

【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

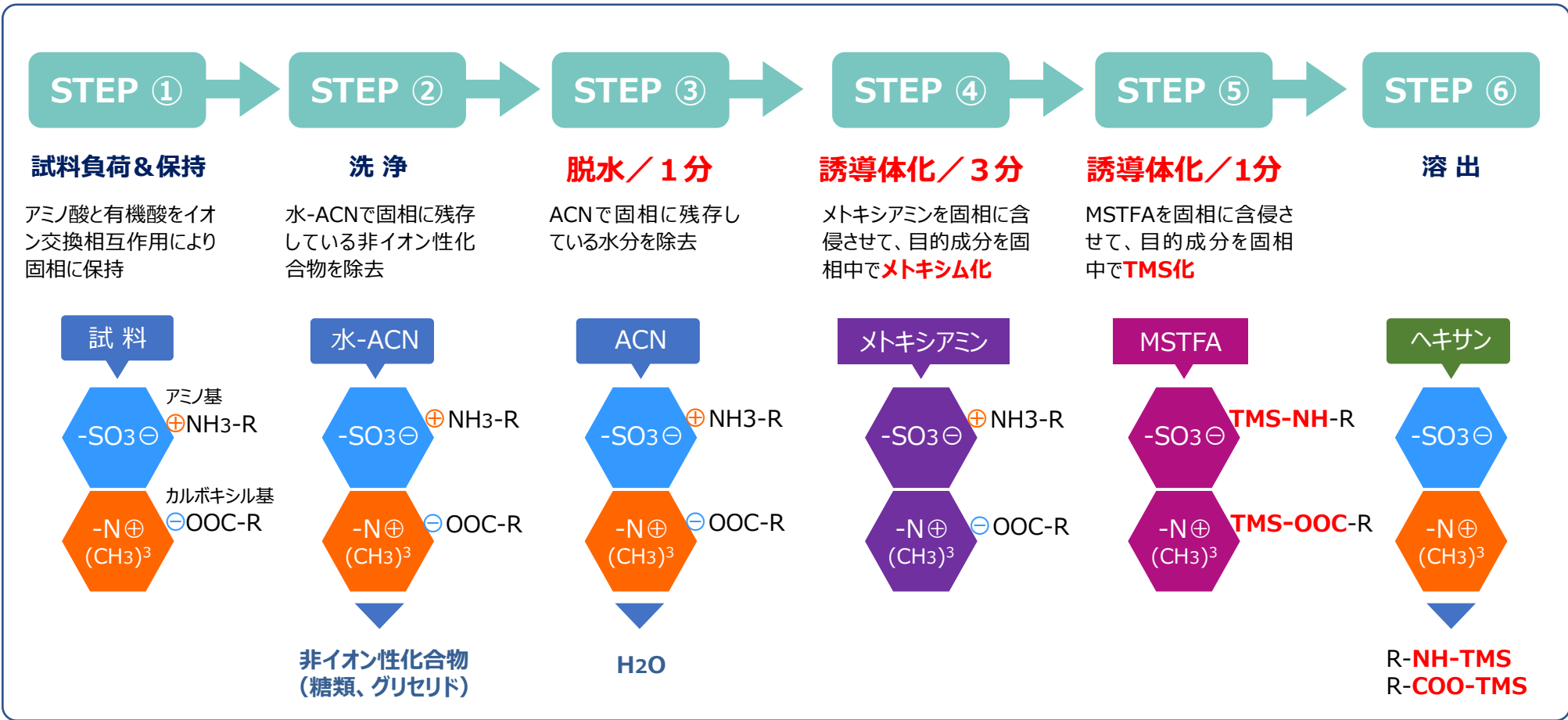


SPE-GCによる誘導体化から測定までの
オンライン化

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

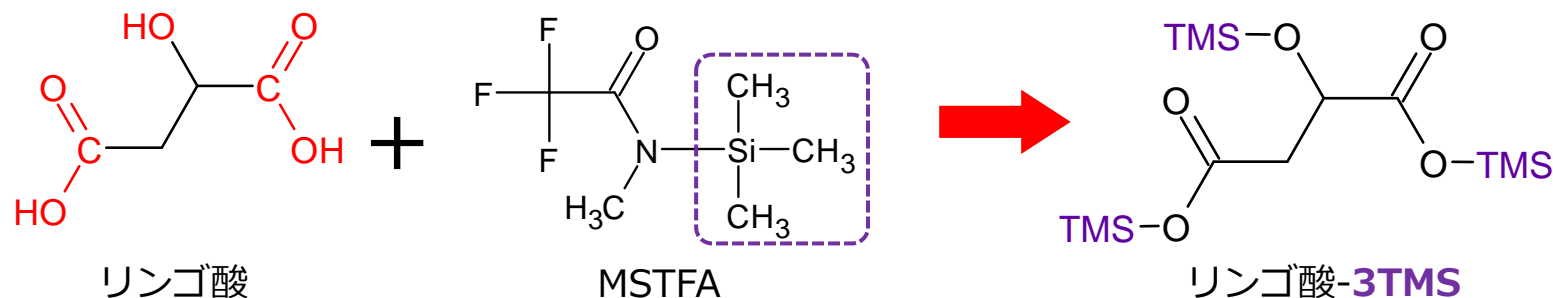
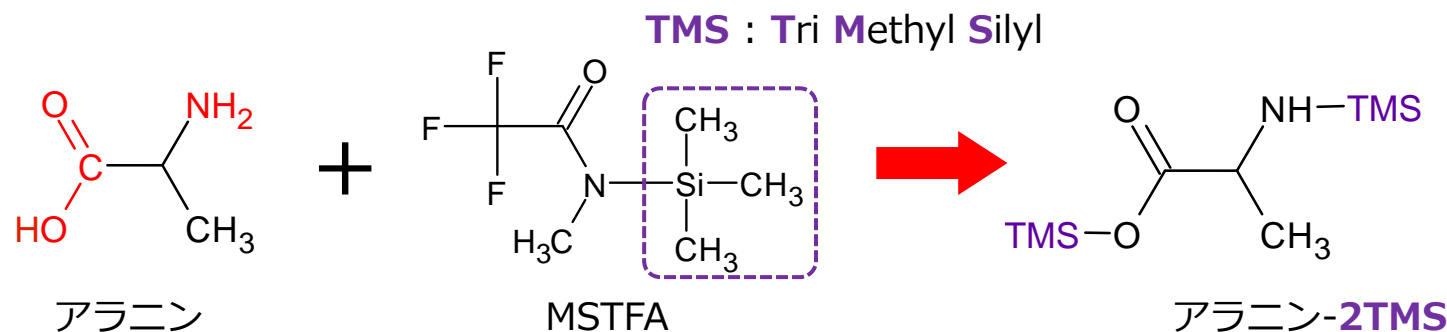


特許登録：(株)アイスティサイエンス

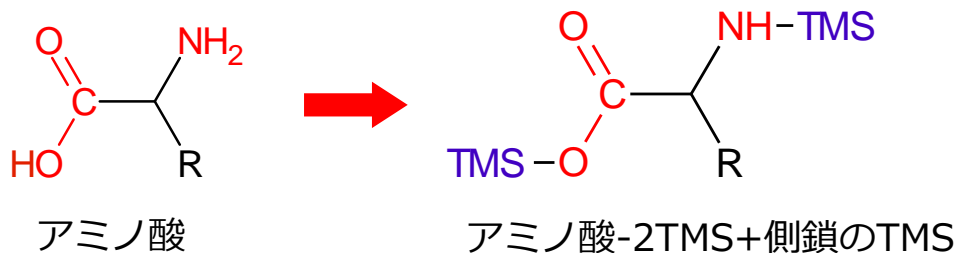
アミノ酸と有機酸のTMS (Tri Methyl Silyl) 化

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 : $R-NH_2 > R-NH-R$

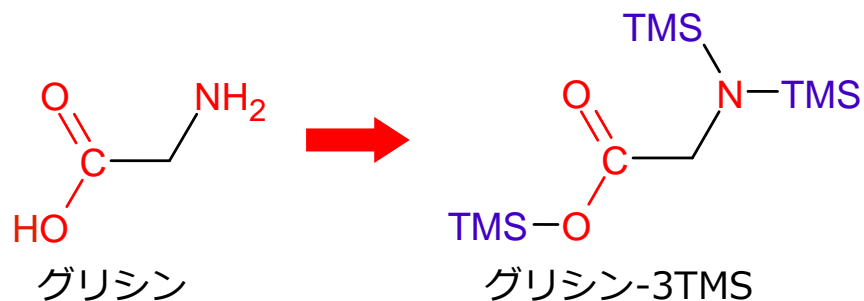
参考文献 :
 小川茂, ぶんせき, 2006, 7, 332-336



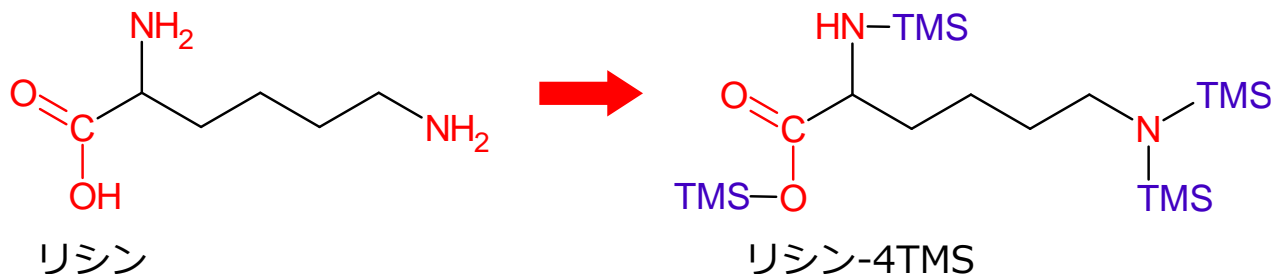
アミノ酸のTMS化について



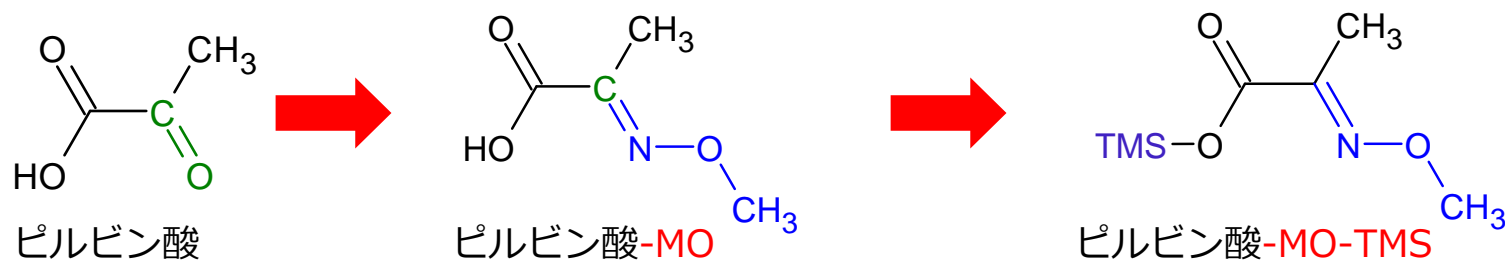
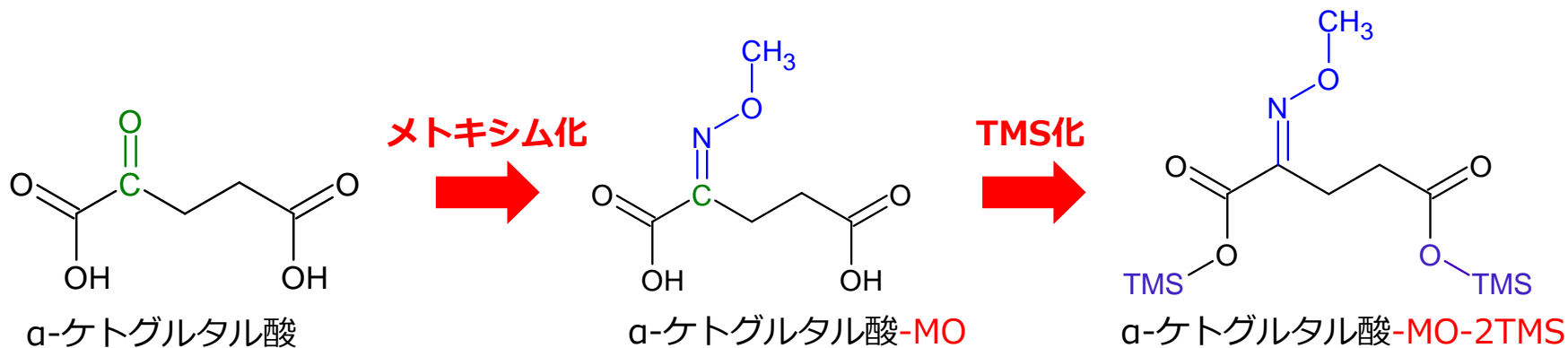
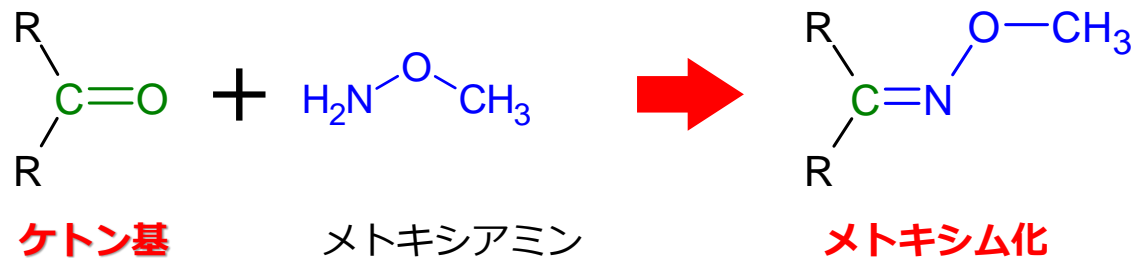
α炭素にRが結合している場合
α炭素に結合しているアミンには
1つのTMSしか結合しない。



α炭素にRが結合していない場合
α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

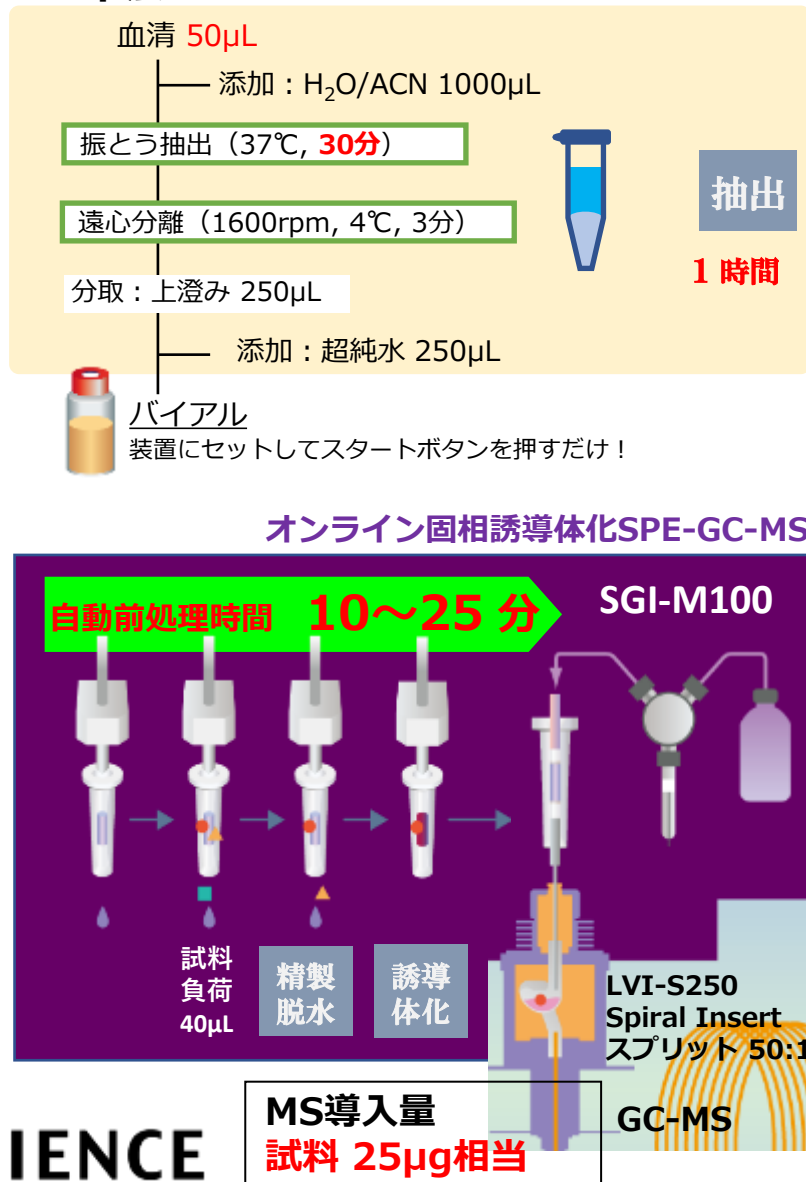


従来法と本法の前処理比較

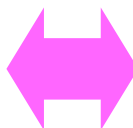
■ 従来法



■ 本法

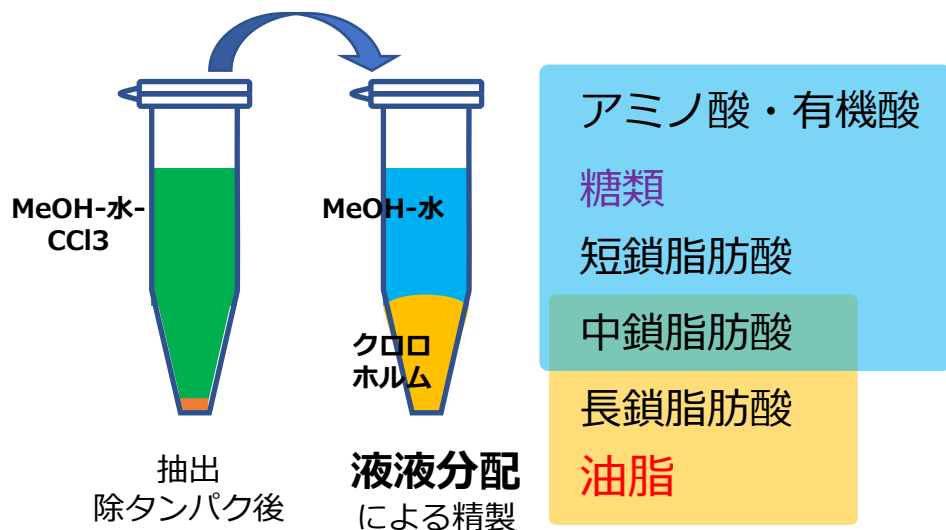


20 時間



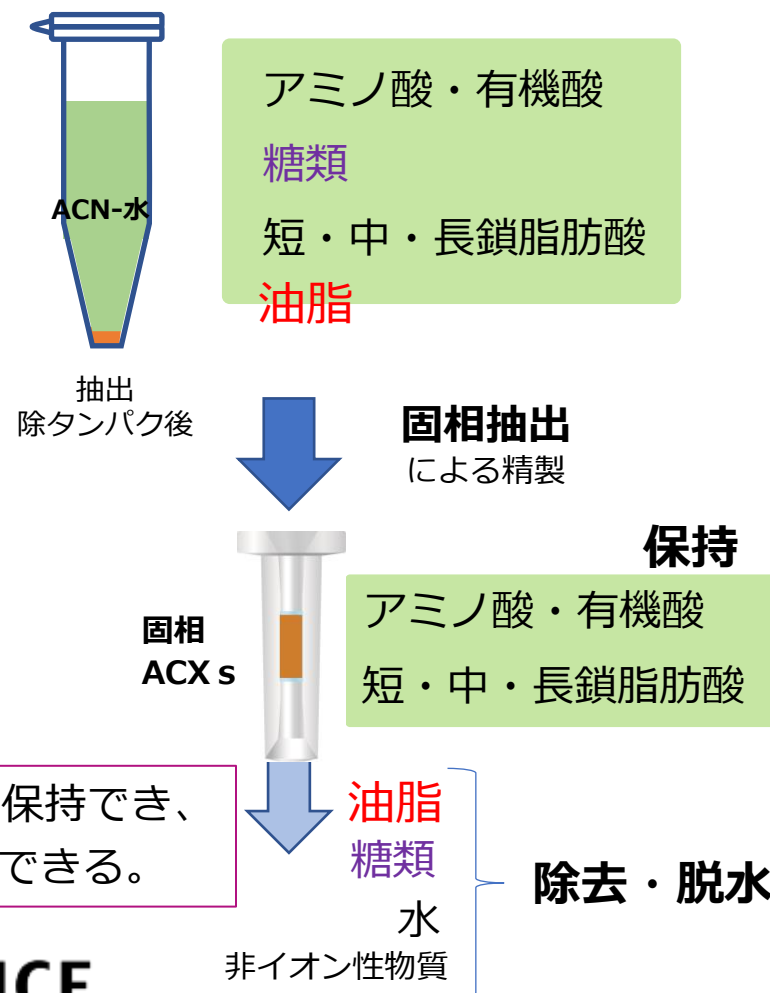
抽出と精製について

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。

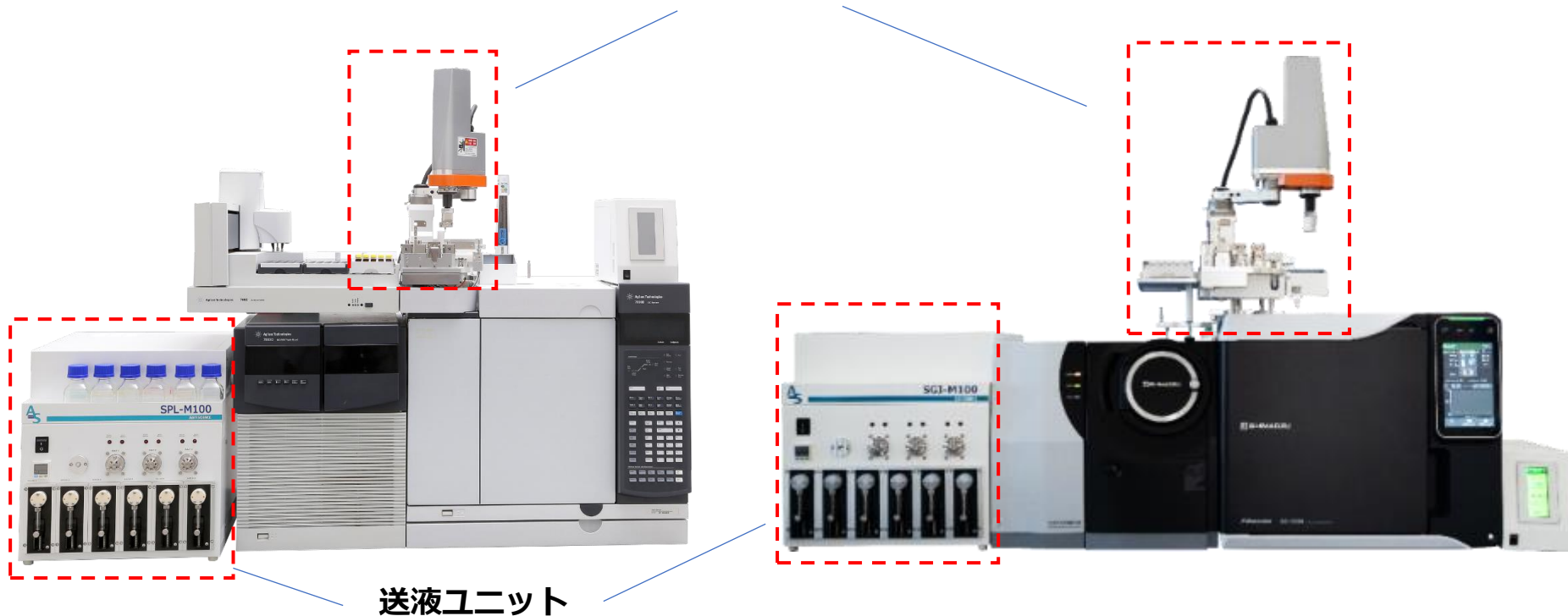
アセトニトリル-水 抽出 (本法)



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 μ 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 μ m

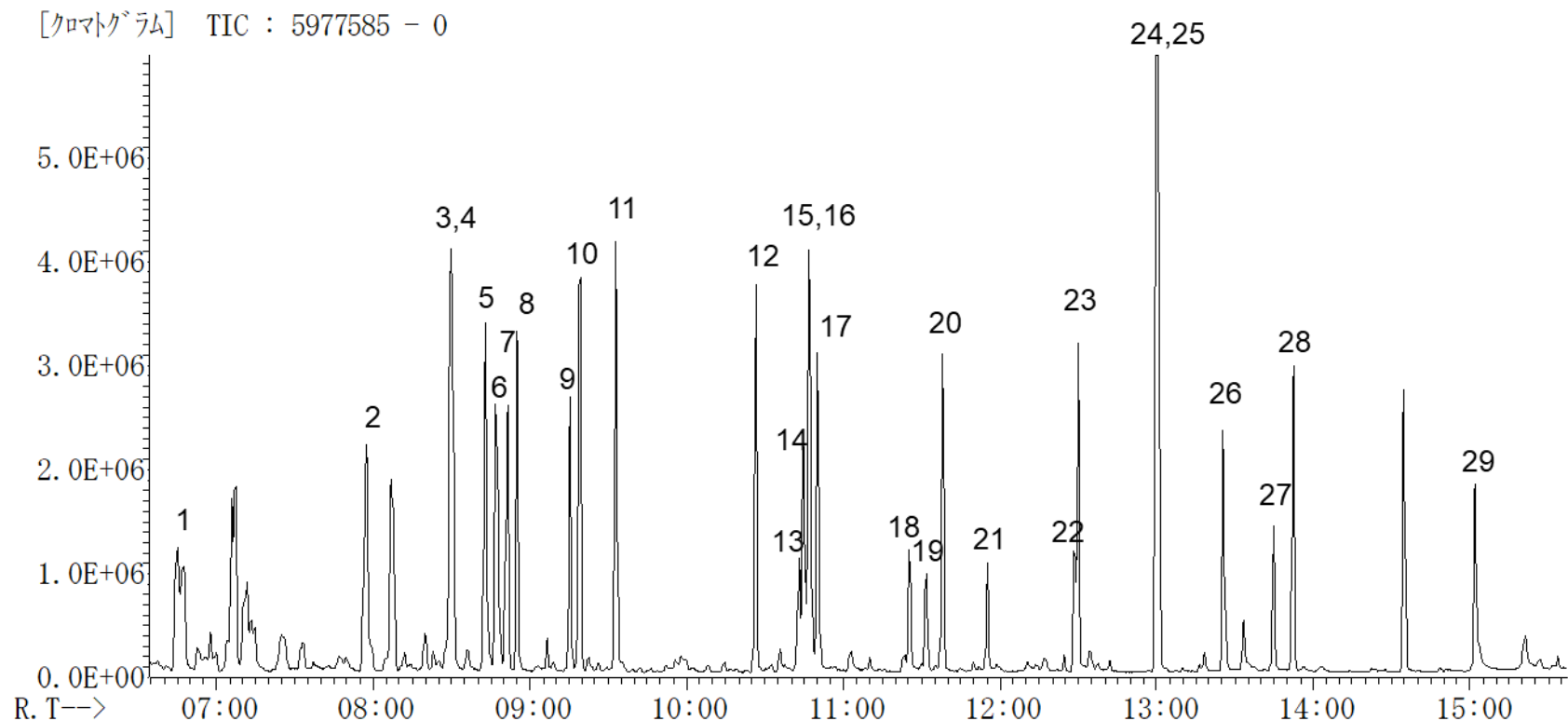
Oven Temp. **100°C(2min)**-10°C/min-220°C-30°C/min-310°C(4.7min)

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/ μ L

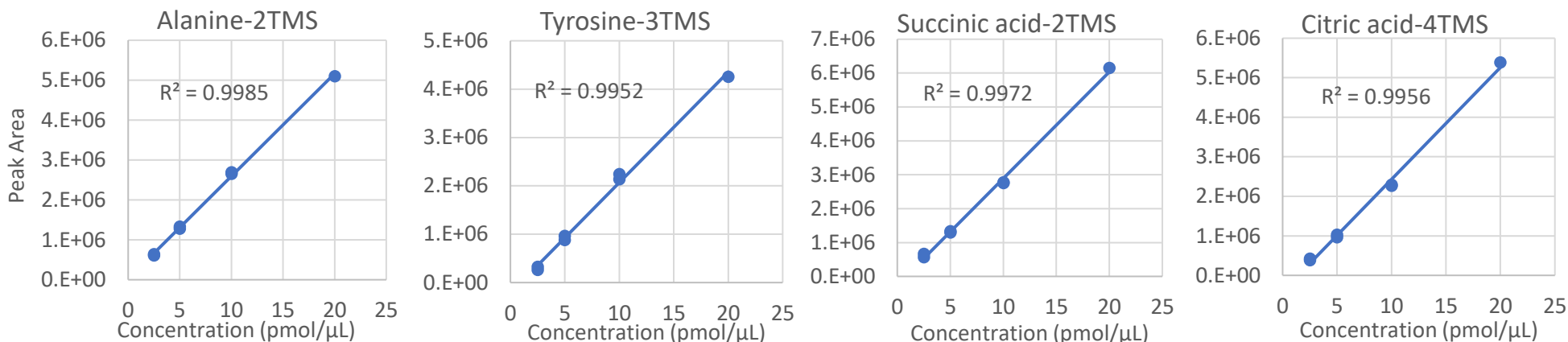
本法による標準溶液の再現性

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 μ L

— 添加 ACN 500 μ L

振とう (37 $^{\circ}$ C, 1 min)

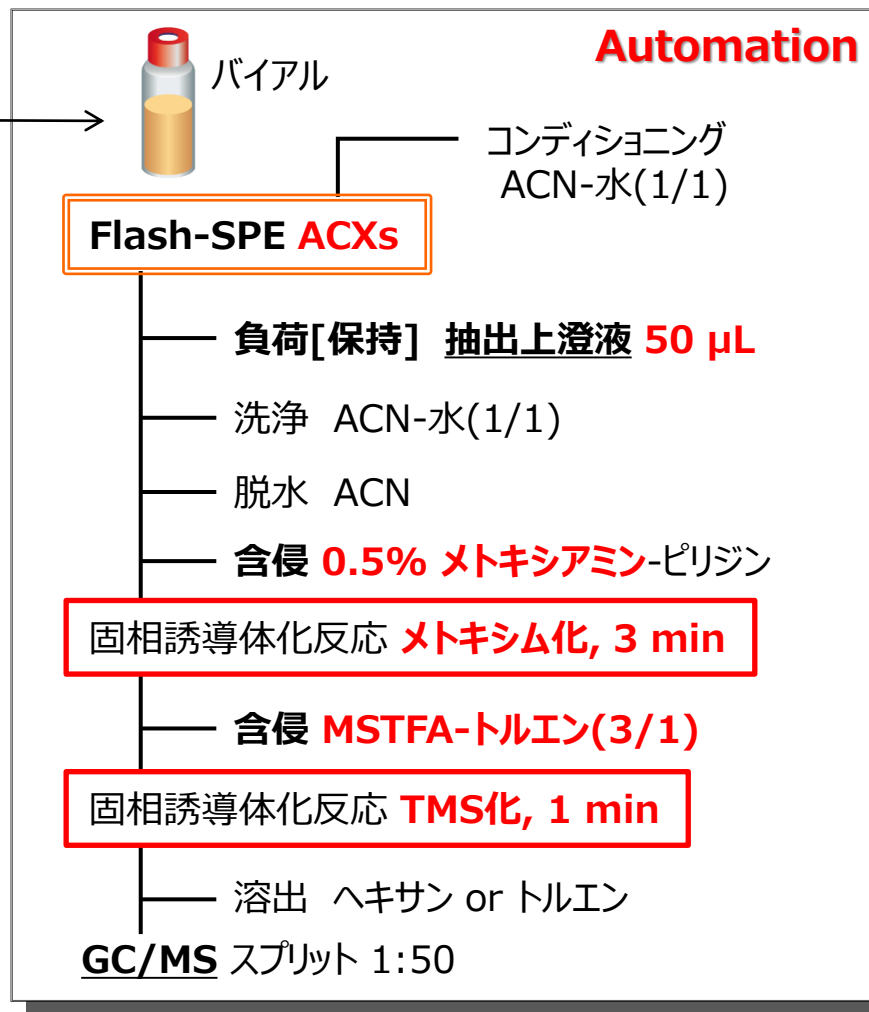
遠心分離 14000 rpm, 3 min

— 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。

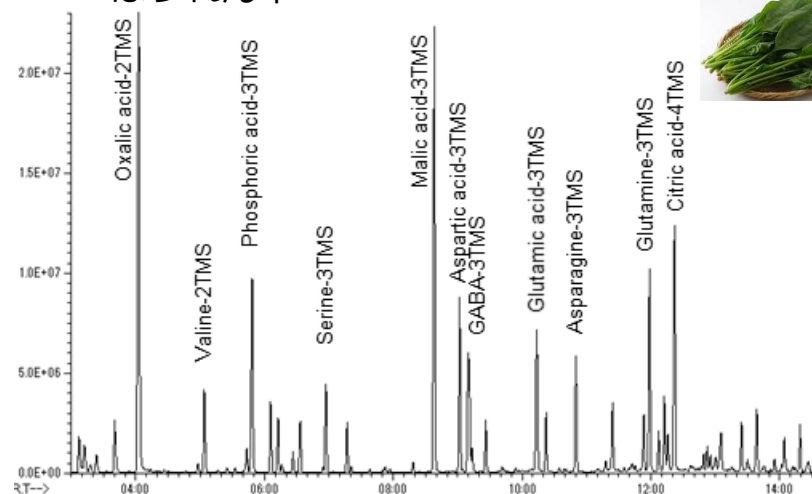
B. トマト

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。

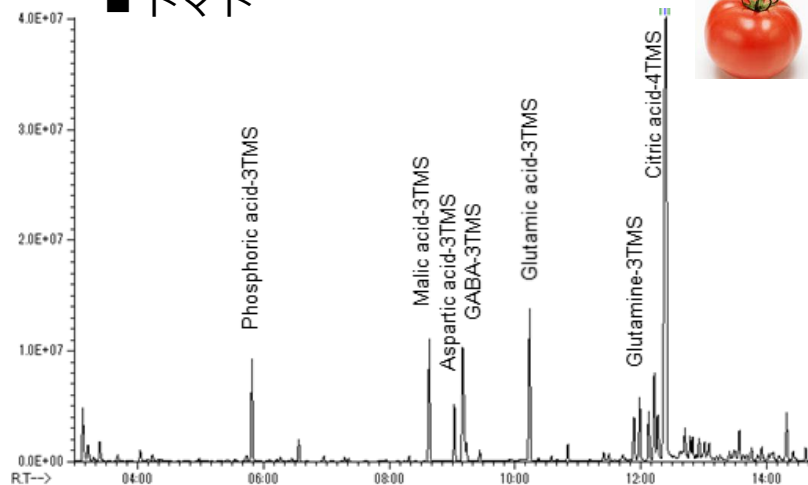
C. うめ

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。

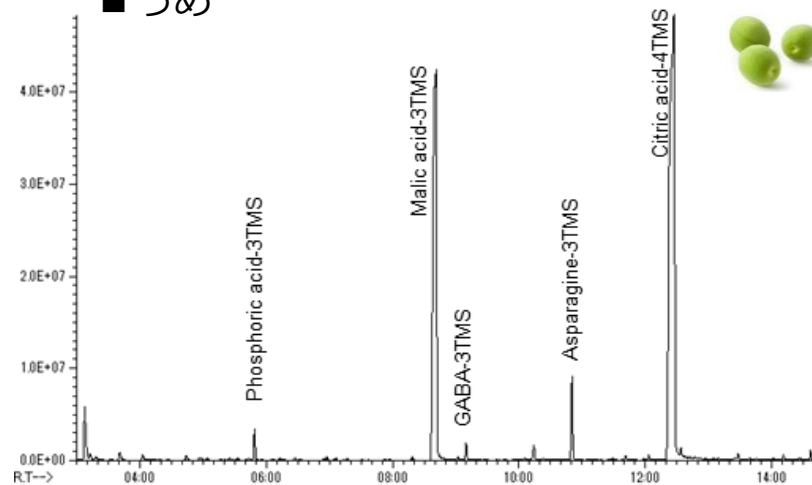
■ ほうれん草



■ トマト



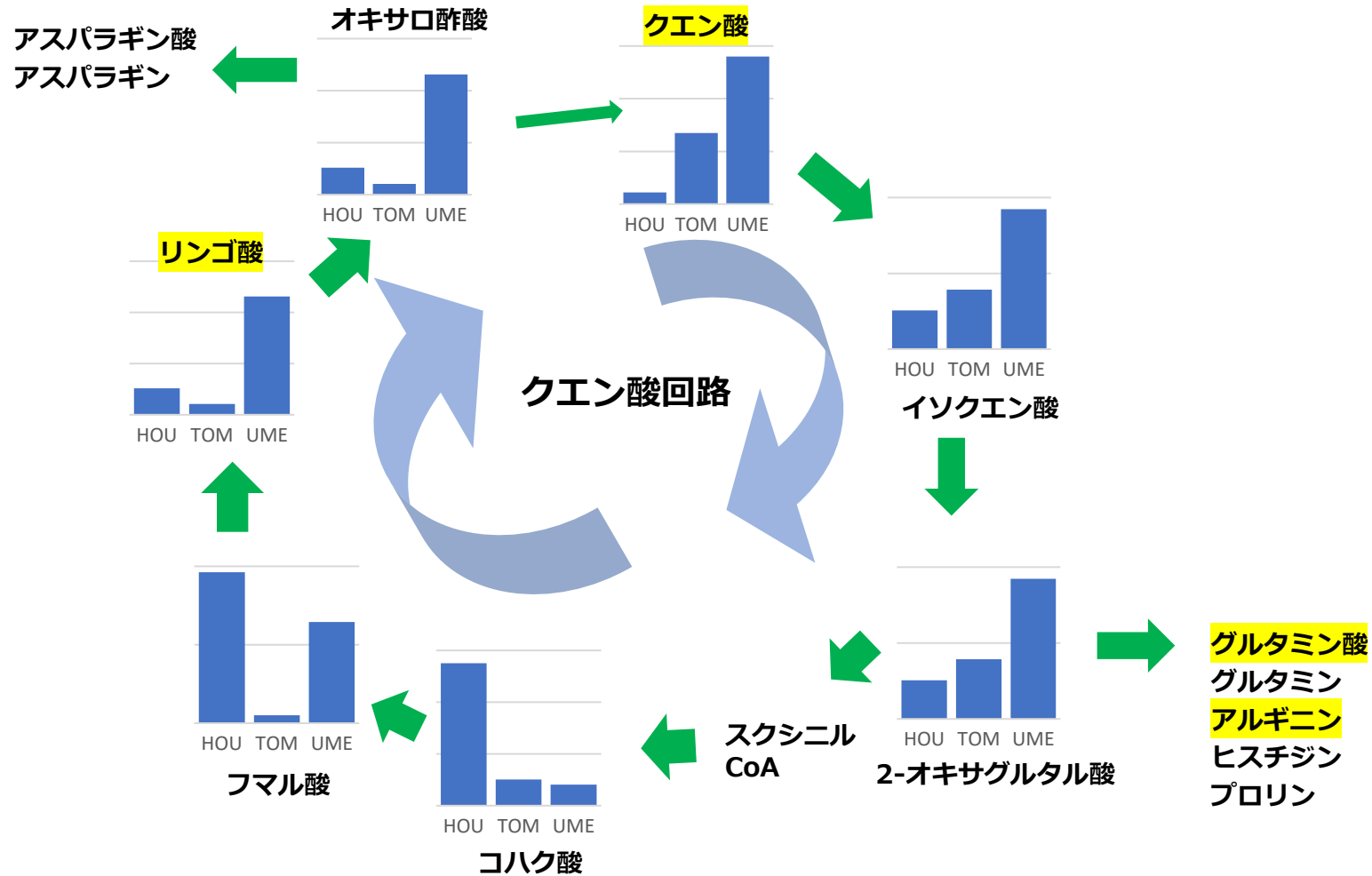
■ うめ



各農作物の成分量比較

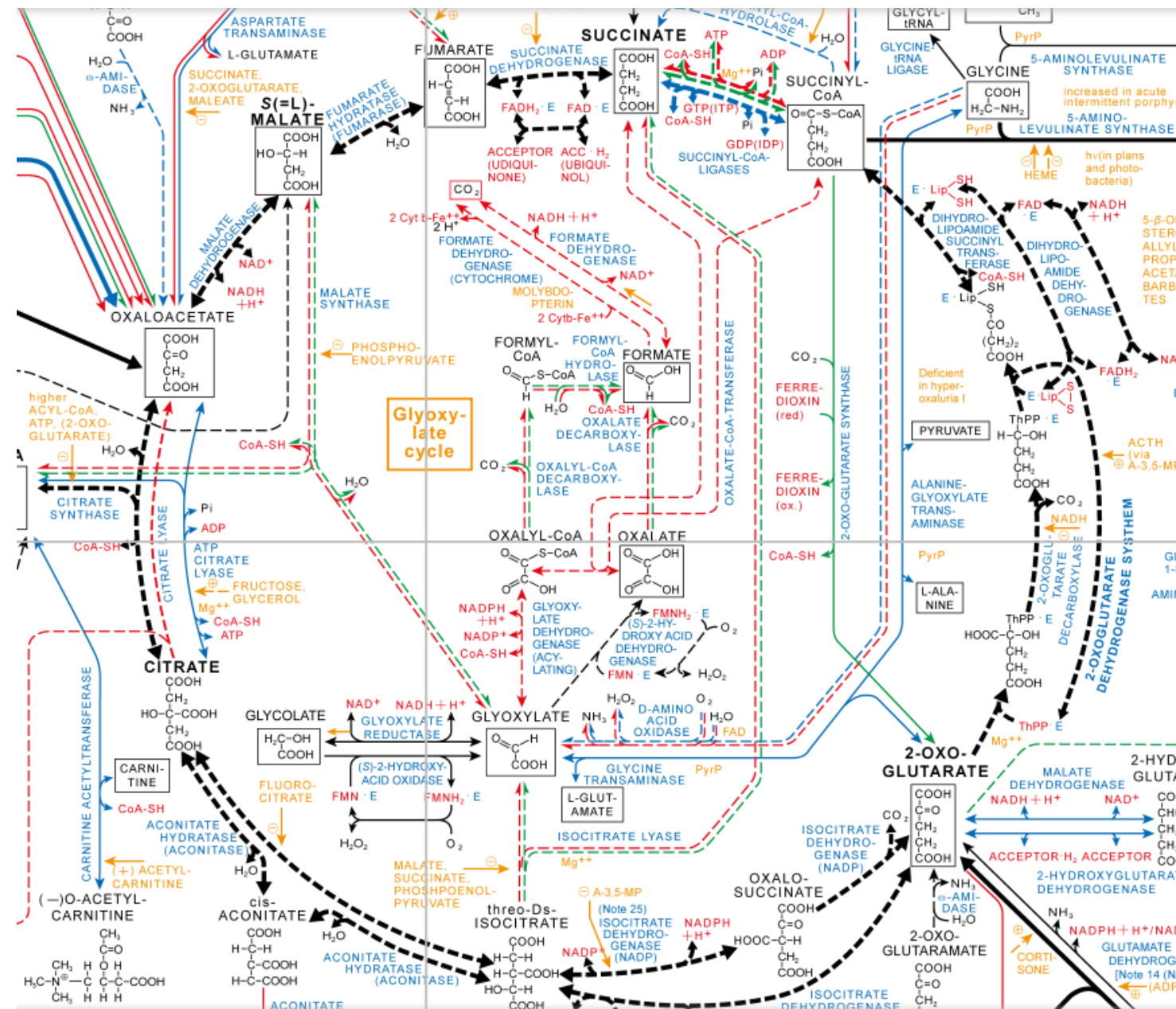


代謝マップ



追加資料

Rocheの代謝マップ



抽出：血清/血漿

試料採取 50 μ L

添加 水 150 μ L

振とう

添加 アセトニトリル 800 μ 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 μ L

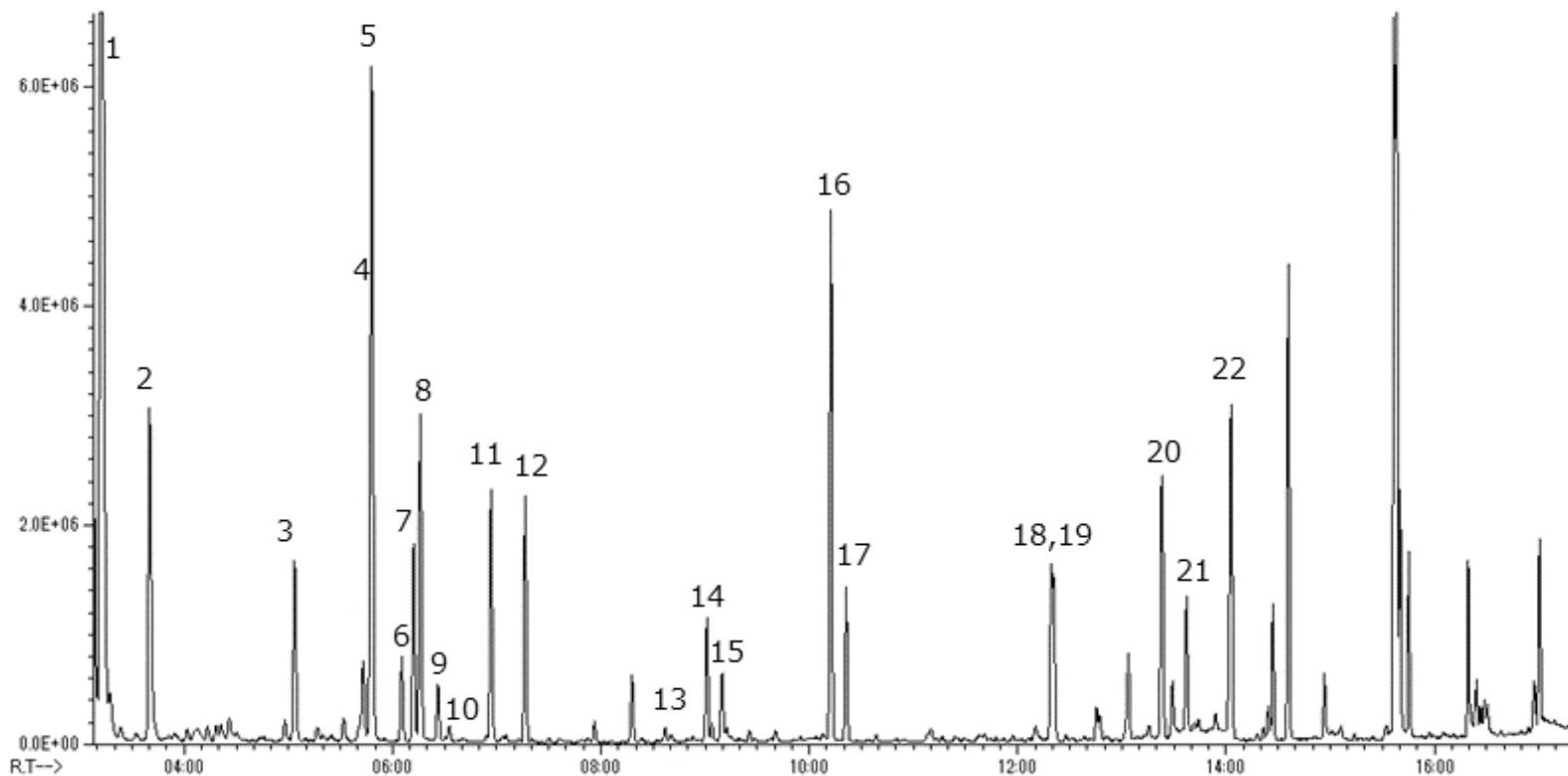
添加 水 500 μ L

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 | ⑬ Glutamic acid-3TMS | ⑰ Tyrosine-3TMS |
| ② Alanine-2TMS | ⑦ Proline-2TMS | ⑫ Threonine-3TMS | ⑭ Phenylalanine-2TMS | ⑱ Gluconic acid-6TMS |
| ③ Valine-2TMS | ⑧ Glycine-3TMS | ⑬ Malic acid-3TMS | ⑮ Ornithine-4TMS | |
| ④ Leucine-2TMS | ⑨ Succinic acid-2TMS | ⑭ Aspartic acid-3TMS | ⑯ Citric acid-4TMS | |
| ⑤ Phosphoric acid-3TMS | ⑩ Glyceric acid-3TMS | ⑮ Pyroglutamic acid-2TMS | ⑰ 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 μL

添加 水 190 μL

添加 アセトニトリル 800 μL

振とう (1 min)



遠心分離 14000 rpm, 2 min

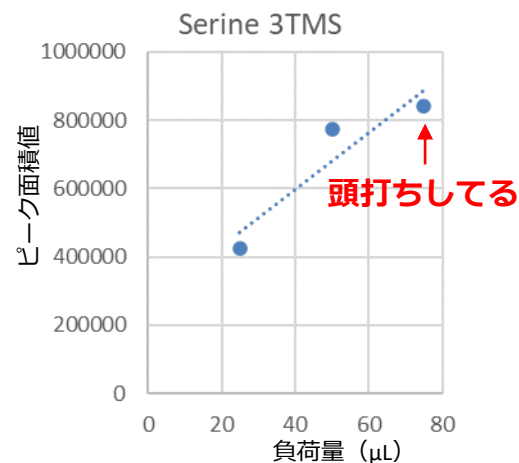
添加 0.1N NaOH

抽出上澄液

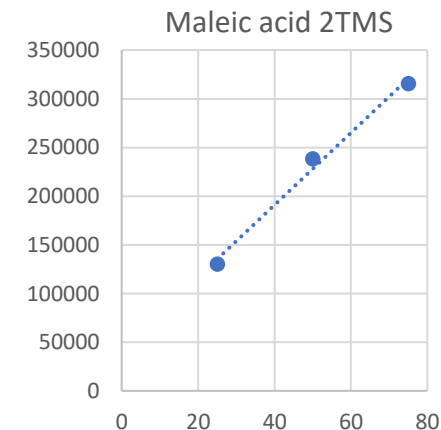
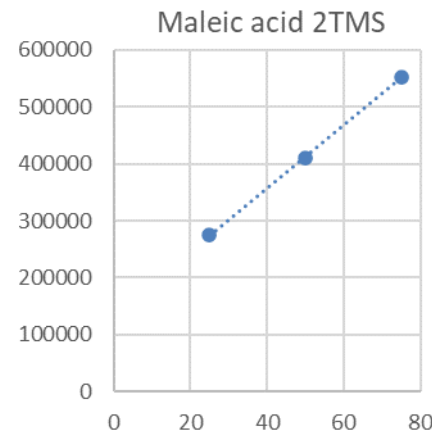
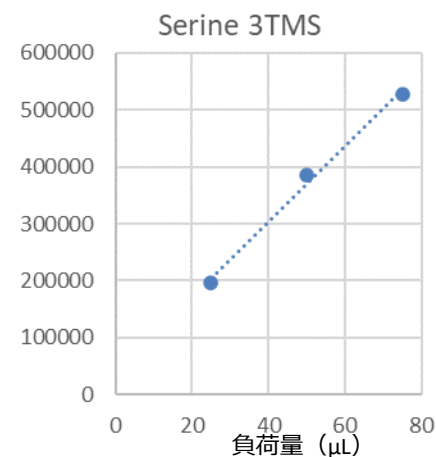


■ 負荷量試験：固相への負荷量を25, 50, 75 μL でのピーク面積値

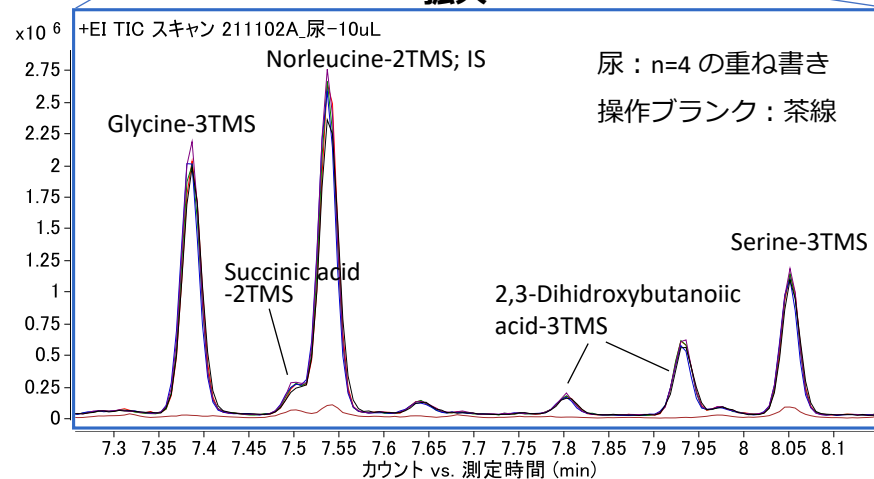
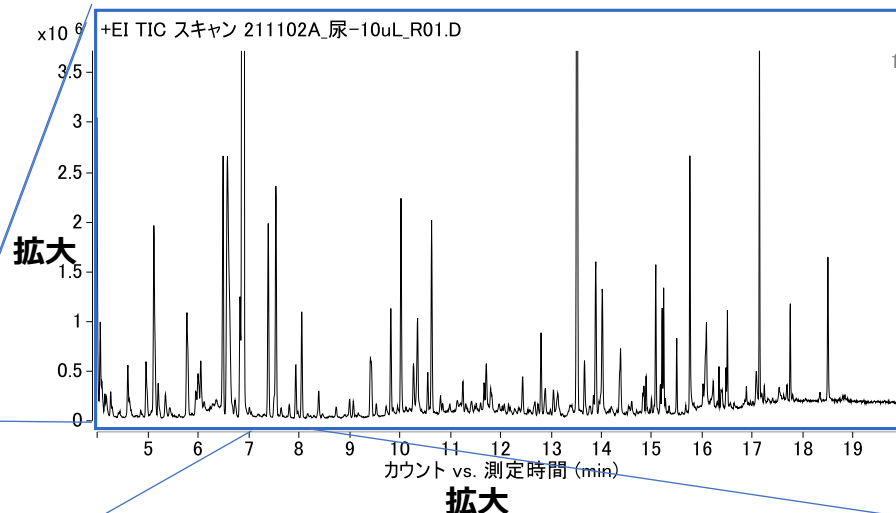
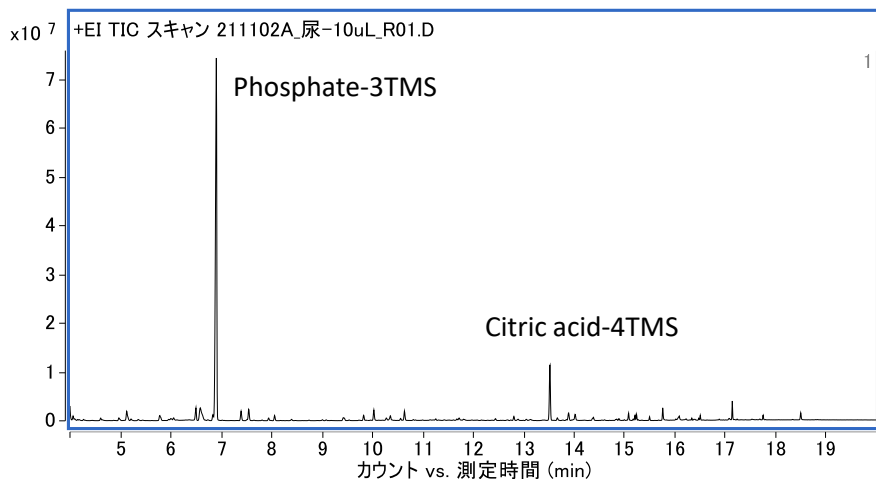
50 μL 採取×2倍希釈



10 μL 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

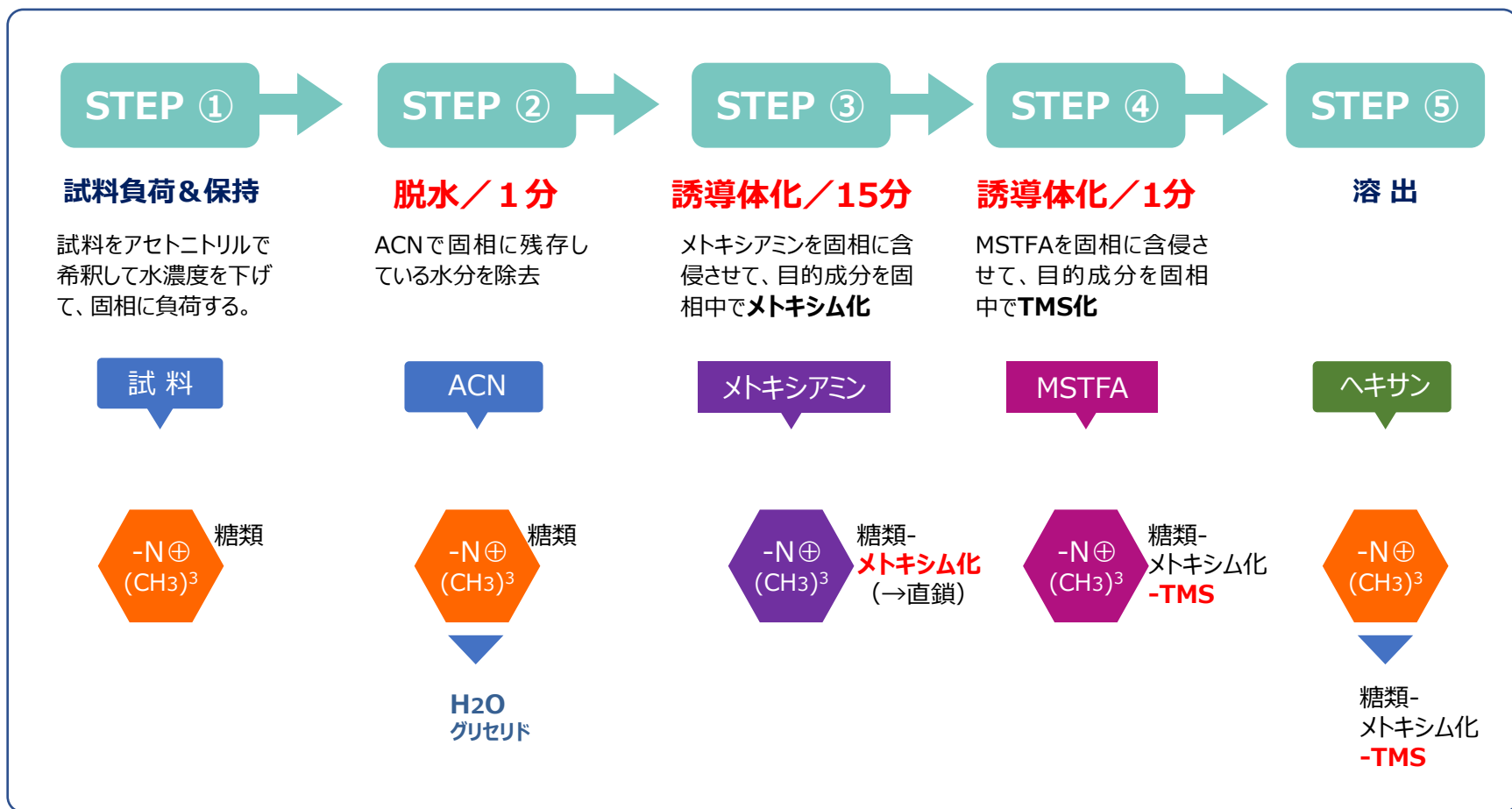
化合物名	1	2	3	4	Ave.	RSD, %
Alanine-2TMS	454,237	451,129	467,421	477,468	462,564	2.6
Valine-2TMS	63,877	59,890	62,083	64,867	62,679	3.5
Leucine-2TMS	45,276	41,099	40,934	43,398	42,676	4.8
Isoleucine 2TMS	20,450	19,162	17,851	18,615	19,020	5.8
Proline 2TMS	26,797	22,814	24,906	20,508	23,756	11.4
Glycine 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。

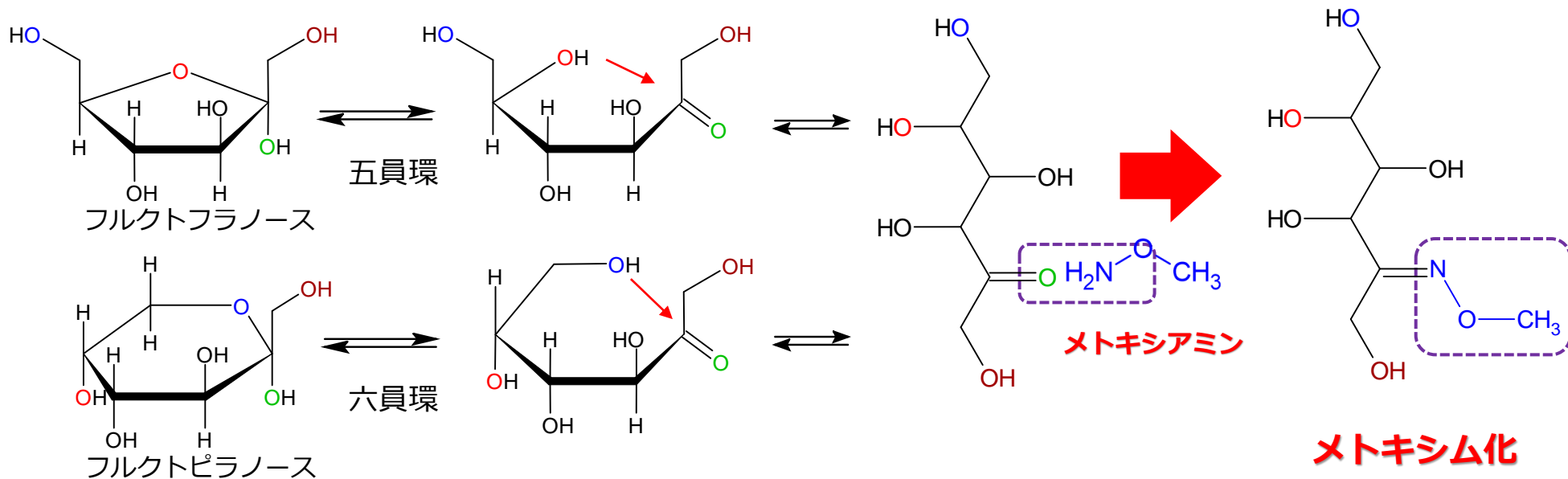
固相誘導体化法：糖類



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

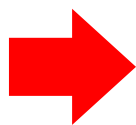
■フルクトースの場合



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

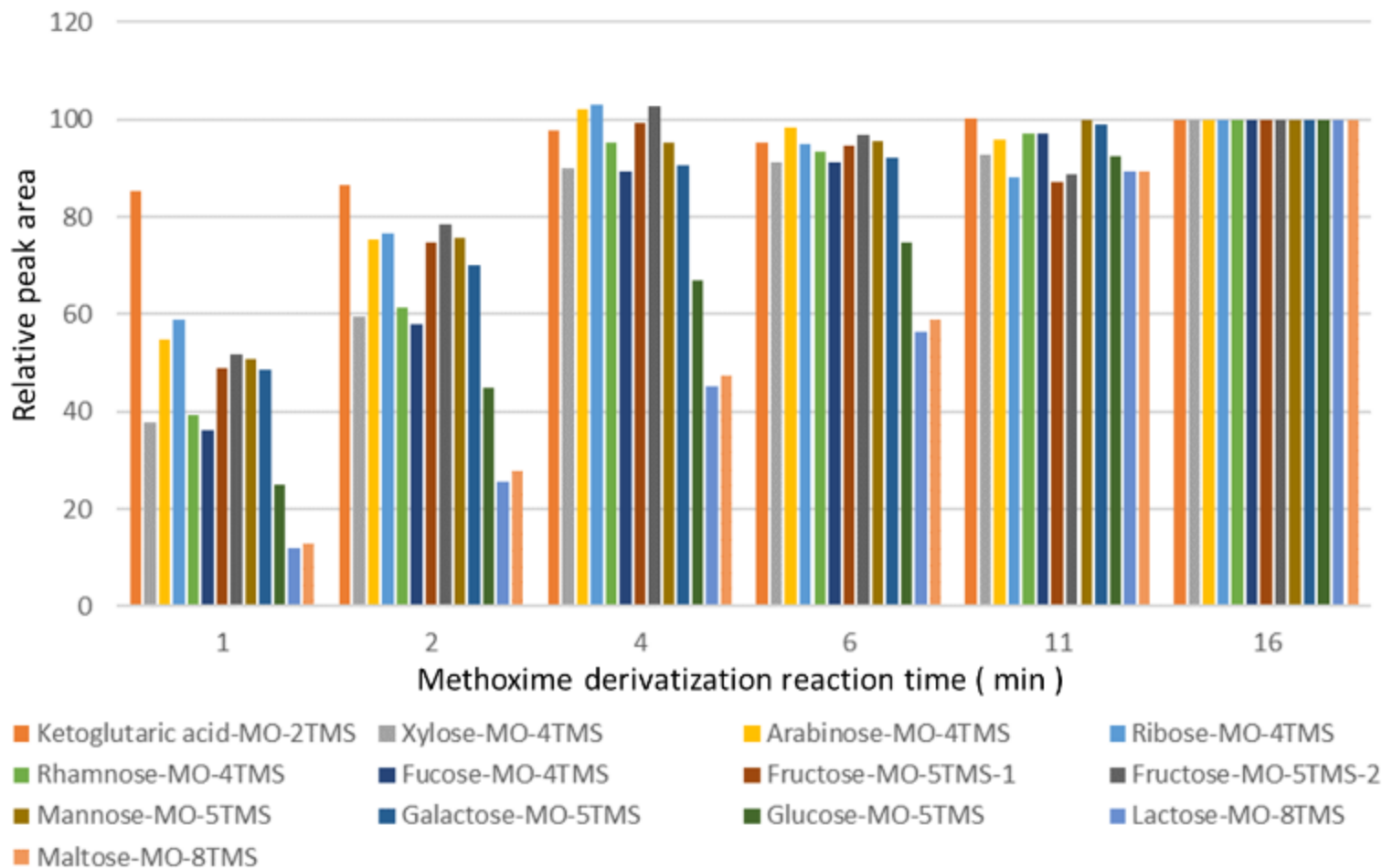
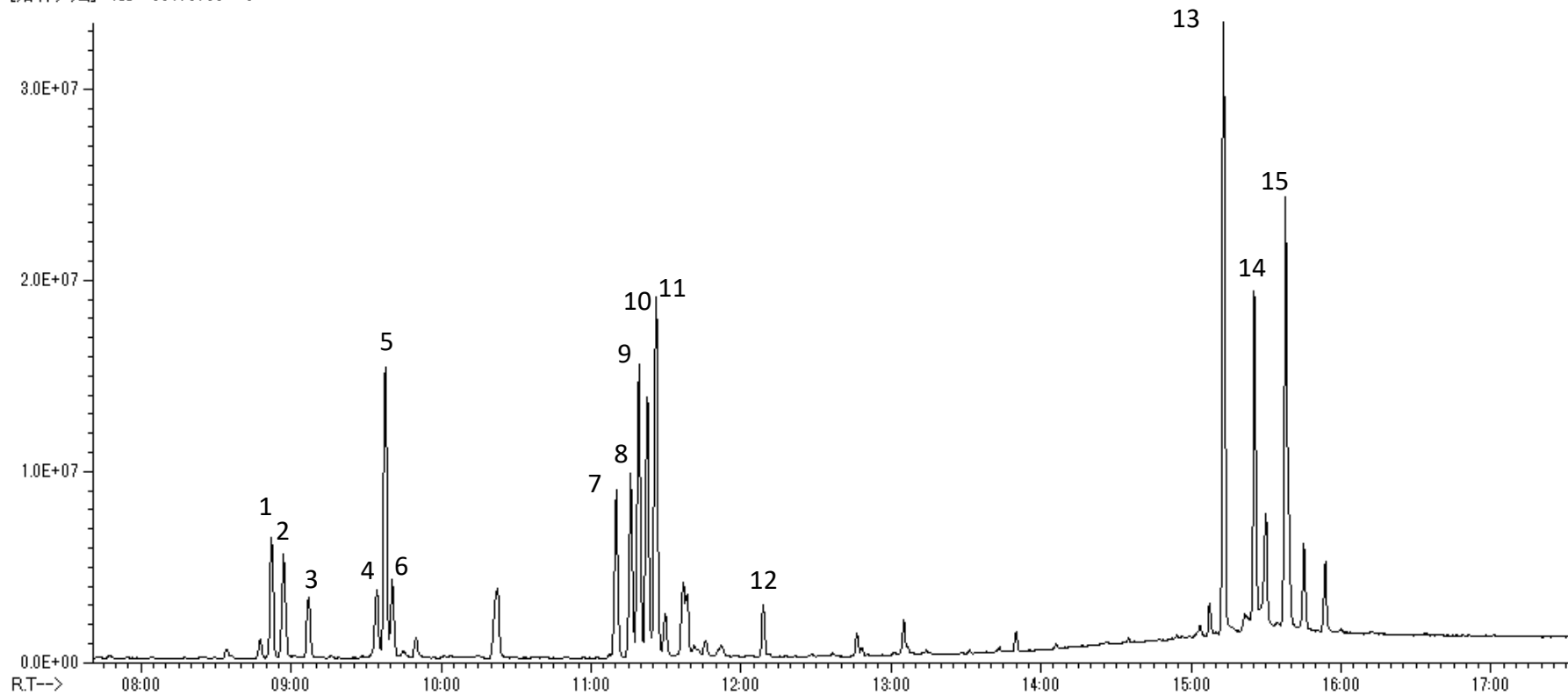


Fig. 3. Relations of methoxime derivatization reaction time in sorbent and the relative peak area

本システムによる糖類のSCAN-TIC

【クロマトグラム】 TIC : 33473768 - 0

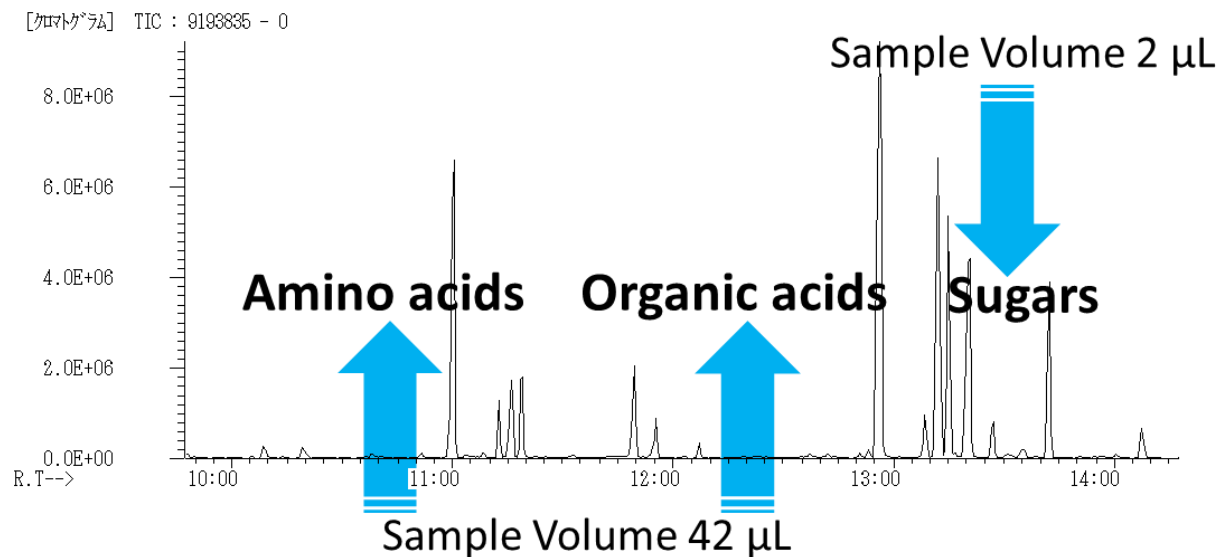
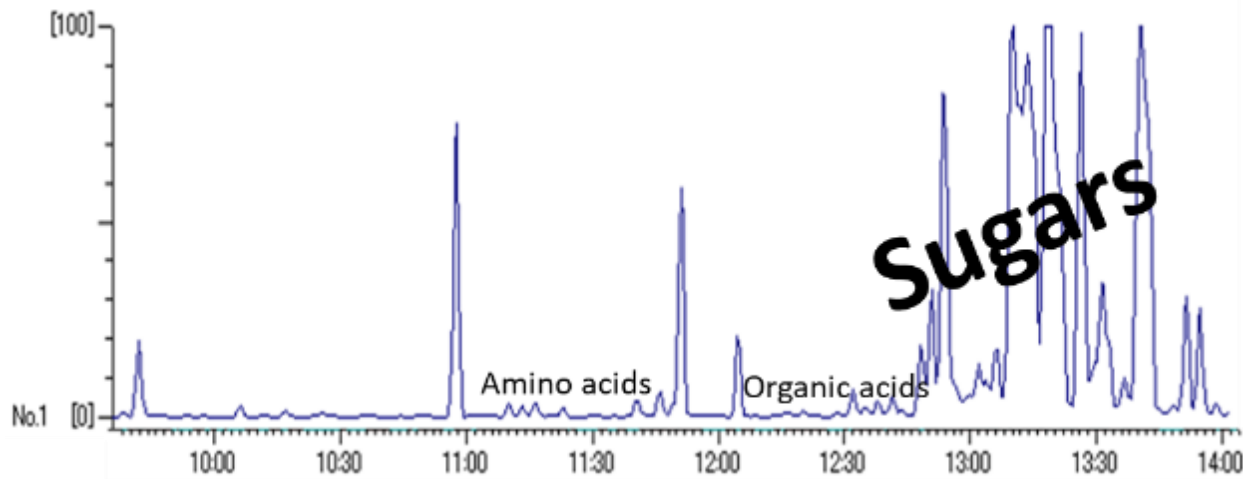


1	Xylose-MO-4TMS
2	Arabinose-MO-4TMS
3	Ribose-MO-4TMS
4	Rhamnose-MO-4TMS
5	Ribitol-5TMS

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 μ L

└ 添加 水 150 μ L
手振とう

└ 添加 ACN 800 μ 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 μ L**

洗浄 ACN-水(1/1)

脱水 ACN

負荷[保持] **抽出上澄液 3 μ 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

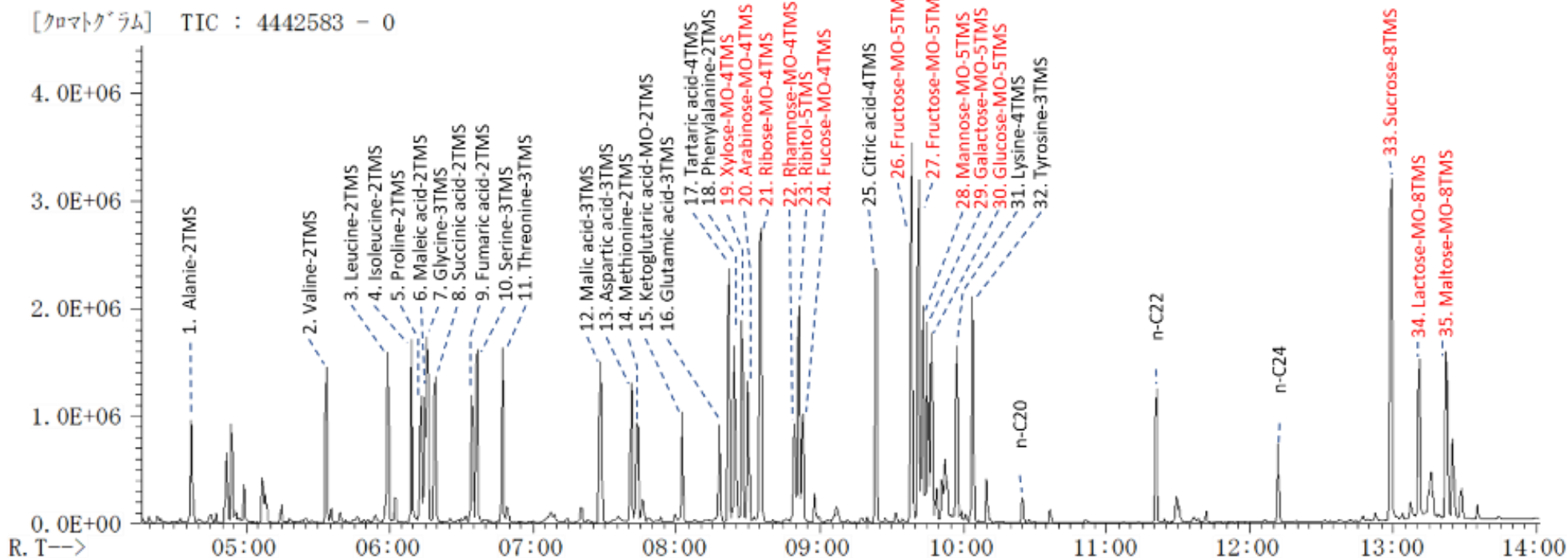


Fig. 2. The SCAN total ion chromatogram of standard solution using SPE-GC-MS system with automated solid-phase derivatization method

* Concentration of **amino acids and organic acids** standard solution is **0.02nmol/ μ L**

* Concentration of **sugars** standard solution is **0.2nmol/ μ L**

野菜ジュースのSCAN-TIC

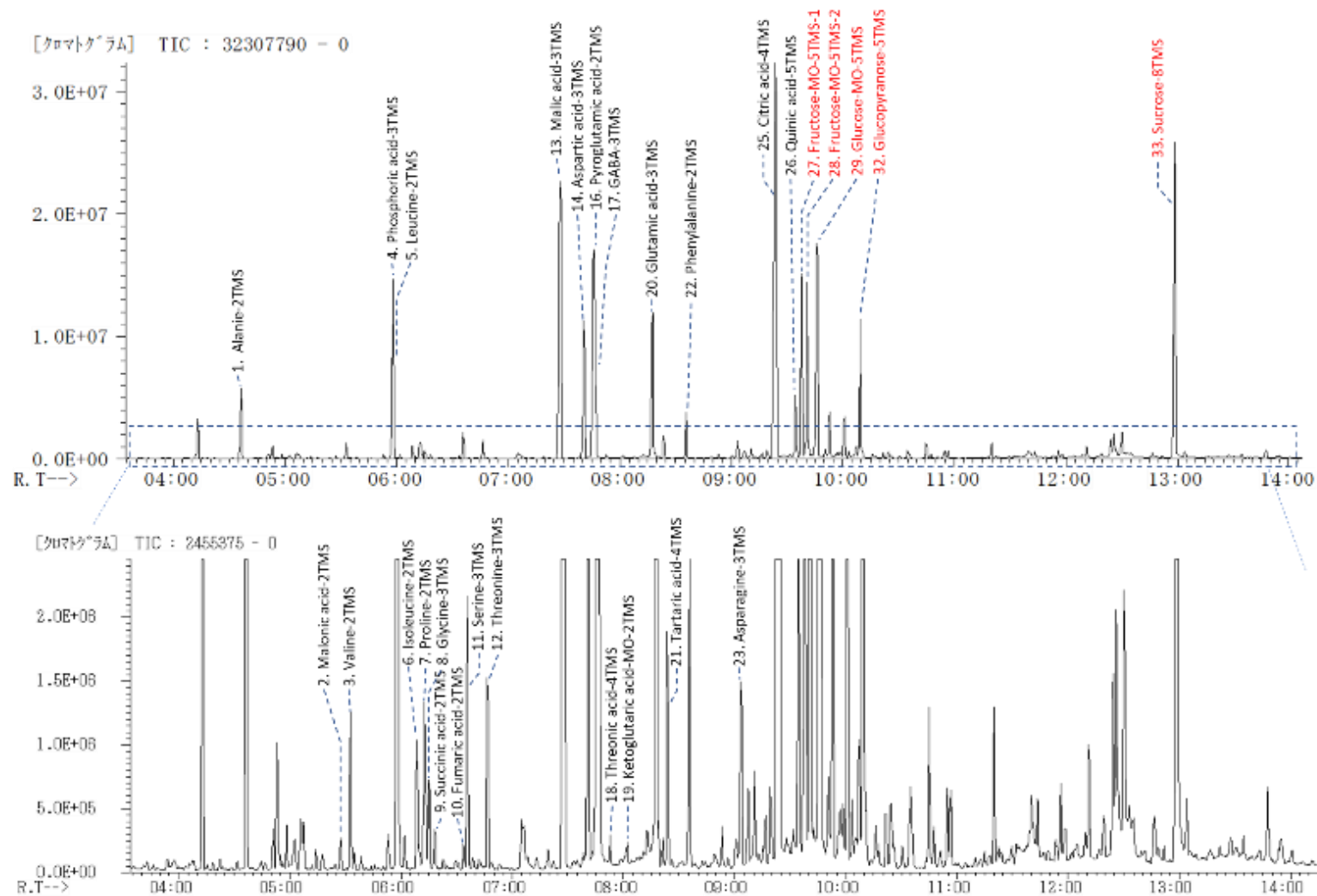
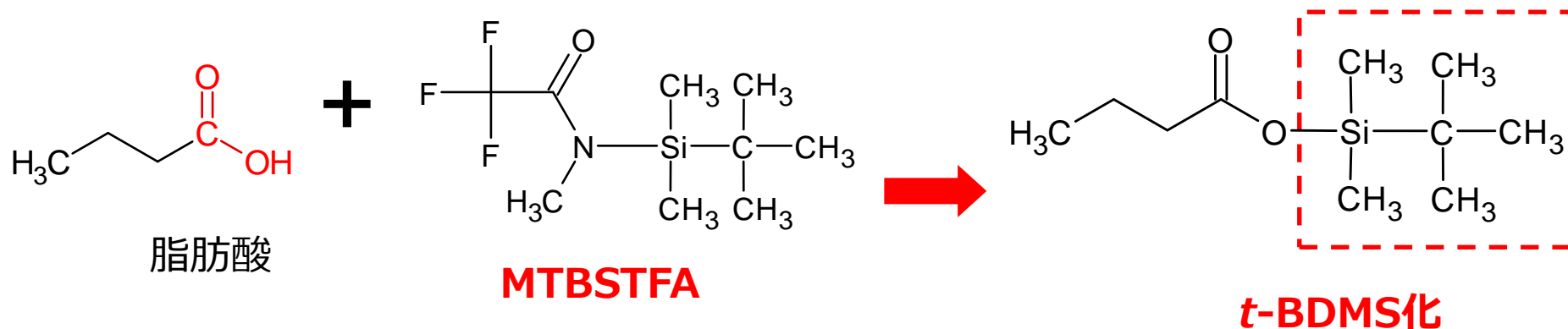


Fig. 4. The SCAN total ion chromatogram of the Vegetable juice using SPE-GC-MS system with automated solid-phase derivatization method

短鎖脂肪酸の t-BDMS誘導体化

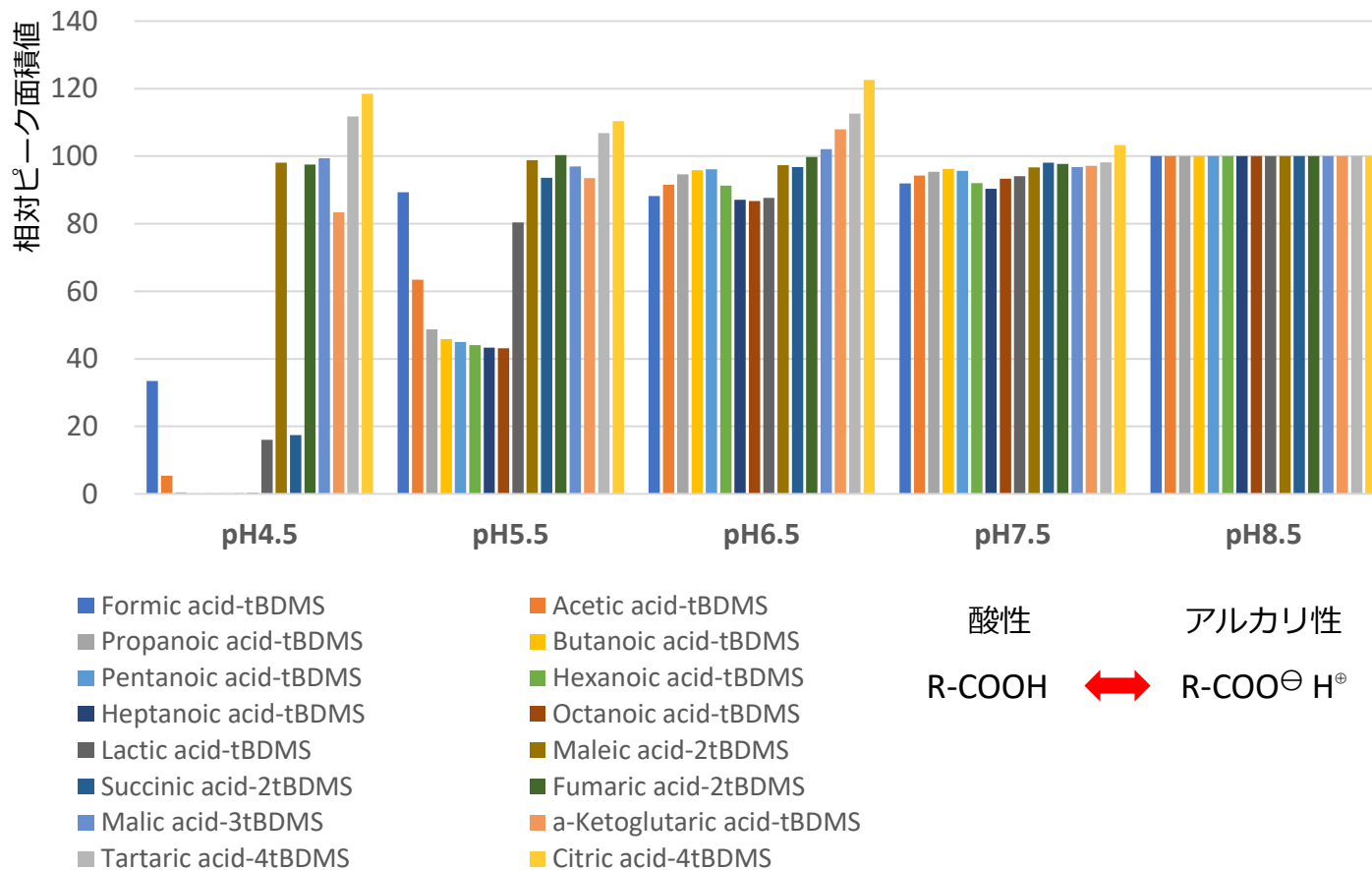
t-BDMS(**t-Butyl DiMethyl Silyl**)化



- 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。

抽出液のpH調整について

- 抽出液にNaOH水を添加してpHを8（7～9）ぐらいに調整する



- 1 Formic acid pKa = 3.7
- 2 Acetic acid pKa = 4.6
- 3 Propanoic acid pKa = 4.8
- 4 Butanoic acid pKa = 4.8
- 5 Pentanoic acid pKa = 4.8
- 6 Hexanoic acid pKa = 5.1
- 7 Heptanoic acid pKa = 5.1
- 8 Lactic acid pKa = 3.8
- 9 Octanoic acid pKa = 5.2
- 10 Maleic acid pKa = 3.1
- 11 Succinic acid pKa = 3.5
- 12 Fumaric acid pKa = 3.6
- 13 Malic acid pKa = 3.2
- 14 a-Ketoglutaric acid
- 15 Tartaric acid pKa = 2.7
- 16 Citric acid pKa = 3.0

測定条件：短鎖脂肪酸

SPE-GC Interface SPL-M100 (AiSTI Science)

SPE Cartridge Flash-ACX

Sampling Volume 50 μ 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 μ m

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

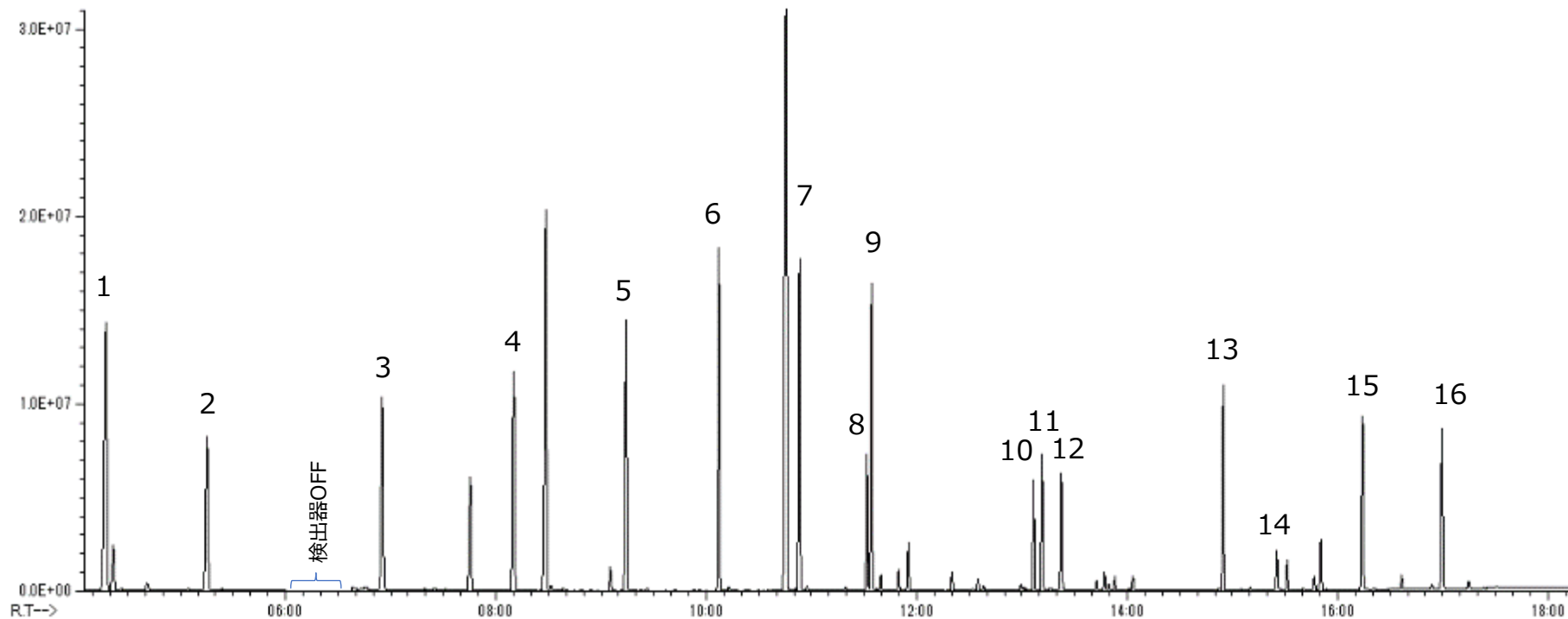
Trans. Line Temp. 290°C

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

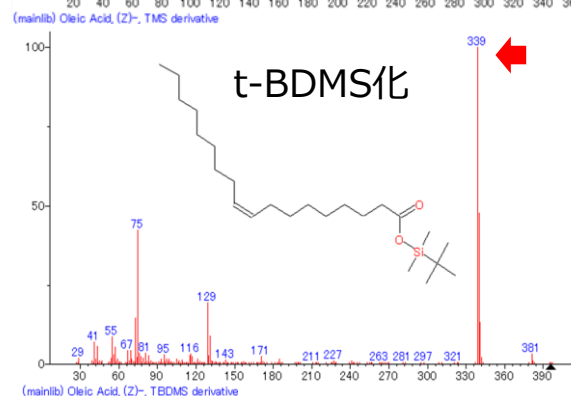
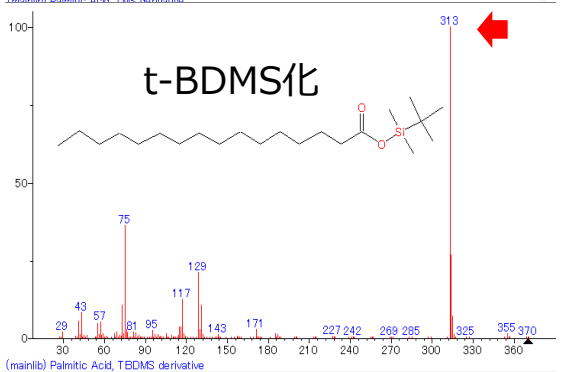
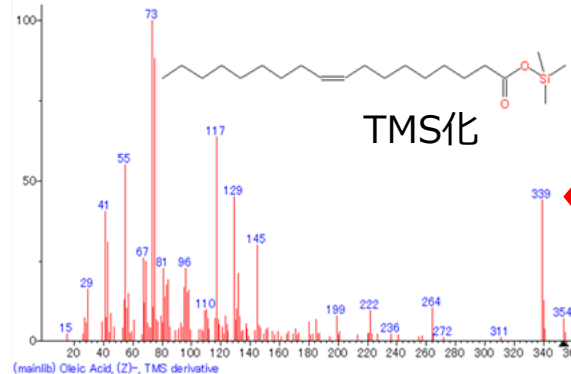
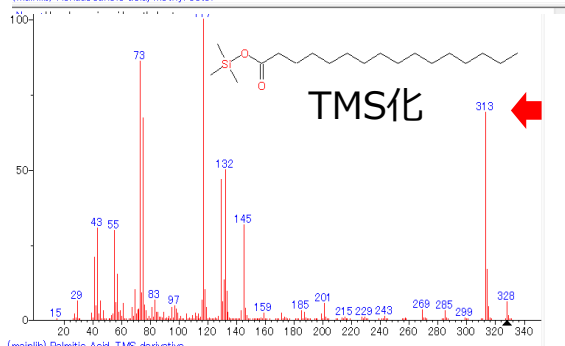
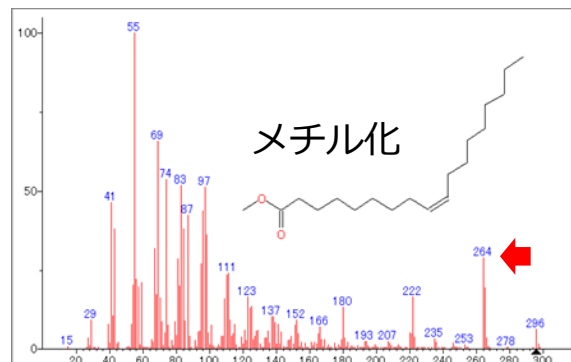
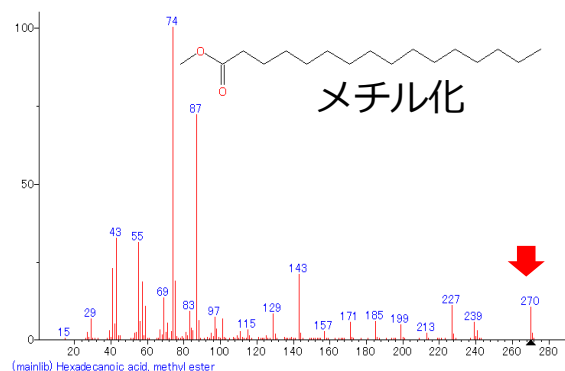
13. Malic acid-3tBDMS
14. a-Ketoglutaric acid-3tBDMS
15. Tartaric acid-4tBDMS
16. Citric acid-4tBDMS

長鎖脂肪酸のメチル化とTMS化とt-BDMS化

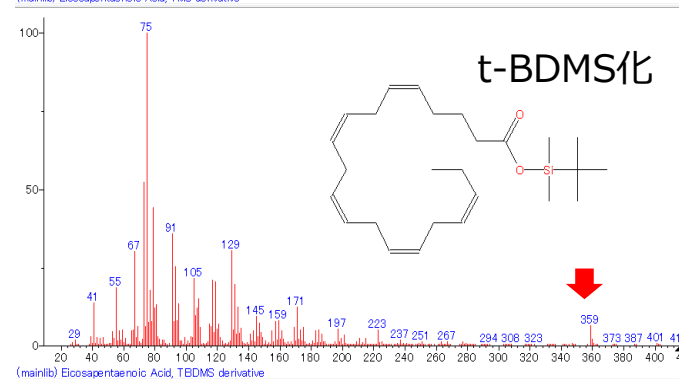
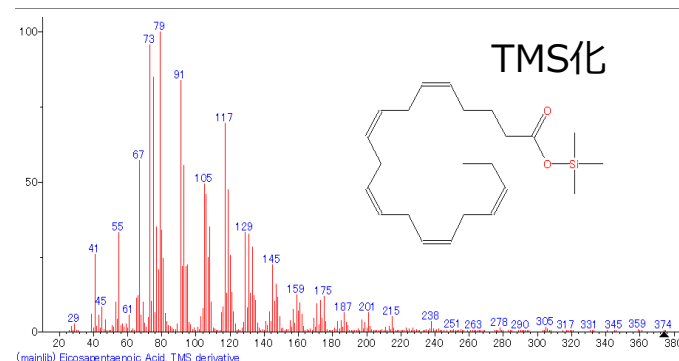
パルミチン酸

オレイン酸

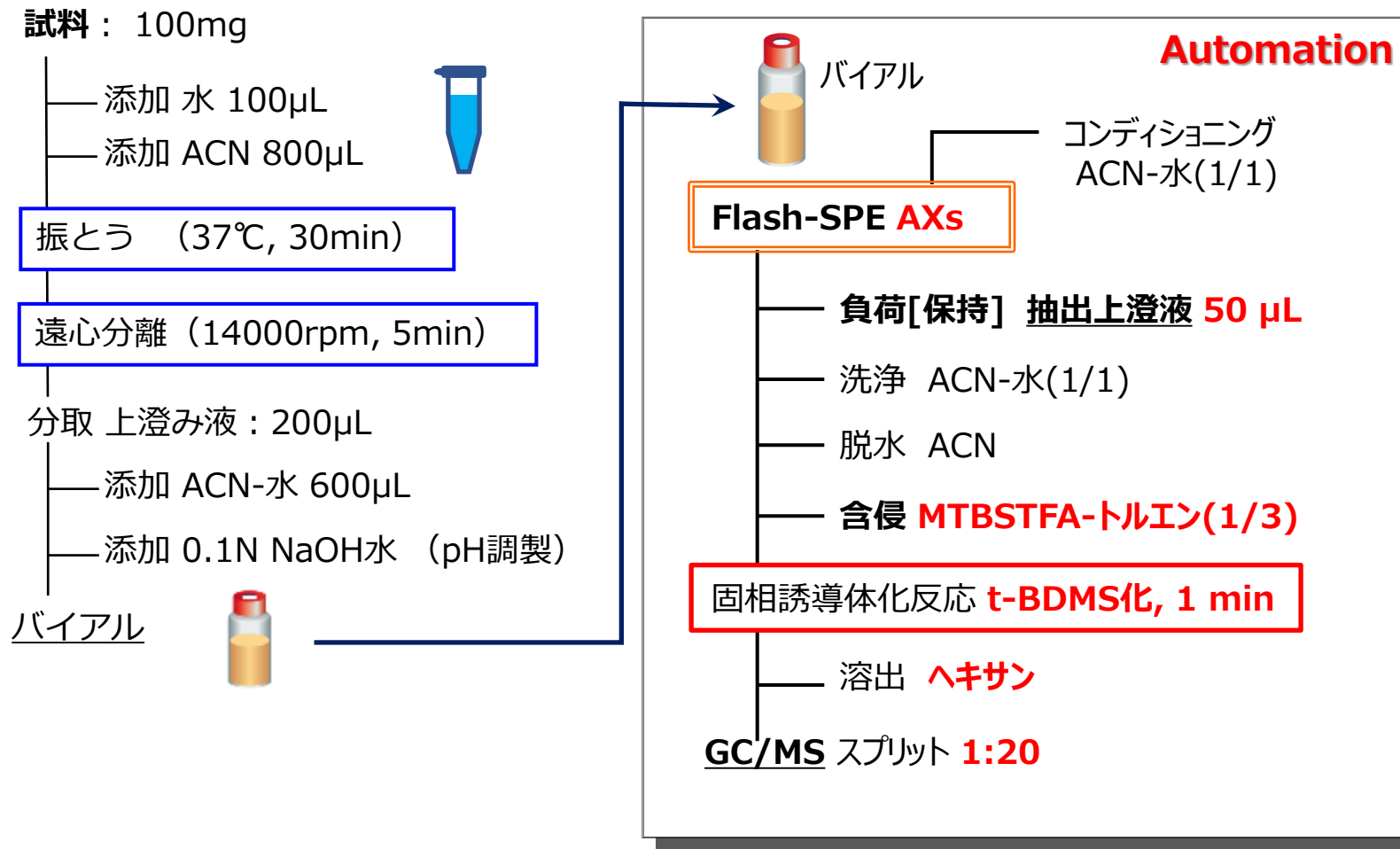
メチル化よりTMS化やt-BDMS化の方が高質量域での強度の高いフラグメントイオンが検出される。



EPA



ブルーチーズの t-BDMS誘導体化による分析



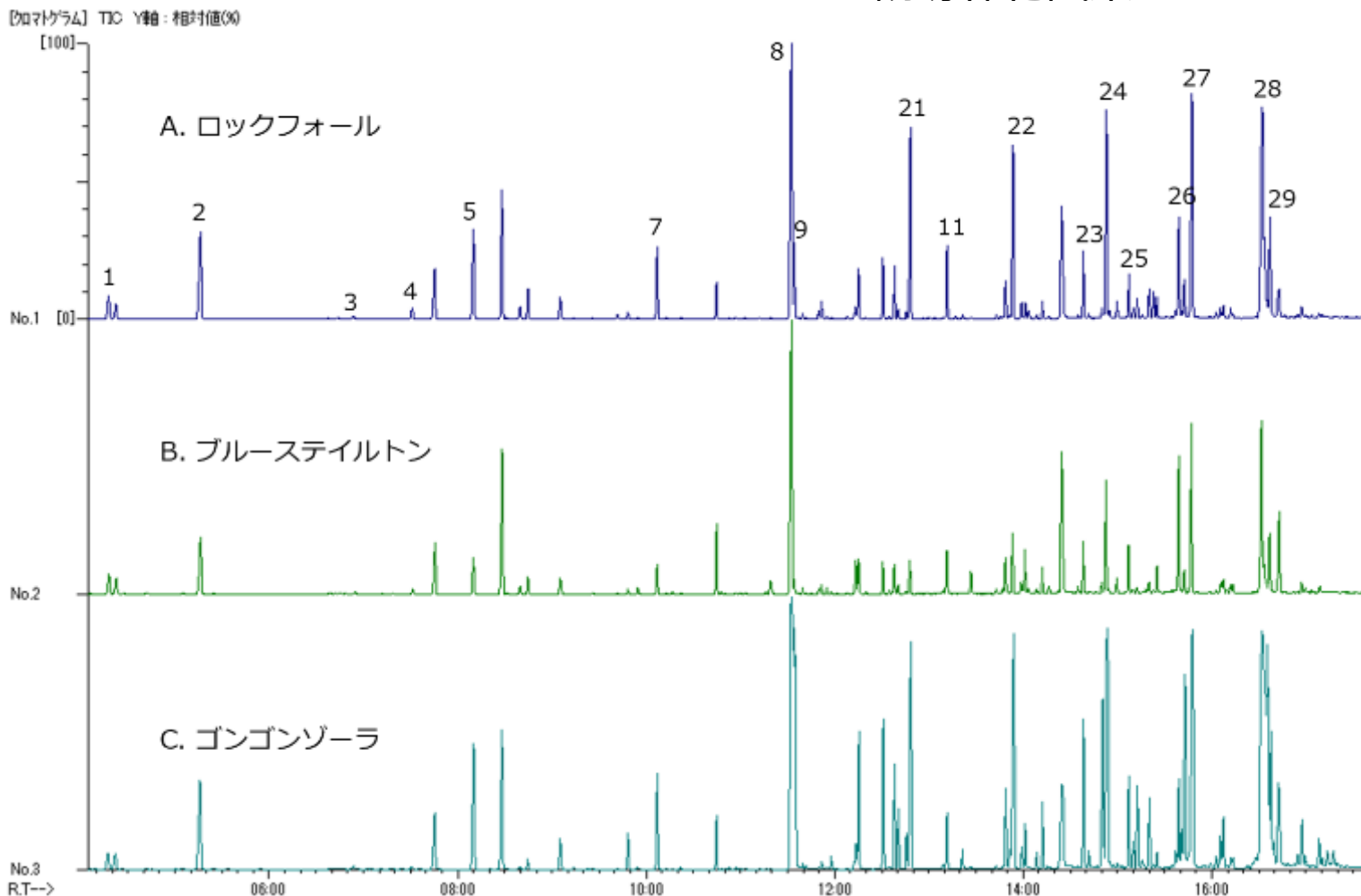
ブルーチーズ3種のSCANトータルイオンクロマトグラム比較

誘導體化試薬：MTBSTFA

試料：ブルーチーズ3種



C B A



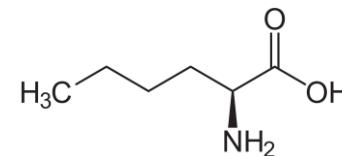
- 1 Formic acid-tBDMS
- 2 Acetic acid-tBDMS
- 3 Propionic acid-tBDMS
- 4 Butyric acid-tBDMS
- 5 Valeric acid-tBDMS
- 7 Enanthic acid-tBDMS
- 8 Lactic acid-2tBDMS
- 9 Octanoic acid-tBDMS
- 11 Succinic acid-2tBDMS
- 21 Decanoic acid-tBDMS
- 22 Dodecanic acid-tBDMS
- 24 Tetradecanoic acid-tBDMS
- 25 Aspartic 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

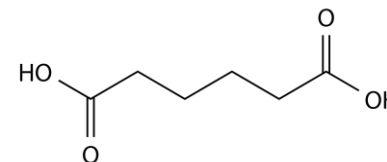
従来法では2-イソプロピルリンゴ酸 (Isopropyl malic acid)や
 リビトールなどが使用されていますが、

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。

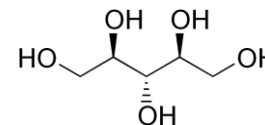
アミノ酸：ノルロイシン



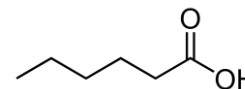
有機酸：アジピン酸



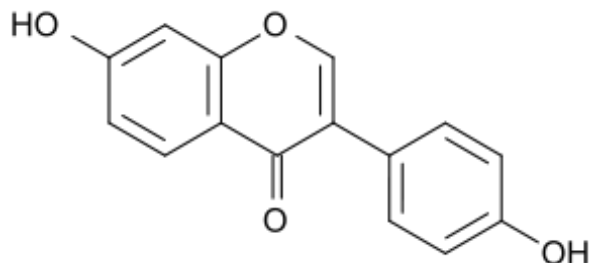
糖類：リビトール



短鎖脂肪酸：ヘキサン酸-d (検討中)



ダイゼイン類

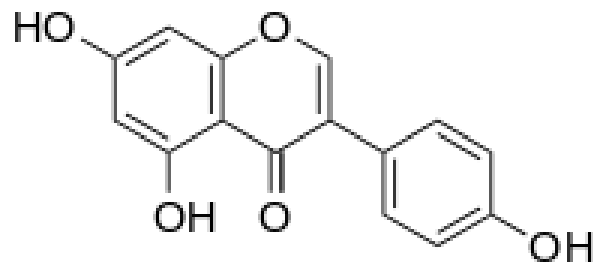


Daidzein

MW:254.2

Daidzein-2TMS

MW:398

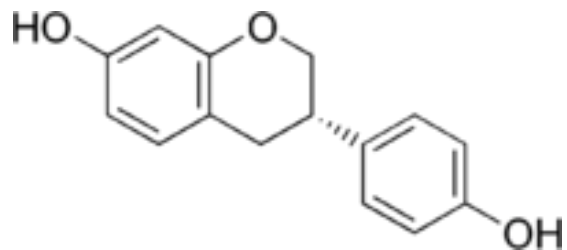


Genistein

MW:270.2

Genistein-3TMS

MW:486



Equol

MW:242.2

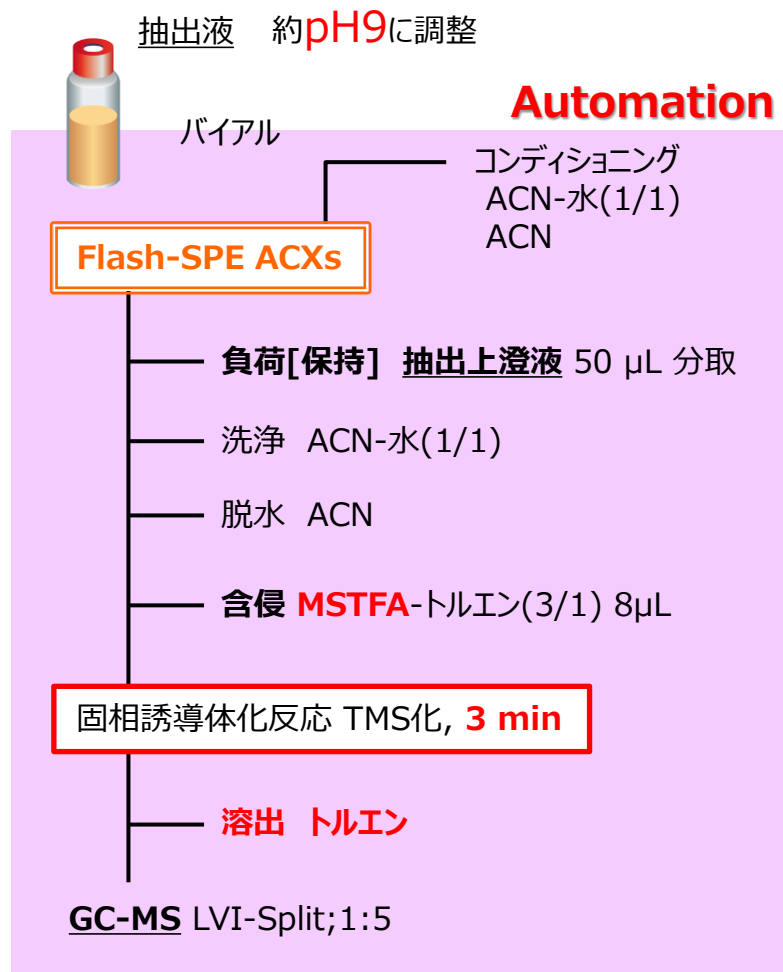
Equol-2TMS

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、イソフラボン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 μ 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 μ m
Oven Temp. 120°C(3min)-40°C/min-280°C-10°C/min
-320°C(2min)

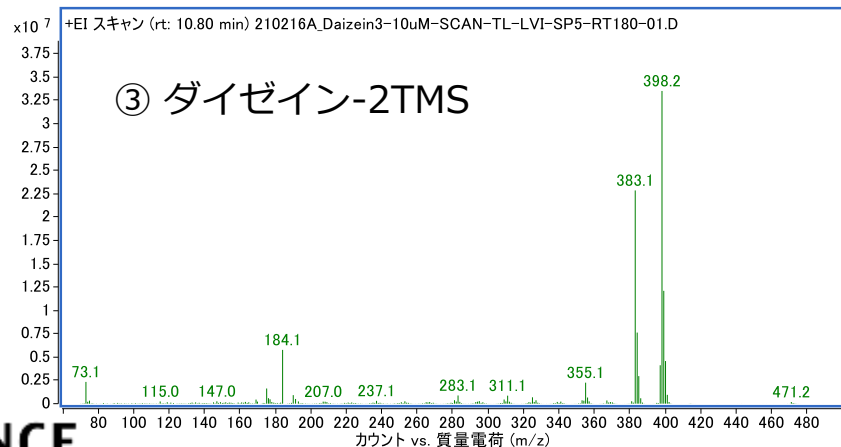
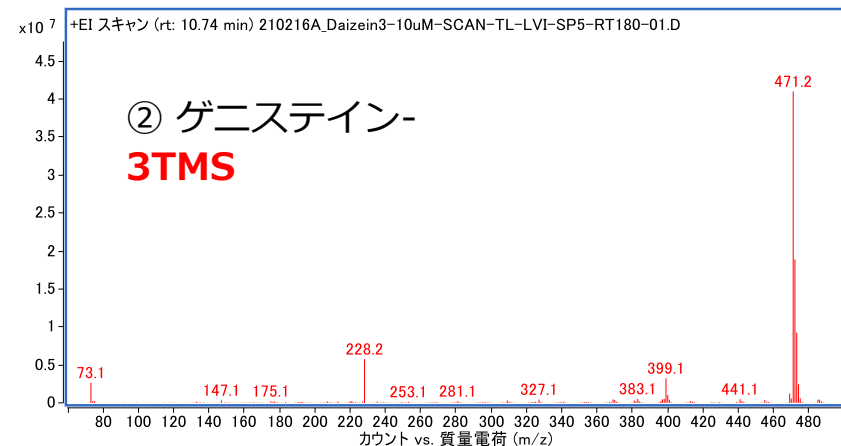
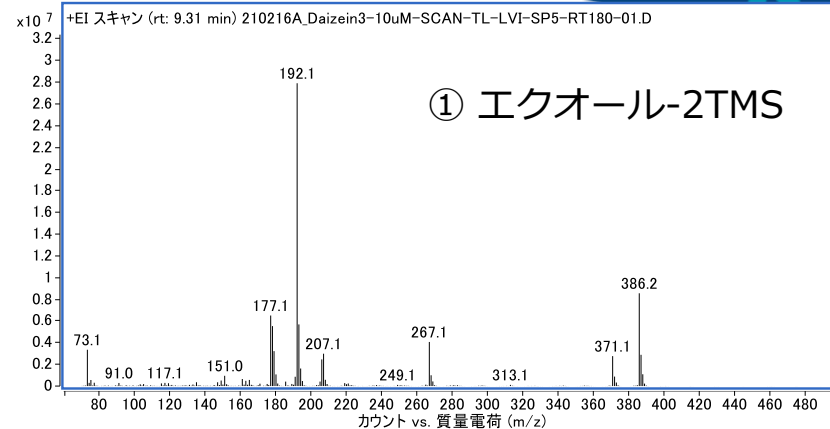
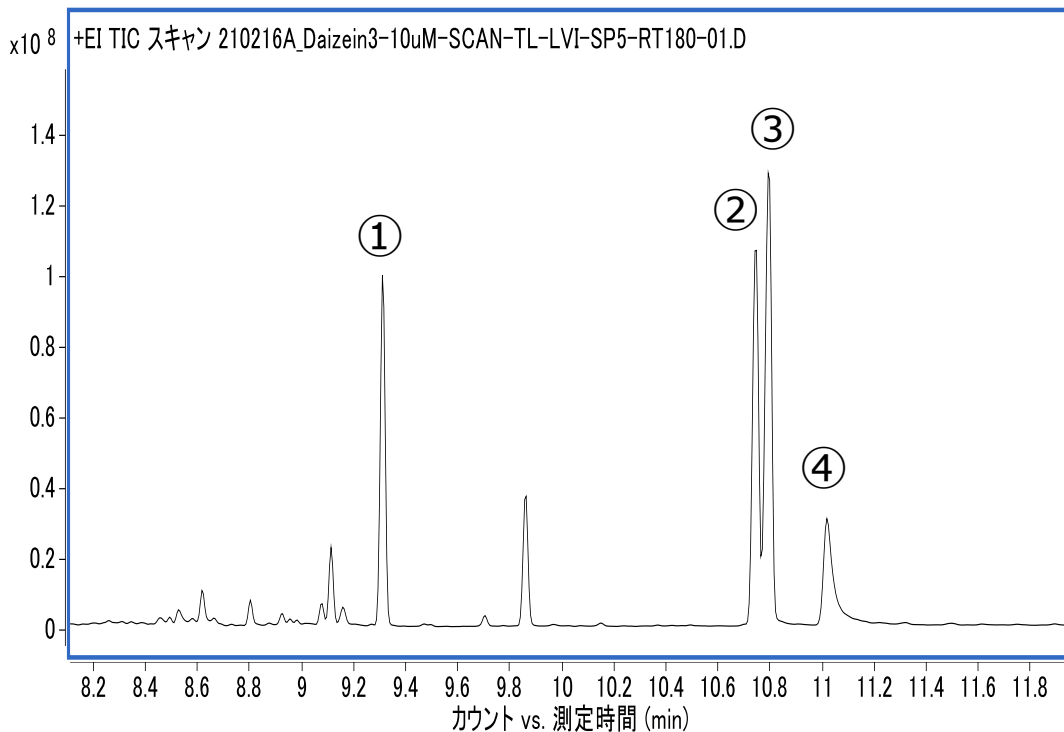
Trans. L.Temp. 320°C

MS

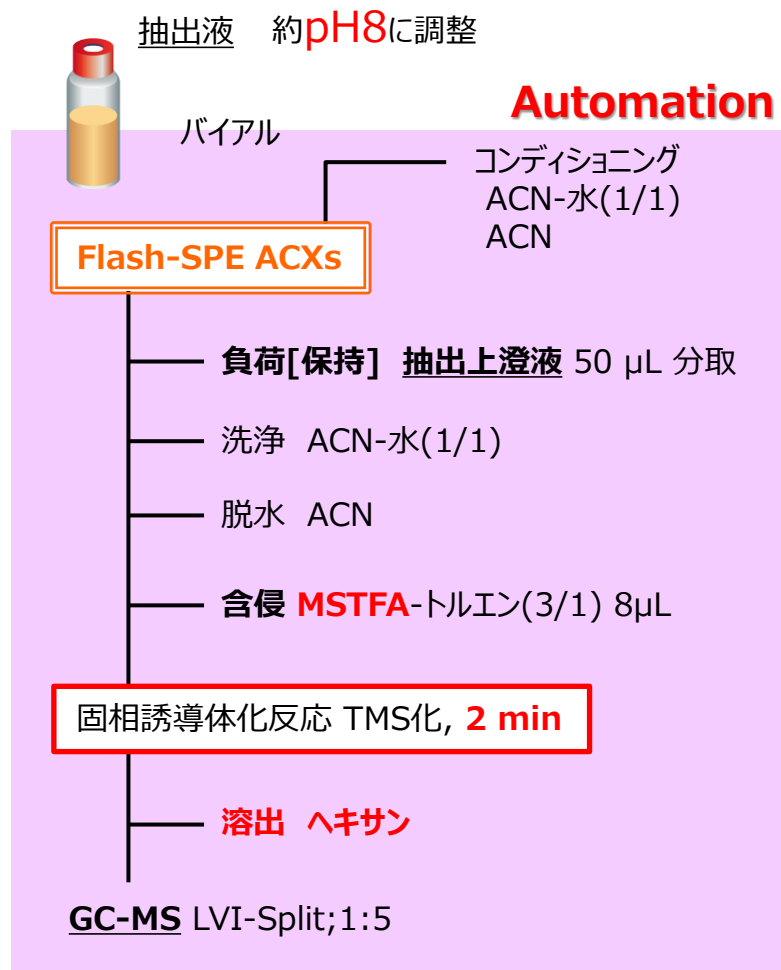
MS Method SCAN, m/z;70-490, or MRM

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 μ L

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

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

GC

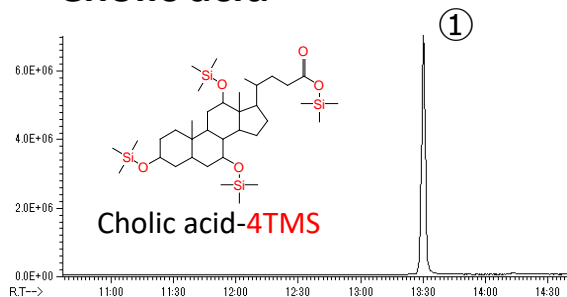
Inlet Mode **Split 1:50**
Flow Mode Constant Flow, 1 ml/min
Pre-Column 0.25mm i.d. x 1m
Column Vf-5ms, 0.25mm i.d. x 30m, df;0.25 μ m
Oven Temp. **100°C(2min)**-30°C/min-**310°C-2°C/min**
-325°C
Trans. L. Temp. **320°C**

MS

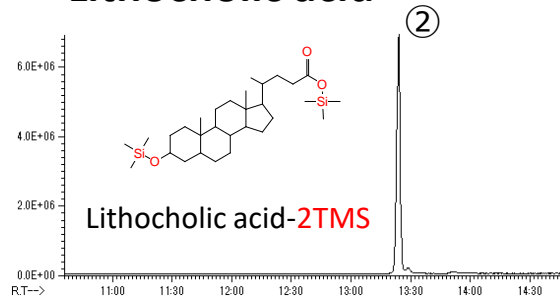
MS Method SCAN, m/z;70-470, or MRM

本法による胆汁酸のSCAN-TICとスペクトル

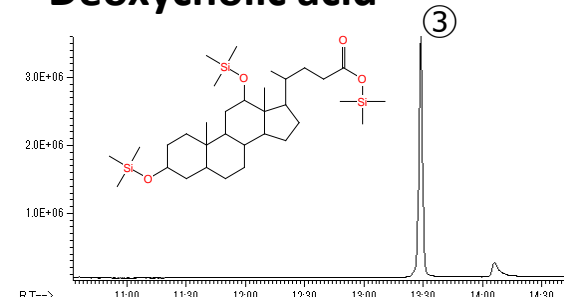
Cholic acid



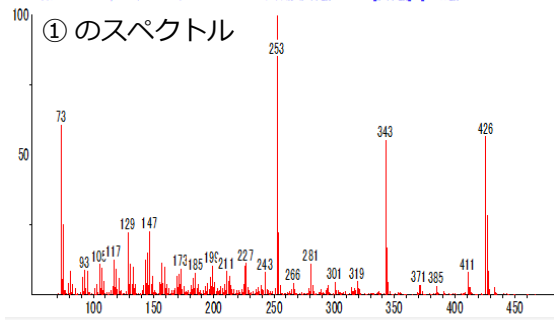
Lithocholic acid



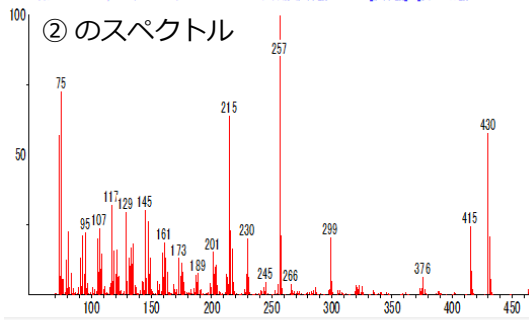
Deoxycholic acid



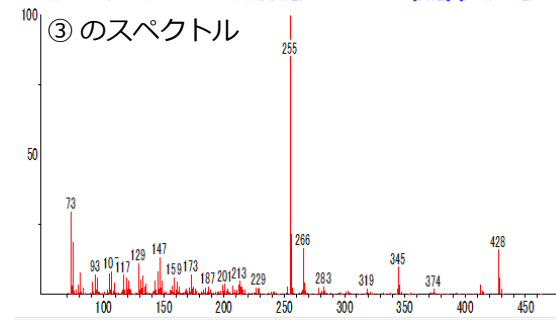
スキャン#1809-1782.1826 (RT=13.31) of D:\#95977B\#化合物-胆汁酸\200827A_胆汁酸_01_コール酸.SPE



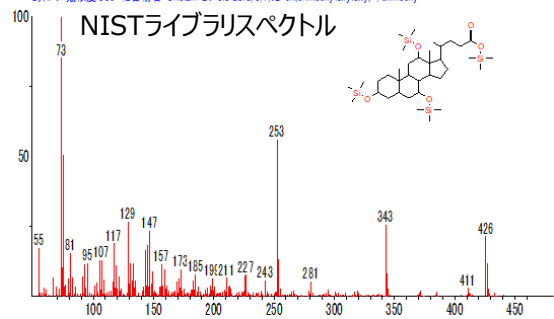
スキャン#1765-1714.1868 (RT=13.24) of D:\#95977B\#化合物-胆汁酸\200827A_胆汁酸_02_リコール酸.SPE



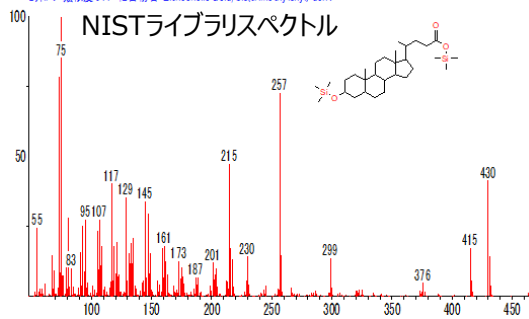
スキャン#1803-0 (RT=13.29) of D:\#95977B\#化合物-胆汁酸\VAIAEXPRT.AIA\200827A_胆汁酸_03_デオキシコール酸.SPE



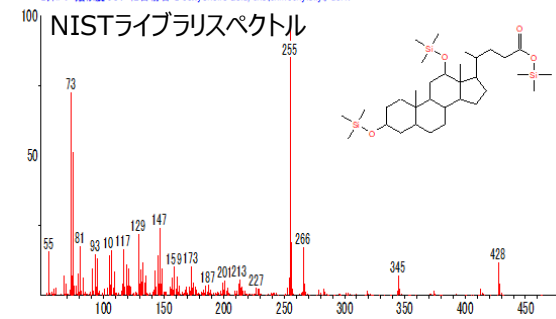
タイプ#1 類似度:85 化合物名:Cholan-24-oic acid,3,7,12-tri(trimethylsilyloxy)-, trimethyl



タイプ#1 類似度:977 化合物名:Lithocholic acid, bis(trimethylsilyl) deriv.



タイプ#1 類似度:834 化合物名:Deoxycholic acid, tris(trimethylsilyl) deriv.



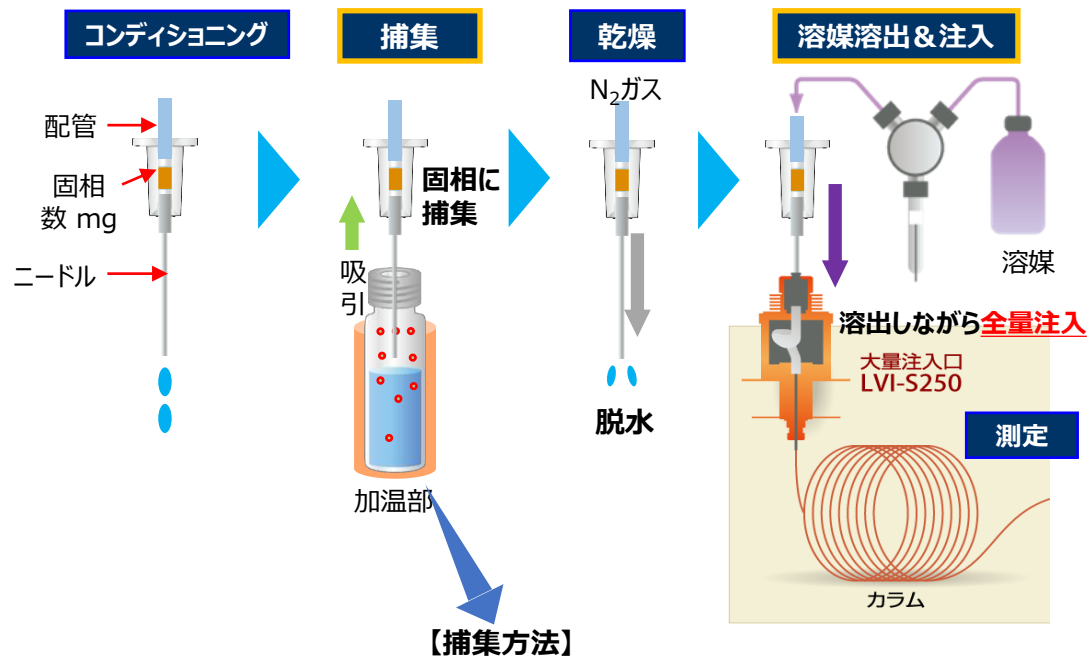
オンライン固相捕集-溶媒溶出法

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。

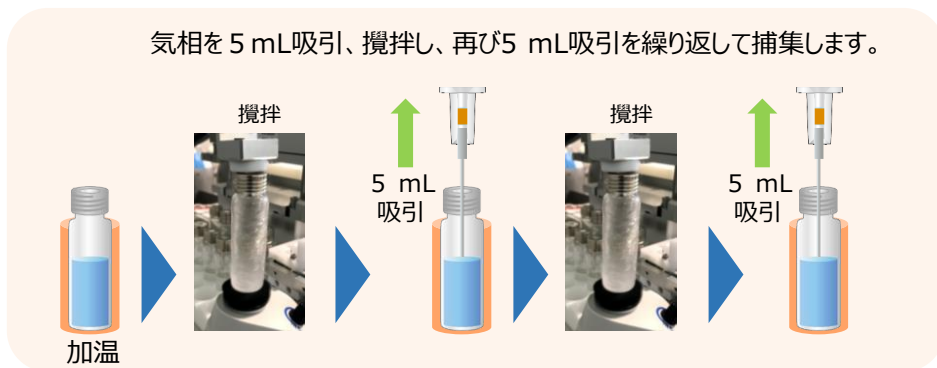
前処理時間14分

- 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。

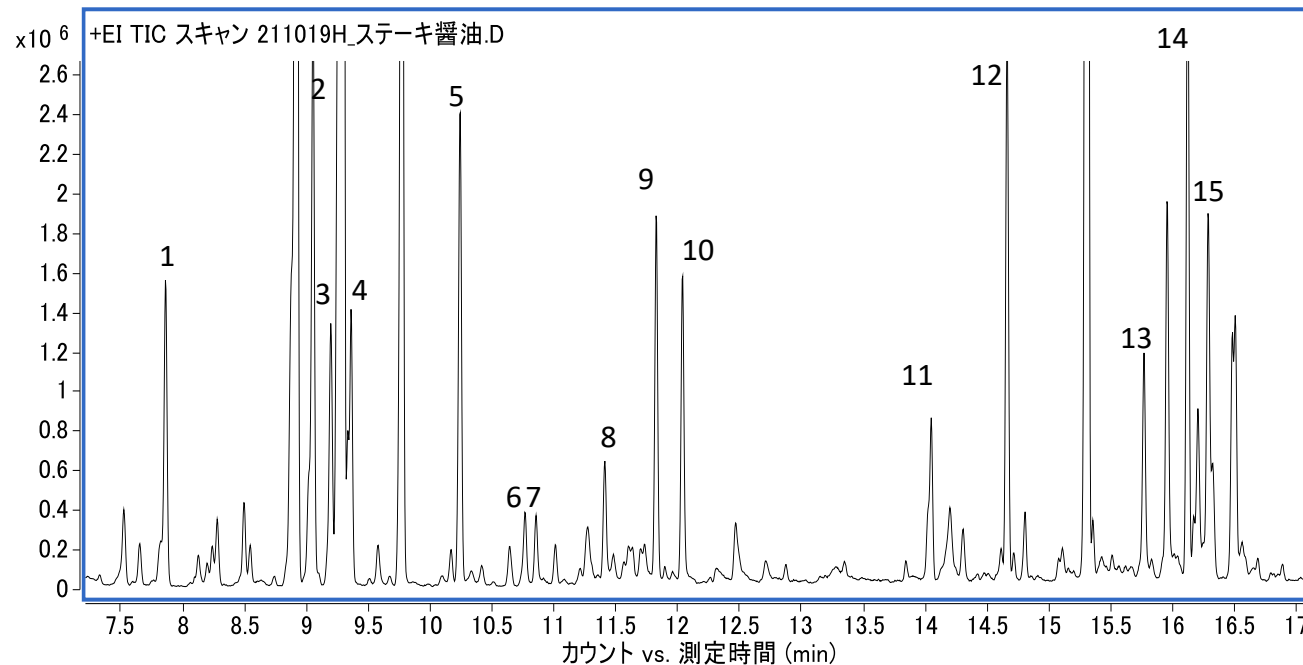
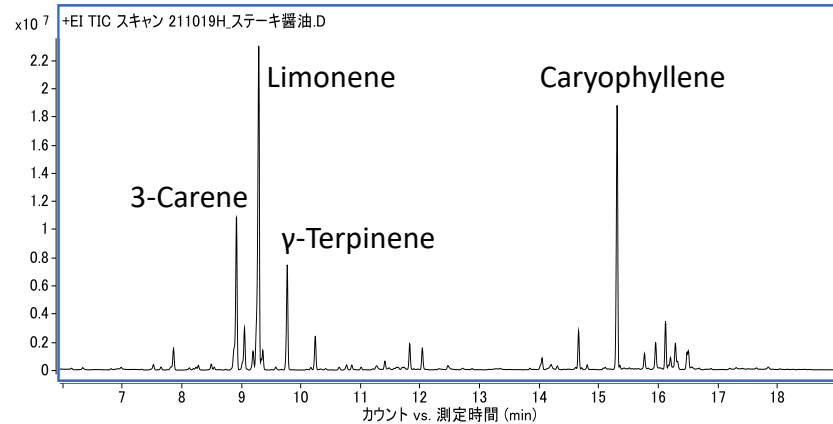


【捕集方法】

気相を5 mL吸引、攪拌し、再び5 mL吸引を繰り返して捕集します。

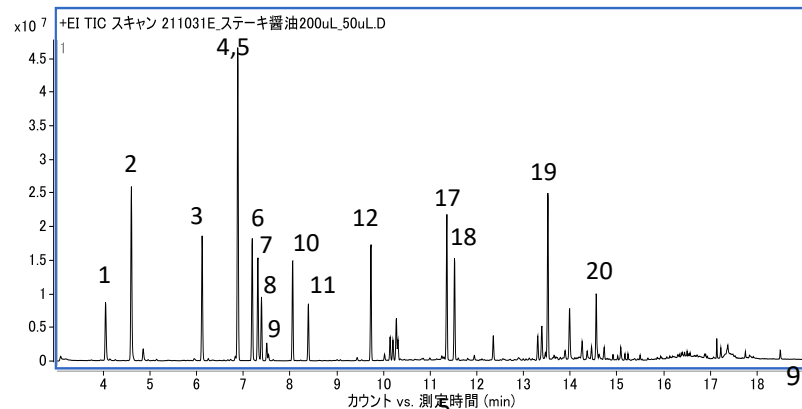


ステーキ醬油：におい分析

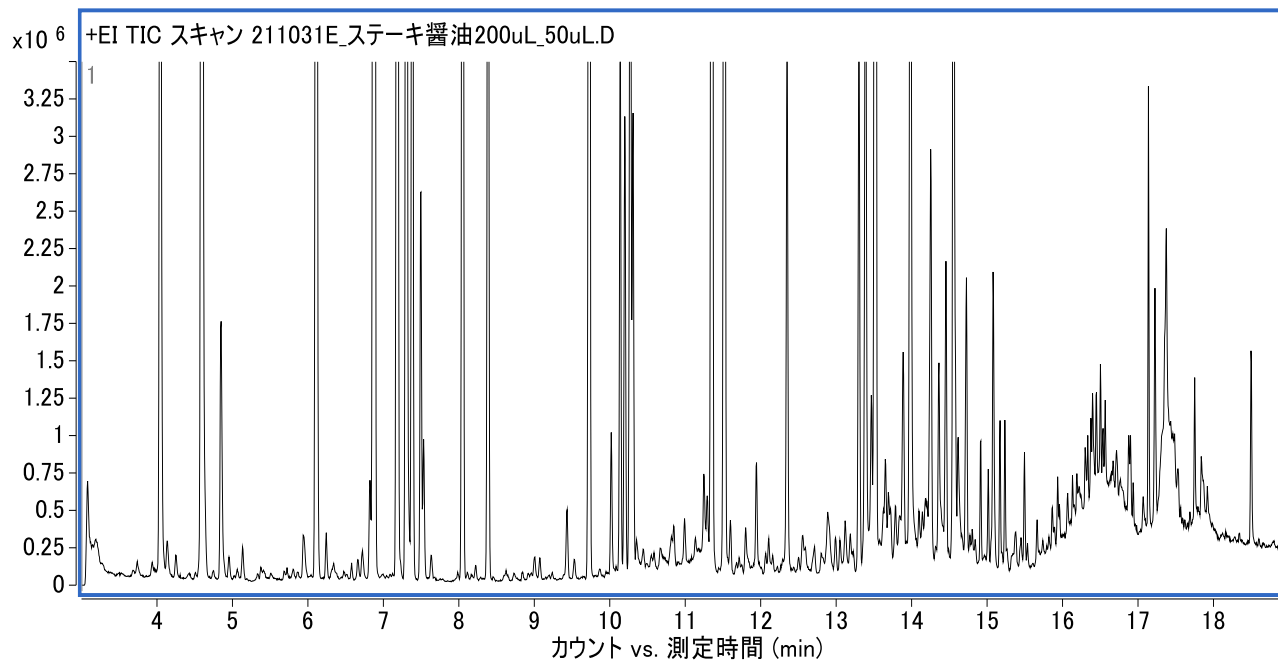


1. Camphene
2. Terpinolene
3. Cymene
4. Eucalyptol
5. Terpinolene
6. 1-Allyl-2-isopropylsulfane
7. Fenchol
8. Trisulfide, methyl propyl
9. 4-terpineol
10. Terpineol
11. Elemene
12. Copaene
13. Humulene
14. Zingiberene
15. Bisabolene

ステーキ醬油：アミノ酸/有機酸分析

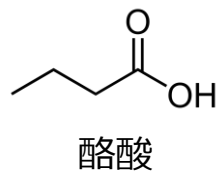
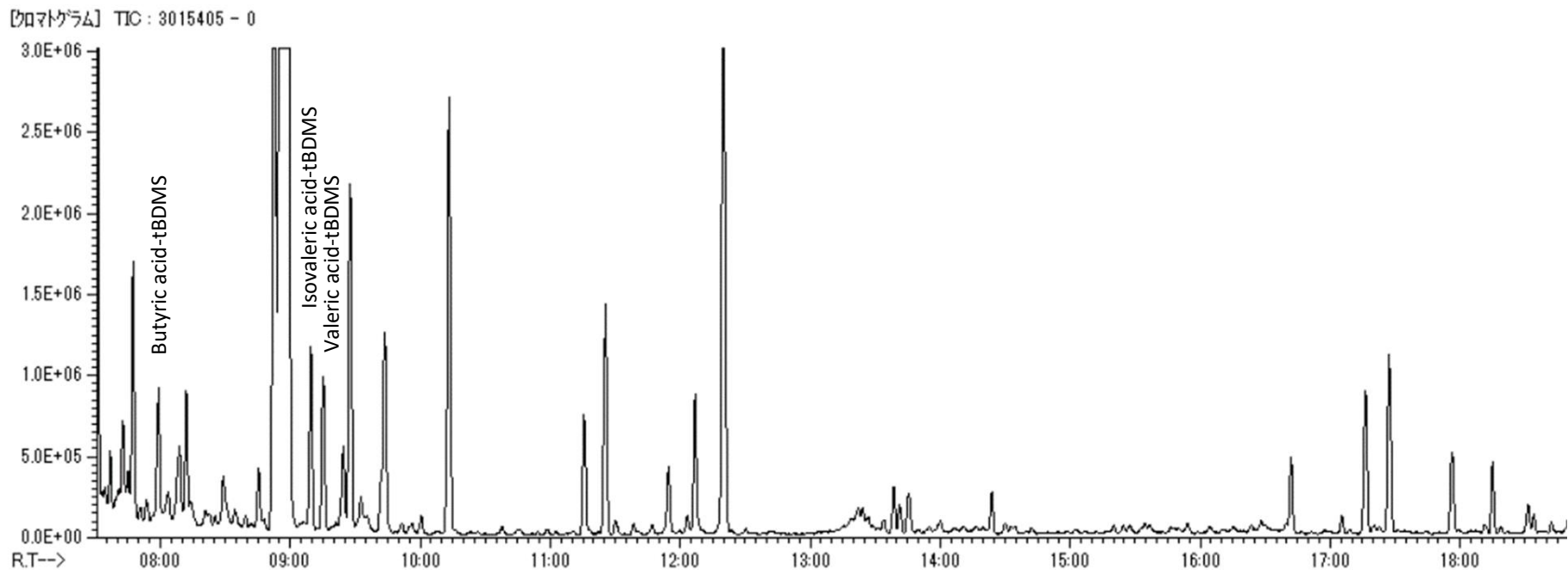


- | | |
|-------------------------|----------------------------|
| 1. Lactic acid-2TMS | 11. Threonine-3TMS |
| 2. Alanine-2TMS | 12. Malic acid-3TMS |
| 3. Valine-2TMS | 13. Aspartic acid-3TMS |
| 4. Phosphoric acid-3TMS | 14. Methionine-2TMS |
| 5. Leucine-2TMS | 15. Pyroglutamic acid-2TMS |
| 6. Isoleucine-2TMS | 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 |

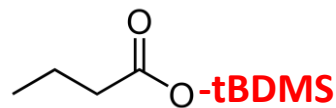


納豆：におい-誘導体化分析

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。



誘導体化試薬



酪酸 - tBDMS