | 3.8    |
| 12  | Malic acid-3TMS        | 485,209   | 496,725   | 505,695   | 464,603   | 471,484   | 446,942   | 451,563   | 459,884   | 497,251   | 475,484   | 4.5    |
| 13  | Aspartic acid-3TMS     | 527,945   | 521,172   | 605,941   | 439,870   | 548,152   | 689,805   | 622,430   | 590,812   | 358,848   | 544,997   | 18.3   |
| 14  | Methionine-2TMS        | 1,317,135 | 1,376,552 | 1,320,877 | 1,165,099 | 1,233,662 | 1,299,449 | 1,267,142 | 1,274,606 | 1,279,034 | 1,281,506 | 4.6    |
| 15  | Proline-oxo-2TMS       | 1,972,283 | 2,178,513 | 2,188,232 | 2,213,001 | 2,171,464 | 2,218,260 | 2,414,150 | 2,348,929 | 2,386,591 | 2,232,380 | 6.1    |
| 16  | Cytosine-2TMS          | 1,164,055 | 1,199,619 | 1,211,399 | 1,081,564 | 1,154,429 | 1,179,900 | 1,130,354 | 1,140,346 | 1,191,227 | 1,161,433 | 3.5    |
| 17  | Aminobutyric acid-3TMS | 1,903,218 | 2,080,359 | 1,832,270 | 1,718,333 | 1,911,954 | 1,983,878 | 1,952,195 | 1,884,295 | 2,036,145 | 1,922,516 | 5.6    |
| 18  | Ketoglutaric acid-3TMS | 179,954   | 187,293   | 167,292   | 138,034   | 169,160   | 156,600   | 151,045   | 147,256   | 178,112   | 163,861   | 10.1   |
| 19  | Glutamic acid-3TMS     | 486,088   | 482,193   | 528,880   | 375,004   | 494,429   | 585,775   | 510,207   | 483,426   | 320,272   | 474,030   | 16.8   |
| 20  | Phenylalanine-2TMS     | 1,553,897 | 1,642,952 | 1,616,874 | 1,422,103 | 1,528,499 | 1,564,042 | 1,507,985 | 1,508,373 | 1,520,941 | 1,540,630 | 4.2    |
| 21  | Asparagine-3TMS        | 264,587   | 293,568   | 269,785   | 215,342   | 260,091   | 264,791   | 258,735   | 249,746   | 263,337   | 259,998   | 7.9    |
| 22  | Putrescine-4TMS        | 1,097,163 | 1,143,662 | 1,022,892 | 1,069,833 | 1,140,680 | 1,218,672 | 1,113,605 | 1,075,243 | 1,130,409 | 1,112,462 | 5.0    |
| 23  | Aconitic acid-3TMS     | 1,068,411 | 1,095,208 | 1,085,018 | 973,865   | 1,026,875 | 1,009,638 | 1,007,640 | 1,025,144 | 1,085,668 | 1,041,941 | 4.1    |
| 24  | Citric acid-4TMS       | 2,509,279 | 2,585,329 | 2,551,370 | 2,326,885 | 2,437,909 | 2,410,546 | 2,372,287 | 2,395,838 | 2,470,814 | 2,451,140 | 3.5    |
| 25  | Ornithine-4TMS         | 948,801   | 1,074,181 | 928,962   | 889,675   | 963,445   | 1,025,487 | 1,049,537 | 1,005,050 | 1,047,923 | 992,562   | 6.3    |
| 26  | Adenine-2TMS           | 1,791,455 | 1,859,990 | 1,930,628 | 1,670,688 | 1,831,552 | 1,839,583 | 1,690,694 | 1,722,793 | 1,876,276 | 1,801,518 | 5.0    |
| 27  | Lysine-4TMS            | 438,332   | 487,673   | 411,966   | 389,263   | 423,849   | 469,263   | 485,851   | 449,843   | 475,516   | 447,951   | 7.8    |
| 28  | Tyrosine-3TMS          | 2,290,304 | 2,415,910 | 2,339,399 | 2,070,195 | 2,220,032 | 2,300,204 | 2,231,995 | 2,184,577 | 2,239,834 | 2,254,717 | 4.4    |
| 29  | Guanine-3TMS           | 1,276,608 | 1,325,553 | 1,372,469 | 1,201,496 | 1,273,918 | 1,292,009 | 1,214,782 | 1,217,067 | 1,316,201 | 1,276,678 | 4.5    |

\* 標準溶液バイアル中濃度 : 0.01nmol/μL

# 濃度とピーク面積値の関係（直線性）：検量線



バイアル中濃度：アミノ酸, 有機酸：2, 5, 10, 20 pmol/μL (μM)

## ★ 検量線を作成する時の注意点

濃度が高すぎると・・・（頭打ちになる）

混合成分数が多すぎても・・・（頭打ちになる）

アミノ酸の混合標準溶液は0.1N HClが含有している場合が多く、pH調整が必要。

有機酸の濃度が高いと溶液が酸性となって、解離しなくなるので、pH調整が必要。

イオン交換樹脂は保持できるイオン数が決まっております、椅子取りゲームとなります。

# 前処理フロー：農作物中アミノ酸/有機酸の一斉分析

## 【ドライアイス凍結粉碎】

農作物の可食部100~200 g にドライアイスを加えて凍結粉碎した。

## 【抽出】 (50 mLの遠沈チューブ)

**試料採取** 10 g 凍結粉碎した試料

— 添加 水 10 mL

手振とう

— 添加 ACN 20 mL

振とう抽出 10 min

遠心分離 3500 rpm, 3 min

分取 抽出上澄液 500  $\mu$ L

— 添加 ACN 500  $\mu$ L

振とう (37  $^{\circ}$ C, 1 min)

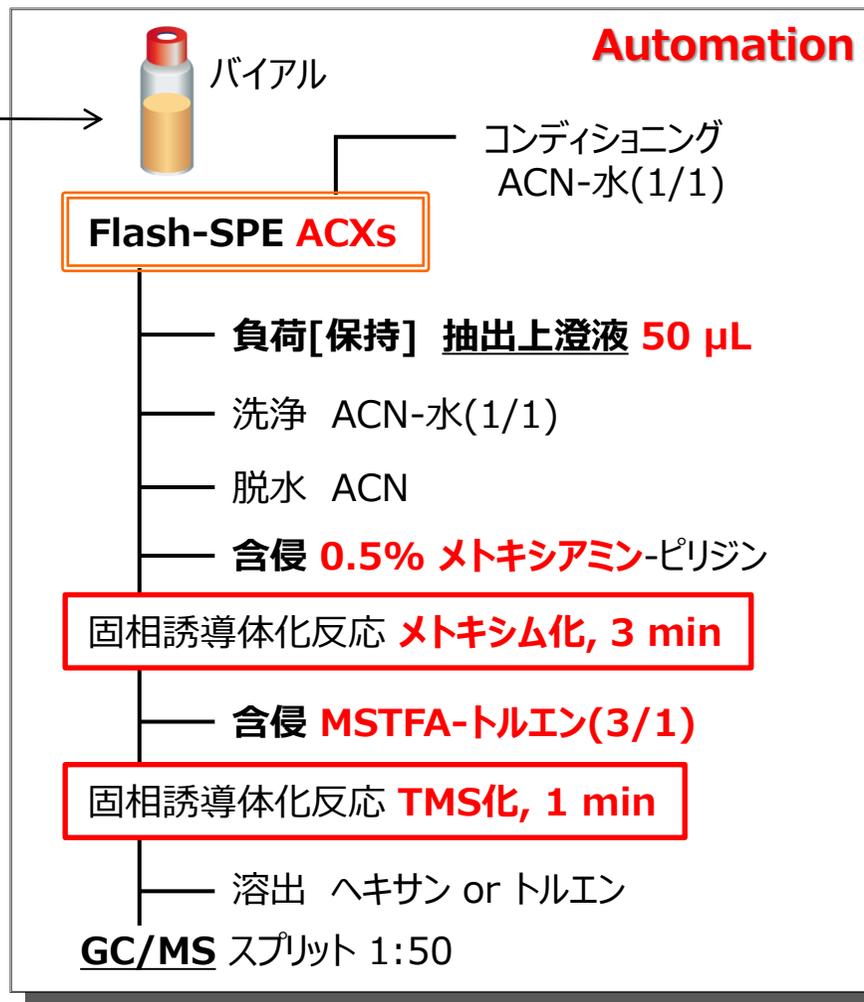
遠心分離 14000 rpm, 3 min

— 添加 0.1N NaOH

**抽出上澄液**



## ■ アミノ酸/有機酸



# 予冷式ドライアイス凍結粉砕

常温粉砕



凍結粉砕



凍結乾燥ではなく、  
水分を含んだまま凍結して  
粉砕する。



食品全体の成分を均一化する。  
水分を含んだ成分濃度の分析。  
大がかりな装置を必要としない。



# 各農作物のSCAN-TIC

## A. ほうれん草

ほうれん草には**シュウ酸**が多く含まれており、体内でカルシウムと結合し腎臓や尿路に結石を引き起こすことがある。

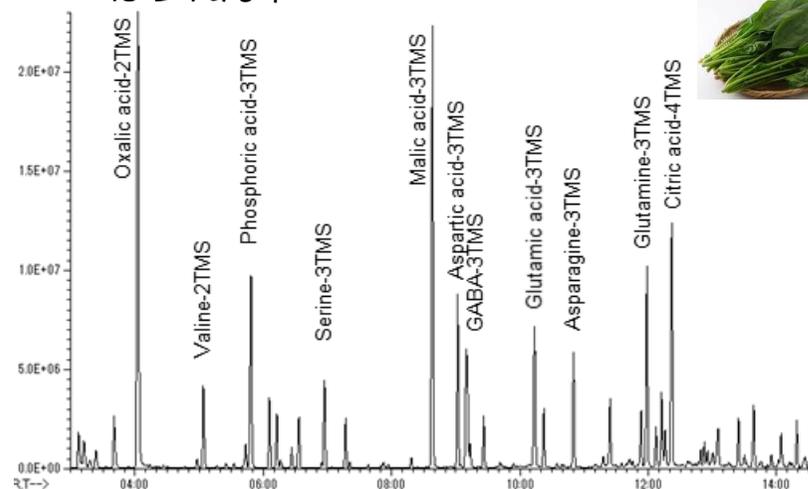
## B. トマト

**グルタミン酸**の濃度が非常に高いためうま味があること、**酸味**・水分があることから、ケチャップ、トマトソース、ピザソースなどに用いられる。

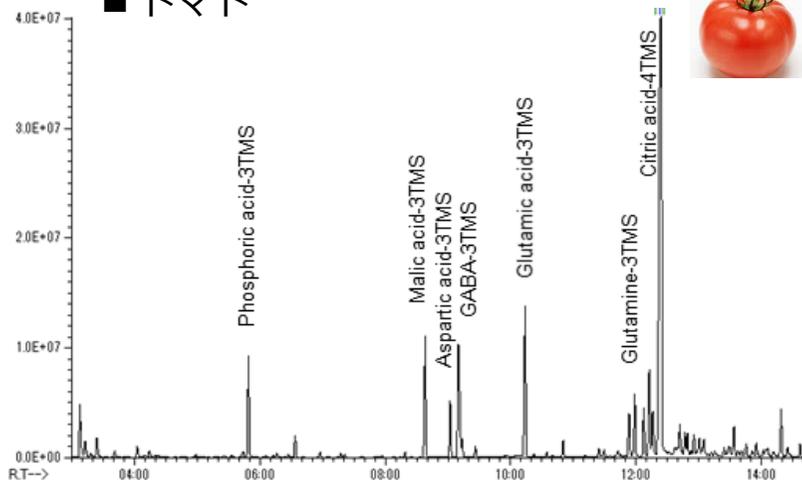
## C. うめ

強い酸味が特徴であり、**クエン酸**をはじめとする**有機酸**などを多く含む。

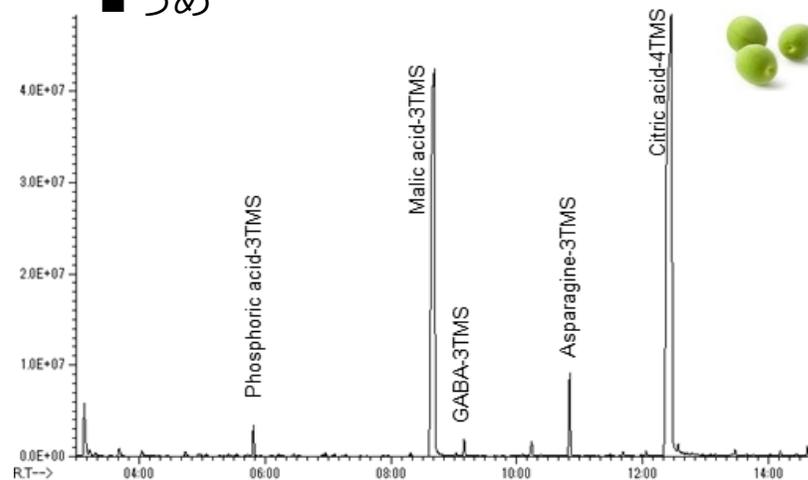
### ■ ほうれん草



### ■ トマト



### ■ うめ

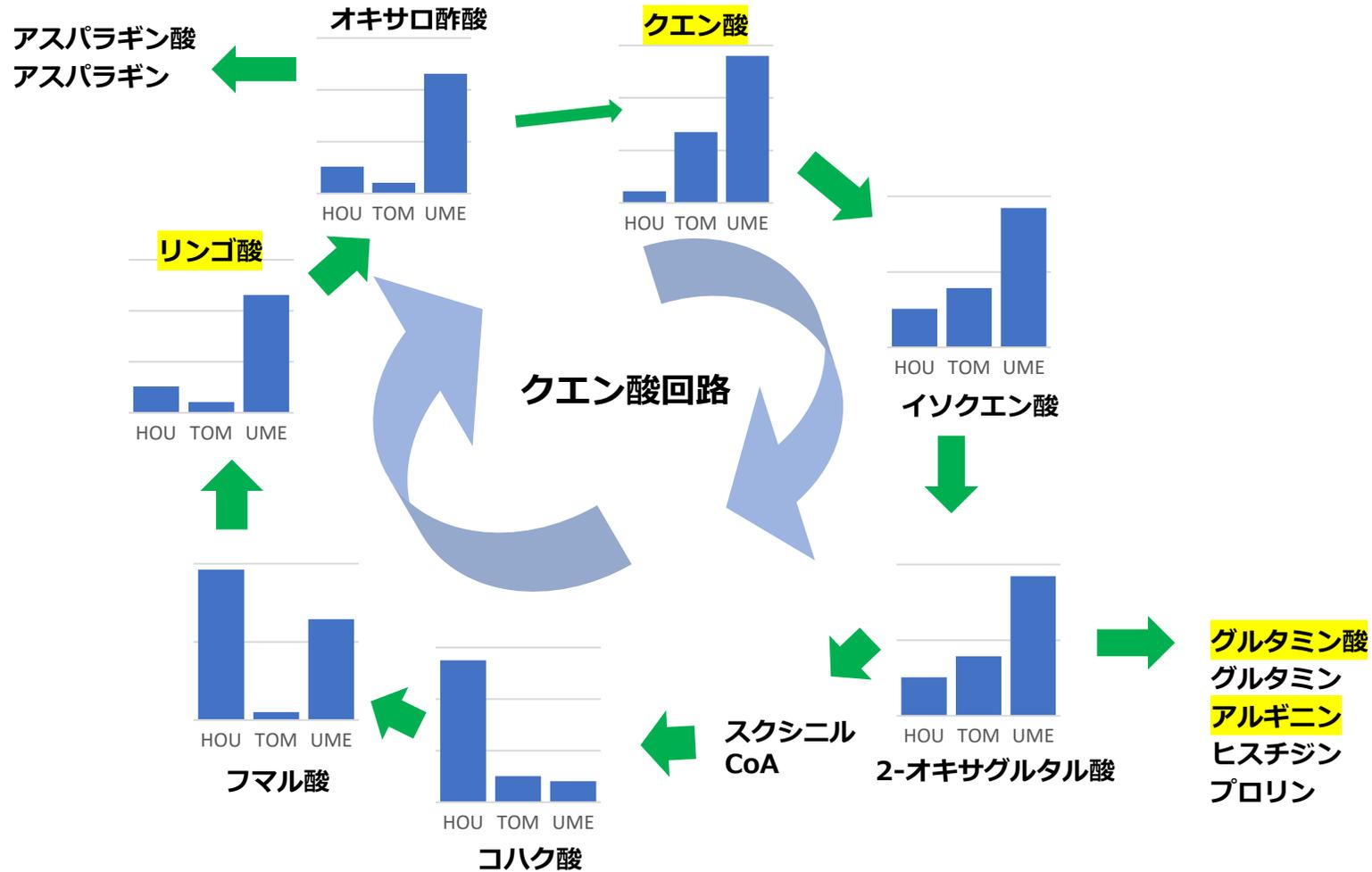


# 各農作物の成分量比較



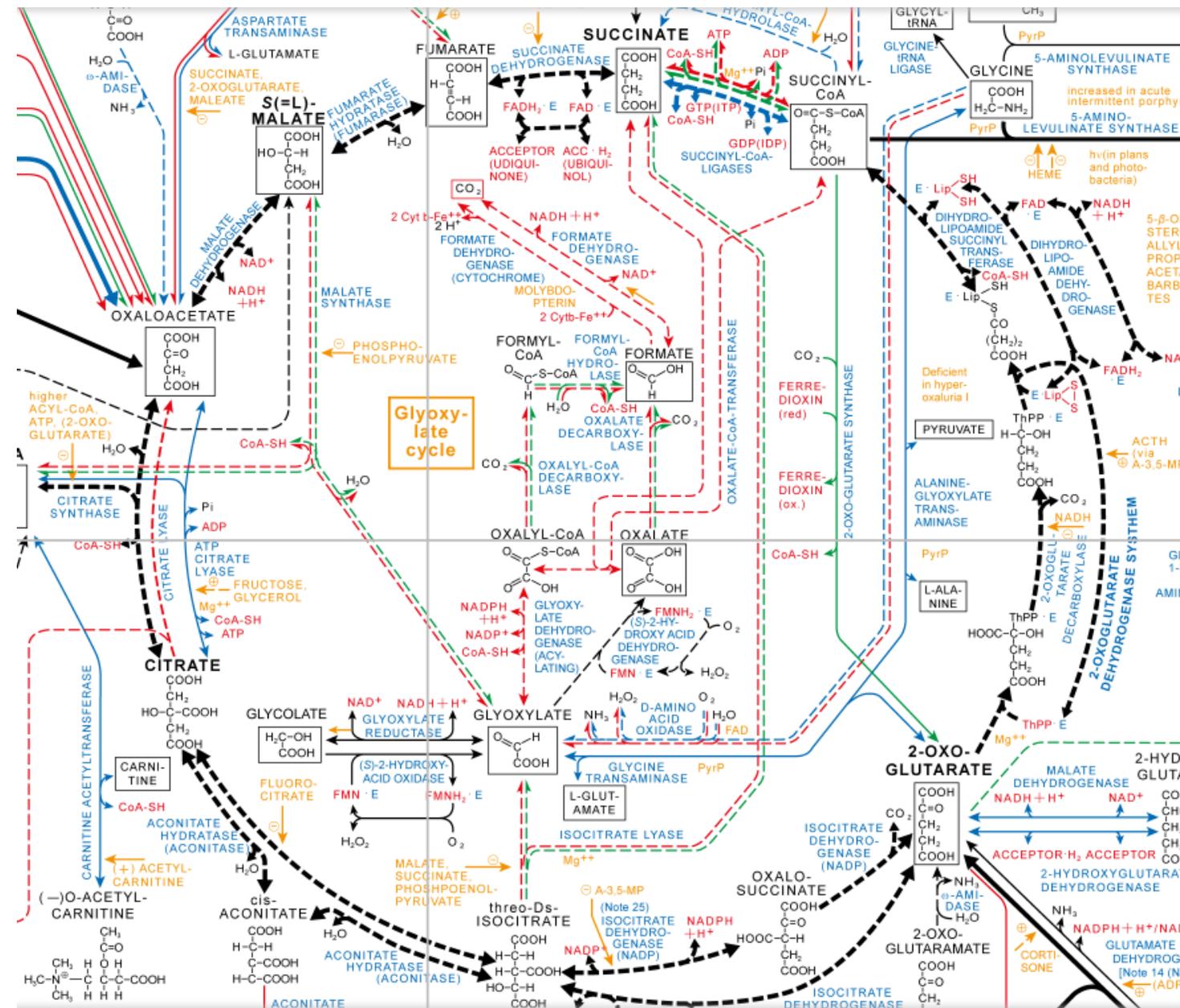
HOU : ほうれん草  
 TOM : トマト  
 UME : うめ

# 代謝マップ



# 追加資料

## Rocheの代謝マップ



# 抽出：血清/血漿

試料採取 50  $\mu$ L

添加 水 150  $\mu$ L

振とう

添加 アセトニトリル 800  $\mu$ L

振とう (37  $^{\circ}$ C, 30 min)

遠心分離 14000 rpm, 3 min

抽出液



【 アミノ酸/有機酸 短・中・長鎖脂肪酸 】

分取 抽出上澄液 500  $\mu$ L

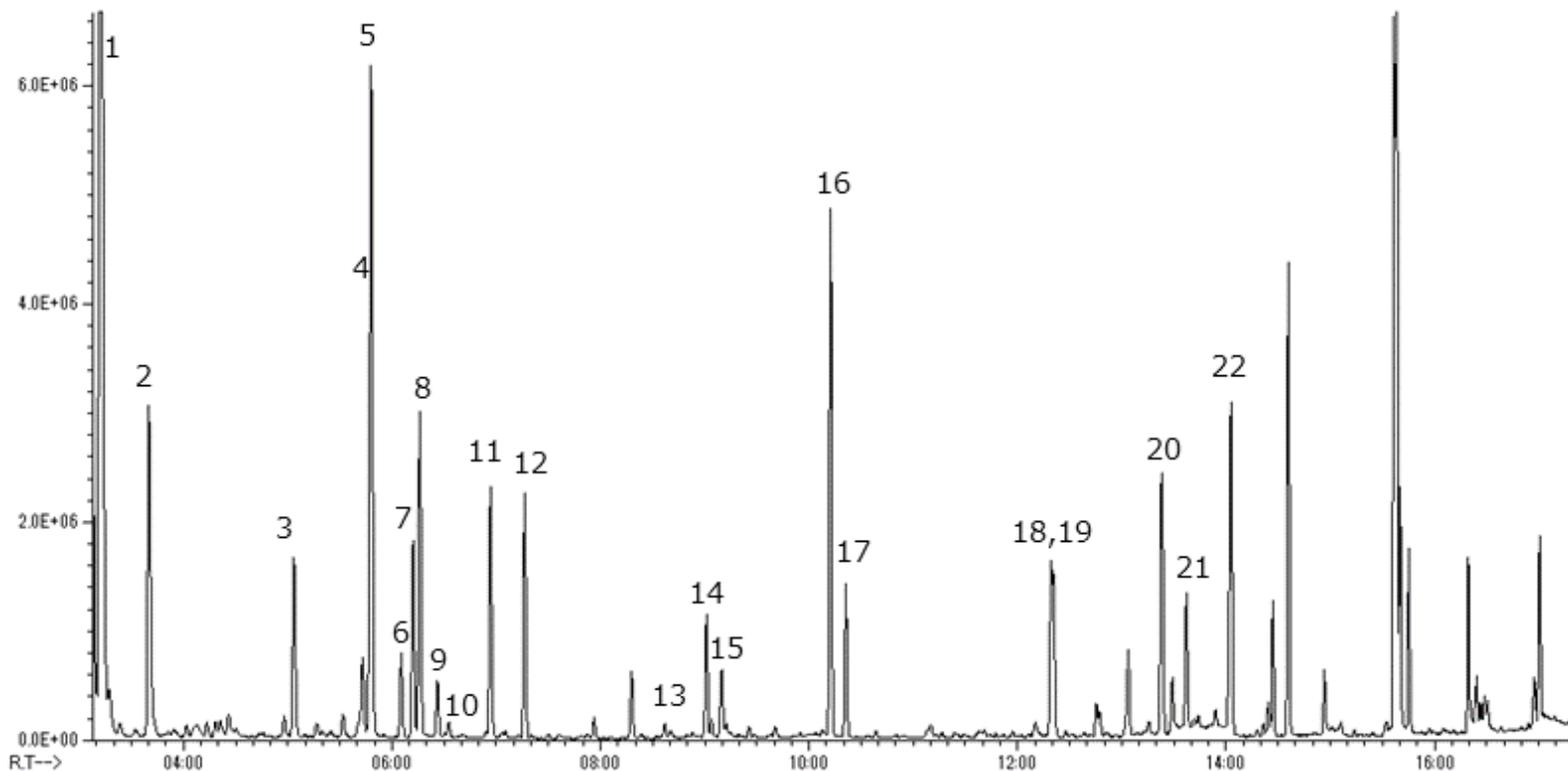
添加 水 500  $\mu$ L

添加 0.1M NaOH  
約pH8に調整

検液



# マウス血清のSCAN-TIC



- |                        |                      |                          |                      |                      |
|------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|
| ① Lactic acid-2TMS     | ⑥ Isoleucine-2TMS    | ⑪ Serine-3TMS            | ⑯ Glutamic acid-3TMS | ⑳ Tyrosine-3TMS      |
| ② Alanine-2TMS         | ⑦ Proline-2TMS       | ⑫ Threonine-3TMS         | ⑰ Phenylalanine-2TMS | ㉑ Gluconic acid-6TMS |
| ③ Valine-2TMS          | ⑧ Glycine-3TMS       | ⑬ Malic acid-3TMS        | ⑱ Ornithine-4TMS     |                      |
| ④ Leucine-2TMS         | ⑨ Succinic acid-2TMS | ⑭ Aspartic acid-3TMS     | ⑲ Citric acid-4TMS   |                      |
| ⑤ Phosphoric acid-3TMS | ⑩ Glyceric acid-3TMS | ⑮ Pyroglutamic acid-2TMS | ㉒ Lysine-4TMS        |                      |

# 血清の添加回収試験

| No. | 成分名                   | Standard  | 操作Blank   | マウス血清      | マウス血清+ST   | 回収率,%        |
|-----|-----------------------|-----------|-----------|------------|------------|--------------|
|     |                       | ST        | B         | M          | A          | (A-M)/(ST-B) |
| 1   | Lactic acid-2TMS      | 2,641,331 | 2,044,267 | 14,805,790 | 11,895,241 | -            |
| 2   | Alanine-2TMS          | 2,526,424 | 84,451    | 4,971,432  | 6,847,093  | 77           |
| 6   | Valine-2TMS           | 3,223,917 | 8,177     | 2,224,994  | 5,182,605  | 92           |
| 9   | Leucine-2TMS          | 3,806,169 | 9,760     | 3,940,497  | 7,217,079  | 86           |
| 10  | Isoleucine-2TMS       | 3,483,014 | 5,009     | 958,681    | 4,444,077  | 100          |
| 11  | Proline-2TMS          | 3,349,273 | 6,613     | 3,008,108  | 5,928,827  | 87           |
| 12  | Glycine-3TMS          | 2,822,020 | 38,903    | 3,192,716  | 5,175,424  | 71           |
| 14  | Succinic acid-2TMS    | 5,442,569 | 51,260    | 607,407    | 6,159,930  | 103          |
| 15  | Fumaric acid-2TMS     | 1,886,256 | 3,365     | 11,533     | 1,967,128  | 104          |
| 16  | Serine-3TMS           | 1,763,290 | 19,550    | 1,451,277  | 3,032,036  | 91           |
| 17  | Threonine-3TMS        | 584,437   | 2,454     | 484,176    | 957,064    | 81           |
| 18  | Malic acid-3TMS       | 610,728   | 1,773     | 18,302     | 629,151    | 100          |
| 20  | Aspartic acid-3TMS    | 2,929,674 | 5,116     | 784,543    | 3,822,406  | 104          |
| 21  | Methionine-2TMS       | 321,403   | 1,578     | 77,627     | 321,294    | 76           |
| 22  | 4-Hydroxyproline-3TMS | 2,400,683 | 122       | 54,733     | 1,997,473  | 81           |
| 23  | GABA-3TMS             | 808,381   | 5,804     | 9,875      | 776,441    | 96           |
| 25  | Threonic acid-4TMS    | 331,448   | 417       | 27,125     | 202,330    | 53           |
| 27  | Glutamic acid-3TMS    | 2,350,172 | 2,555     | 3,437,586  | 6,150,075  | 116          |
| 28  | Phenylalanine-2TMS    | 1,457,813 | 1,404     | 690,541    | 2,098,341  | 97           |
| 31  | Putrescine-4TMS       | 4,356,542 | 1,610     | 9,512      | 4,597,459  | 105          |
| 33  | Citric acid-4TMS      | 911,581   | 660       | 216,437    | 1,160,422  | 104          |
| 36  | Lysine-4TMS           | 1,587,702 | 1,259     | 940,190    | 2,675,748  | 109          |
| 37  | Histidine-3TMS        | 2,194,472 |           | 10,446     | 3,240,581  | 147          |
| 38  | Tyrosine-3TMS         | 4,650,501 | 1,959     | 1,175,034  | 5,939,201  | 102          |
| 41  | Tryptophan-3TMS       | 230,794   | 0         | 29,096     | 398,017    | 160          |
| 43  | Cystine-4TMS          | 2,142,088 | 0         | 14,728     | 2,196,172  | 102          |

# 本システムによるマウス血清の再現性

| No. | 成分名                   | U1         | U2         | U3         | U4         | U5         | Ave.       | RSD,% |
|-----|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------|
| 1   | Lactic acid-2TMS      | 14,649,682 | 15,089,600 | 13,841,394 | 15,639,698 | 14,808,578 | 14,805,790 | 4.4   |
| 2   | Alanine-2TMS          | 5,118,252  | 4,719,988  | 4,790,287  | 5,126,762  | 5,101,869  | 4,971,432  | 4.0   |
| 6   | Valine-2TMS           | 2,261,504  | 2,125,119  | 2,152,889  | 2,285,552  | 2,299,904  | 2,224,994  | 3.6   |
| 9   | Leucine-2TMS          | 4,005,604  | 3,817,067  | 3,780,734  | 4,039,212  | 4,059,866  | 3,940,497  | 3.3   |
| 10  | Isoleucine-2TMS       | 971,384    | 928,534    | 931,475    | 980,243    | 981,767    | 958,681    | 2.8   |
| 11  | Proline-2TMS          | 3,078,401  | 2,818,958  | 2,910,867  | 3,100,657  | 3,131,659  | 3,008,108  | 4.5   |
| 12  | Glycine-3TMS          | 3,243,322  | 2,973,200  | 3,083,005  | 3,312,366  | 3,351,687  | 3,192,716  | 5.0   |
| 14  | Succinic acid-2TMS    | 609,722    | 610,940    | 585,493    | 627,168    | 603,713    | 607,407    | 2.5   |
| 15  | Fumaric acid-2TMS     | 11,626     | 11,149     | 10,691     | 11,947     | 12,254     | 11,533     | 5.4   |
| 16  | Serine-3TMS           | 1,466,003  | 1,327,848  | 1,366,049  | 1,533,536  | 1,562,951  | 1,451,277  | 7.1   |
| 17  | Threonine-3TMS        | 497,778    | 441,900    | 461,299    | 506,740    | 513,163    | 484,176    | 6.4   |
| 18  | Malic acid-3TMS       | 19,076     | 18,062     | 17,173     | 18,728     | 18,470     | 18,302     | 4.0   |
| 20  | Aspartic acid-3TMS    | 745,837    | 821,214    | 711,854    | 825,260    | 818,549    | 784,543    | 6.7   |
| 21  | Methionine-2TMS       | 71,255     | 66,983     | 76,059     | 92,889     | 80,950     | 77,627     | 12.9  |
| 22  | 4-Hydroxyproline-3TMS | 54,583     | 47,943     | 51,238     | 58,569     | 61,333     | 54,733     | 9.9   |
| 23  | GABA-3TMS             | 10,265     | 8,742      | 9,675      | 10,265     | 10,430     | 9,875      | 7.0   |
| 25  | Threonic acid-4TMS    | 28,177     | 28,501     | 22,545     | 29,638     | 26,765     | 27,125     | 10.2  |
| 27  | Glutamic acid-3TMS    | 3,365,311  | 3,486,693  | 3,156,198  | 3,603,886  | 3,575,843  | 3,437,586  | 5.3   |
| 28  | Phenylalanine-2TMS    | 682,545    | 669,938    | 666,324    | 718,207    | 715,692    | 690,541    | 3.6   |
| 31  | Putrescine-4TMS       | 9,970      | 9,716      | 9,256      | 8,922      | 9,694      | 9,512      | 4.4   |
| 33  | Citric acid-4TMS      | 212,800    | 218,960    | 209,116    | 224,337    | 216,971    | 216,437    | 2.7   |
| 36  | Lysine-4TMS           | 926,298    | 906,996    | 922,350    | 974,013    | 971,295    | 940,190    | 3.2   |
| 37  | Histidine-3TMS        | 10,802     | 9,595      | 9,636      | 10,237     | 11,959     | 10,446     | 9.4   |
| 38  | Tyrosine-3TMS         | 1,192,371  | 1,093,010  | 1,123,091  | 1,241,557  | 1,225,141  | 1,175,034  | 5.5   |
| 41  | Tryptophan-3TMS       | 29,187     | 29,591     | 28,393     | 29,027     | 29,282     | 29,096     | 1.5   |
| 43  | Cystine-4TMS          | 15,113     | 14,209     | 13,349     | 15,634     | 15,333     | 14,728     | 6.4   |

ピーク面積値（絶対値）  
の結果です。

内標による補正はしていません。

# オンライン固相誘導体化法：尿

## 【抽出】

試料採取 尿 10  $\mu\text{L}$

添加 水 190 $\mu\text{L}$

添加 アセトニトリル 800 $\mu\text{L}$

振とう (1 min)



遠心分離 14000 rpm, 2 min

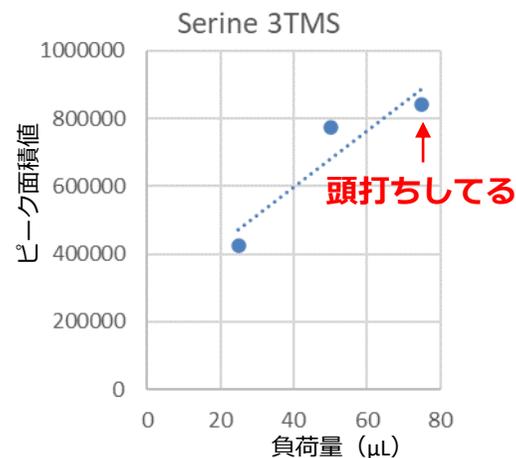
添加 0.1N NaOH

抽出上澄液

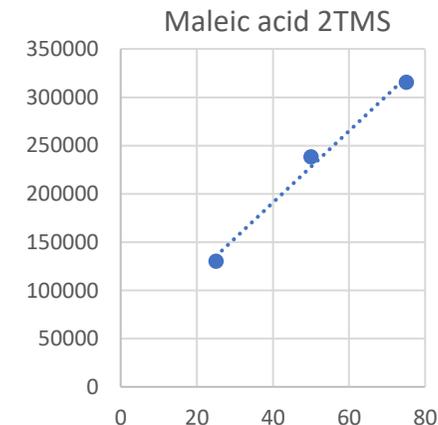
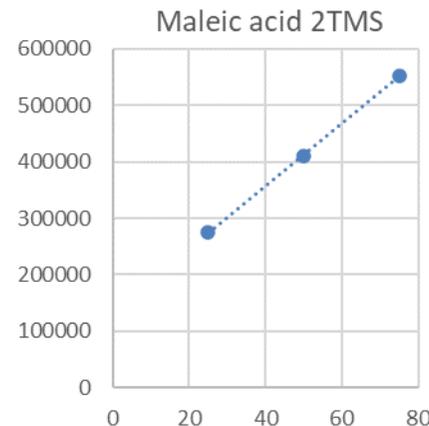
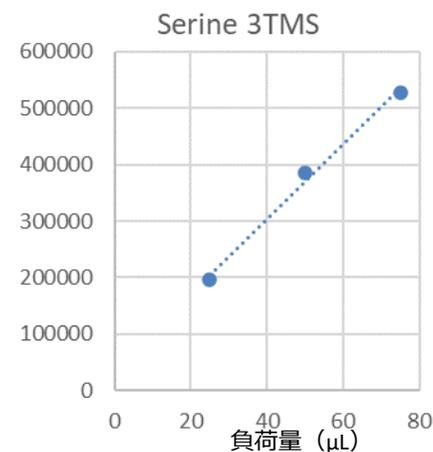


■ 負荷量試験：固相への負荷量を25, 50, 75 $\mu\text{L}$ でのピーク面積値

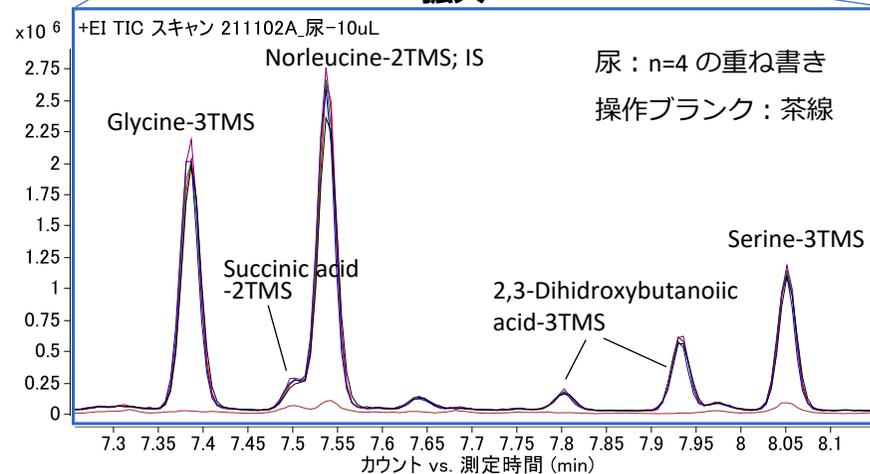
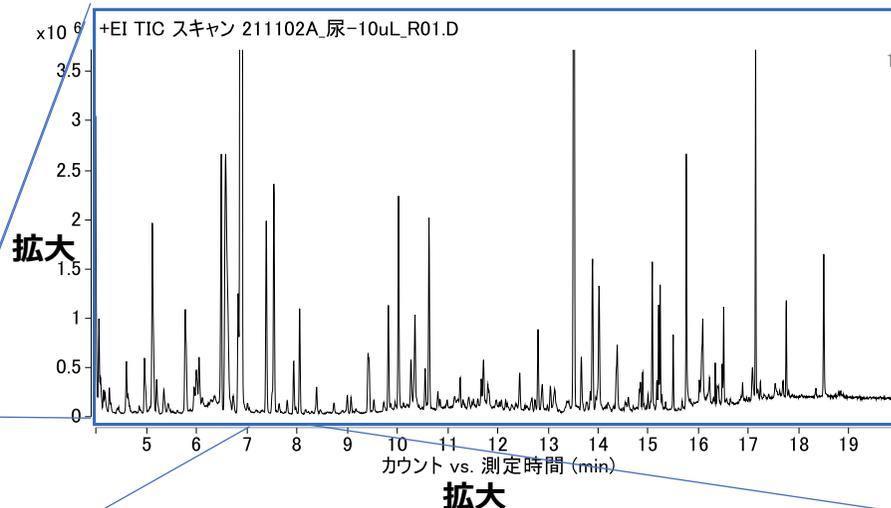
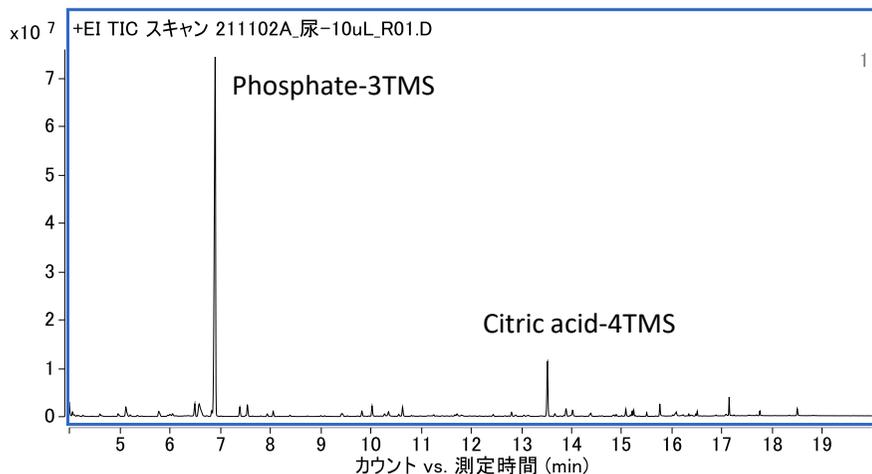
50 $\mu\text{L}$ 採取×2倍希釈



10 $\mu\text{L}$ 採取×希釈無し



# 尿のSCAN-TIC



尿から高濃度のリン酸とクエン酸、そしてアミノ酸・有機酸を含めた多くの成分が検出された。

尿 n=4 の重ね書きのピークの再現性もよく、良好なクロマトグラムを得られた。

# 尿のアミノ酸・有機酸メソッドによる再現性

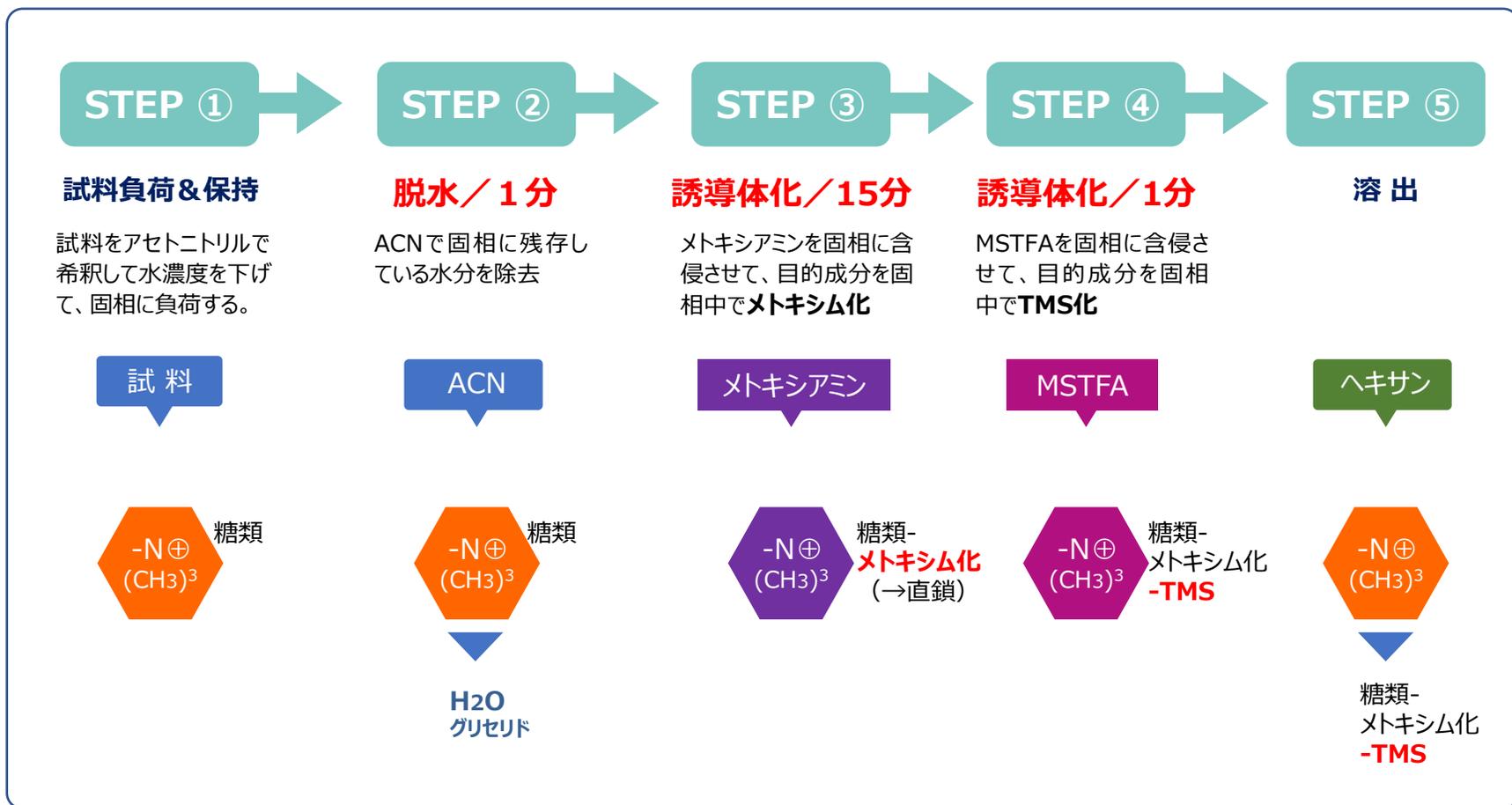
| 化合物名                | 1         | 2         | 3         | 4         | Ave.      | RSD, % |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|
| Alanine-2TMS        | 454,237   | 451,129   | 467,421   | 477,468   | 462,564   | 2.6    |
| Valine-2TMS         | 63,877    | 59,890    | 62,083    | 64,867    | 62,679    | 3.5    |
| Leucine-2TMS        | 45,276    | 41,099    | 40,934    | 43,398    | 42,676    | 4.8    |
| Isoleucine 2TMS     | 20,450    | 19,162    | 17,851    | 18,615    | 19,020    | 5.8    |
| Proline 2TMS        | 26,797    | 22,814    | 24,906    | 20,508    | 23,756    | 11.4   |
| Glycine 3TMS        | 1,111,414 | 1,098,354 | 1,120,950 | 1,174,577 | 1,126,324 | 3.0    |
| Serine 3TMS         | 405,652   | 415,183   | 389,251   | 412,685   | 405,693   | 2.9    |
| Threonine 3TMS      | 67,052    | 69,451    | 66,368    | 69,104    | 67,994    | 2.2    |
| Glutamic acid 3TMS  | 16,219    | 14,083    | 12,825    | 13,434    | 14,140    | 10.5   |
| Phenylalanine 2TMS  | 37,860    | 36,978    | 34,966    | 36,532    | 36,584    | 3.3    |
| Norleucine 2TMS-IS  | 1,898,393 | 1,876,725 | 1,870,739 | 1,984,343 | 1,907,550 | 2.8    |
| Oxalic acid 2TMS    | 457,287   | 449,275   | 451,207   | 494,352   | 463,030   | 4.6    |
| Maleic acid 2TMS    | 243,527   | 245,430   | 242,421   | 256,388   | 246,941   | 2.6    |
| Succinic acid 2TMS  | 102,348   | 104,567   | 110,125   | 118,507   | 108,887   | 6.6    |
| Citric acid 4TMS    | 2,952,604 | 2,887,417 | 2,989,869 | 3,091,864 | 2,980,438 | 2.9    |
| Adipic acid 2TMS-IS | 319,500   | 307,471   | 314,777   | 324,318   | 316,516   | 2.3    |

**ピーク面積値（絶対値）**

の結果です。

内標による補正はしていません。

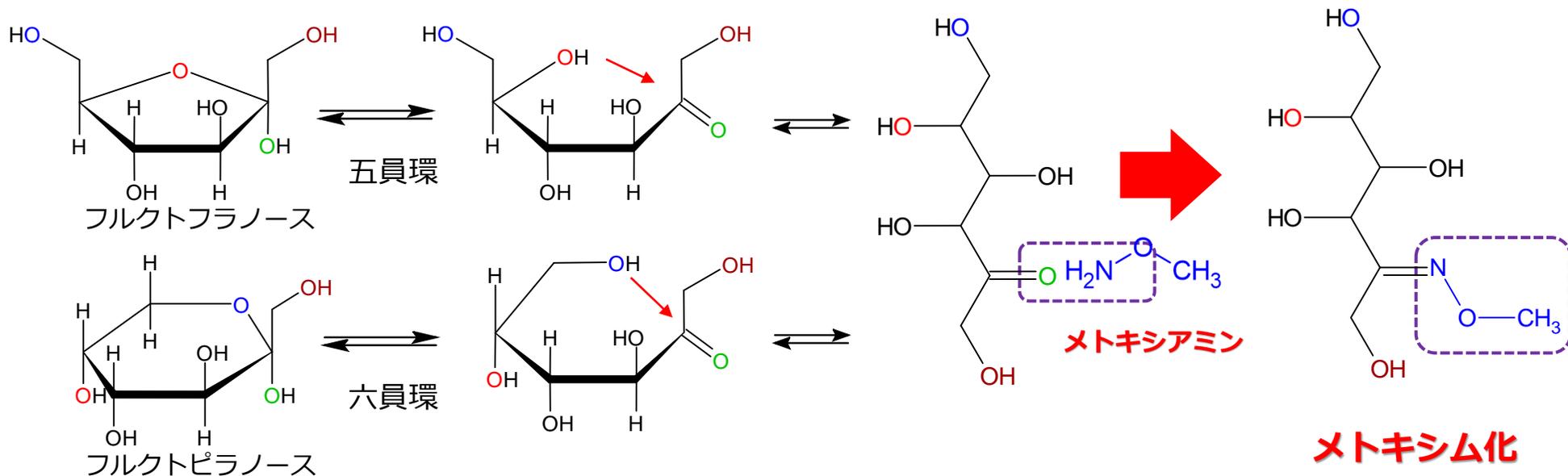
# 固相誘導体化法：糖類



特許登録：(株)アイスティサイエンス

# 糖類の異性体とメトキシシム化

## ■フルクトースの場合



環状構造

直鎖構造（開環構造）

糖類は多くの異性体を持つため、そのままTMS化するとピークがいくつも出現してしまう。



メトキシシム化することで環状構造になることを防ぎ、直鎖構造に絞り込むことができる。

# メトキシアミンによる誘導体化反応時間

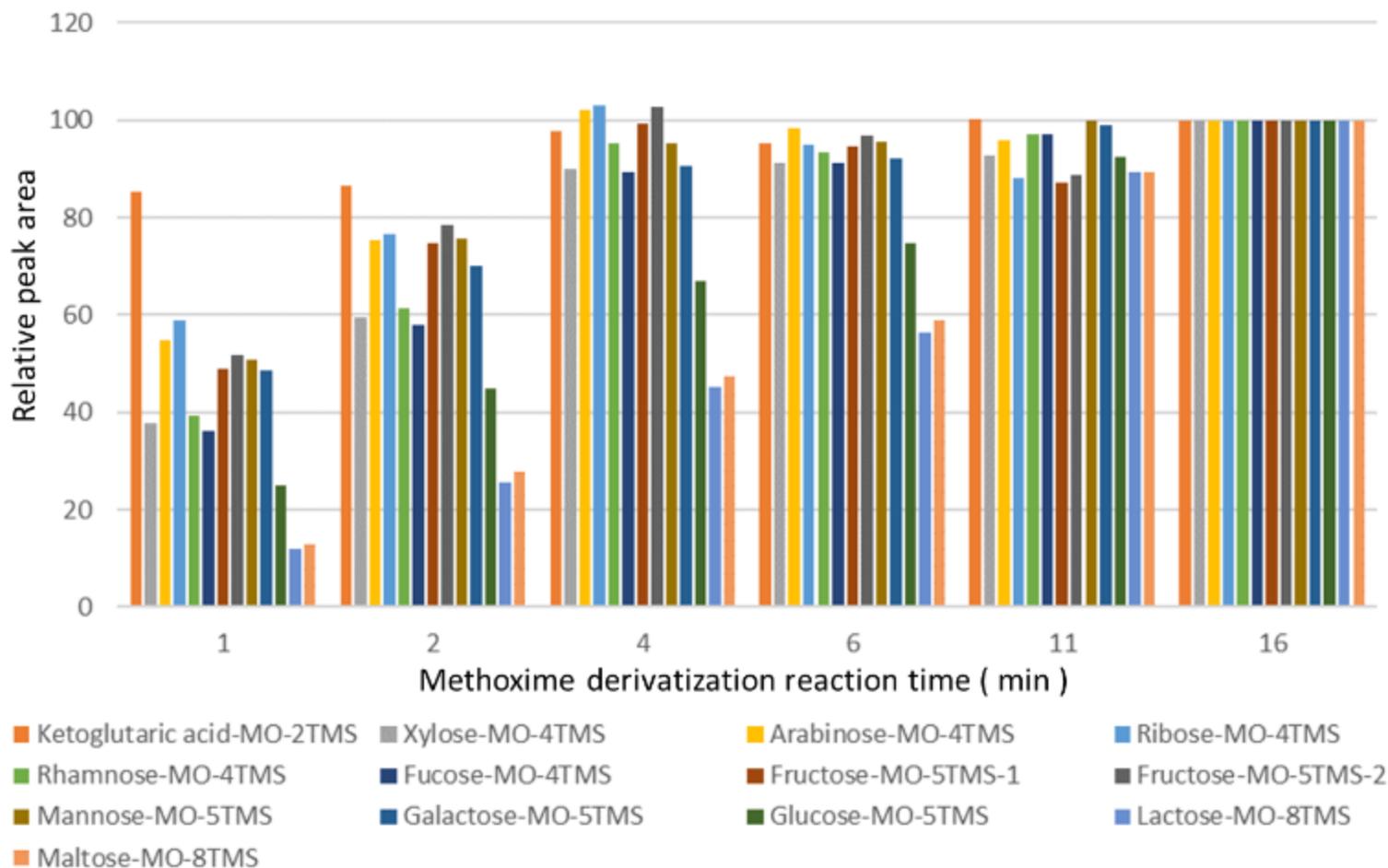
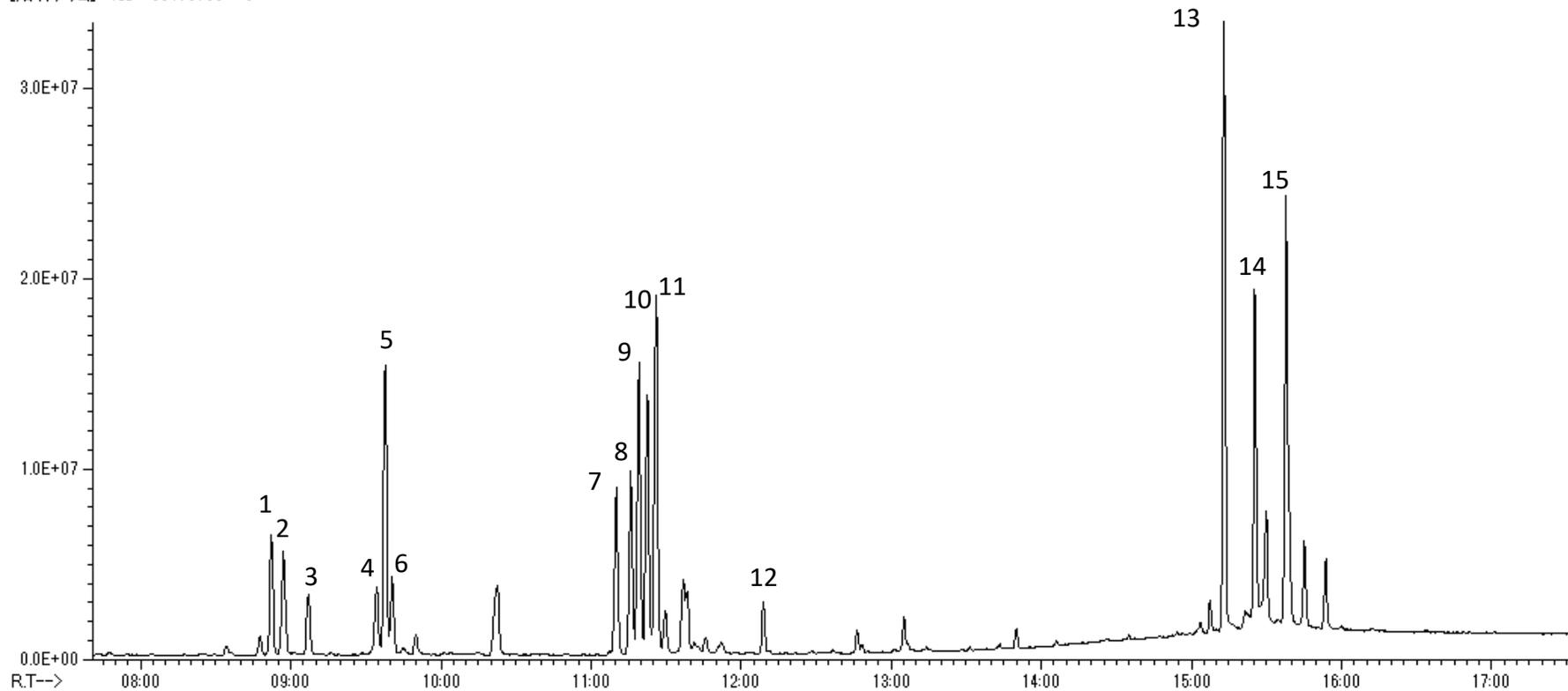


Fig. 3. Relations of methoxime derivatization reaction time in sorbent and the relative peak area

# 本システムによる糖類のSCAN-TIC

【クロマトグラム】 TIC : 33473768 - 0

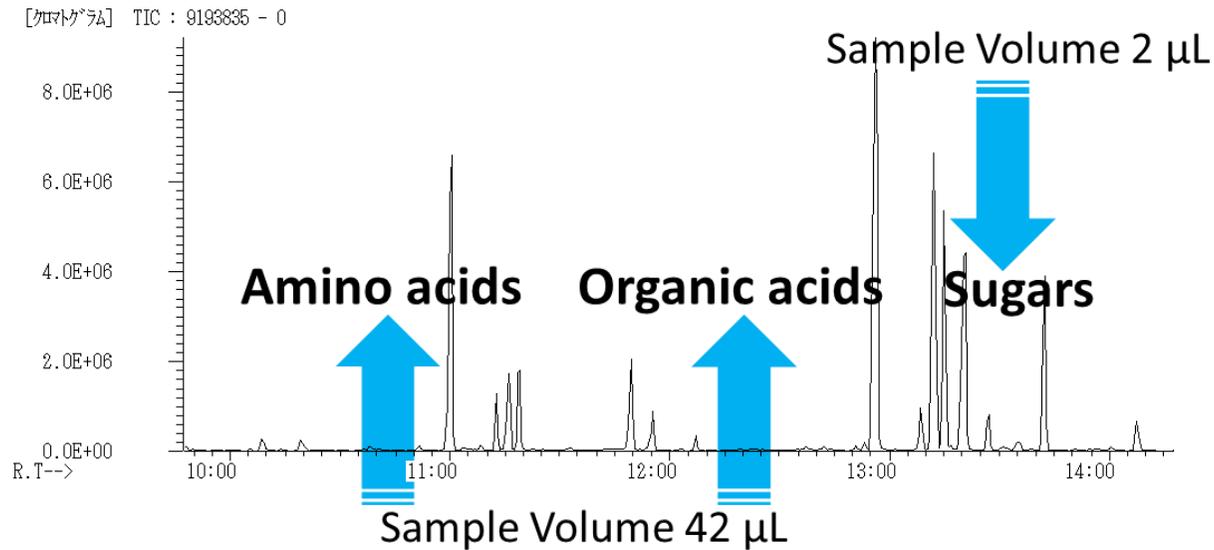
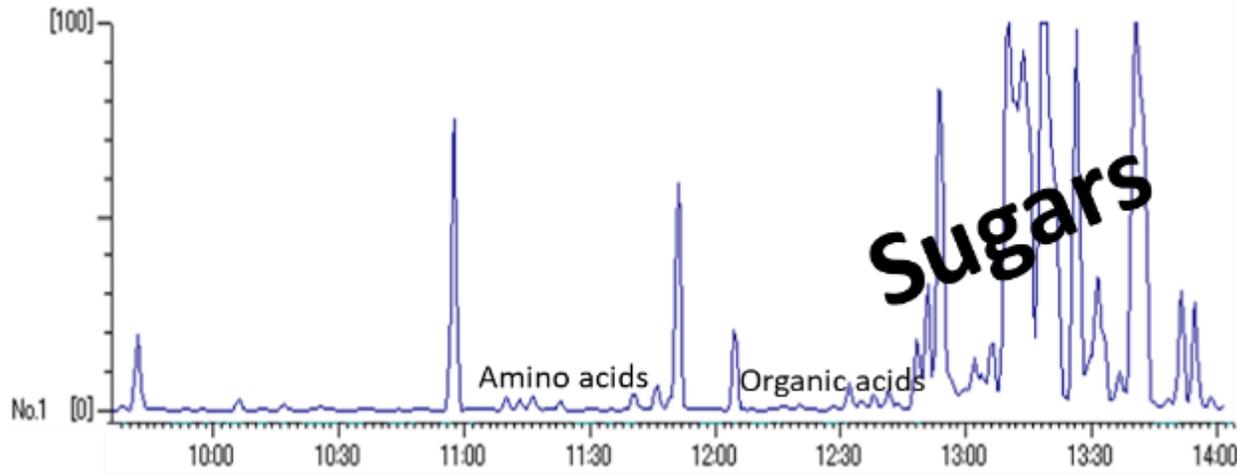


|   |                   |
|---|-------------------|
| 1 | Xylose-MO-4TMS    |
| 2 | Arabinose-MO-4TMS |
| 3 | Ribose-MO-4TMS    |
| 4 | Rhamnose-MO-4TMS  |
| 5 | Ribitol-5TMS      |

|    |                    |
|----|--------------------|
| 6  | Fucose-MO-4TMS     |
| 7  | Fructose-MO-5TMS-1 |
| 8  | Fructose-MO-5TMS-2 |
| 9  | Mannose-MO-5TMS    |
| 10 | Galactose-MO-5TMS  |

|    |                    |
|----|--------------------|
| 11 | Glucose-MO-5TMS    |
| 12 | Glucopyranose-5TMS |
| 13 | Sucrose-8TMS       |
| 14 | Lactose-MO-8TMS    |
| 15 | Maltose-MO-8TMS    |

# 糖類を多く含む試料の分析の課題と対策



# 2段階試料負荷による野菜ジュースの分析

## ■ アミノ酸/有機酸/糖類 Automation

試料採取 野菜ジュース 50  $\mu$ L

└ 添加 水 150  $\mu$ L  
手振とう

└ 添加 ACN 800  $\mu$ L

振とう (37  $^{\circ}$ C, 1 min)

遠心分離 14000 rpm, 3 min

└ 添加 0.1N NaOH

抽出上澄液



1回目負荷

2回目負荷

Flash-SPE ACXs

コンディショニング  
ACN-水(1/1)

負荷[保持] 抽出上澄液 40  $\mu$ L

洗浄 ACN-水(1/1)

脱水 ACN

負荷[保持] 抽出上澄液 3  $\mu$ L

混合 ACN

脱水 ACN

含侵 10% メトキシアミン-ピリジン

固相誘導体化反応 メトキシ化, 15 min

含侵 MSTFA-トルエン(3/1)

固相誘導体化反応 TMS化, 1 min

溶出 ヘキサン or トルエン

GC/MS スプリット 1:50

# 本システムによるアミノ酸/有機酸/糖類のSCAN-TIC

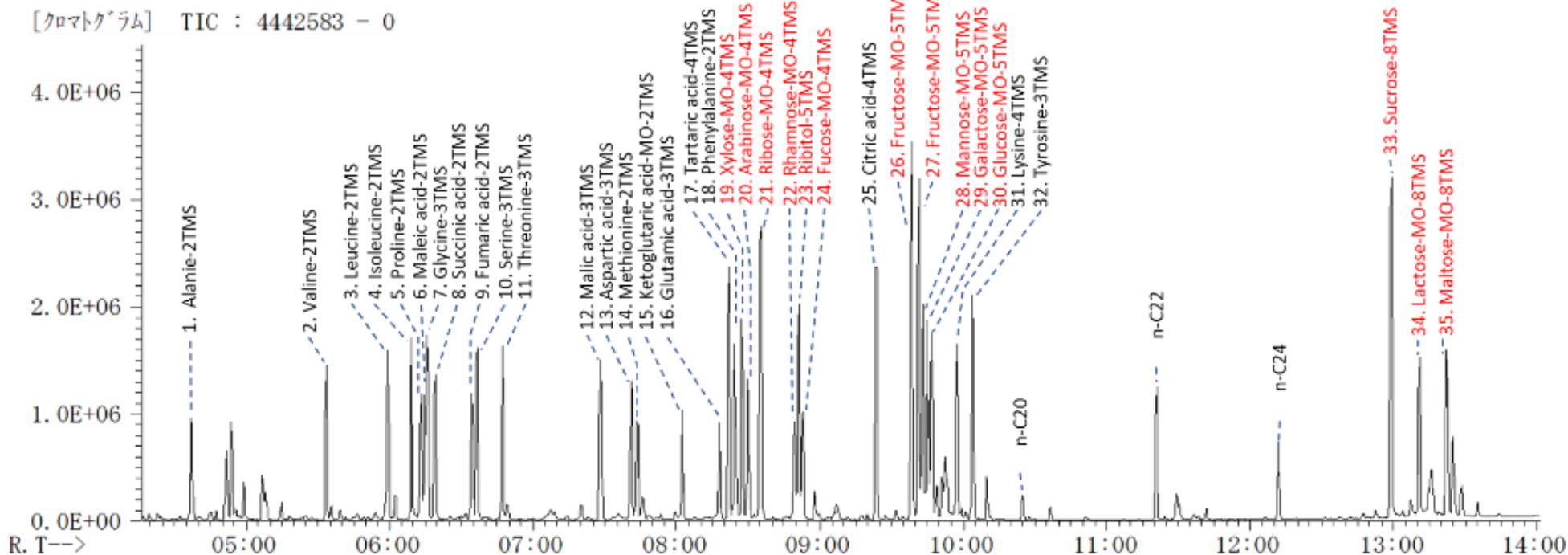


Fig. 2. The SCAN total ion chromatogram of standard solution using SPE-GC-MS system with automated solid-phase derivatization method

\* Concentration of **amino acids and organic acids** standard solution is **0.02nmol/ $\mu$ L**

\* Concentration of **sugars** standard solution is **0.2nmol/ $\mu$ L**

# 野菜ジュースのSCAN-TIC

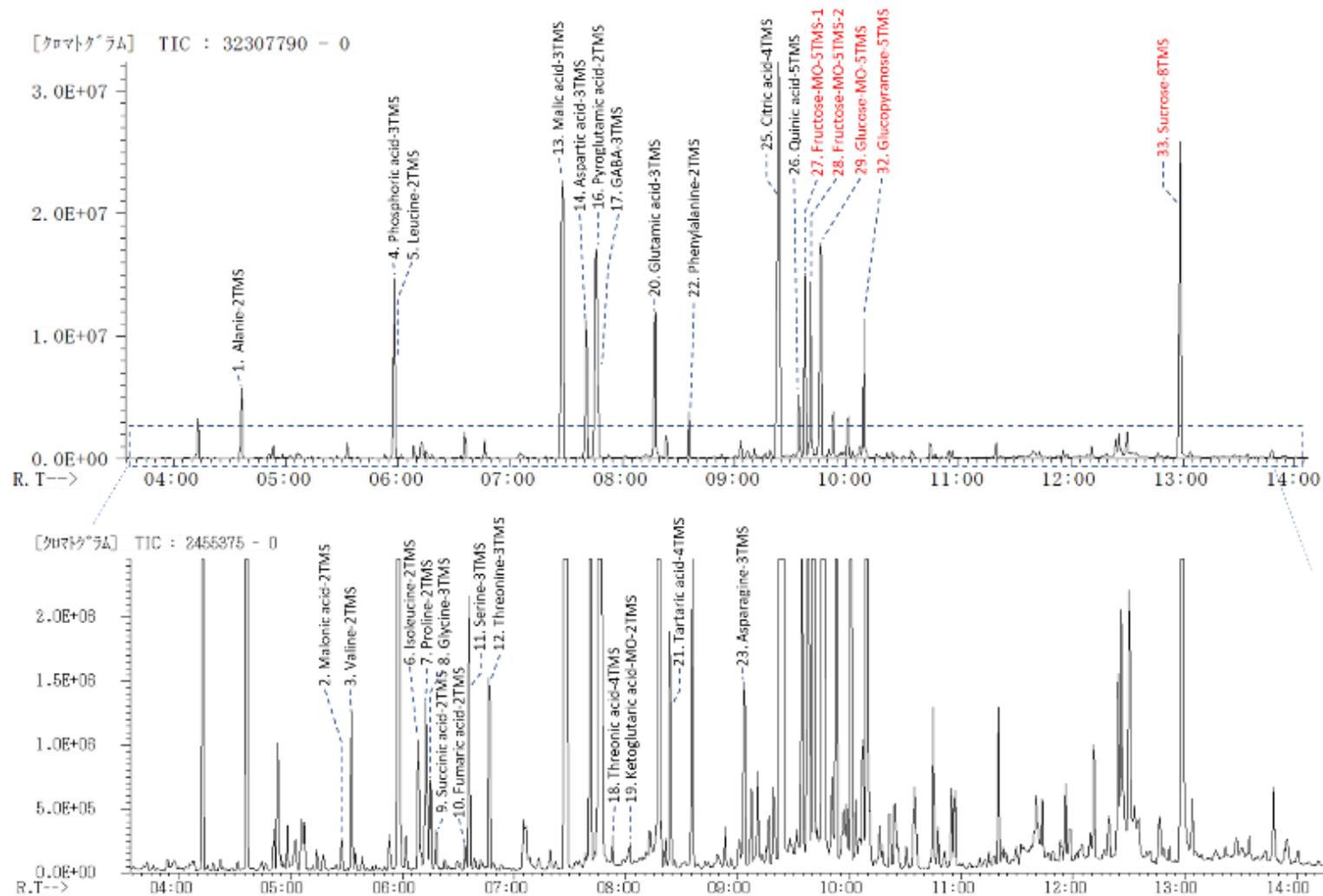
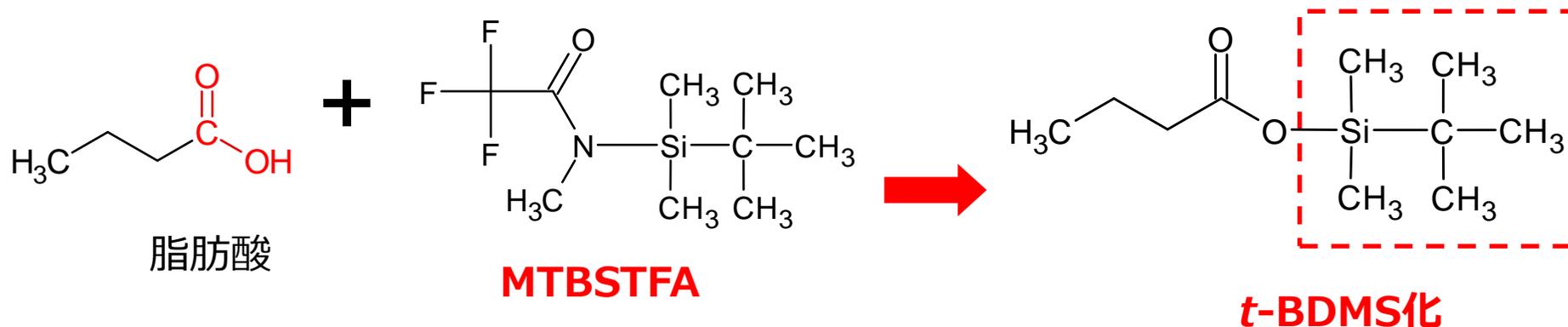


Fig. 4. The SCAN total ion chromatogram of the Vegetable juice using SPE-GC-MS system with automated solid-phase derivatization method

# 短鎖脂肪酸の t-BDMS誘導体化

## t-BDMS(**t-Butyl DiMethyl Silyl**)化



- t-BDMS化はTMS化より質量数が大きくなり、分析しやすくなる。
- TMS 誘導体は加水分解されやすいのに対し、t-BDMS 誘導体は加水分解に対し安定している。
- 分子量に近いところでのフラグメントイオンを得られるため解析しやすい。



## 測定条件：短鎖脂肪酸

---

### **SPE-GC Interface SPL-M100 (AiSTI Science)**

SPE Cartridge Flash-ACX

Sampling Volume 50  $\mu$ L

### **PTV Injector LVI-S250 (AiSTI Science)**

Insert Type Spiral Insert

Injector Temp. **150°C**(0.5min)-25°C/min-290°C(16min)

### **GC**

Inlet Mode Split 1:20

Flow Mode Constant Flow, 1 ml/min

Pre-Column 0.25mm i.d. x 1m

Column Vf-5ms, 0.25mm i.d. x 30m, df;0.25 $\mu$ m

Oven Temp. **60°C(3min)**-10°C/min-100°C-20°C/min-310°C(4min)

Trans. Line Temp. 290°C

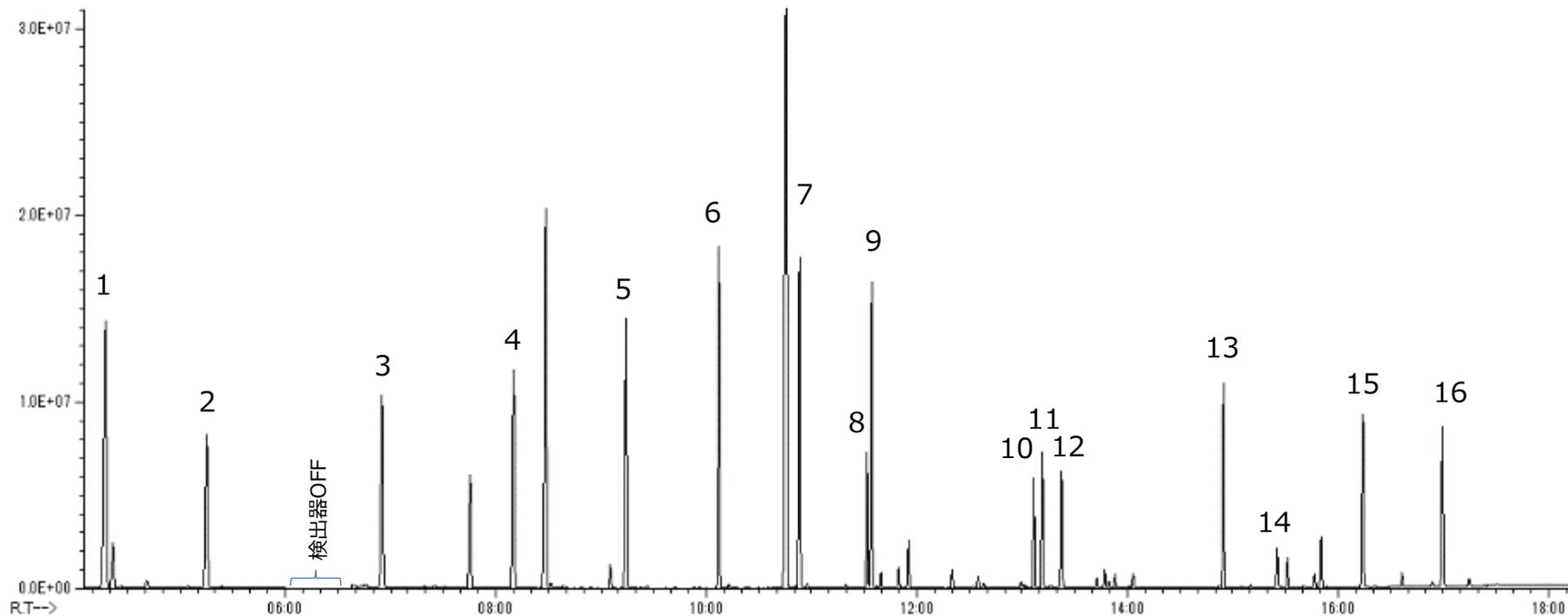
### **MS**

MS Method SCAN, m/z;70-470

---

# t-BDMS誘導体化による短鎖脂肪酸と有機酸のSCAN-TIC

[007474] TIC : 81036800 - 0



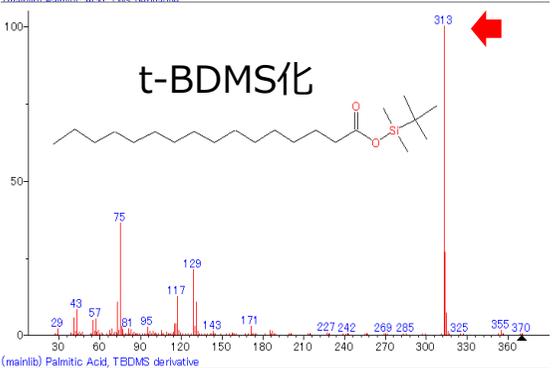
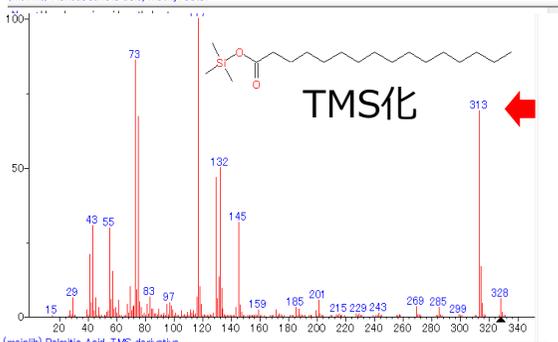
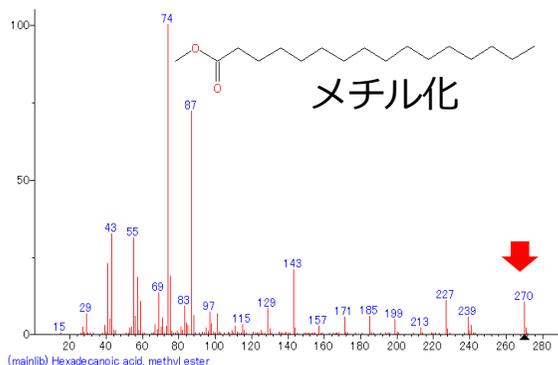
1. Methanoic acid-tBDMS
2. Ethanoic acid-tBDMS
3. Propanoic acid-tBDMS
4. Butanoic acid-tBDMS
5. Pentanoic acid-tBDMS
6. Hexanoic acid-tBDMS

7. Heptanoic acid-tBDMS
8. Lactic acid-2tBDMS
9. Octanoic acid-tBDMS
10. Maleic acid-2tBDMS
11. Succinic acid-2tBDMS
12. Fumaric acid-2tBDMS

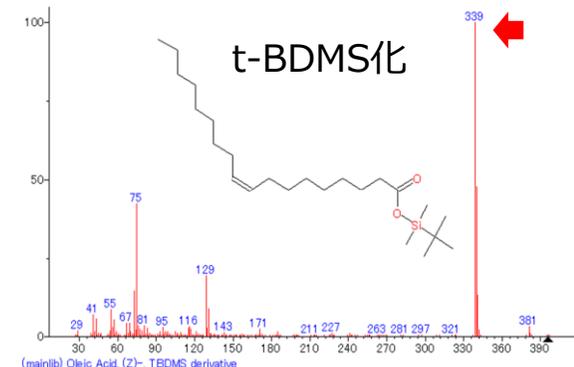
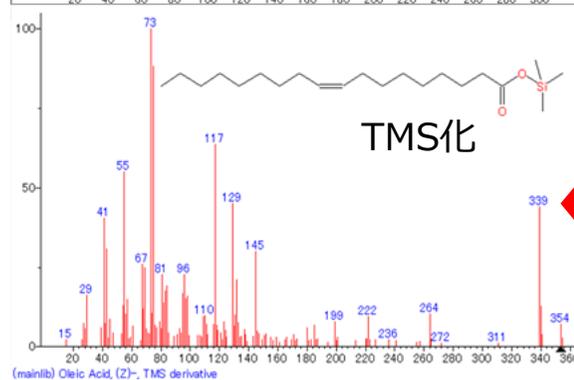
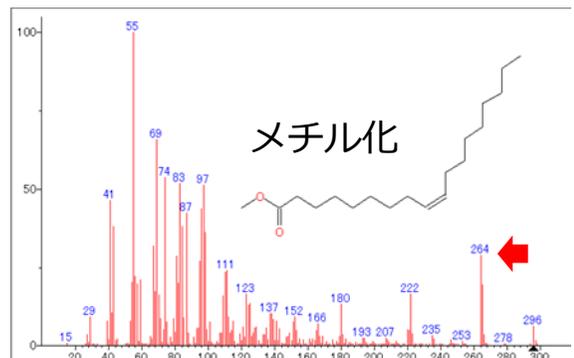
13. Malic acid-3tBDMS
14. a-Ketoglutaric acid-3tBDMS
15. Tartaric acid-4tBDMS
16. Citric acid-4tBDMS

# 長鎖脂肪酸のメチル化とTMS化とt-BDMS化

## パルミチン酸

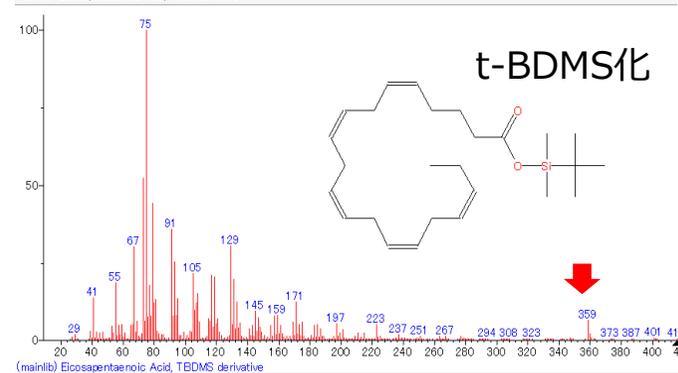
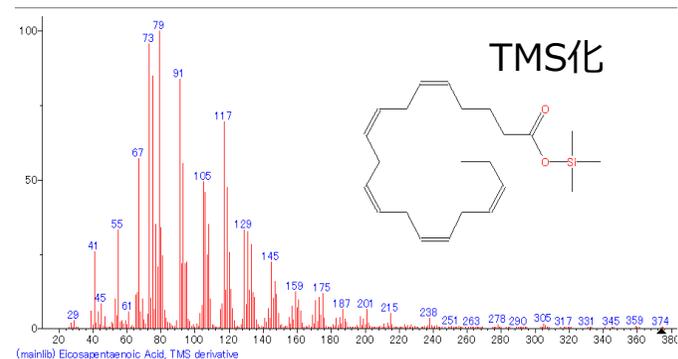


## オレイン酸

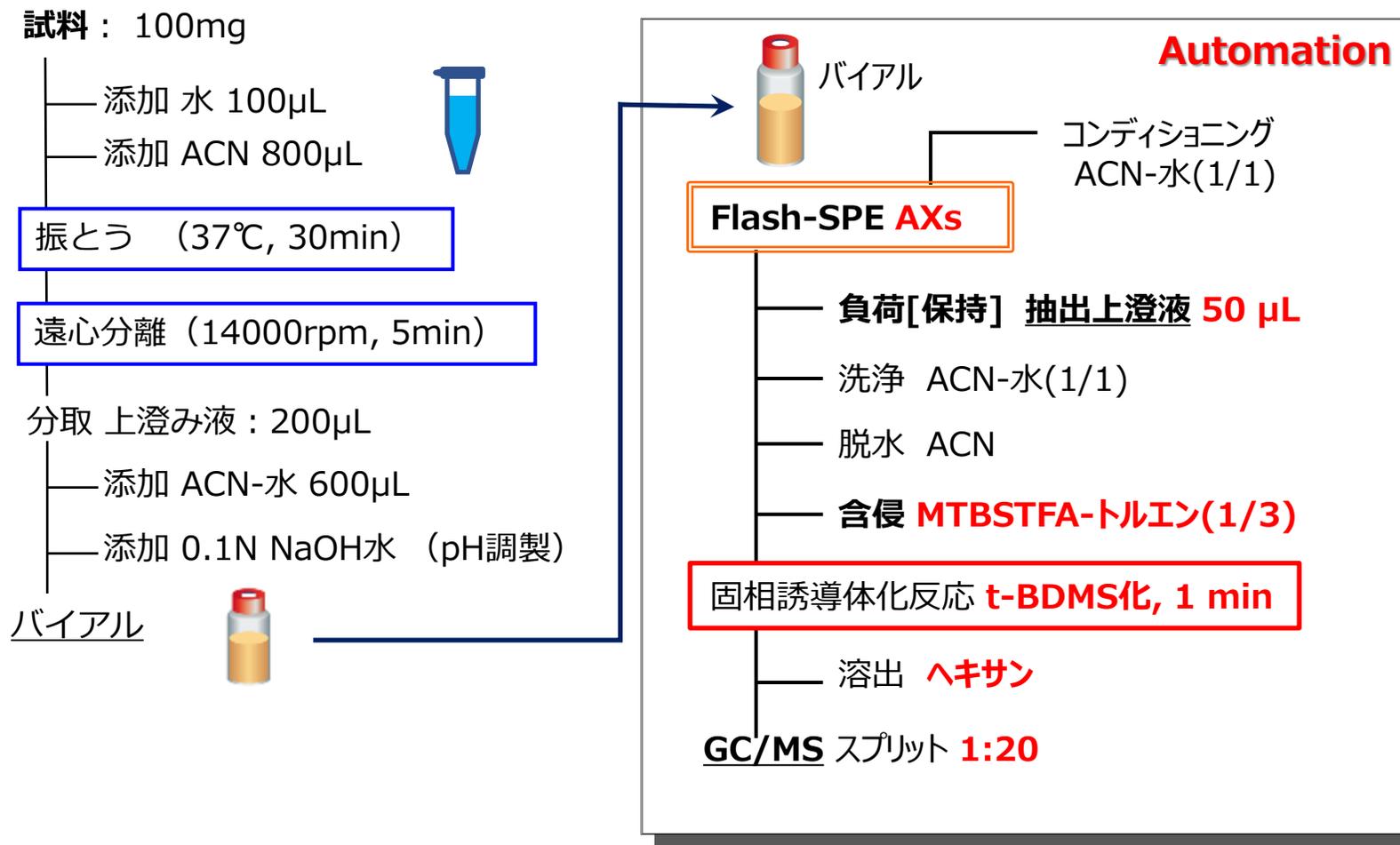


メチル化よりTMS化やt-BDMS化の方が高質量域での強度の高いフラグメントイオンが検出される。

## EPA



# ブルーチーズの t-BDMS誘導体化による分析



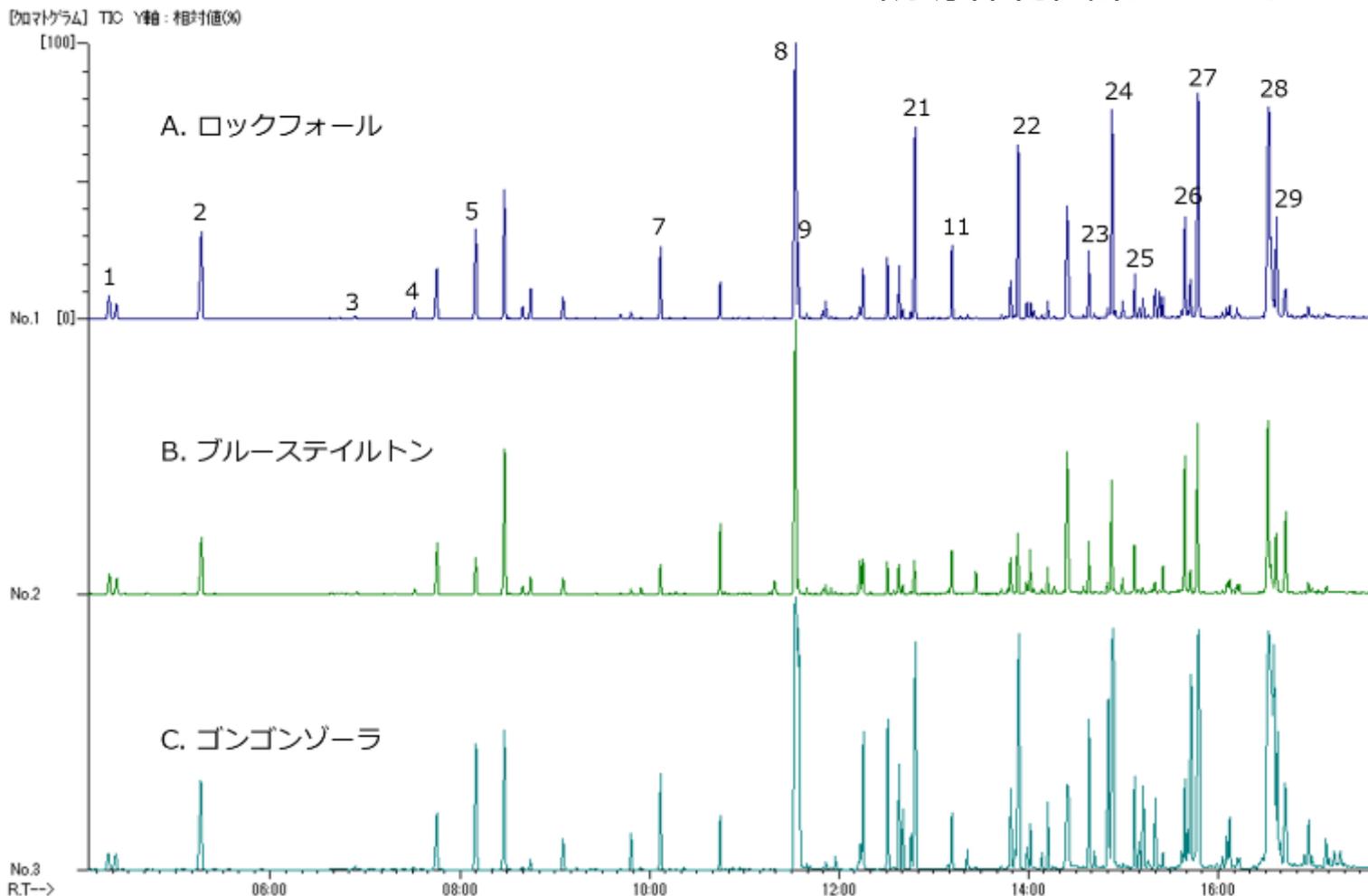
# ブルーチーズ3種のSCANトータルイオンクロマトグラム比較

誘導體化試薬：MTBSTFA

試料：ブルーチーズ3種



C B A



- 1 Formic acid-tBDMS
- 2 Acetic acid-tBDMS
- 3 Propionic acid-tBDMS
- 4 Butyric acid-tBDMS
- 5 Valeric acid-tBDMS
- 7 Enanthic acid-tBDMS
- 8 Lactic acid-2tBDMS
- 9 Octanoic acid-tBDMS
- 11 Succinic acid-2tBDMS
- 21 Decanoic acid-tBDMS
- 22 Dodecanic acid-tBDMS
- 24 Tetradecanoic acid-tBDMS
- 25 Aspartic acid-3tBDMS
- 26 Glutamic acid-3tBDMS
- 27 Hexadecanoic acid-tBDMS
- 28 cis-9-Octadecenoic acid
- 29 Stearic acid-tBDMS

# 内標について

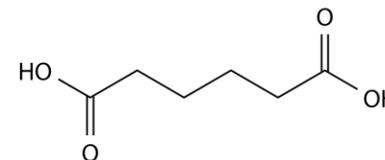
従来法では2-イソプロピルリンゴ酸 (Isopropyl malic acid)や  
 リビトールなどが使用されていますが、

固相誘導体化法では、固相の保持に合わせる必要があるため、アミノ酸、  
 有機酸、糖類、短鎖脂肪酸のそれぞれに適した内標が必要となります。

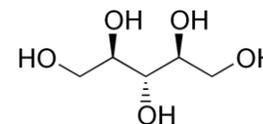
アミノ酸：ノルロイシン



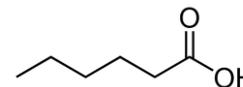
有機酸：アジピン酸



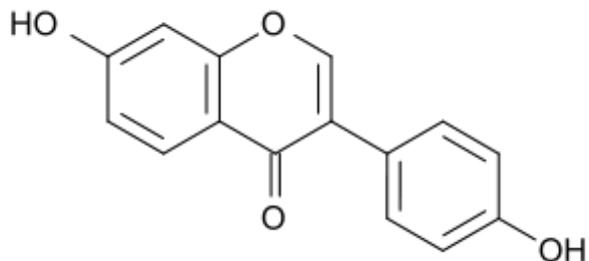
糖類：リビトール



短鎖脂肪酸：ヘキサン酸-d (検討中)



# ダイゼイン類

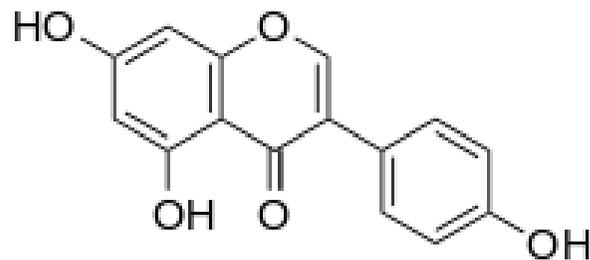


Daidzein

MW:254.2

Daidzein-2TMS

MW:398

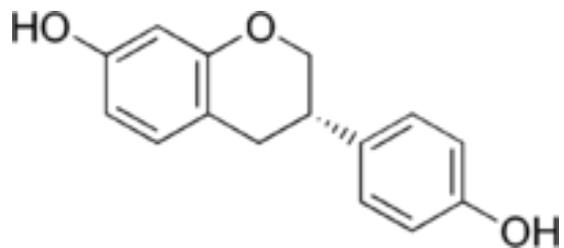


Genistein

MW:270.2

Genistein-3TMS

MW:486



Equol

MW:242.2

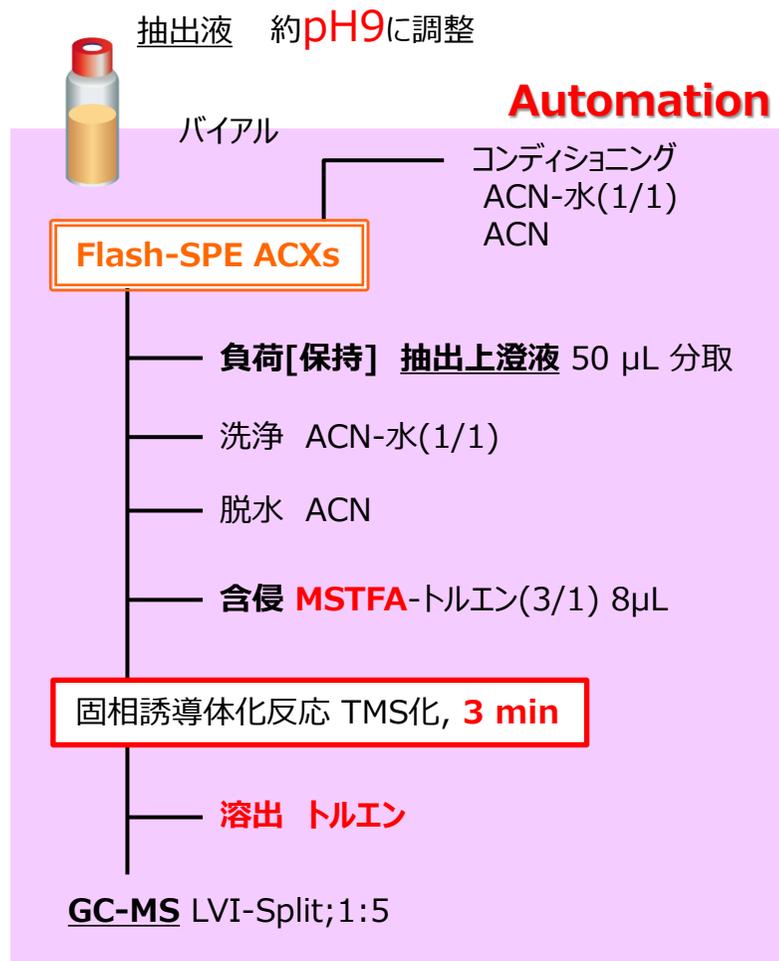
Equol-2TMS

MW:386

イソフラボン的一种。ダイゼインやゲニステインのような他のイソフラボン化合物は、イソ大豆や豆腐や植物性タンパク質大豆製品のような食品にも存在している。エクオールは、腸内細菌によってイソフラボン的一种であるダイゼインから代謝される。

しかし、約30-50%のヒトしかエクオールを作る腸内細菌を持っていない。(引用: Wikipedia)

# オンライン固相誘導体化法：ダイゼイン類



## 測定条件

### SPE-GC Interface SPL-M100 (AiSTI Science)

SPE Cartridge Flash-ACX  
Sampling Vol. 50  $\mu$ L

### PTV Injector LVI-S250 (AiSTI Science)

Insert Type Spiral Insert  
Injector Temp. 120°C(0.5min)-120°C/min-290°C(8min)

### GC

Inlet Mode Split Vent  
150mL/min(0.5min) -Split 1:5(2.5min)-  
GasSaver(3min)

Flow Mode Constant Flow, 1 ml/min

Pre-Column 0.25mm i.d. x 1m

Column Vf-5ms, 0.25mm i.d. x 30m, df;0.25 $\mu$ m

Oven Temp. 120°C(3min)-40°C/min-280°C-10°C/min  
-320°C(2min)

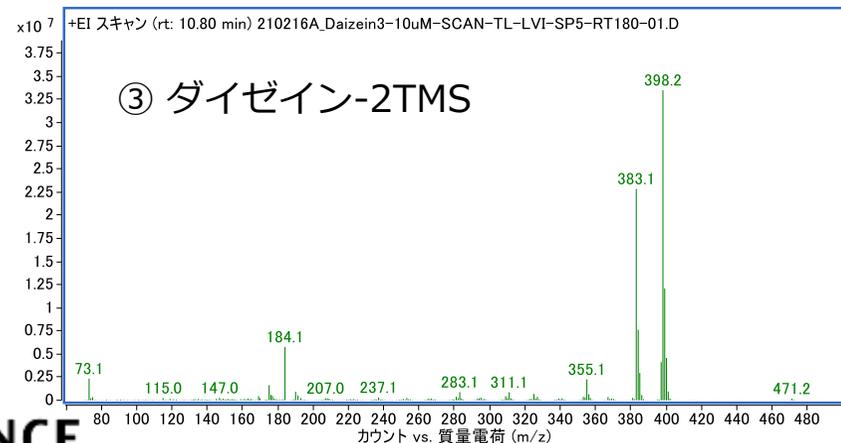
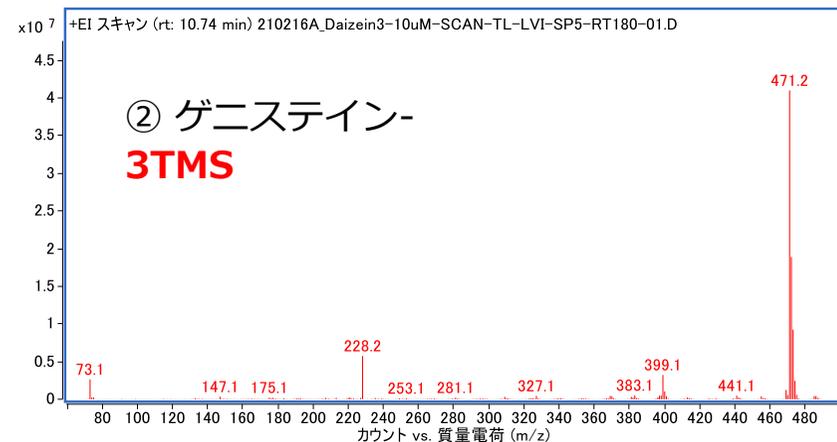
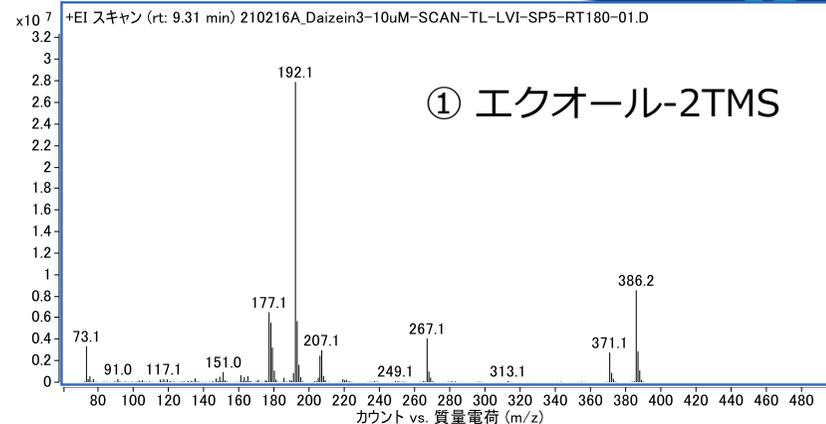
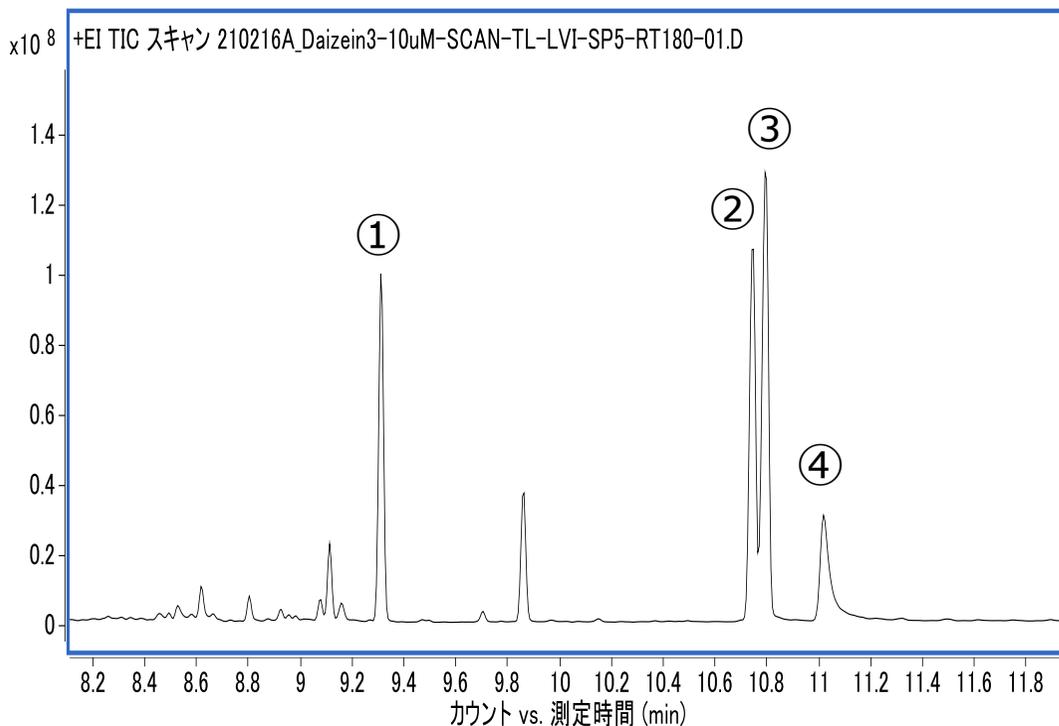
Trans. L.Temp. 320°C

### MS

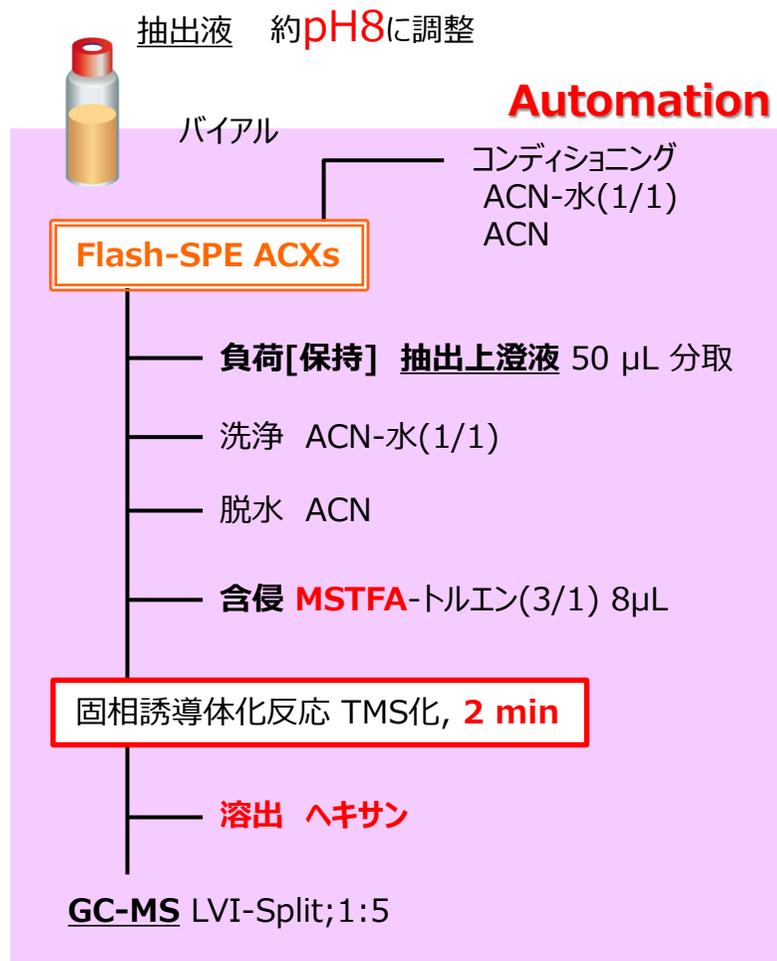
MS Method SCAN, m/z;70-490, or MRM

# ダイゼイン類3種のSCAN-TIC

## ダイゼイン類3種のSCAN-TIC



# オンライン固相誘導体化法：胆汁酸



## 測定条件

### SPE-GC Interface **SPL-M100 (AiSTI Science)**

SPE Cartridge Flash-ACX  
Sampling Vol. 50  $\mu$ L

### PTV Injector **LVI-S250 (AiSTI Science)**

Insert Type Spiral Insert  
Injector Temp. **120°C(0.5min)**-120°C/min-290°C(8min)

### GC

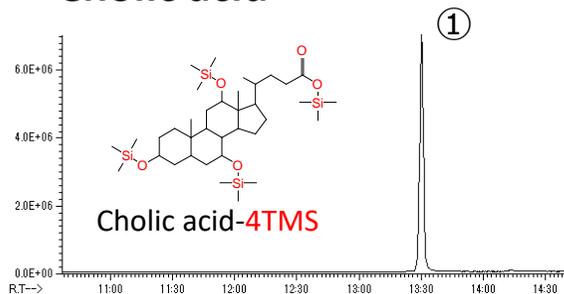
Inlet Mode **Split 1:50**  
Flow Mode Constant Flow, 1 ml/min  
Pre-Column 0.25mm i.d. x 1m  
Column Vf-5ms, 0.25mm i.d. x 30m, df;0.25 $\mu$ m  
Oven Temp. **100°C(2min)**-30°C/min-**310°C-2°C/min**  
-325°C  
Trans. L. Temp. **320°C**

### MS

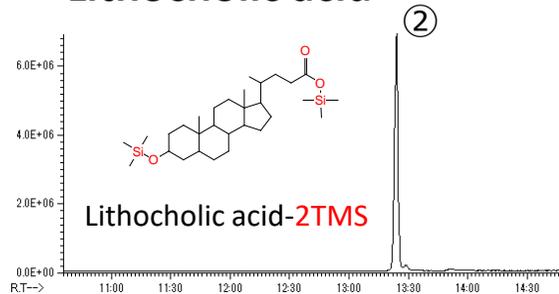
MS Method SCAN, m/z;70-470, or MRM

# 本法による胆汁酸のSCAN-TICとスペクトル

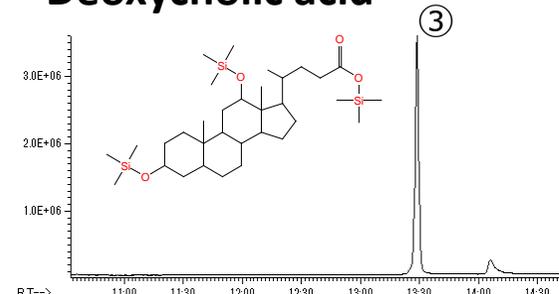
## Cholic acid



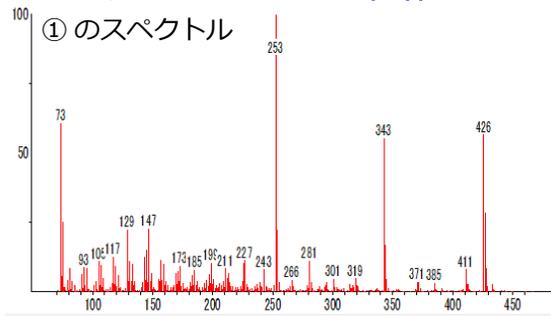
## Lithocholic acid



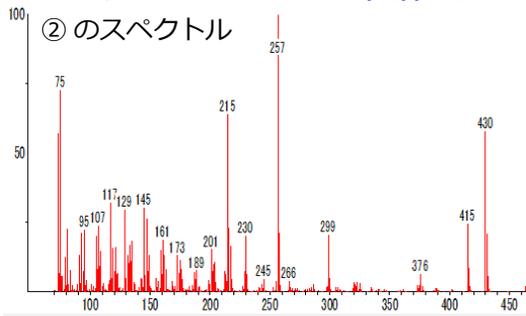
## Deoxycholic acid



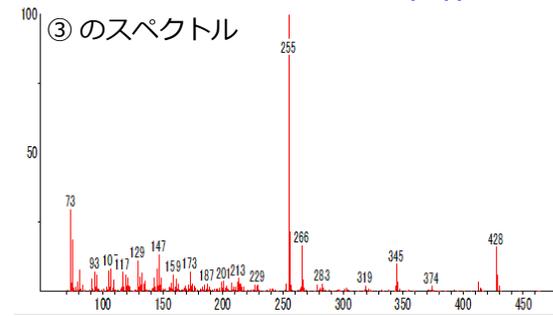
スキャン#1809-1782.1826 (RT=13.31) of D:\#95977B\#化合物-胆汁酸\200827A\_胆汁酸\_01\_コール酸.SPE



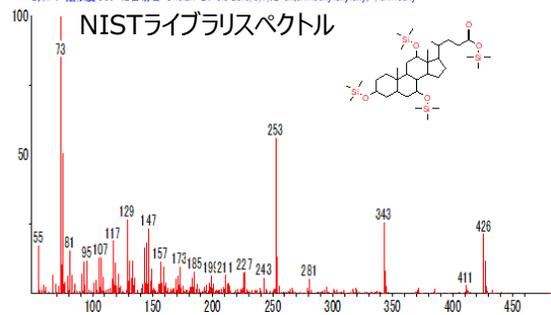
スキャン#1765-1714.1868 (RT=13.24) of D:\#95977B\#化合物-胆汁酸\200827A\_胆汁酸\_02\_リコール酸.SPE



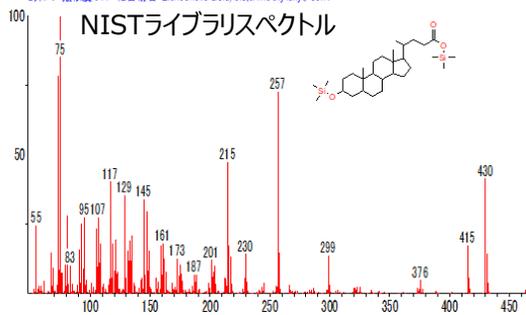
スキャン#1803-0 (RT=13.29) of D:\#95977B\#化合物-胆汁酸\VAIAEXPRT.AIA\200827A\_胆汁酸\_03\_デオキシコール酸.SPE



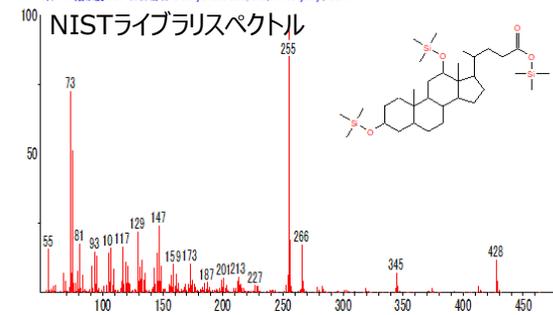
タイプ#1 類似度:85 化合物名: Cholan-24-oic acid, 3,7,12-tri(trimethylsilyloxy)-, trimethyl



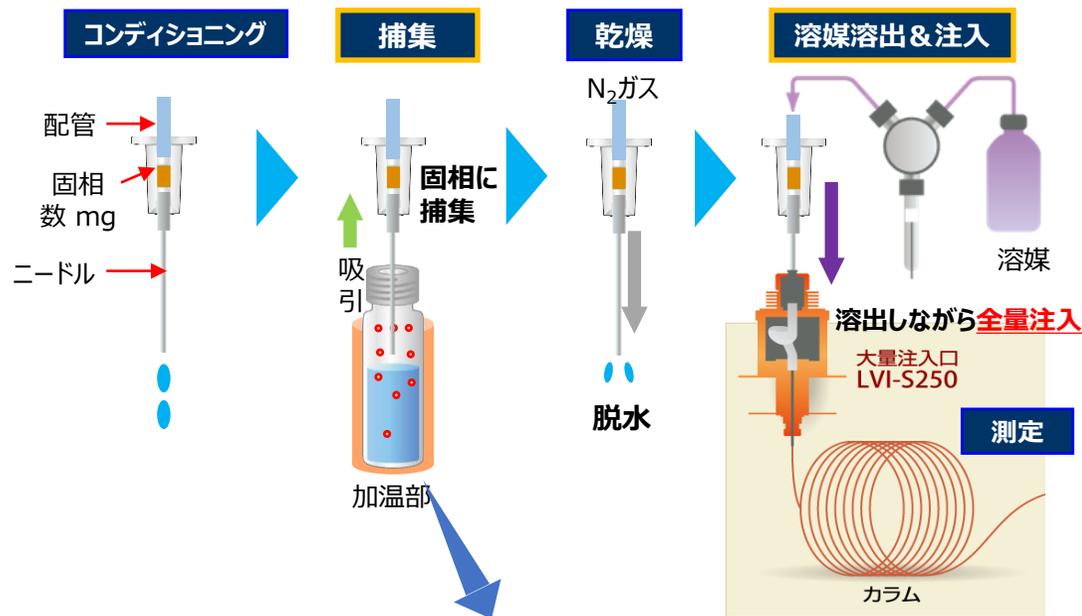
タイプ#1 類似度:97 化合物名: Lithocholic acid, bis(trimethylsilyl) deriv.



タイプ#1 類似度:84 化合物名: Deoxycholic acid, tris(trimethylsilyl) deriv.



# オンライン固相捕集-溶媒溶出法



【捕集方法】



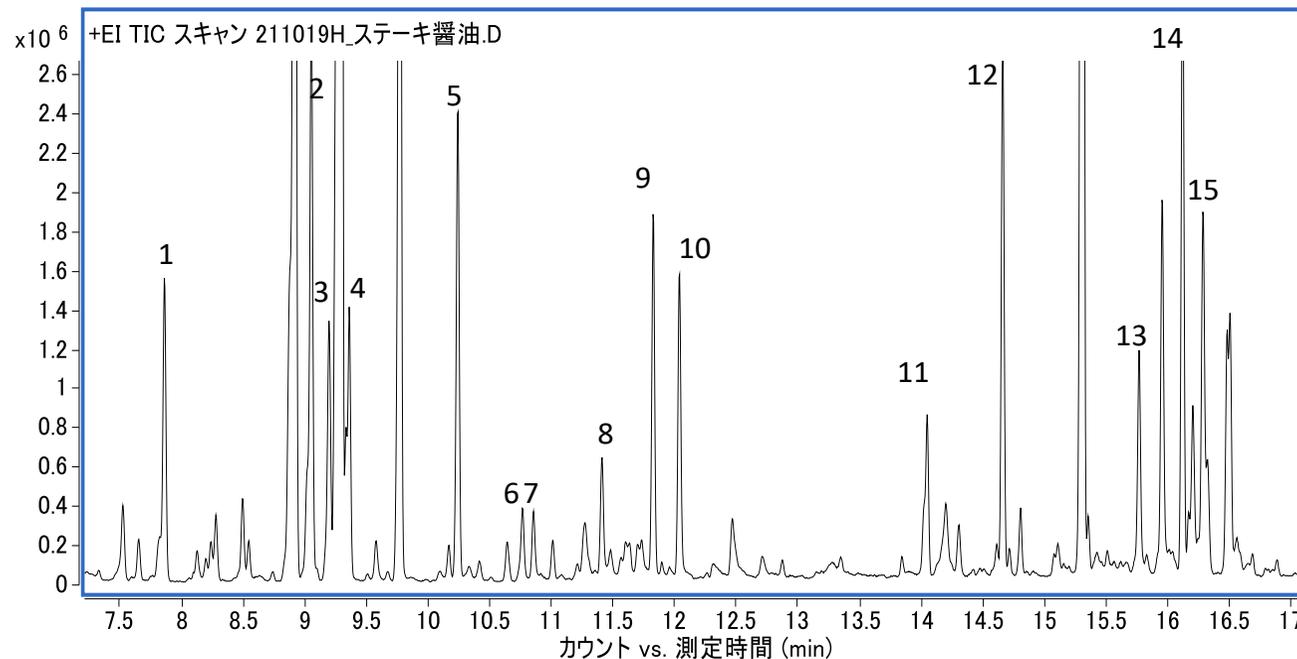
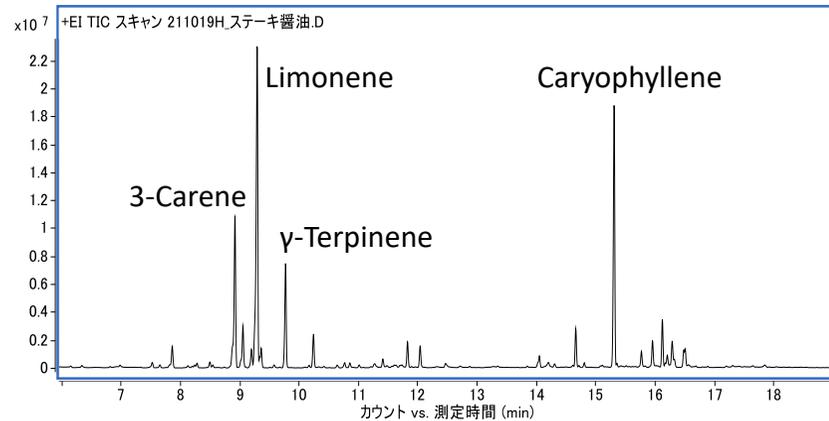
固相からの溶出液をGCに全量導入するオンラインSPE-GC/MSシステムによる**新しい固相捕集-溶媒溶出法**を開発した。

- 迅速に気相を一定量捕集可能。
- 熱に弱い成分を分析可能。
- 気相中の水分を除去可能。
- オンサイトサンプリングが可能。
- 誘導体化が可能。

**前処理時間14分**

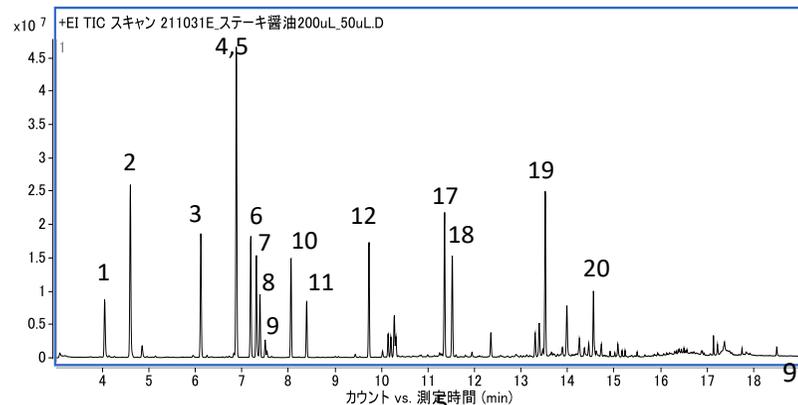
- ① 試料を一定時間加温 (50℃)
- ② 固相を溶媒でコンディショニング
- ③ 窒素ガスで固相を乾燥
- ④ 試料を一定時間攪拌
- ⑤ 試料の気相を固相に一定量吸引
- ⑥ 窒素ガスで固相を乾燥
- ⑦ 注入口へニードルを挿入
- ⑧ 目的物質を溶媒で固相から溶出させながらGCへ全量注入。

# ステーキ醬油：におい分析

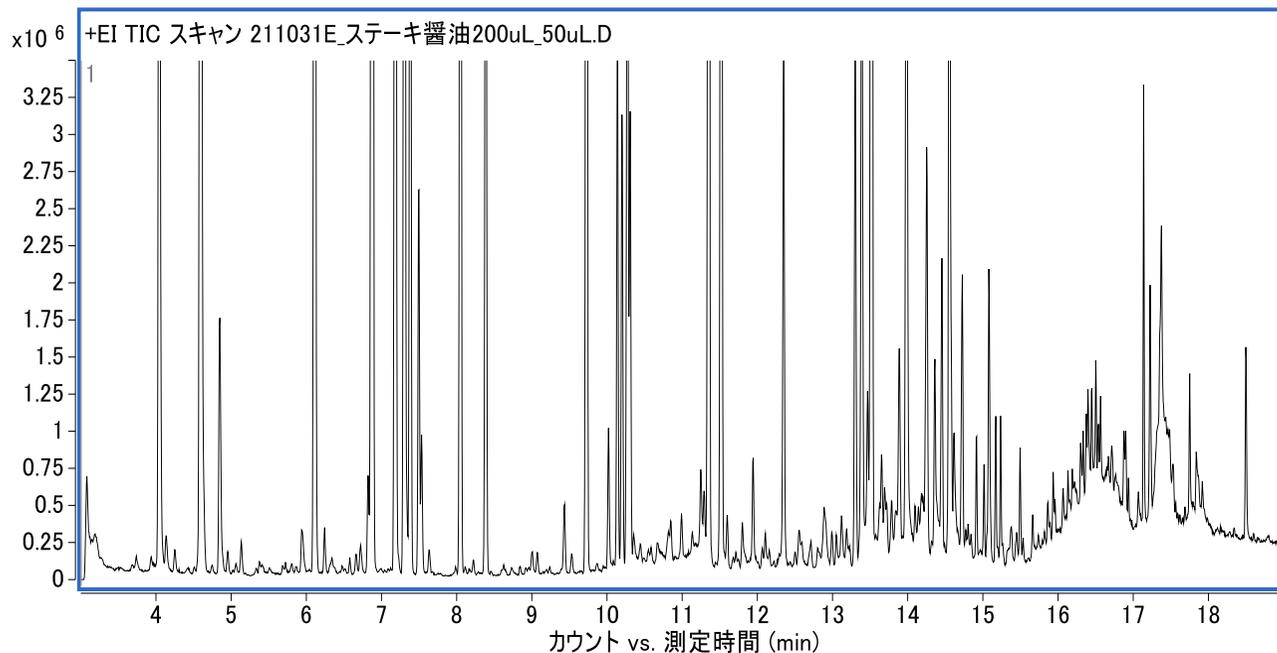


1. Camphene
2. Terpinolene
3. Cymene
4. Eucalyptol
5. Terpinolene
6. 1-Allyl-2-isopropylidysulfane
7. Fenchol
8. Trisulfide, methyl propyl
9. 4-terpineol
10. Terpineol
11. Elemene
12. Copaene
13. Humulene
14. Zingiberene
15. Bisabolene

# ステーキ醬油：アミノ酸/有機酸分析



- |                         |                            |
|-------------------------|----------------------------|
| 1. Lactic acid-2TMS     | 11. Threonine-3TMS         |
| 2. Alanine-2TMS         | 12. Malic acid-3TMS        |
| 3. Valine-2TMS          | 13. Aspartic acid-3TMS     |
| 4. Phosphoric acid-3TMS | 14. Methionine-2TMS        |
| 5. Leucine-2TMS         | 15. Pyroglutamic acid-2TMS |
| 6. Isoleucine-2TMS      | 16. GABA-3TMS              |
| 7. Proline-2TMS         | 17. Glutamic acid-3TMS     |
| 8. Glycine-3TMS         | 18. Phenylalanine-2TMS     |
| 9. Succinic acid-2TMS   | 19. Citric acid-4TMS       |
| 10. Serine-3TMS         | 20. Lysine-4TMS            |
|                         | 21. Tyrosine-3TMS          |



# 納豆：におい-誘導体化分析

誘導体化試薬 MTBSTFAを溶出溶媒に混液させて、t-BDMS化を行った。

