

オンライン固相誘導体化SPE-GC/MSのご紹介

【メタボローム分析最新情報/半網羅分析から成分グループ分析まで】

～対象試料および対象成分による固相誘導体化法の最適化～

株式会社アイスティサイエンス



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

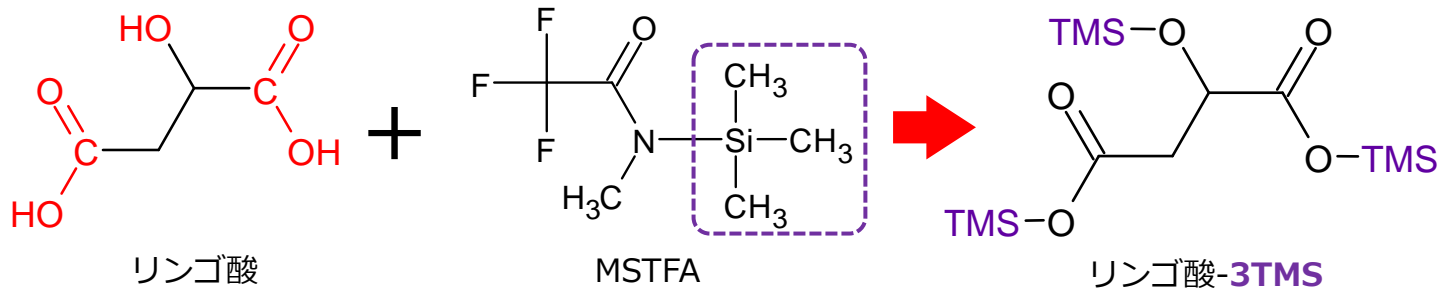
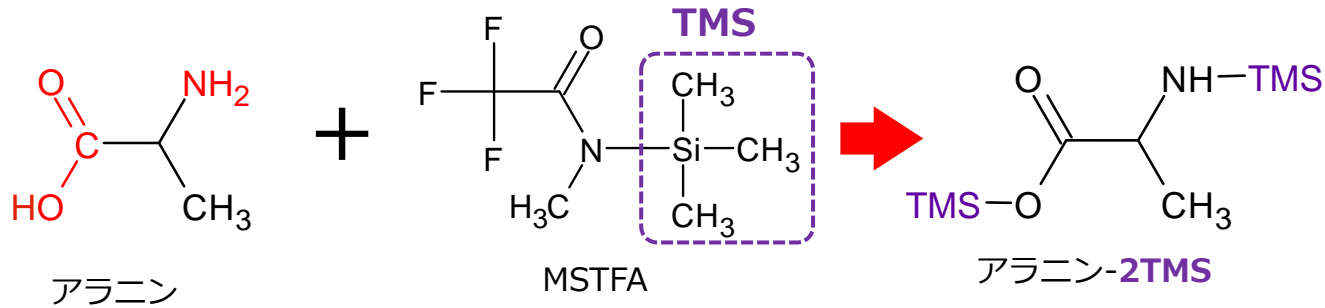
固相誘導体化法を用いたオンラインSPE-GC/MSシステムの開発

アミノ酸と有機酸のTMS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

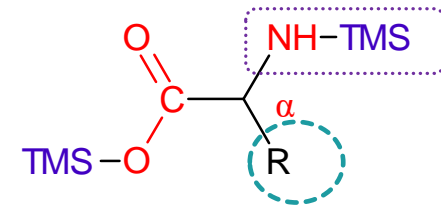


TMS化により揮発しにくい目的成分を気化しやすい物質に変化させることで、GCMSでの測定が可能となる。

★アミノ酸のTMS化について

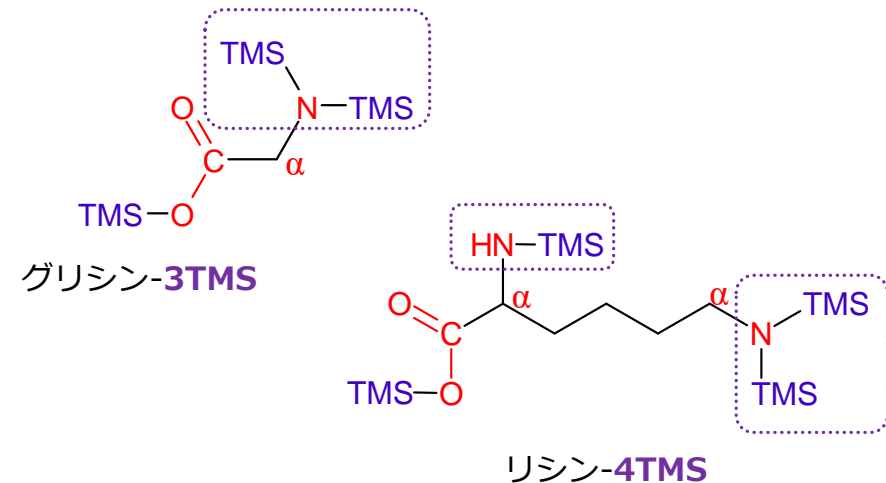
■ α 炭素にRが結合している場合

アミンには**1つのTMS**しか結合しない。

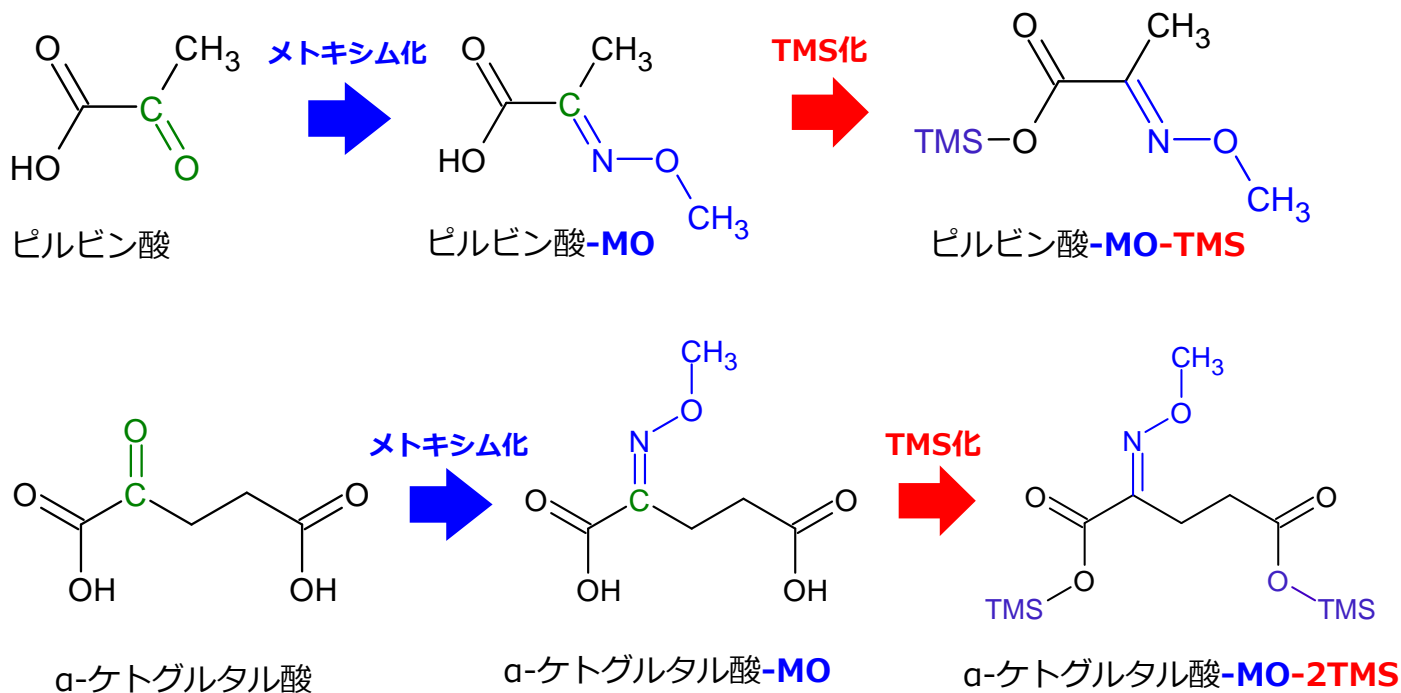
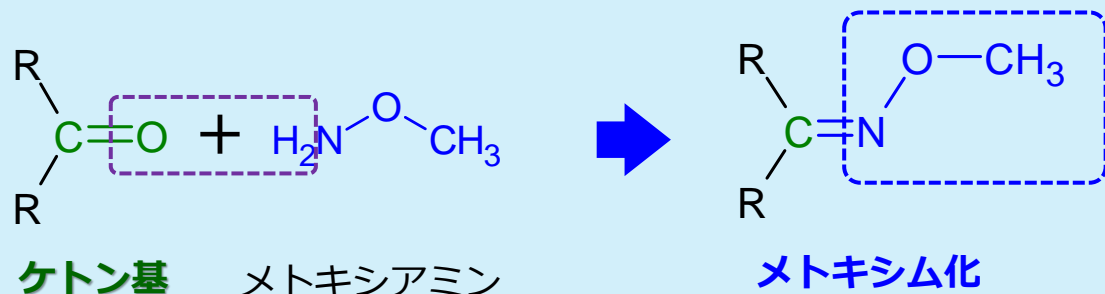


■ α 炭素にRが結合していない場合

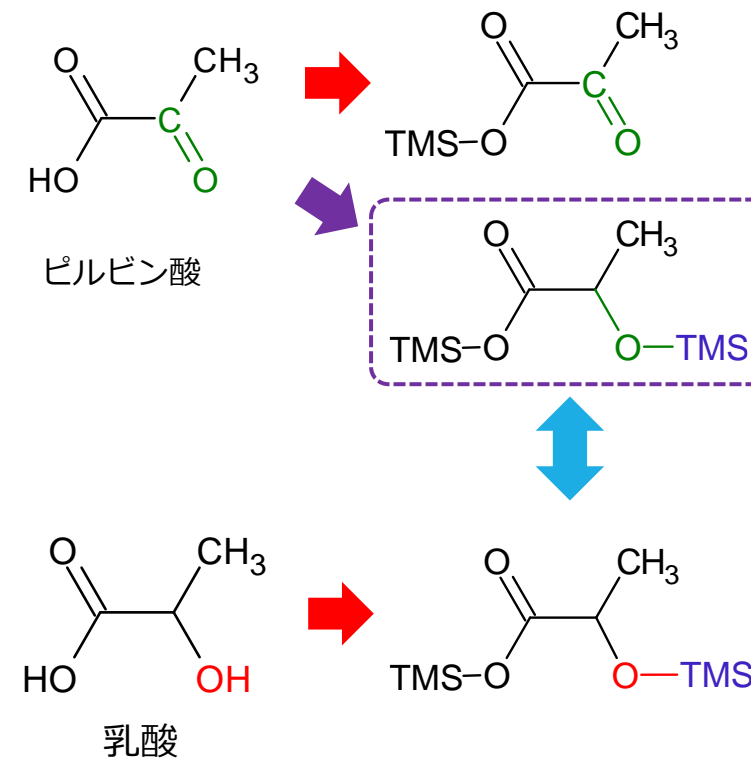
アミンには**2つのTMS**が結合する。



メトキシム化について

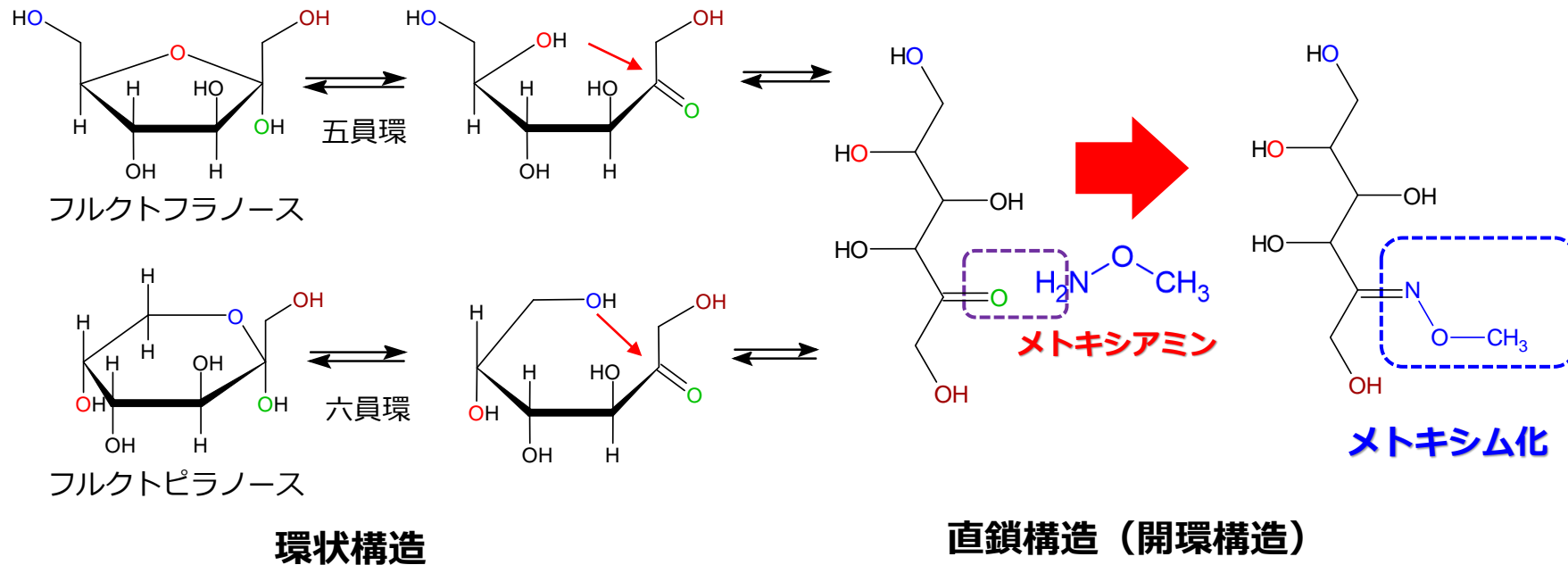


■ メトキシム化しなかったら

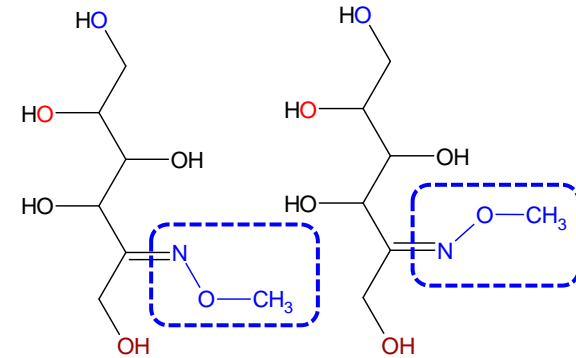


糖類の異性体とメトキシシム化

■ フルクトースの場合



■ メトキシシム化では 2本のピークが出現しやすい

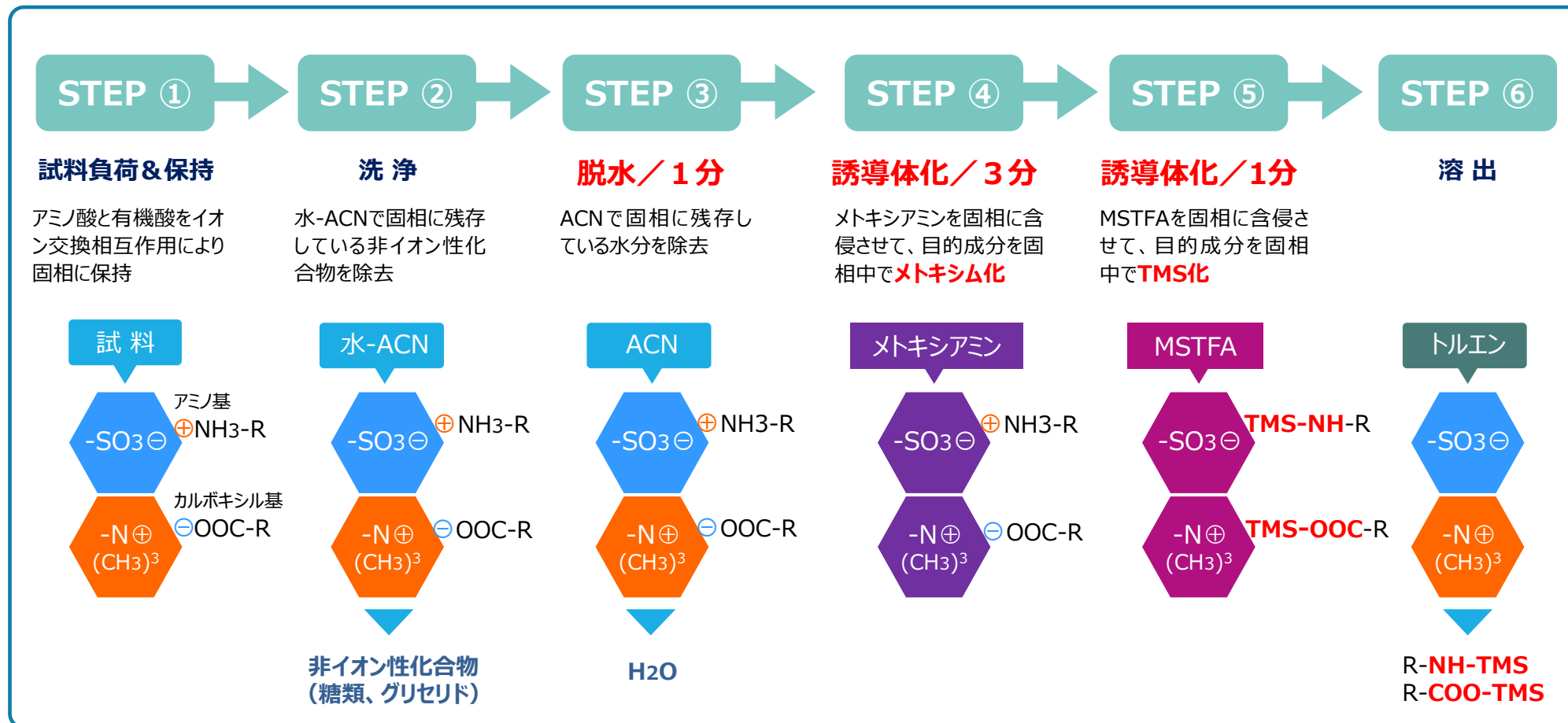


糖類は多くの異性体を持つため、そのままTMS化するとピークがいくつも出現してしまう。

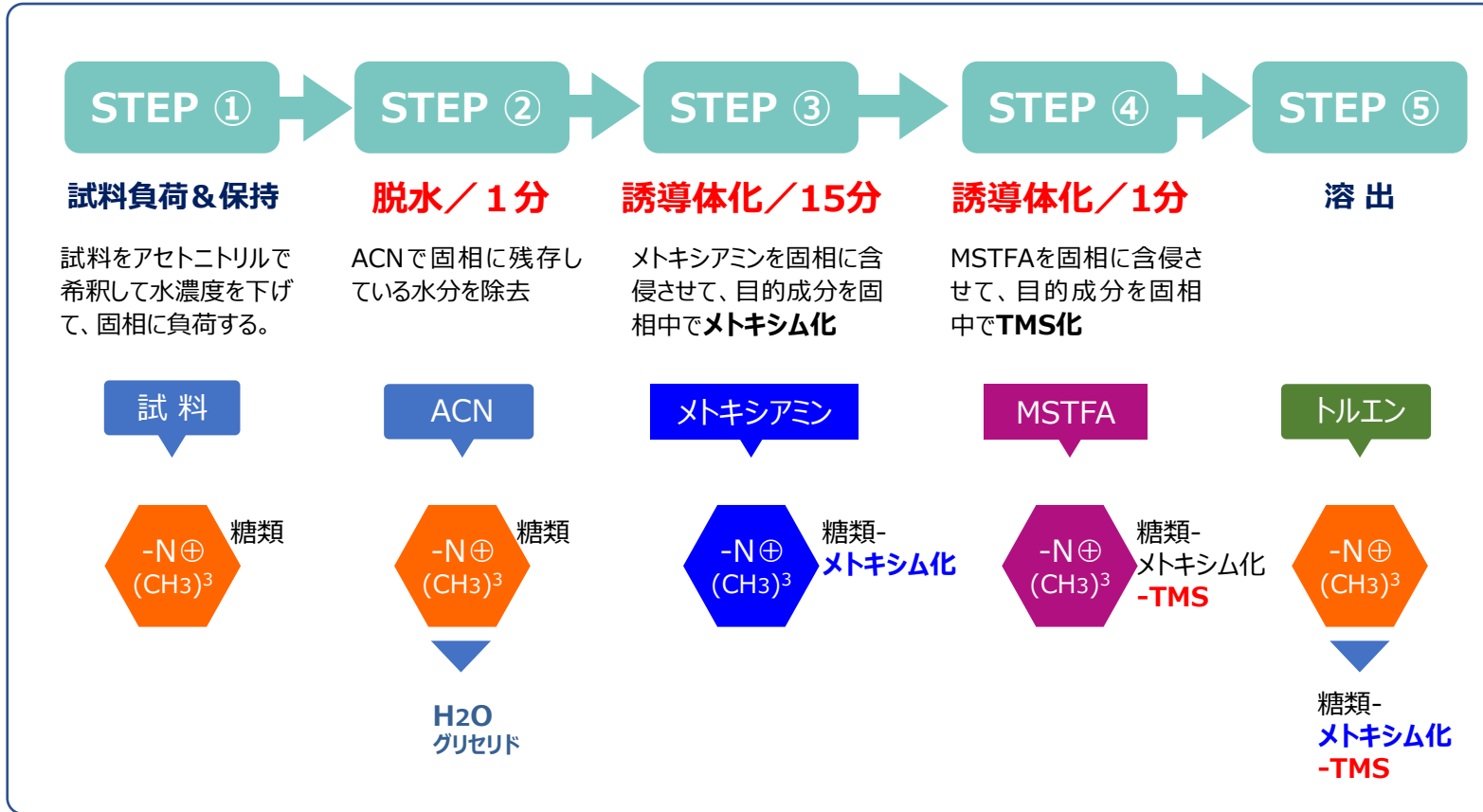


メトキシシム化することで環状構造になることを防ぎ、直鎖構造に絞り込むことができる。

固相誘導体化法：アミノ酸/有機酸

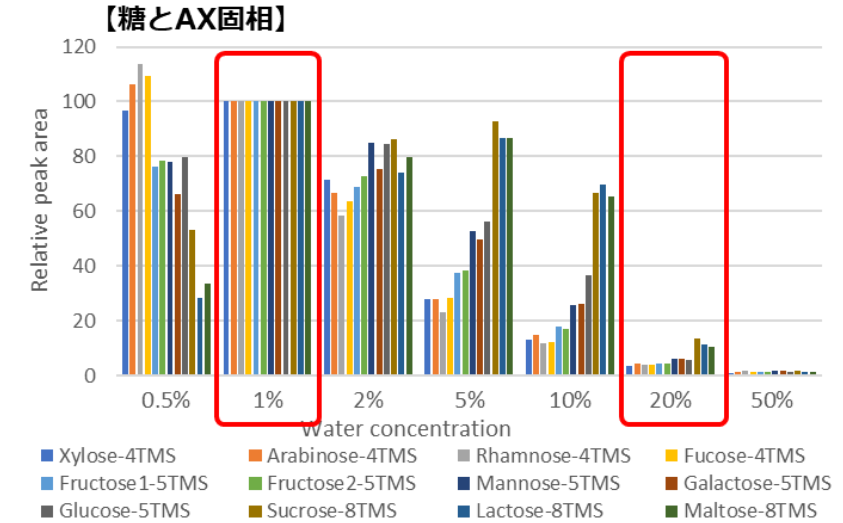


固相誘導体化法：糖類



特許登録：(株)アイスティサイエンス

■ 試料負荷時の水濃度と固相への保持について



■ メトキシアミンによる誘導体化反応時間

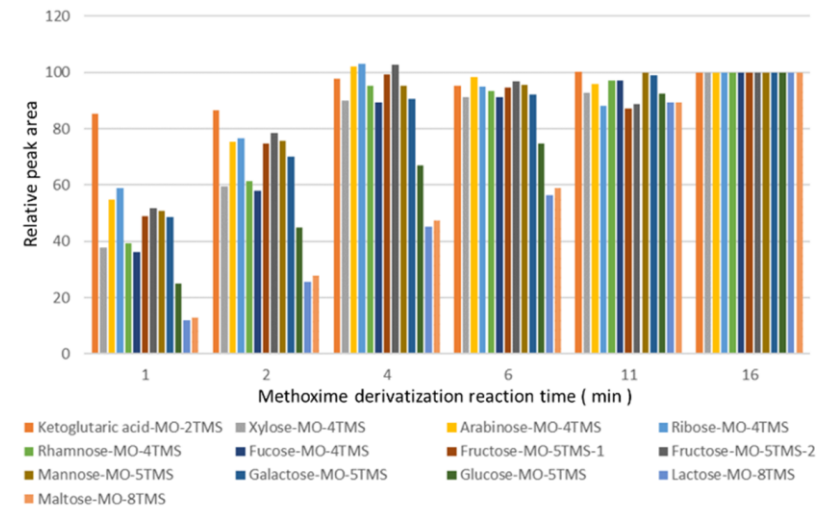


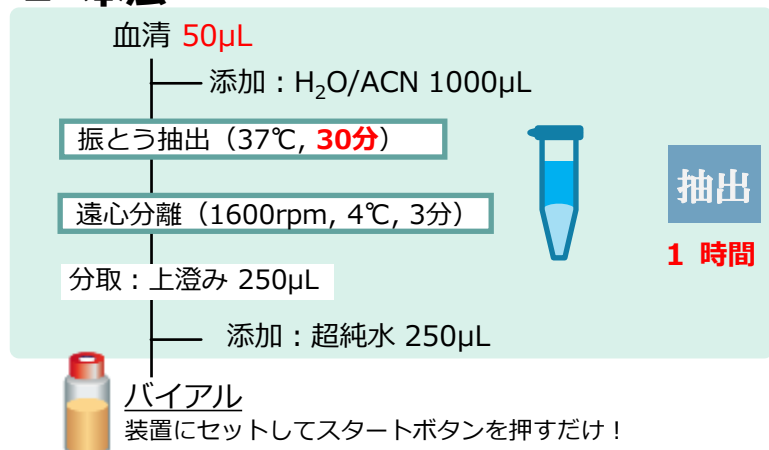
Fig. 3. Relations of methoxime derivatization reaction time in sorbent and the relative peak area

従来法と本法の前処理比較

■ 従来法

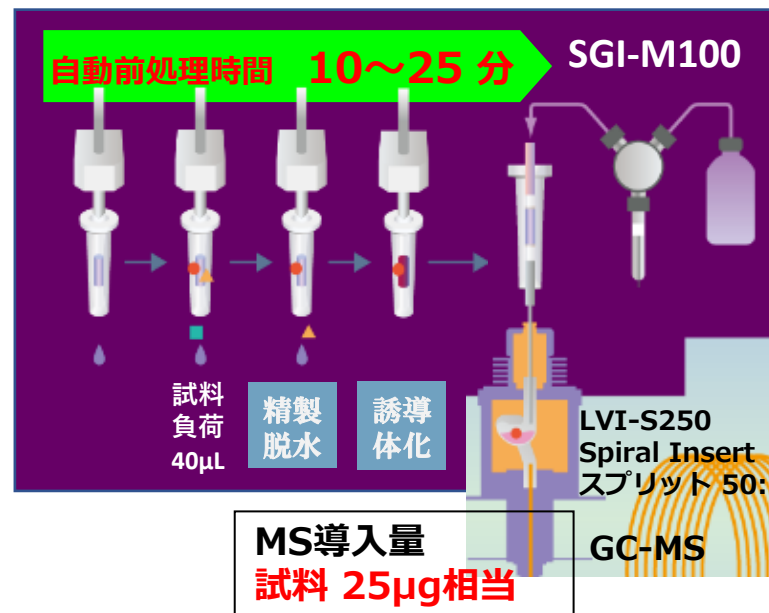


■ 本法



20 時間

オンライン固相誘導体化SPE-GC-MS



MS導入量
試料 4µg相当

MS導入量
試料 25µg相当

オンラインSPE-GC-MSシステムとメリット

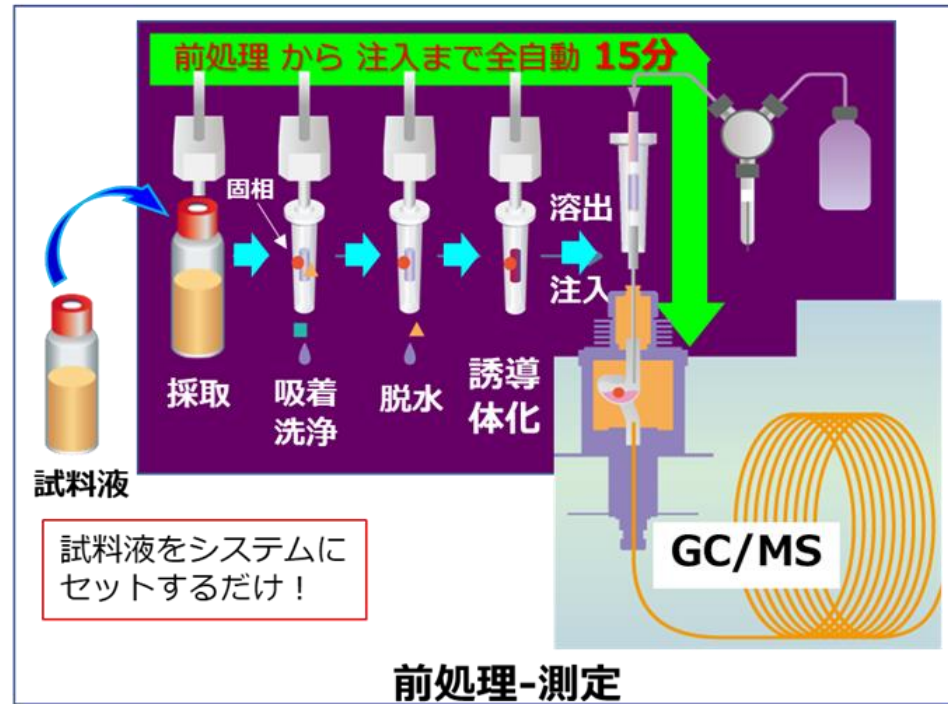


SPL-M100とアジレント社製GCMS



SPL-M100と島津社製GCMS

■ 本システムによるメタボローム分析



オンライン化：前処理と測定機器を接続して一体化する技術

測定している間に次の検体を前処理する（併行稼働）ことで多検体を迅速に分析できる。

ポイント①

前処理から測定まで**完全自動化**

ポイント②

自動化による**分析精度の向上**

ポイント③

溶出液の全量注入による**高感度化**

ポイント④

固相による**精製効果**

ポイント⑤

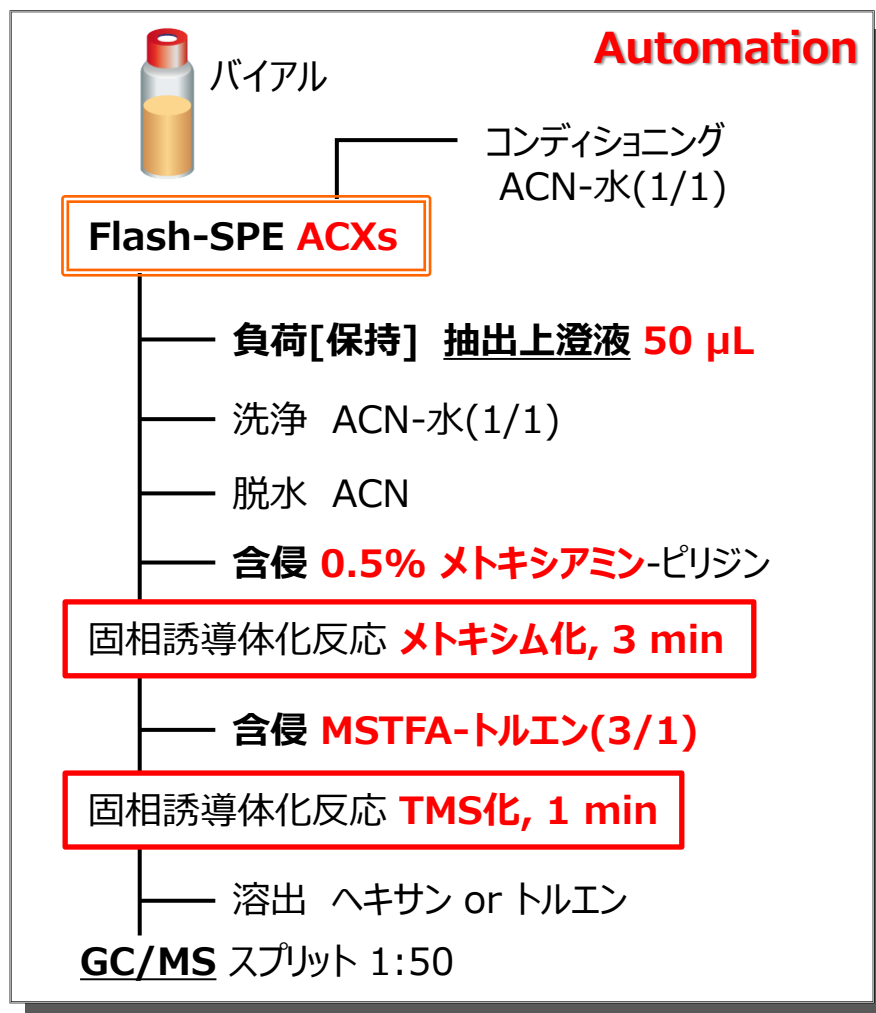
誘導体化してから注入するまでの時間が一定：**安定性**

ポイント⑥

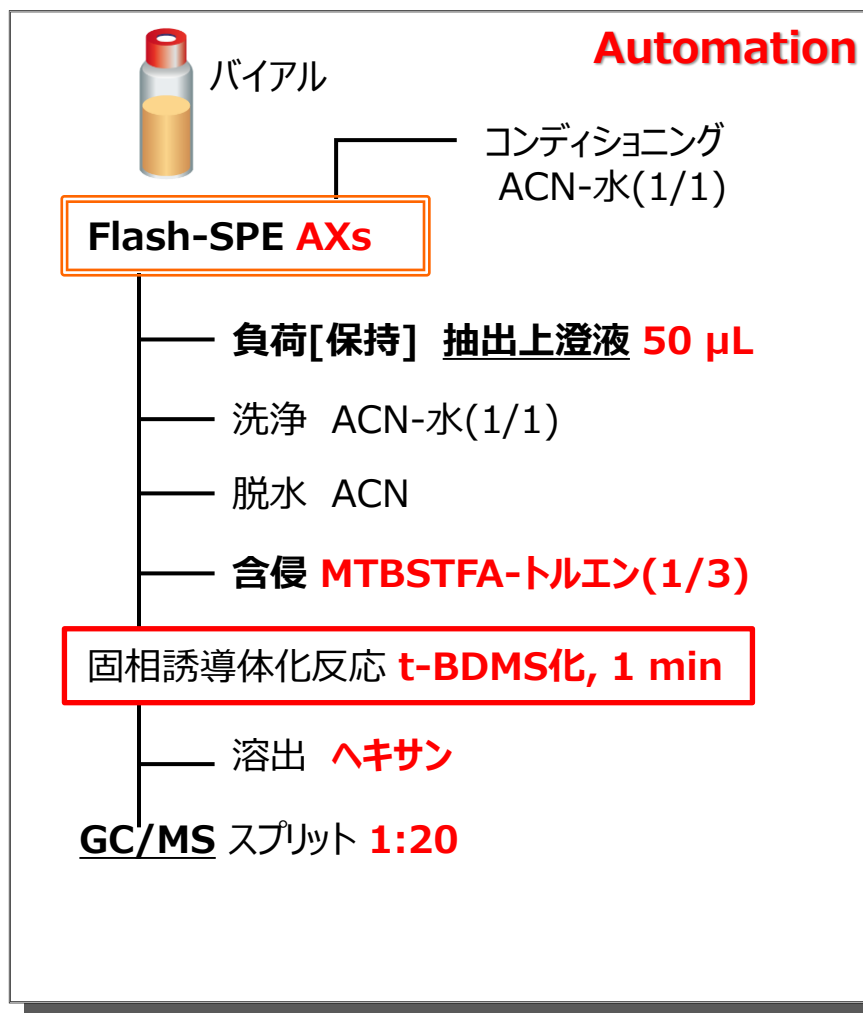
多検体の**ハイスループット**

前処理フロー

■ アミノ酸/有機酸

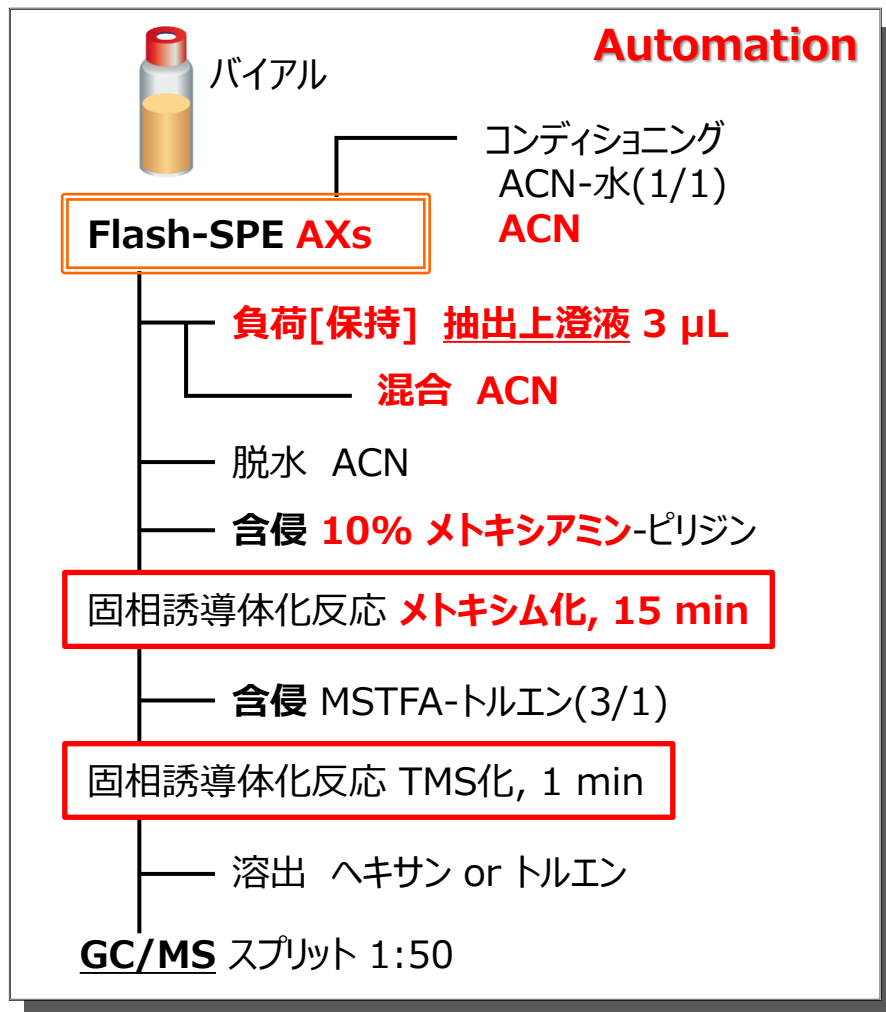


■ 短鎖脂肪酸

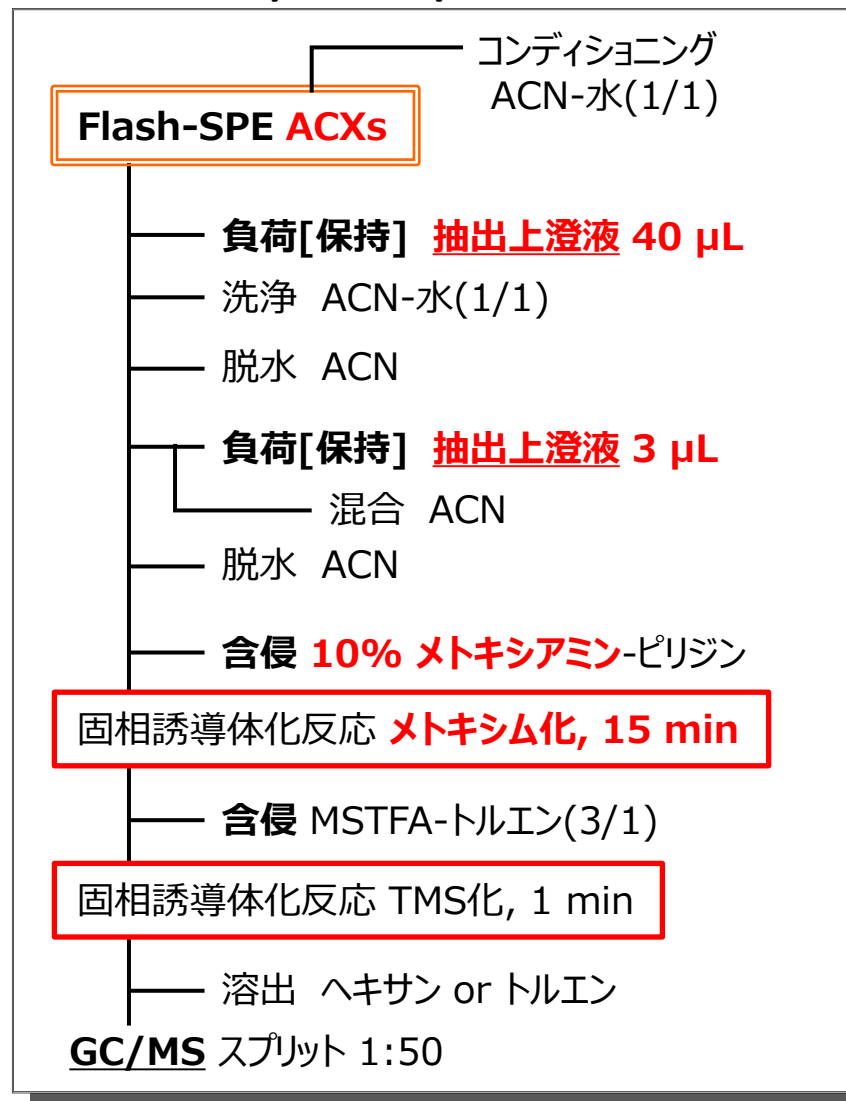


前処理フロー

■ 糖類



■ アミノ酸/有機酸/糖類 **Automation**



測定条件

アミノ酸/有機酸、糖類

SPE-GC Interface SPL-M100 (AiSTI Science)

SPE Cartridge	Flash-ACXs
Sampling Volume	50 µL

PTV Injector

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;0.25µm
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
-----------	------------------

短鎖脂肪酸

SPE-GC Interface SPL-M100 (AiSTI Science)

SPE Cartridge	Flash-AXs
Sampling Volume	50 µL

PTV Injector

Insert Type	Spiral Insert
Injector Temp.	220°C (0.5min)-25°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;0.25µm
Oven Temp.	60°C(3min) -10°C/min-100°C-20°C/min-
310°C(4min)	

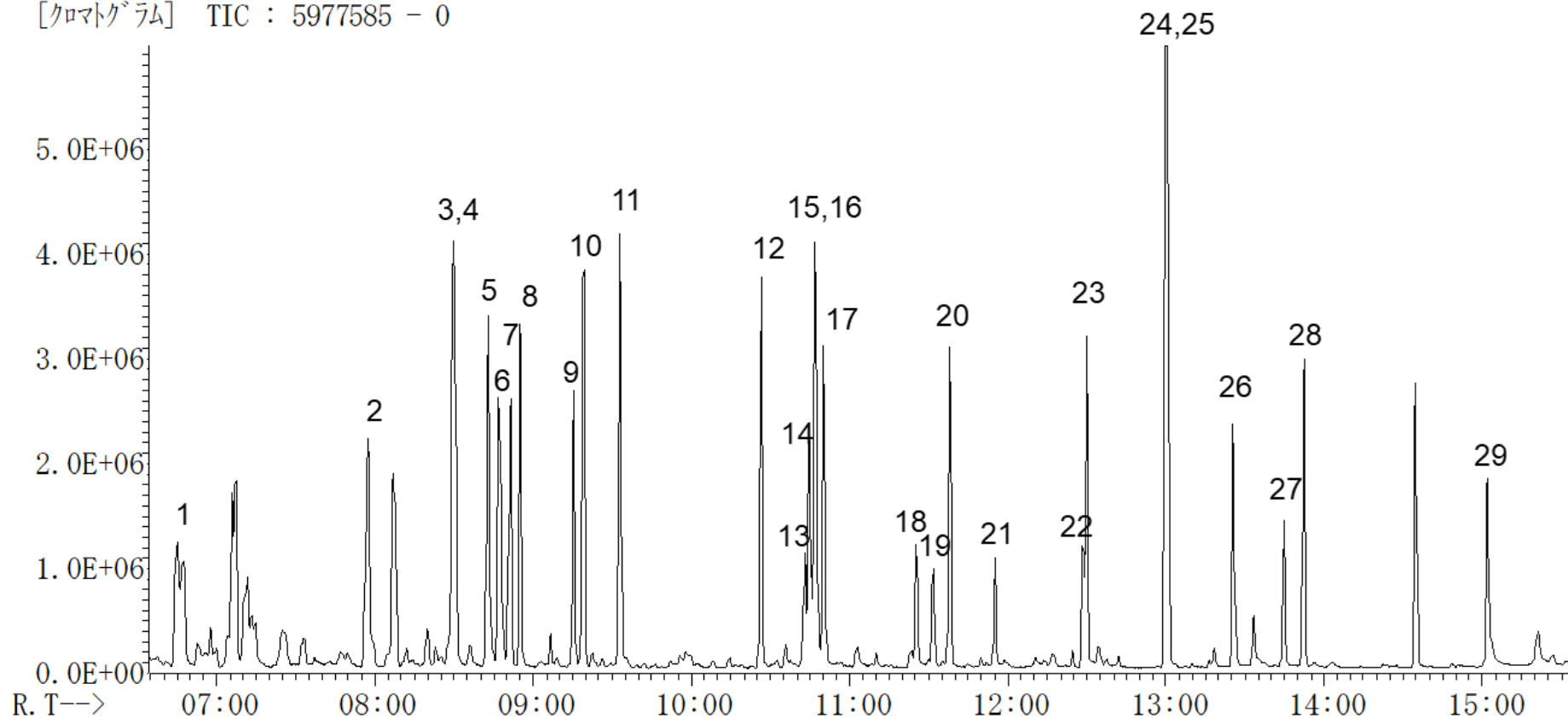
Trans. Line Temp. 290°C

MS

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

本法によるアミノ酸・有機酸のSCAN-トータルイオンクロマトグラム

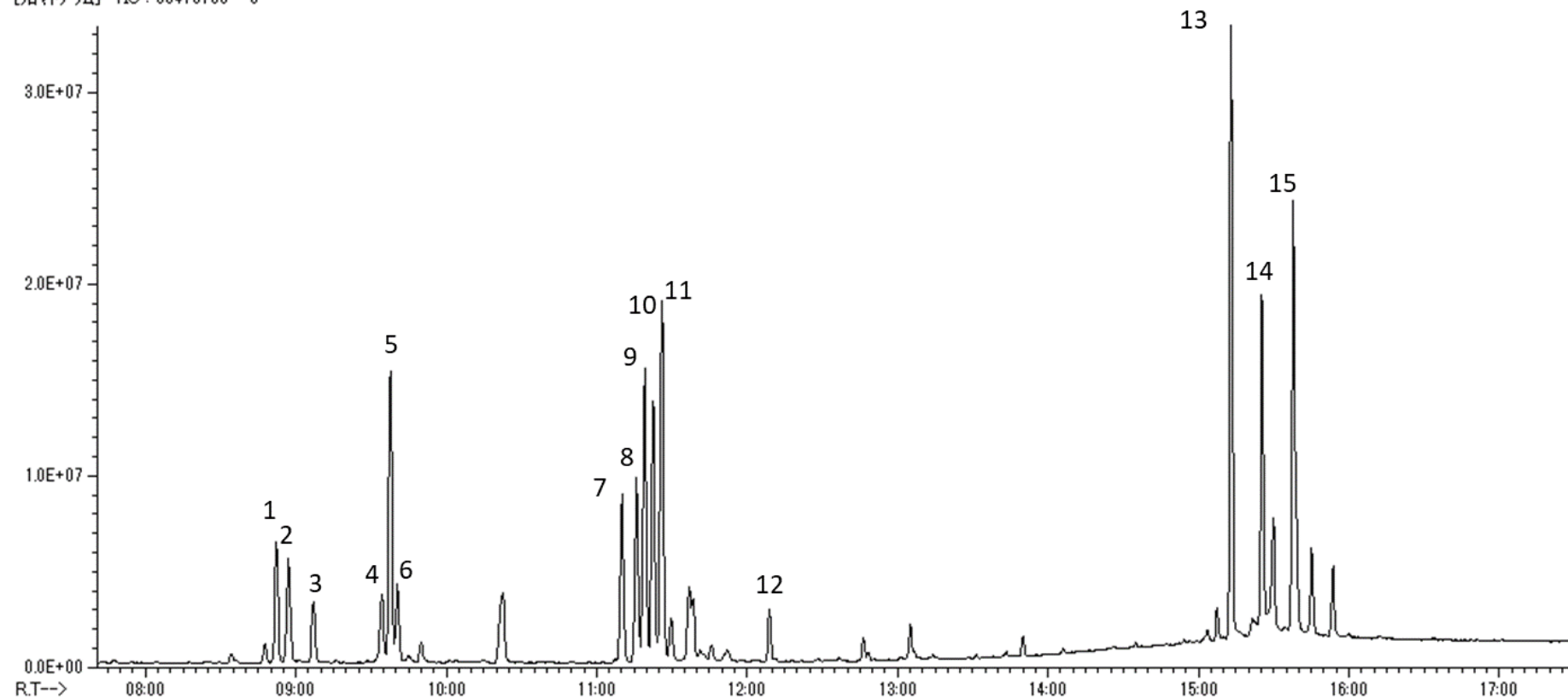
[クロマトグラム] TIC : 5977585 - 0



- | | | | | | |
|--------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|-------------------|
| 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 | |

本法による糖類のSCAN-トータルイオンクロマトグラム

[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

アミノ酸-アミン類のピーク面積値の再現性

化合物メソッド				アミノ酸-アミン類の固相誘導体化, ピーク面積値, n = 7								Ave.	RSD
No.	化合物名	RT	m/z	1	2	3	4	5	6	7			
1	Alanine, 2TMS_1	4.537	116	103,325,518	99,279,183	100,136,043	97,904,012	101,180,092	99,491,941	99,997,328	100,187,731	1.7	
2	Valine, 2TMS	6.051	144	125,525,990	120,506,298	121,154,315	118,306,166	122,469,929	120,920,544	121,509,773	121,484,717	1.8	
3	Norvaline, 2TMS	6.376	144	127,474,424	122,615,015	122,950,199	120,992,617	124,497,155	122,995,351	123,774,435	123,614,171	1.6	
4	Leucine, 2TMS	6.815	158	148,395,732	144,359,575	143,685,496	141,528,577	146,394,425	143,692,409	144,875,305	144,704,503	1.5	
5	Isoleucine, 2TMS	7.121	158	131,263,218	126,779,800	126,810,438	124,616,344	129,757,662	126,738,037	128,169,821	127,733,617	1.7	
6	Proline, 2TMS	7.237	142	139,186,631	134,555,471	134,747,518	132,243,101	137,723,400	133,834,596	135,229,331	135,360,007	1.7	
7	Glycine, 3TMS	7.321	174	107,445,890	104,365,071	104,526,613	101,821,328	106,567,018	103,809,772	105,231,678	104,823,910	1.8	
8	Serine, 3TMS	7.988	204	79,489,335	76,809,516	77,379,494	75,057,274	78,461,111	77,574,732	77,110,411	77,411,696	1.8	
9	Threonine, 3TMS	8.326	218	41,210,147	39,521,111	39,772,832	38,718,862	40,562,124	40,134,217	40,132,957	40,007,464	2.0	
10	beta-Alanine, 3TMS	8.938	248	47,896,760	46,897,113	46,602,179	44,928,536	47,906,243	46,430,757	47,182,042	46,834,804	2.2	
11	Homoserine, 3TMS	9.171	218	49,613,328	48,465,893	48,338,837	48,324,321	50,803,934	48,313,837	49,797,592	49,093,963	2.0	
12	Aspartic acid, 3TMS	10.067	232	76,690,876	72,508,675	74,433,213	72,951,939	74,432,179	75,277,947	74,529,148	74,403,425	1.9	
13	Methionine, 2TMS	10.120	176	78,022,045	75,471,071	75,139,914	74,148,805	77,270,949	75,921,070	76,610,568	76,083,489	1.7	
14	Pyroglutamic acid, 2TMS	10.181	156	15,609,321	20,225,973	14,784,767	13,514,595	18,708,309	16,391,674	14,187,795	16,203,205	15.1	
15	Glutamic acid, 3TMS	11.271	246	55,863,947	48,658,623	54,129,787	53,370,218	51,576,444	53,541,989	55,197,289	53,191,185	4.6	
16	Asparagine, 4TMS	11.319	188	8,567,058	7,518,611	8,674,186	8,102,264	7,841,918	8,595,871	8,507,914	8,258,260	5.4	
17	Phenylalanine, 2TMS	11.432	218	89,057,734	85,301,192	85,182,018	84,505,450	86,844,043	85,298,010	86,282,769	86,067,317	1.8	
18	Asparagine, 3TMS	11.861	231	14,394,032	13,810,253	13,493,667	13,460,613	14,382,041	13,888,825	14,026,169	13,922,228	2.7	
19	Putrescine, 4TMS	12.638	174	178,995,868	174,133,131	171,401,332	170,796,623	178,452,726	170,889,030	174,110,484	174,111,313	2.0	
20	Ornithine, 4TMS	13.454	142	94,493,015	91,425,151	90,423,968	90,060,547	93,146,991	89,706,572	91,975,886	91,604,590	1.9	
21	Lysine, 4TMS	14.535	317	42,963,888	42,258,692	40,823,253	41,139,813	42,872,816	40,772,650	42,362,813	41,884,846	2.3	
22	Histidine, 3TMS	14.559	154	46,918,743	46,844,568	46,768,311	43,879,388	51,684,777	45,787,952	50,172,484	47,436,603	5.6	
23	Tyrosine, 3TMS	14.738	218	165,037,925	162,774,516	160,175,562	157,024,304	164,691,521	160,160,063	161,440,155	161,614,864	1.7	
24	Tryptophan, 3TMS	17.362	202	133,119,800	129,022,784	123,494,906	119,177,048	137,452,997	113,758,342	125,528,948	125,936,403	6.4	
25	Spermidine, 5TMS	17.628	144	84,461,788	83,981,100	76,668,589	77,430,173	88,476,513	74,597,013	77,892,331	80,501,073	6.4	
26	Cystine, 4TMS	17.973	218	109,879,480	115,101,896	99,304,192	98,798,762	117,446,940	94,819,927	97,439,529	104,684,389	8.8	
27	Spermine, 6TMS	21.463	144	24,605,969	36,653,209	14,928,702	19,096,932	42,821,012	9,296,125	13,059,897	22,923,121	54.9	

有機酸類のピーク面積値の再現性

化合物メソッド				有機酸類の固相誘導体化, ピーク面積値, n = 7								
No.	化合物名	RT	m/z	1	2	3	4	5	6	7	Ave.	RSD
1	Lactic Acid, 2TMS	3.986	191	13,755,778	13,089,634	13,524,952	13,227,005	13,086,433	13,335,288	13,427,183	13,349,468	1.8
2	alpha-Hydroxyisobutyric acid, 2TMS	4.075	131	55,046,099	51,539,221	52,001,495	51,609,086	51,421,715	51,686,360	51,221,076	52,075,007	2.6
3	Glycolic acid, 2TMS	4.219	147	49,411,141	46,641,552	47,223,508	45,982,745	45,777,273	46,627,931	46,594,818	46,894,138	2.6
4	Caproic acid (C6:0), 1TMS	4.245	173	19,642,617	17,925,507	18,521,396	17,681,999	18,477,058	18,827,442	18,243,021	18,474,149	3.5
5	Oxalic acid, 2TMS	4.909	147	44,500,336	42,024,068	44,076,045	41,641,643	40,154,540	41,864,371	40,499,803	42,108,687	3.9
6	Hydroxypropionic acid, 2TMS	5.093	177	3,572,268	3,333,324	3,494,033	3,333,112	3,462,932	3,563,180	3,543,423	3,471,753	2.9
7	3-Hydroxybutyric acid, 2TMS	5.294	191	9,313,014	8,893,399	9,520,962	9,509,061	9,873,313	10,279,837	10,484,577	9,696,309	5.7
8	Heptanoic acid, TMS	5.473	187	29,201,577	26,512,364	27,713,306	26,396,290	27,607,608	27,999,312	27,101,610	27,504,581	3.5
9	Malonic acid, 2TMS	5.903	147	67,904,435	67,331,804	76,992,537	70,816,553	75,839,006	83,750,665	82,315,535	74,992,934	8.8
10	3-Hydroxyisovaleric acid, 2TMS	5.988	131	23,690,894	19,302,278	20,783,408	18,728,373	24,247,222	21,737,067	21,419,036	21,415,468	9.6
11	Methylmalonic acid, 2TMS	6.044	147	109,408,113	103,985,234	110,614,351	106,119,718	106,185,159	109,975,433	111,150,488	108,205,499	2.5
12	Caprylic acid (C8:0), TMS	6.781	201	33,430,800	29,935,899	31,410,141	30,050,774	31,785,554	32,129,157	30,810,713	31,364,720	3.9
13	Ethylmalonic acid, 2TMS	6.942	147	99,717,805	93,862,637	100,291,953	95,641,531	96,450,008	99,697,247	99,963,379	97,946,366	2.6
14	Maleic acid, 2TMS	7.296	147	102,243,330	96,638,068	102,666,148	98,793,409	97,999,583	103,157,160	101,675,892	100,453,370	2.6
15	Succinic acid, 2TMS	7.431	247	11,535,211	10,978,202	11,624,172	11,152,678	11,408,566	11,638,505	11,745,326	11,440,380	2.5
16	Fumaric acid, 2TMS	7.922	245	69,898,525	66,296,093	70,875,841	67,925,194	69,026,627	70,823,727	72,098,936	69,563,563	2.8
17	Nonanoic acid, TMS (C9:0)	8.095	215	29,333,902	26,639,635	27,713,709	26,365,139	27,948,813	28,217,400	27,094,310	27,616,130	3.7
18	Glutaric acid, 2TMS	8.654	261	15,401,119	14,357,012	15,253,747	14,662,626	15,228,507	15,322,379	15,363,775	15,084,166	2.7
19	Malonic acid, 3TMS	8.857	305	9,561,850	10,066,838	8,940,260	9,641,416	7,856,751	7,077,199	7,310,282	8,636,371	14.0
20	Capric acid, TMS (C10:0)	9.367	229	27,464,915	24,776,580	25,791,411	24,717,441	26,197,102	26,557,195	25,388,376	25,841,860	3.8
21	Malic acid, 3TMS	9.659	233	22,673,095	21,495,119	22,748,554	21,613,687	21,664,934	22,478,317	22,353,155	22,146,695	2.4
22	Adipic acid, 2TMS	9.945	275	8,756,845	8,158,658	8,536,617	8,156,842	8,587,677	8,655,732	8,726,799	8,511,310	3.0
23	Oxoglutaric acid, 1MO, 2TMS_1	10.470	198	4,963,882	4,478,467	4,810,762	4,668,221	4,456,342	4,736,292	4,784,794	4,699,823	3.9
24	Undecanoic acid, TMS (C11:0)	10.576	243	39,480,491	35,946,383	37,100,790	35,418,221	37,829,936	38,339,421	36,329,470	37,206,387	3.9
25	Oxoglutaric acid, 1MO, 2TMS_2	10.770	198	10,041,247	9,002,296	9,493,760	9,437,771	9,212,271	9,545,883	9,660,131	9,484,765	3.5
26	Tartaric acid, 4TMS	11.422	292	36,142,966	33,835,767	35,185,817	33,503,879	33,556,240	34,784,352	33,922,994	34,418,859	2.9
27	Lauric acid, TMS (C12:0)	11.730	257	34,019,712	30,843,613	31,807,900	30,715,216	32,702,959	33,030,530	31,277,833	32,056,823	3.9
28	cis-Aconitic acid, 3TMS	12.728	375	13,942,758	13,055,755	14,001,162	13,362,904	13,642,518	14,214,764	14,381,703	13,800,223	3.4
29	Azelaic acid, 2TMS	13.295	317	13,636,188	12,563,147	13,577,031	13,052,184	13,758,515	14,219,912	14,301,235	13,586,888	4.5
30	Citric acid, 4TMS	13.445	273	79,523,133	76,060,924	79,686,421	76,505,173	77,475,508	80,936,632	79,126,496	78,473,470	2.3

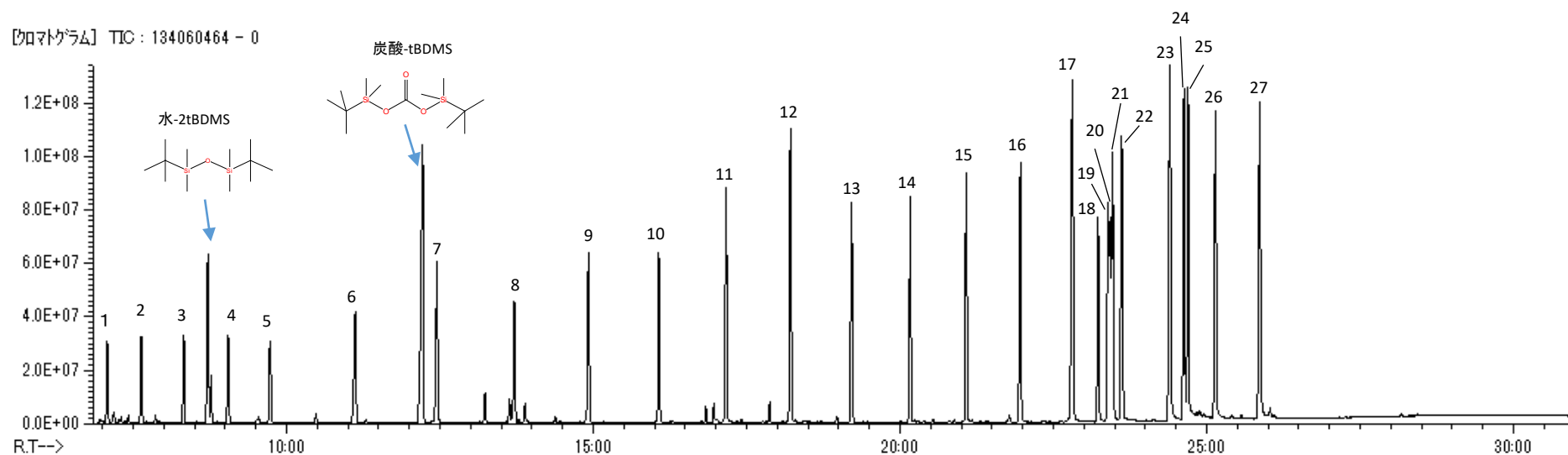
有機酸類 2 のピーク面積値の再現性

化合物メソッド				有機酸類2の固相誘導体化, ピーク面積値, n = 7								
No.	化合物名	RT	m/z	1	2	3	4	5	6	7	Ave.	RSD
1	Pyruvic acid_1MO_1TMS	4.143	174	2,841,749	2,630,460	2,701,569	2,569,328	2,556,974	2,332,694	2,402,680	2,576,493	6.7
2	2-Oxobutyric acid_1MO_1TMS_1	4.396	188	482,610	446,400	463,425	429,954	482,895	445,278	460,787	458,764	4.3
3	2-Oxobutyric acid_1MO_1TMS_2	4.747	188	2,091,585	1,917,085	2,073,619	1,977,437	2,014,711	1,833,052	1,965,720	1,981,887	4.5
4	Sarcosine_2TMS	5.206	116	46,156,178	45,654,935	46,151,480	44,371,416	45,590,364	43,978,619	44,883,582	45,255,225	1.9
5	2-Oxoisocaproic acid_1MO_1TMS_1	5.712	189	1,125,954	1,036,930	1,129,819	1,074,881	1,164,155	1,066,890	1,121,621	1,102,893	4.0
6	2-Oxoisocaproic acid_1MO_1TMS_2	6.170	216	1,197,691	1,134,411	1,279,596	1,279,643	1,221,911	1,164,489	1,218,536	1,213,754	4.5
7	Ethanolamine_3TMS	6.878	174	70,073,985	69,934,722	70,147,591	69,062,565	70,638,273	69,188,789	71,214,374	70,037,186	1.1
8	4-Hydroxyproline_3TMS	10.171	230	47,797,709	48,105,813	49,899,887	48,038,775	50,843,902	49,130,181	52,357,982	49,453,464	3.4
9	4-Aminobutyric acid_3TMS	10.254	304	12,113,774	12,552,734	12,645,555	12,336,543	13,049,968	12,933,063	13,997,370	12,804,144	4.8
10	Lauric acid(C12:0)_1TMS	11.730	257	15,785,021	15,854,356	15,444,658	17,766,782	16,999,001	14,605,450	16,687,396	16,163,238	6.6
11	Quinolinic acid_2TMS	12.568	296	3,711,170	3,663,201	3,688,776	3,842,367	4,026,603	3,885,254	4,071,231	3,841,229	4.3
12	Tridecanoic acid(C13:0)_1TMS	12.819	271	16,202,845	16,217,519	15,859,709	18,045,629	17,546,272	15,087,601	17,243,668	16,600,463	6.3
13	Hippuric acid_2TMS	13.414	206	6,957,862	6,739,079	6,790,891	7,241,610	7,347,934	6,810,989	7,032,803	6,988,738	3.4
14	Myristic acid (C14:0)_1TMS	13.861	285	18,733,874	18,713,455	18,370,678	21,079,191	20,344,809	17,648,294	20,030,821	19,274,446	6.4
15	Hippuric acid_1TMS	13.904	206	5,942,145	5,648,997	6,137,239	6,081,478	5,854,603	5,442,026	6,026,158	5,876,092	4.3
16	3-Hydroxyanthranilic acid_3TMS	14.011	354	12,184,427	11,714,411	10,761,840	10,316,026	10,571,153	9,759,273	9,890,798	10,742,561	8.4
17	Pentadecanoic acid(C15:0)_1TMS	14.856	299	17,089,723	16,727,676	16,731,622	19,158,596	18,495,639	16,120,323	18,513,912	17,548,213	6.6
18	3-Indoleacetic acid_2TMS	15.061	202	50,466,623	48,489,757	48,147,519	50,055,962	52,334,536	48,068,402	49,969,309	49,647,444	3.1
19	Gluconic acid_6TMS	15.214	333	10,206,979	9,578,579	9,405,468	9,895,026	10,761,458	10,268,702	10,769,313	10,126,503	5.3
20	Palmitic acid (C16:0)_1TMS	15.807	313	17,827,426	17,421,910	17,539,259	19,824,492	19,076,941	17,041,465	19,332,428	18,294,846	6.0
21	Margaric acid(C17:0)_1TMS	16.716	327	16,101,900	14,940,153	15,836,235	17,121,565	16,369,371	14,770,255	17,205,161	16,049,234	6.0
22	Linoleic acid(C18:2)_1TMS	17.330	337	4,353,385	3,898,621	4,278,047	4,374,701	4,112,596	3,856,002	4,470,350	4,191,958	5.8
23	Oleic acid(C18:1)_1TMS	17.374	339	7,322,969	6,453,642	7,205,303	7,294,594	6,844,032	6,518,644	7,508,810	7,021,142	5.9
24	Stearic acid (C18:0)_1TMS	17.589	341	17,509,311	15,545,239	16,929,499	16,648,663	15,855,704	16,226,070	17,746,507	16,637,285	4.9
25	Nonadecanoic acid(C19:0)_1TMS	18.427	355	13,669,575	10,366,424	13,353,834	11,018,426	10,349,585	11,315,689	12,466,094	11,791,375	11.7
26	Arachidonic acid_1TMS	18.678	117	6,358,410	4,646,208	6,013,556	4,822,220	4,279,669	4,666,361	4,915,727	5,100,307	15.2
27	Arachidic acid(C20:0)_1TMS	19.233	369	16,237,970	10,599,769	15,869,567	10,487,604	10,023,701	12,844,339	12,963,310	12,718,037	20.1
28	Heneicosanoic acid(C21:0)_1TMS	20.008	383	12,861,598	6,954,522	13,157,688	6,448,952	6,265,479	9,676,271	8,747,249	9,158,823	31.7

糖類のピーク面積値の再現性

化合物メソッド				糖類の固相誘導体化, ピーク面積値, n = 7								
No.	化合物名	RT	m/z	1	2	3	4	5	6	7	Ave.	RSD
1	Xylose, 1MeOX, 4TMS_2	11.600	307	4,809,718	4,821,789	4,653,258	4,713,040	4,403,079	4,727,094	4,740,278	4,695,465	3.0
2	Ribose, 1MO, 4TMS_1	11.682	307	5,429,918	5,330,322	5,165,746	5,233,475	4,868,090	5,324,381	5,326,166	5,239,728	3.5
3	Alabinose, 1MO, 4TMS	11.852	307	6,859,195	6,762,105	6,568,111	6,773,506	6,195,187	6,927,057	6,856,956	6,706,017	3.8
4	Rhamnose, 1MO, 4TMS_1	12.310	117	11,788,287	11,586,155	11,432,867	11,800,565	10,865,748	11,993,782	12,028,299	11,642,243	3.5
5	Ribitol, 5TMS	12.374	217	19,549,324	19,467,493	18,874,136	18,642,698	17,800,610	18,933,332	19,301,353	18,938,421	3.2
6	Fucose, 1MO, 4TMS_1	12.410	117	14,143,695	13,995,930	13,826,677	14,188,247	13,129,460	14,385,190	14,632,823	14,043,146	3.4
7	Fucose, 1MO, 4TMS_2	12.568	117	3,052,076	3,054,136	2,996,080	3,083,188	2,870,567	3,163,753	3,167,578	3,055,340	3.3
8	2-Deoxyglucose, 1MO, 4TMS	13.128	276	2,493,718	2,498,435	2,412,446	2,414,960	2,260,461	2,416,769	2,476,748	2,424,791	3.4
9	Fructose, 1MO, 5TMS_1	13.931	307	6,531,077	6,538,086	6,301,192	6,117,119	5,993,038	6,170,851	6,529,833	6,311,600	3.6
10	Fructose, 1MO, 5TMS_2	14.029	307	6,041,894	6,021,212	5,850,398	5,886,292	5,663,225	5,939,150	6,056,309	5,922,640	2.3
11	Mannose, 1MO, 5TMS_1	14.083	319	18,413,056	18,476,846	17,981,562	17,342,541	16,864,616	17,394,861	17,924,003	17,771,069	3.3
12	Galactose, 1MO, 5TMS_1	14.137	319	15,716,246	15,632,001	15,298,270	14,849,171	14,695,126	15,198,101	15,512,297	15,271,602	2.5
13	Glucose, 1MO, 5TMS	14.197	319	16,755,513	16,838,075	16,326,736	15,815,409	15,619,253	15,578,453	15,816,149	16,107,084	3.3
14	Mannose, 1MO, 5TMS_2	14.255	319	2,637,858	2,607,182	2,556,519	2,567,337	2,433,752	2,506,531	2,530,632	2,548,544	2.6
15	Galactose, 1MO, 5TMS_2	14.376	319	4,427,061	3,975,286	3,884,380	3,768,931	3,640,977	3,906,555	3,957,077	3,937,181	6.2
16	Mannitol, 6TMS	14.517	319	31,641,854	31,649,566	30,966,138	30,137,190	29,818,021	29,994,502	31,194,544	30,771,688	2.5
17	Sorbitol, 6TMS	14.586	319	25,962,463	25,633,109	25,151,218	24,521,152	23,961,313	24,664,776	25,540,820	25,062,121	2.8
18	Glucopyranose, 5TMS	14.999	204	3,448,843	3,181,722	3,198,539	2,699,342	2,814,562	3,501,534	4,021,086	3,266,518	13.7
19	myo-Inositol, 6TMS	16.117	305	32,054,624	31,826,219	31,305,678	30,440,197	30,213,540	30,676,881	31,921,163	31,205,472	2.4
20	Sucrose, 8TMS	20.541	361	65,097,386	84,827,962	72,474,874	81,613,253	72,041,534	77,513,359	68,097,708	74,523,725	9.6
21	Lactose, 1MO, 8TMS_2	20.920	361	15,665,199	22,901,469	17,922,399	21,561,589	17,623,254	19,170,607	14,646,857	18,498,768	16.1
22	Maltose, 1MO, 8TMS_2	21.289	361	29,122,306	41,531,667	33,071,146	39,241,426	32,179,348	35,307,084	27,880,112	34,047,584	14.7

短鎖・中鎖・長鎖脂肪酸：TBDMS化



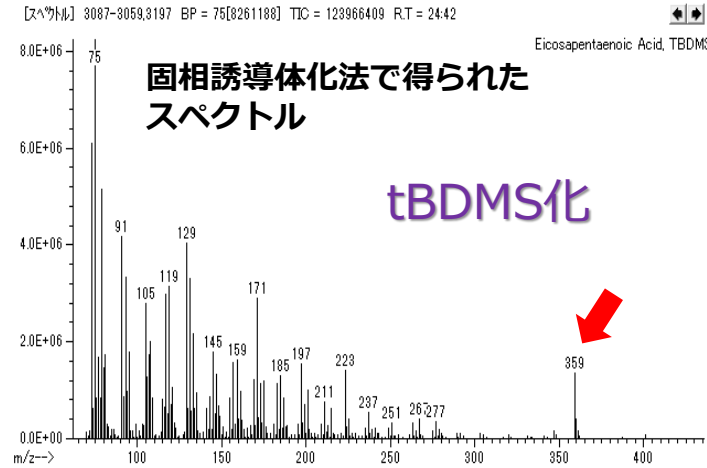
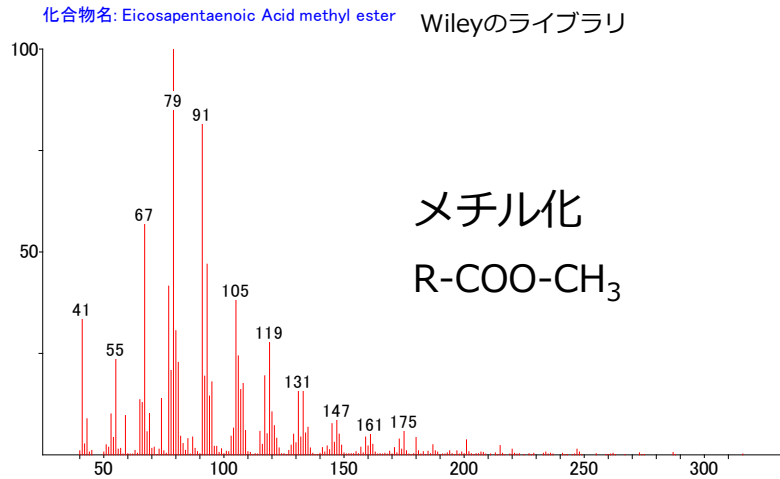
No.	R.T. min	慣用名	IUPAC	略称	和名
1	7.07	Propionic acid	Propanoic acid	3:0	プロピオン酸
2	7.62	Isobutyric acid	2-methylpropanoic acid		イソ酪酸
3	8.32	Butyric acid	Butanoic acid	4:0	酪酸
4	9.05	Isovaleric acid	3-methylbutanoic acid		イソ吉草酸
5	9.72	Valeric acid	Pentanoic acid	5:0	吉草酸
6	11.12	Caproic acid	Hexanoic acid	6:0	カプロン酸
7	12.43	Enanthic acid	Heptanoic acid	7:0	エナント酸
8	13.70	Caprylic acid	Octanoic acid	8:0	カプリル酸
9	14.90	Pelargonic acid	Nonanoic acid	9:0	ベラルゴン酸
10	16.05	Capric acid	Decanoic acid	10:0	カプリン酸
11	17.15	Undecylic acid	Undecanoic acid	11:0	ウンデシル酸
12	18.20	Lauric acid	Dodecanoic acid	12:0	ラウリン酸
13	19.20	Tridecylic acid	Tridecanoic acid	13:0	トリデシル酸
14	20.15	Myristic acid	Tetradecanoic acid	14:0	ミリスチン酸
15	21.07	Pentadecanoic acid	Pentadecylic acid	15:0	ペンタデカン酸

No.	R.T. min	慣用名	IUPAC	略称	和名
16	21.95	Palmitic acid	Hexadecanoic acid	16:0	パルミチン酸
17	22.78	Margaric acid	Heptadecanoic acid	17:0	マルガリン酸
18	23.22	γ -Linolenic acid		18:3(n-6)	γ -リノレン酸
19	23.38	Linoleic acid		18:2(n-6)	リノール酸
20	23.43	Oleic acid		18:1(n-9)	オレイン酸
21	23.47	α -Linolenic acid		18:3(n-3)	α -リノレン酸
22	23.58	Stearic acid	Octadecanoic acid	18:0	ステアリン酸
23	24.37	Nonadecylic acid	Nonadecanoic acid	19:0	ノナデシル酸
24	24.62	Arachidonic acid		20:4(n-6)	アラキドン酸
25	24.68	Eicosapentaenoic acid	Icosapentaenoic acid	20:5(n-3)	エイコサペンタエン酸
26	25.12	Arachidic acid	Eicosanoic acid	20:0	アラキジン酸
27	25.83	Heneicosanoic acid	Heneicosanoic acid	21:0	ヘンイコシル酸

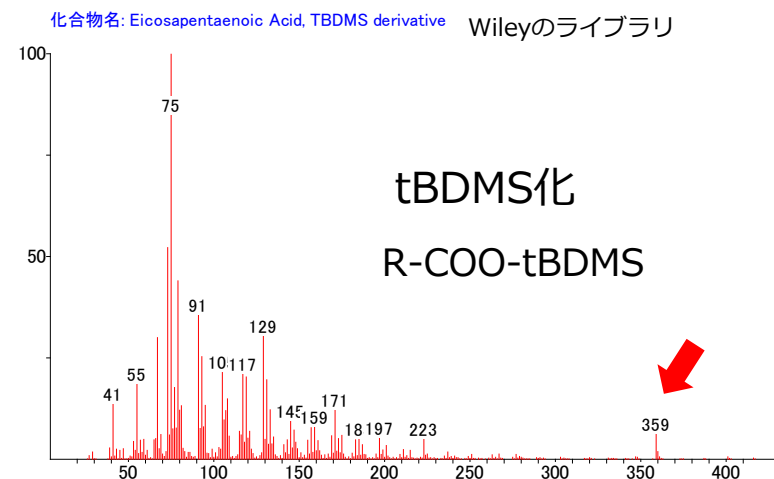
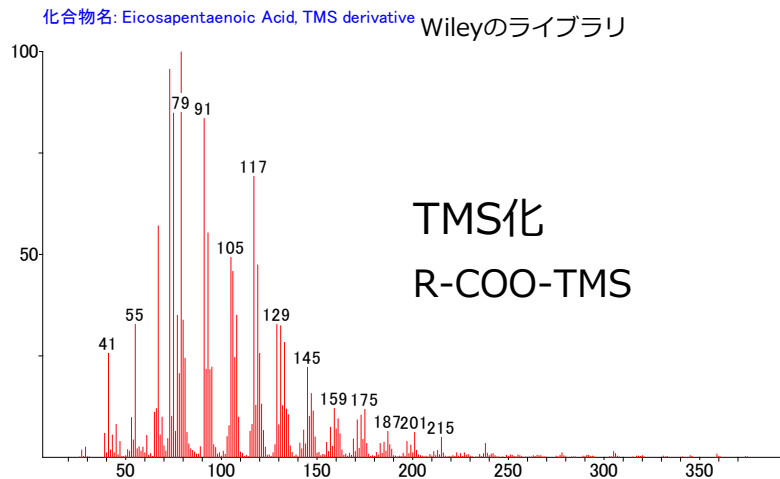
全て -tBDMS

高度不飽和脂肪酸の誘導体化の比較

EPA (エイコサペンタエン酸) をメチル化、TMS化、tBDMS化した時のスペクトル比較



tBDMS化はメチル化やTMS化と比較して、高い質量域でフラグメントイオンを持つため、定性が上がり、分析精度が上がる。

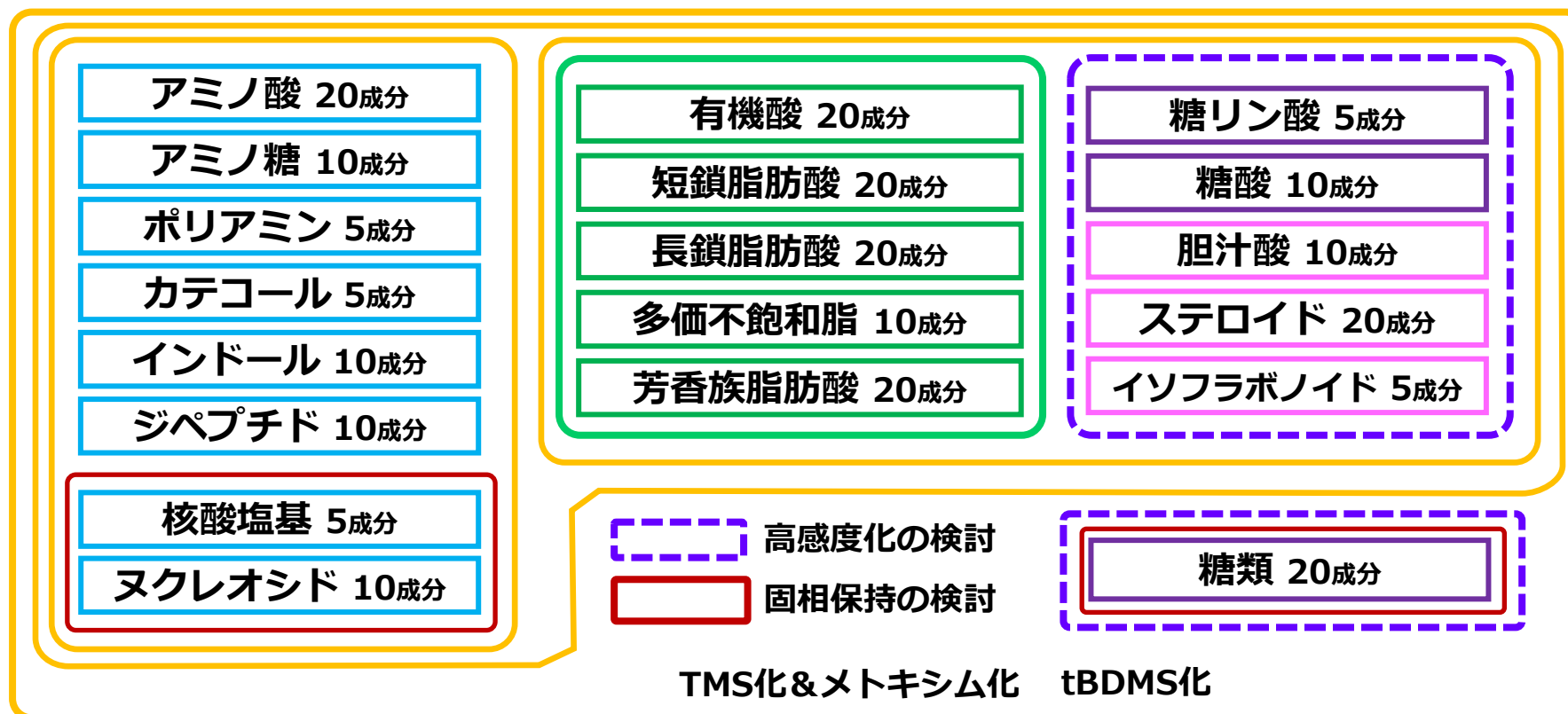


固相誘導体化法による対象成分拡大に向けて

目標

合計**200**成分以上

「種別」および「グループ」の
固相誘導体化法の開発



- ◆ **代謝回路**に合わせた代謝物の選定
- ◆ 既に研究報告されている**マーカー的代謝物**の選定
- ◆ **実試料**で検出された代謝物の選定

『Go-Tech事業』（2022～23年度）
共同研究機関

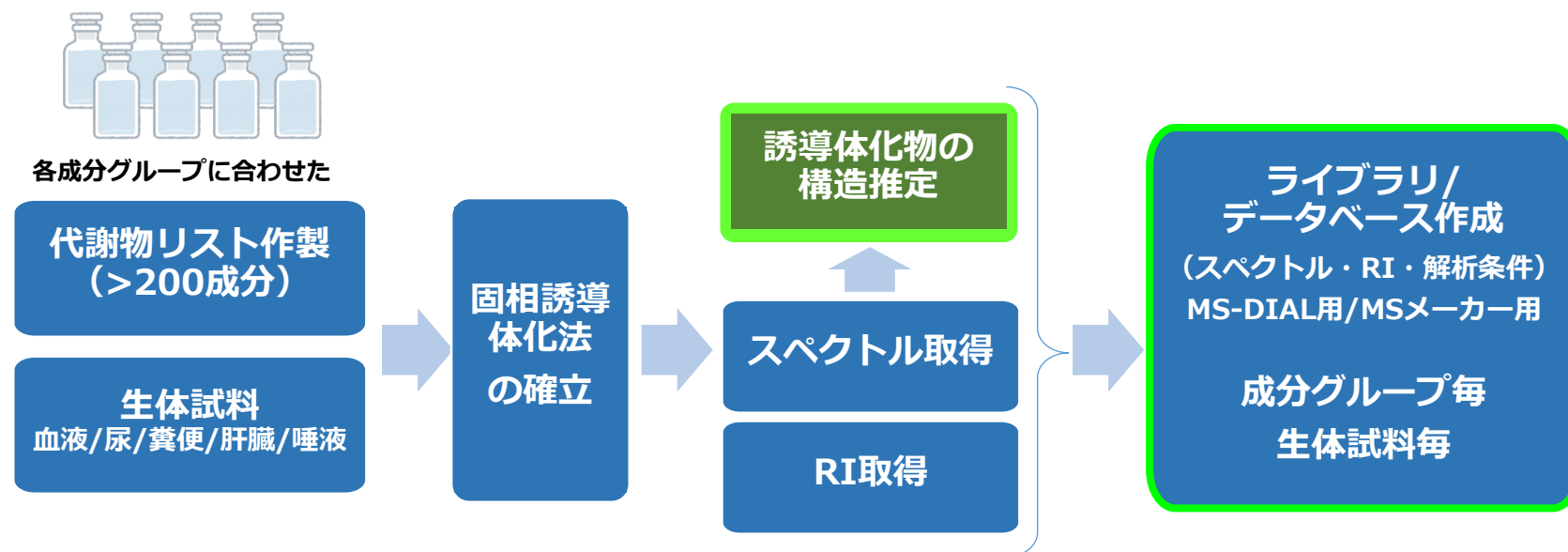
- ・アイステイサイエンス
- ・和歌山県工業技術センター
- ・大阪大学
- ・京都府立医科大学
- ・東京農工大

テーマ1 固相誘導体化法の検討

【1. 新規分析対象成分(代謝物)の固相誘導体化法の開発】

【1-2】スペクトルデータベース作成

■【1-1】で得られたスペクトルデータのデータベース化



誘導体化が確認できた代謝物120成分のスペクトルをデータベース化

血漿を固相誘導体化して得られた成分の定性確認

目標 データベース作成成分数: 200成分以上

テーマ2 各生体試料と目的成分に適した分析法の開発

生体試料

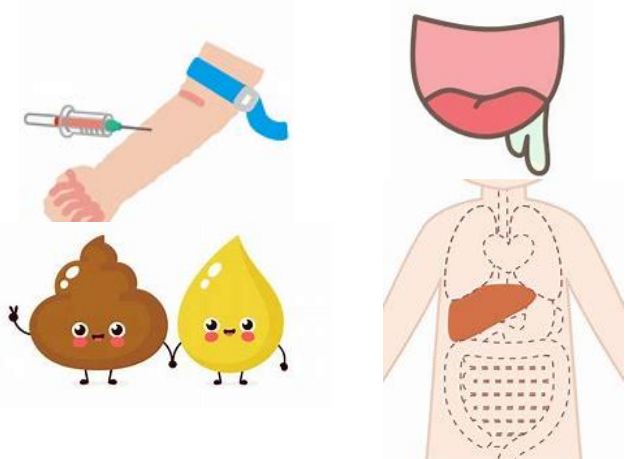
- 血漿・血清
- 尿
- 糞便
- 臓器 (肝臓)
- 唾液

目的成分

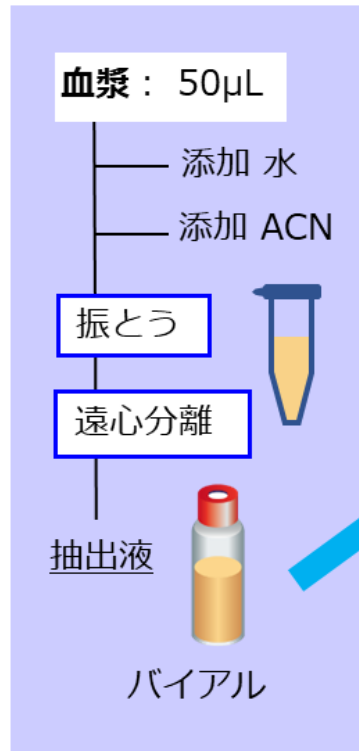
- 濃度
物性
- ・ LogPOW
 - ・ pKa
 - ・ 沸点
 - ・ 分子量
 - ・ 安定性

サブテーマ

- 【2-1】 サンプルング/抽出方法の確立
- 【2-2】 生体試料中の夾雑成分の除去
- 【2-3】 微量生体試料への応用

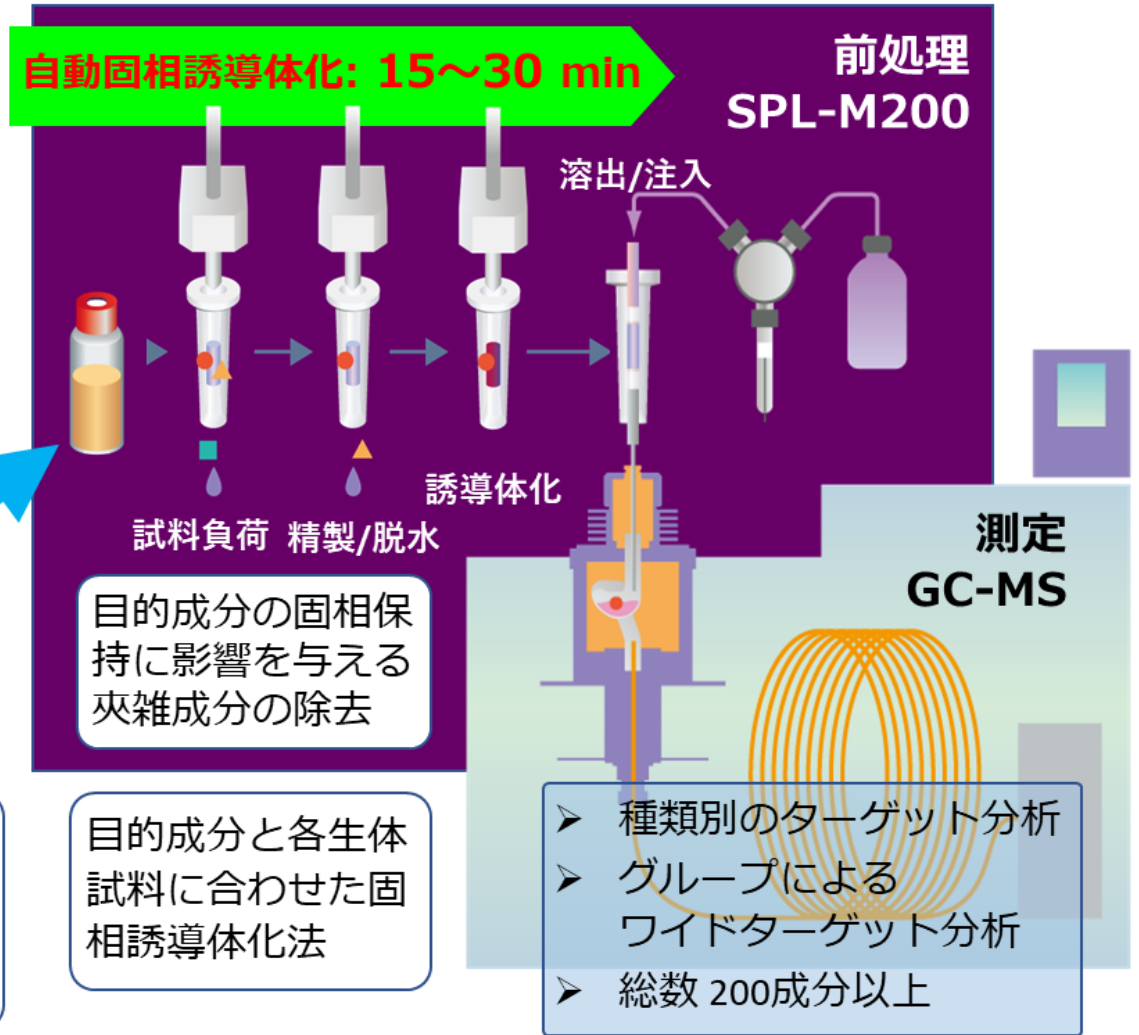


① サンプルング/抽出



血液、尿、唾液
糞便、組織 (肝臓)
の目的成分に適した
サンプルング/抽出法

② 「固相誘導体化」から「測定」まで完全自動化

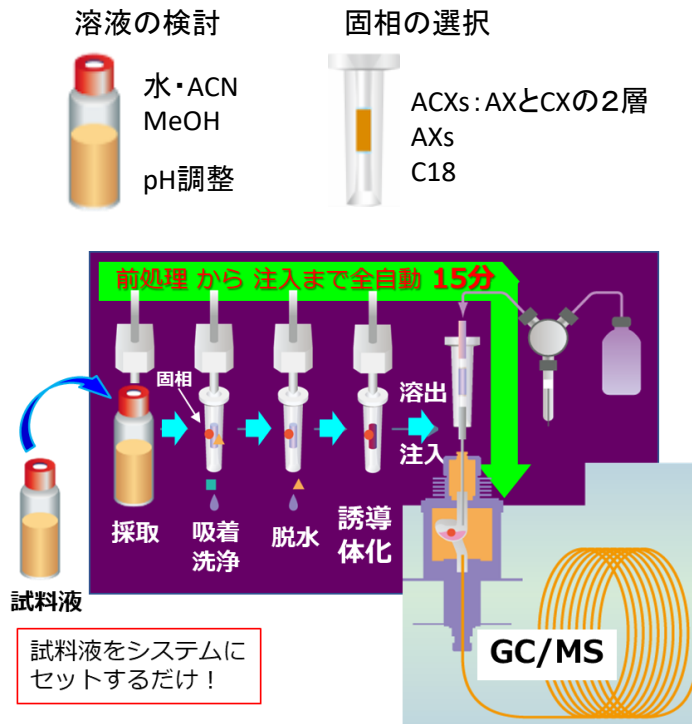


目的成分と各生体
試料に合わせた固
相誘導体化法

- 種類別のターゲット分析
- グループによる
ワイドターゲット分析
- 総数 200成分以上

【1-1】新規分析対象成分の種類別またはグループ別の固相誘導体化法の開発

■ 選定した代謝物140成分の単成分毎のオンライン固相誘導体化(例:グリシン)

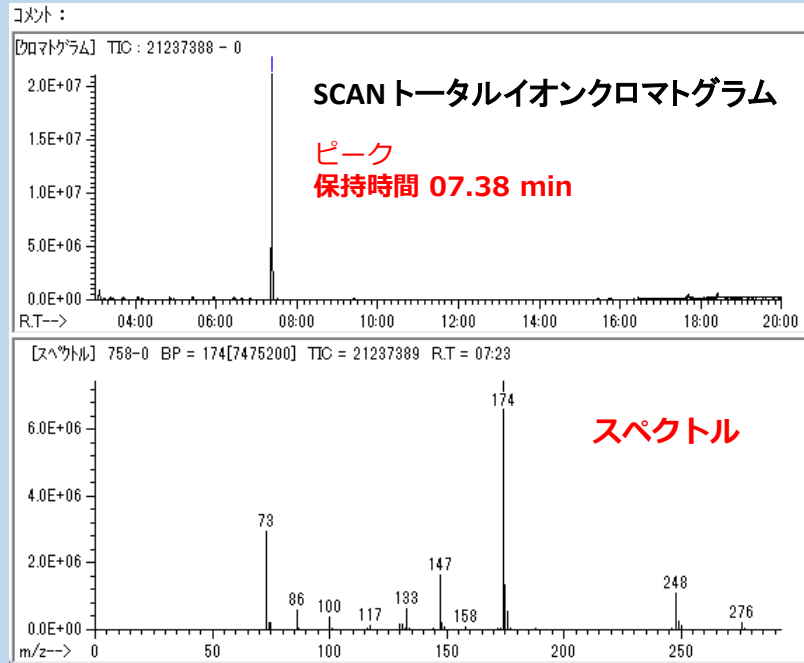


140成分中**120**成分の代謝物の誘導体化を確認した。

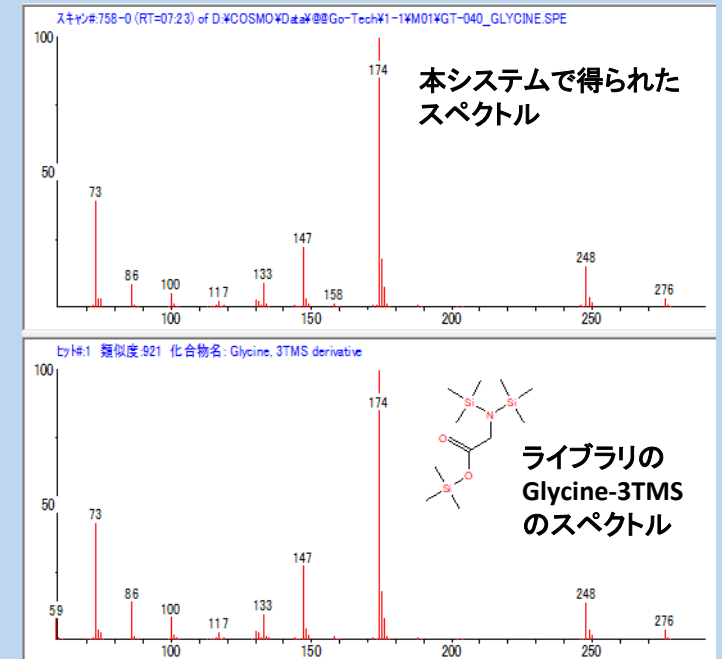
GT-040_Glycine



■ 本システムによる測定結果



■ スペクトルライブラリ検索による定性確認



ステロール類_C18のSCAN-トータルイオンクロマトグラム (検討中)

■ M06-2_C18_STR_100uL

A: Flash-SPE C18 : 保持

負荷[保持] 試料抽出液 100 μ L

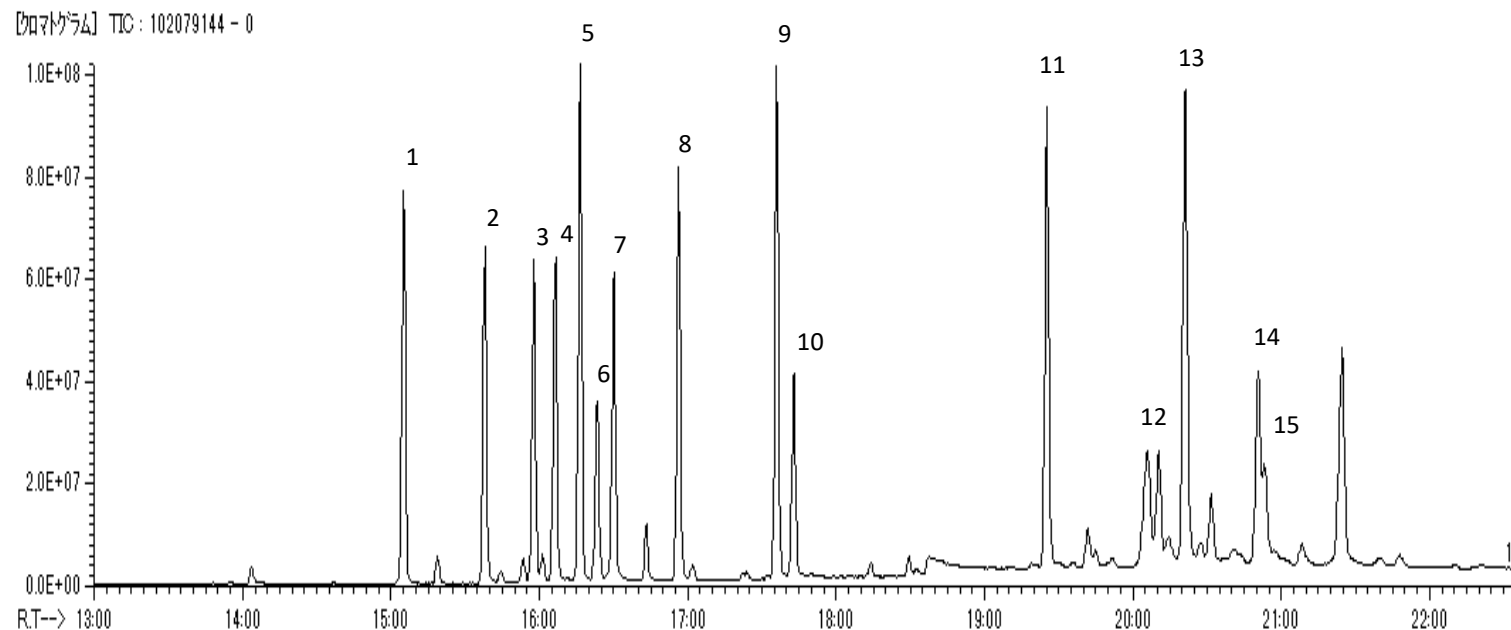
洗液 Syr3 : ACN-水 (1/3)

乾燥 N2ガス

添加 Syr1 : D1 : MSTFA-トルエン

溶出 Syr5 : トルエン

GC-MS : スプリット比 1:50



1. Androsterone-TMS

2. Dehydroepiandrosterone-TMS

3. Dihydrotestosterone-TMS

4. Estrone-TMS

5. Estradiol-2TMS

6. Androstenedione

7. Testosterone-TMS

8. Pregnenolone-TMS

9. Estriol-3TMS

10. Progesterone

11. Cholesterol-TMS

12. Aldosterone-2TMS

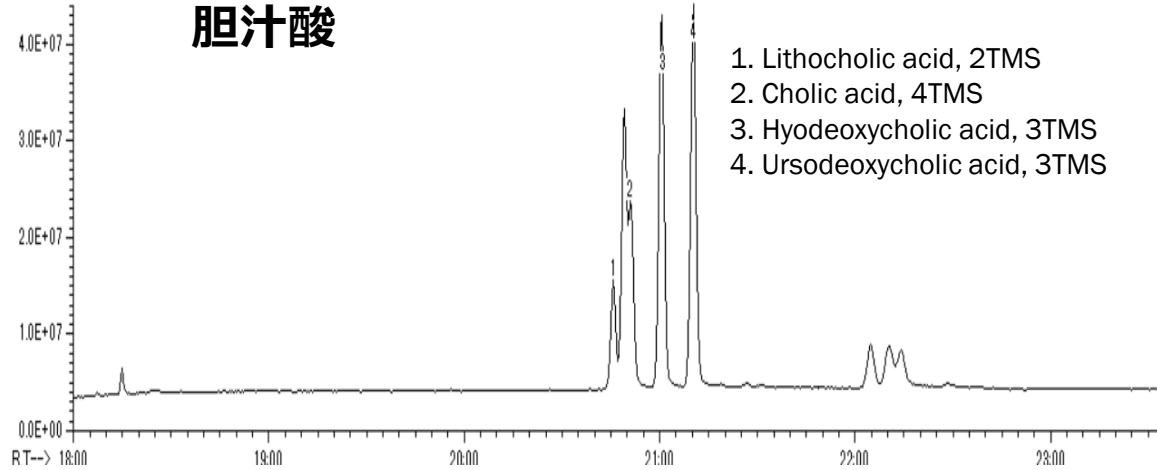
13. Stigmasterol-TMS

14. beta-Sitosterol-TMS

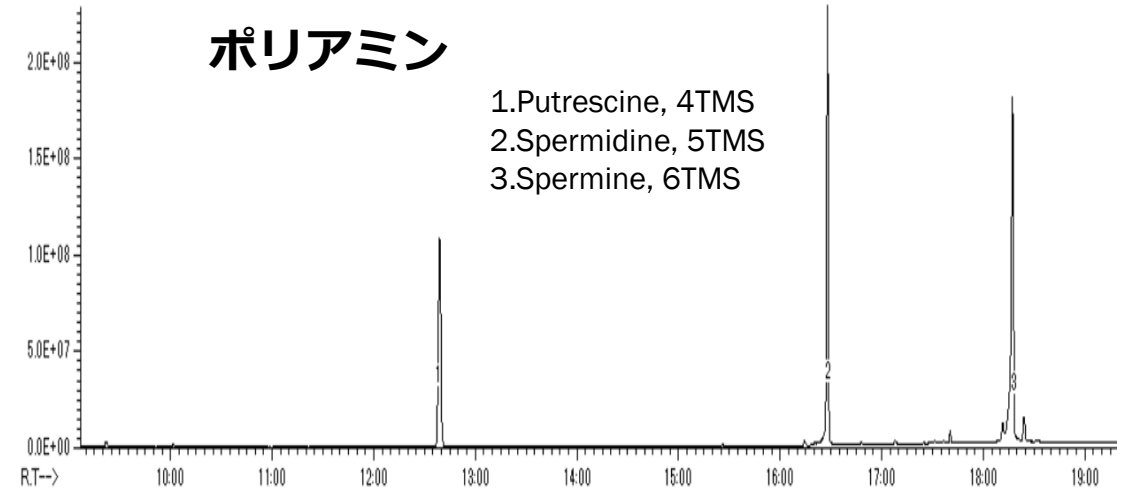
15. Lanosterol-TMS

種類別のSCAN-トータルイオンクロマトグラム (検討中)

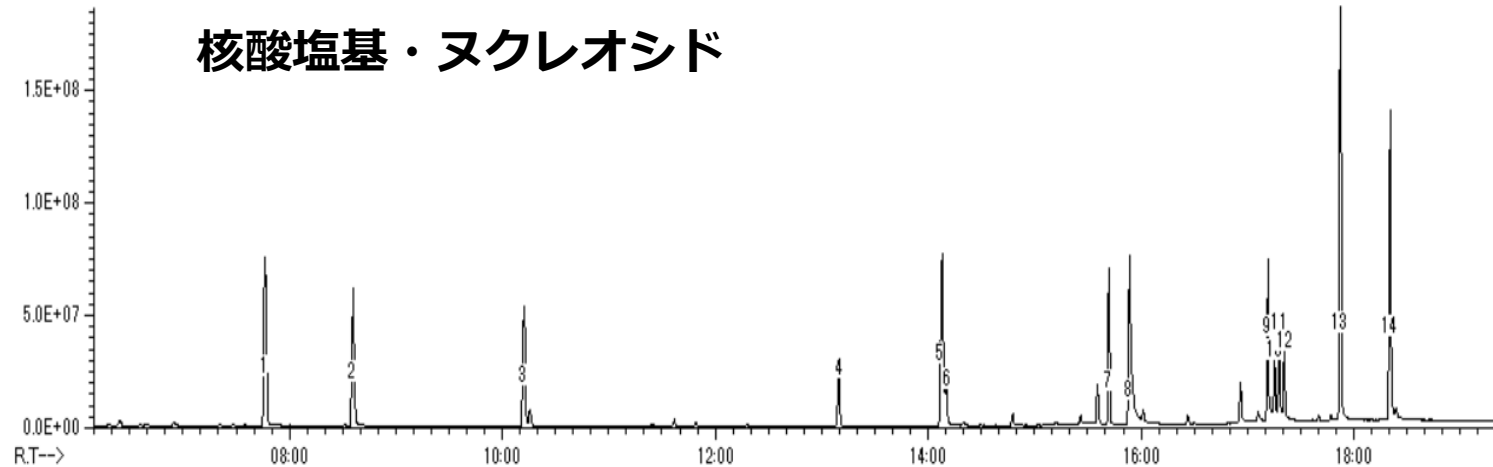
[クロマトグラム] TIC: 44104484 - 0



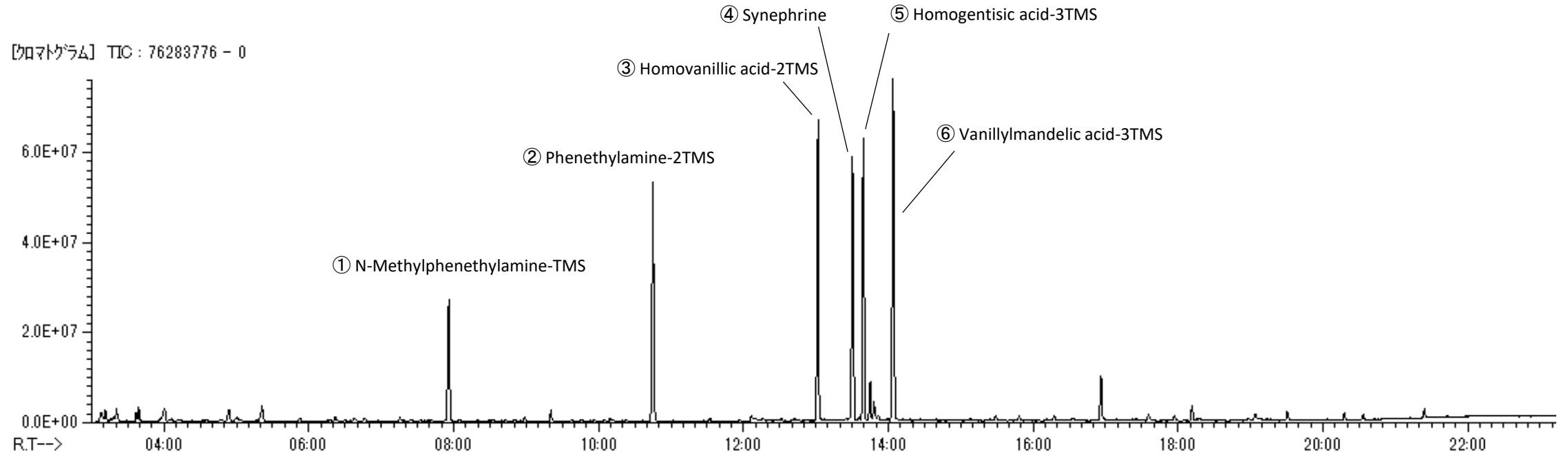
[クロマトグラム] TIC: 229057280 - 0



[クロマトグラム] TIC: 187094208 - 0



フェネチル: (検討中)



Homogentisic acid

Dopa

Adrenaline, Epinephrine

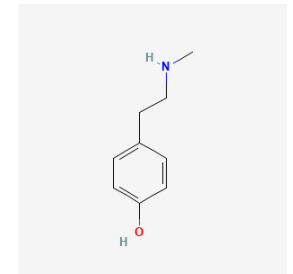
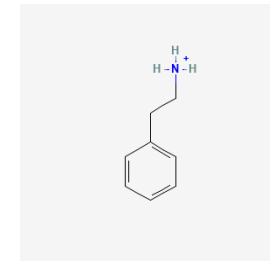
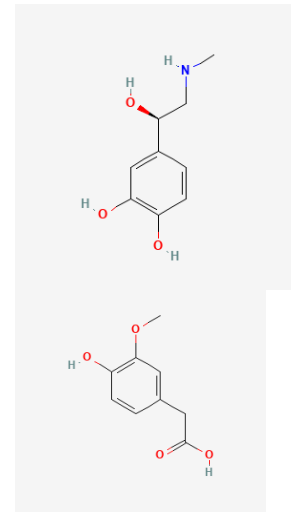
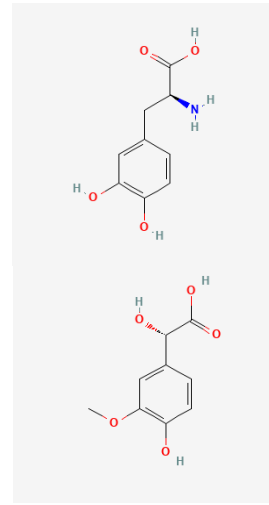
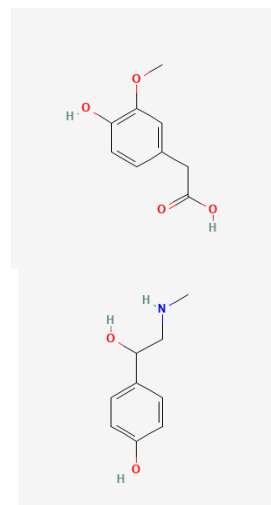
Phenethylamine

N-Methylphenethylamine

Synephrine

Vanillylmandelic acid

Homovanillic acid



【3-1】内部標準物質の選定

■ 各グループ毎の内標となる代謝物の選定

できるだけ天然にない安価に購入できるものを選定した。

選定	対象・目的	コメント
ノルロイシン	アミノ酸	天然にない
アジピン酸	有機酸	天然にない
リビトール	糖類	従来使用されている
ヘキサン酸-d11	短鎖脂肪酸	安定同位体

■ 誘導体化添加や溶出の操作確認のための指標

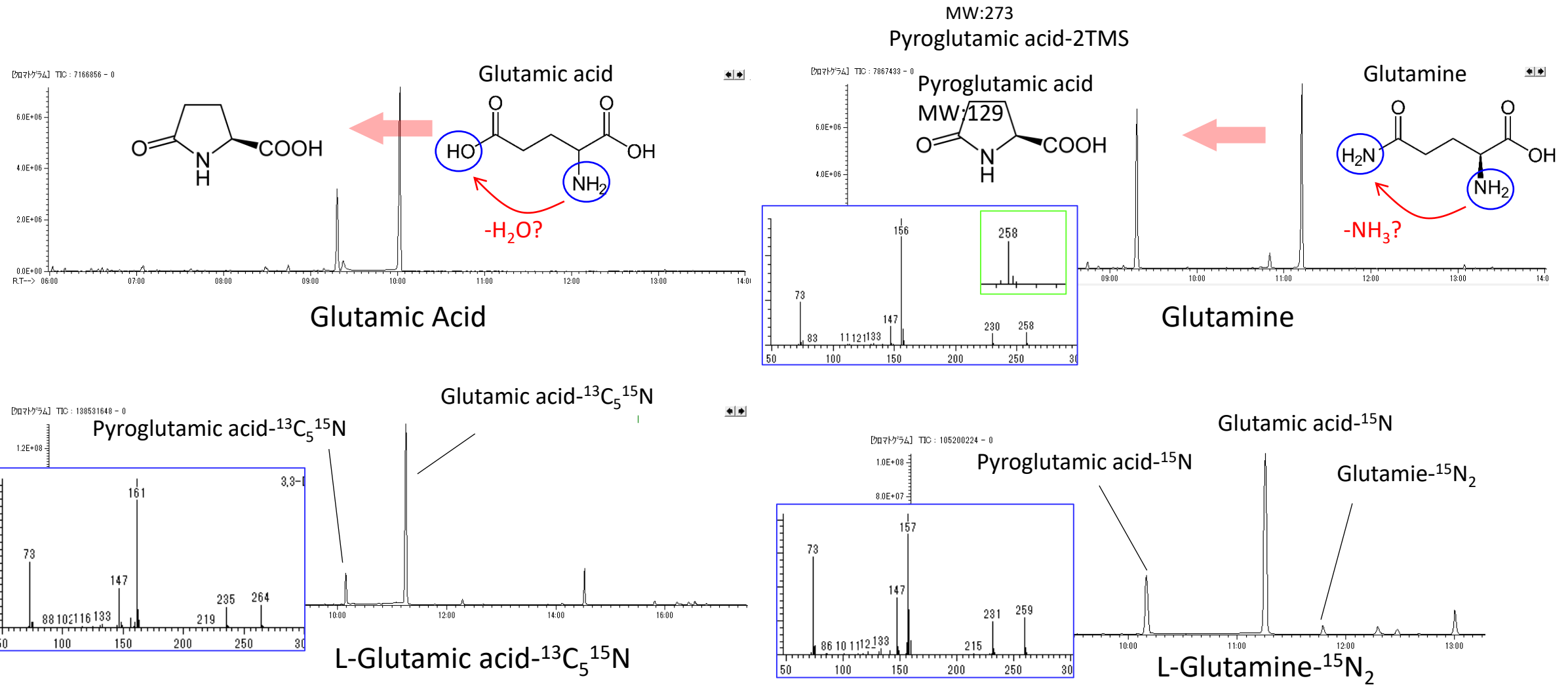
選定	対象・目的	濃度×注入量 =導入量（絶対量）	調製方法
n-C20	メトキシアミン/ピリジン溶液	50ng/μL×4μL =200ng	n-C20/ピリジン 1,000 ng/μL 50μLを MTA/ピリジン溶液1mLに添加
n-C22	トルエン（溶出液）	10ng/μL×25μL =250ng	n-C22/hexane 10,000 ng/μL 50μLを トルエン（溶出液）50mLに添加
n-C24	MSTFA-トルエン(3/1)	25ng/μL×10μL =250ng	n-C24/トルエン 100 ng/μL 333μLを MSTFA 1mLに添加

■ 安定同位体の選定

各グループの内標として、または**変化しやすい代謝物の安定同位体**を選定した。

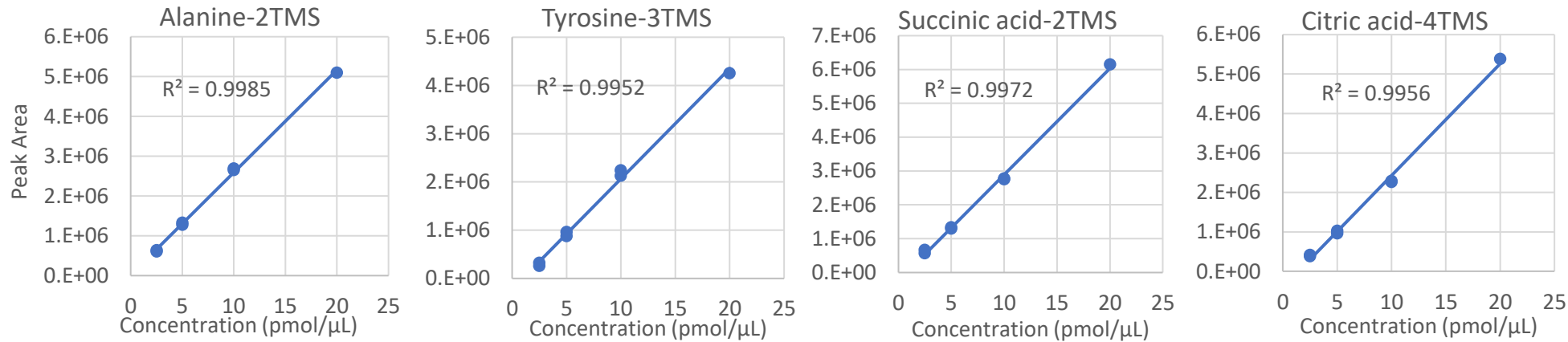
選定	対象・目的
アラニン-d3	アミノ酸の安定同位体
マロン酸-d4	有機酸の安定同位体
ステアリン酸-d35	脂肪酸の安定同位体
酢酸-d4	酢酸の安定同位体
グルタミン酸- ¹³ C5, ¹⁵ N	グルタミン酸の安定同位体
グルタミン- ¹⁵ N2	グルタミンの安定同位体
グルコース-d7	グルコースの安定同位体
オキサロ酢酸-?（探索中）	オキサロ酢酸の安定同位体

グルタミン酸とグルタミンと安定同位体の測定結果



不安定な成分については安定同位体を用いて補正することを検討した。

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）

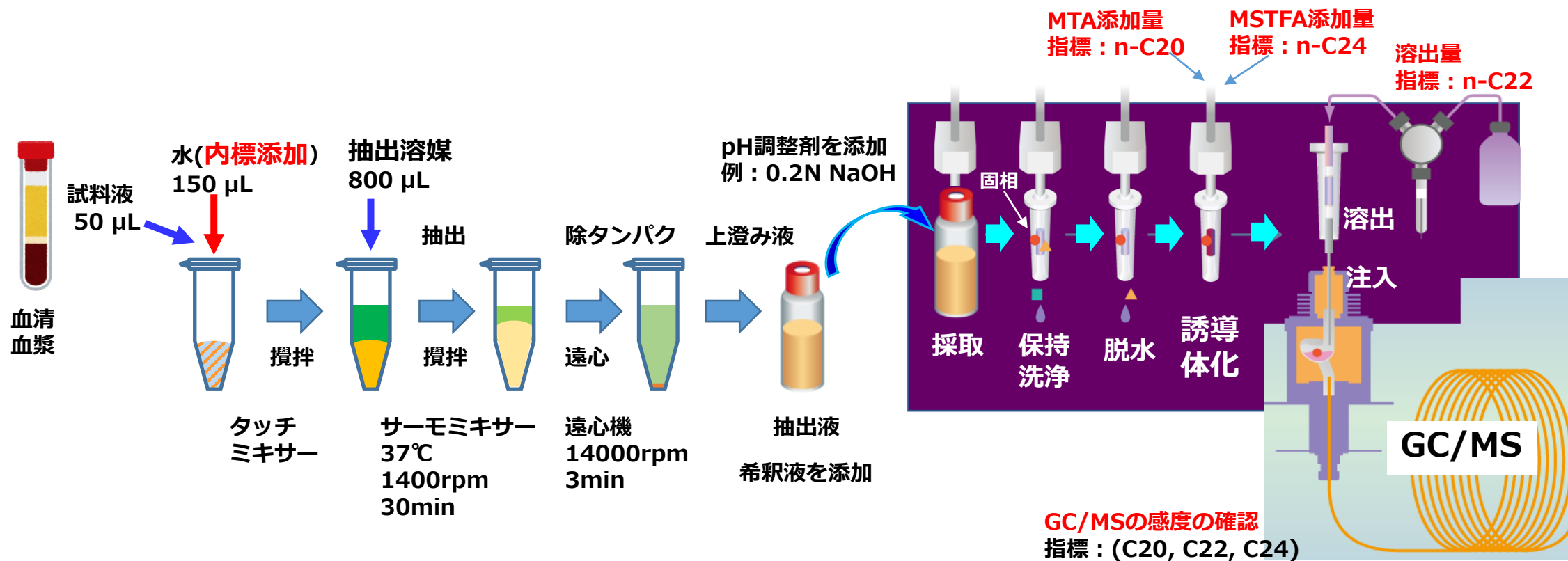
混合成分が多すぎても・・・（頭打ちになる）

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。

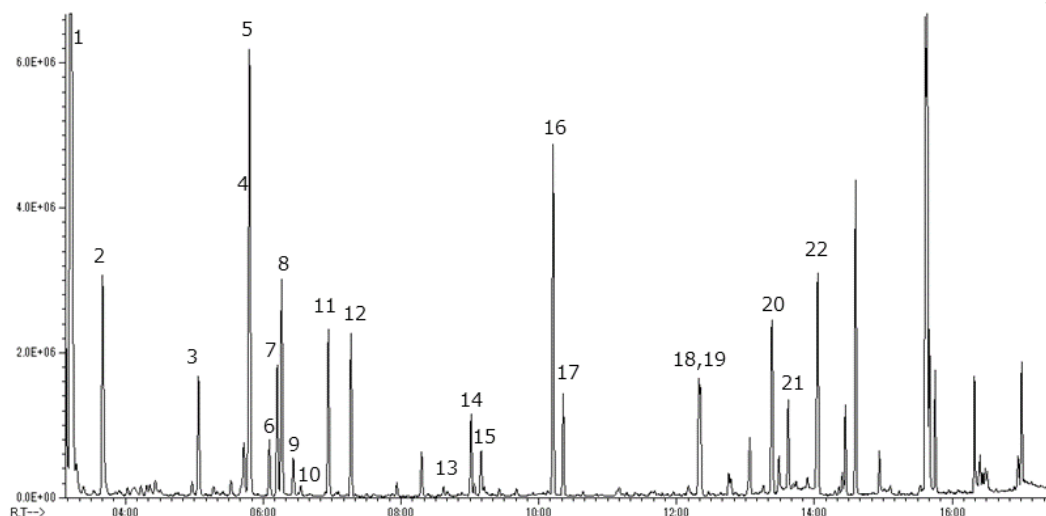
イオン交換樹脂は保持できるイオン数が決まっており、椅子取りゲームとなります。

血清/血漿の分析方法



マウス血清の分析結果

■ マウス血清のSCAN-TIC



- | | | |
|------------------------|--------------------------|----------------------|
| ① Lactic acid-2TMS | ⑪ Serine-3TMS | ⑳ Tyrosine-3TMS |
| ② Alanine-2TMS | ⑫ Threonine-3TMS | ㉑ Gluconic acid-6TMS |
| ③ Valine-2TMS | ⑬ Malic acid-3TMS | |
| ④ Leucine-2TMS | ⑭ Aspartic acid-3TMS | |
| ⑤ Phosphoric acid-3TMS | ⑮ Pyroglutamic acid-2TMS | |
| ⑥ Isoleucine-2TMS | ⑯ Glutamic acid-3TMS | |
| ⑦ Proline-2TMS | ⑰ Phenylalanine-2TMS | |
| ⑧ Glycine-3TMS | ⑱ Ornithine-4TMS | |
| ⑨ Succinic acid-2TMS | ㉒ Citric acid-4TMS | |
| ⑩ Glyceric acid-3TMS | ㉓ Lysine-4TMS | |

■ マウス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,% (A-M)/(ST-B)
		ST	B	M	A	
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

アミノ酸、有機酸メソッドでの再現性、耐久性試験

	RT	マウス血清 Lot.1 100回		マウス血清 Lot.2 100回	
		average	%RSD	average	%RSD
Lactic acid 2TMS	2.74	1688847	5.0	1853041	6.2
Alanine 2TMS	3.06	587522	2.7	740790	2.2
Malonic acid 2TMS	3.79	31366	3.8	40091	3.8
Valine 2TMS	3.87	237318	2.5	298638	2.2
Benzoic Acid, TMS	4.13	7221	8.7	7318	8.5
Leucine 2TMS	4.27	469204	2.6	590823	2.0
Isoleucine 2TMS	4.42	102421	2.4	130129	2.2
Proline 2TMS	4.46	309139	3.9	407225	2.4
Maleic acid 2TMS	4.50	69701	4.1	88390	4.0
Glycine 3TMS	4.51	294420	4.2	370639	4.0
Succinic acid 2TMS	4.57	54141	2.0	66357	2.1
Serine 3TMS	4.87	185988	3.3	233449	3.8
Threonine 3TMS	5.04	86354	3.3	107792	3.9
Malic acid 2TMS	5.69	1857	7.2	2407	6.7
Methionine 2TMS	5.89	23333	11.8	32971	9.8
Aspartic acid 3TMS	5.89	101645	2.8	128257	6.2
Glutamic acid 3TMS	6.49	428765	5.8	552463	6.5
Phenylalanine 2TMS	6.53	102432	3.2	132811	2.7
Citric acid 4TMS	7.57	47365	4.0	59399	5.5
Lysine 4TMS	8.10	71583	4.4	95368	5.6
Tyrosine 3TMS	8.19	196160	3.5	248644	4.6
Palmitelaidic acid, TMS	8.60	26320	6.7	25599	6.5
Palmitic Acid, TMS	8.69	168891	4.2	169496	4.2
Cysteine 3TMS	9.62	5876	9.5	9146	8.4

マウス血清 Lot.1を100回連続測定し、その1週間後マウス血清 Lot.2を100回連続測定しました。

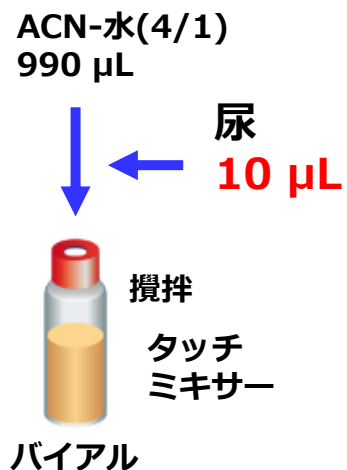
インサート、ガードチップ、カラム等の交換、イオン源の洗浄等のメンテナンスはしていません。

ピーク面積値（絶対値）の結果です。

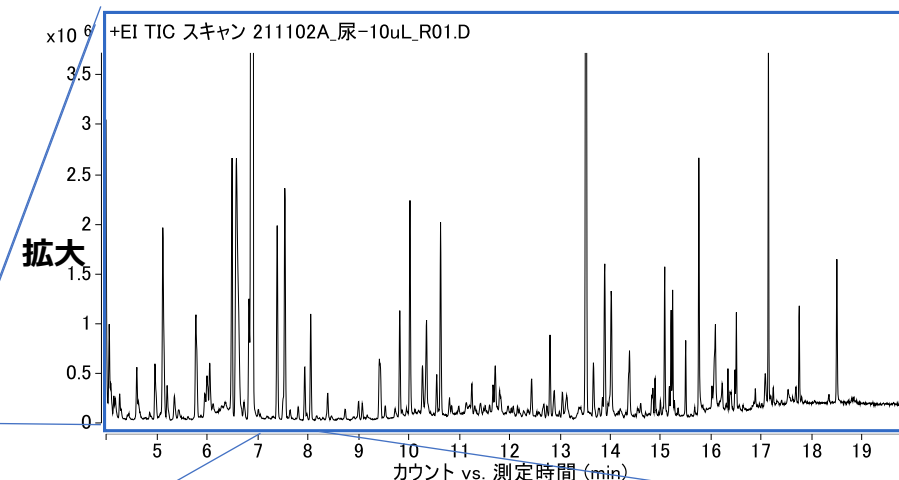
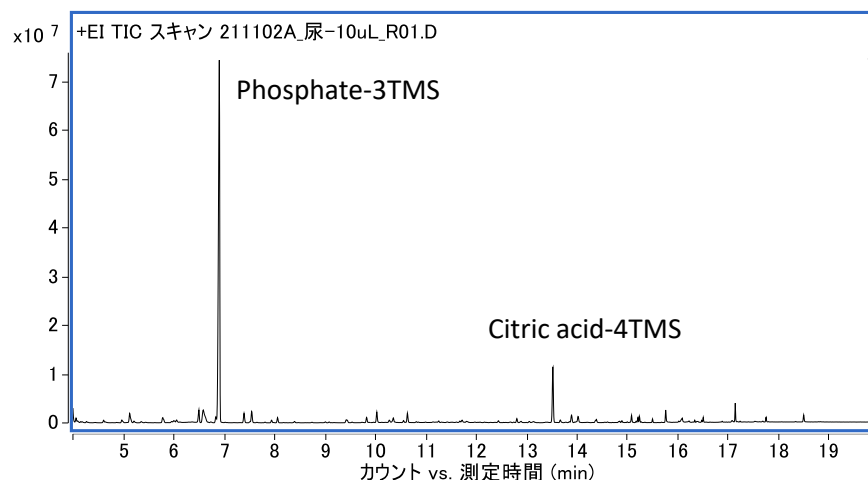
内標による補正はしていません。

【参考資料】
第15回メタボロームシンポジウム
アジレント・テクノロジー杉立氏
発表資料（共同研究）

尿の分析

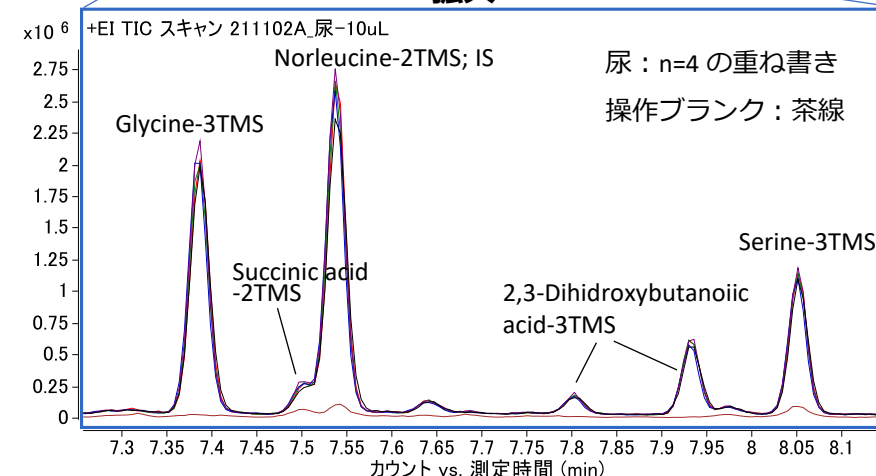


■ 本法による尿のSCAN-TIC



■ ピーク面積値 (絶対値) ※内標による補正はしていません。

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



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。

農作物中アミノ酸/有機酸の一斉分析

【抽出】

(50 mLの遠沈チューブ)

試料採取 10 g **凍結粉砕した試料**

— 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



ドライアイス凍結粉砕

農作物の可食部100~200 g にドライアイスを加えて凍結粉砕する。

常温粉砕



きゅうり

凍結粉砕



ささみ肉



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。

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。

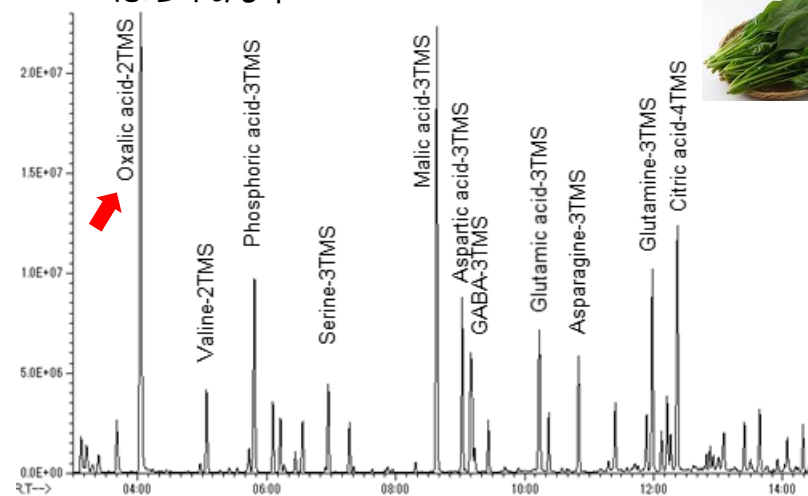
B. トマト

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。

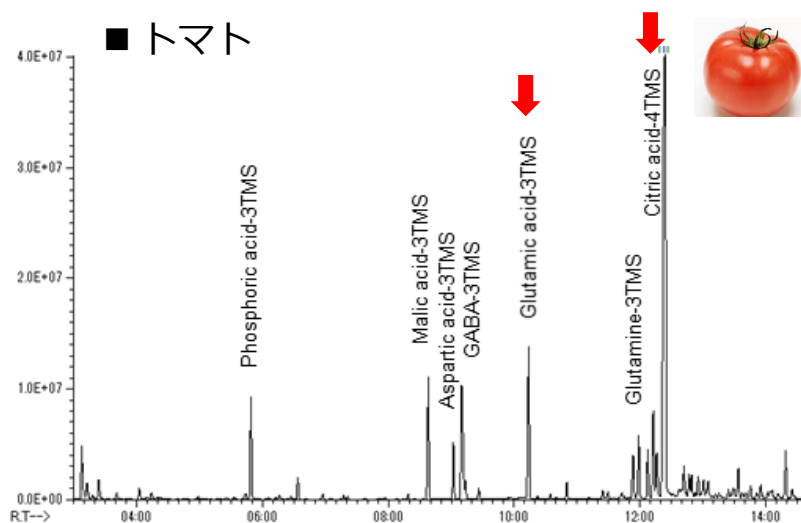
C. うめ

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。

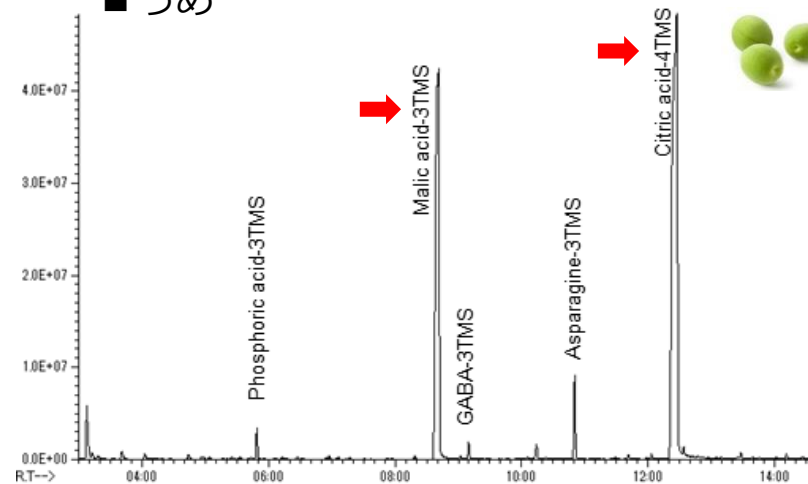
■ ほうれん草



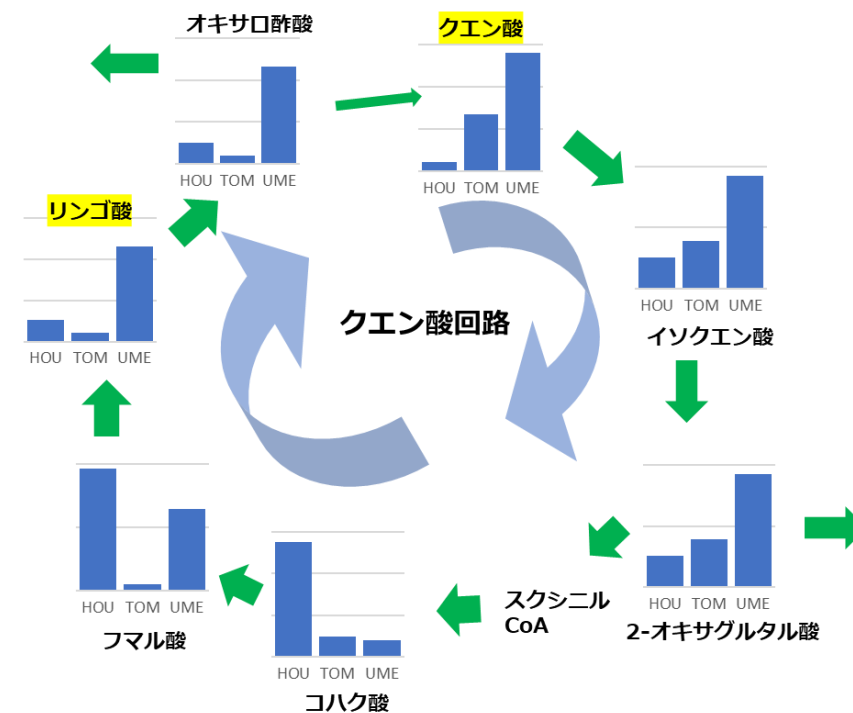
■ トマト



■ うめ

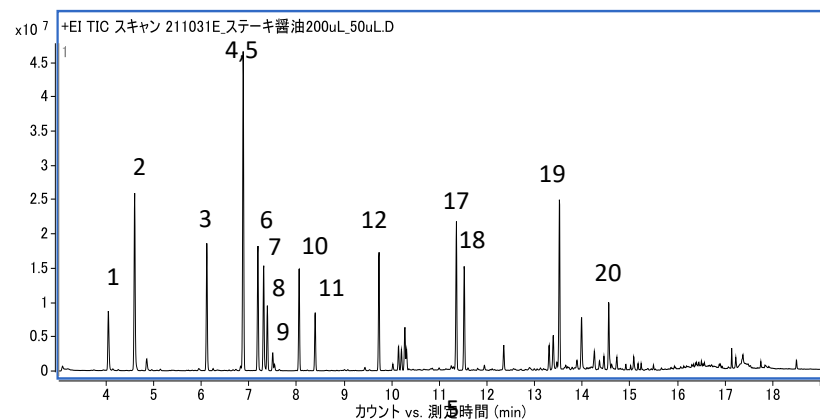


各農作物の成分量比較と代謝マップ



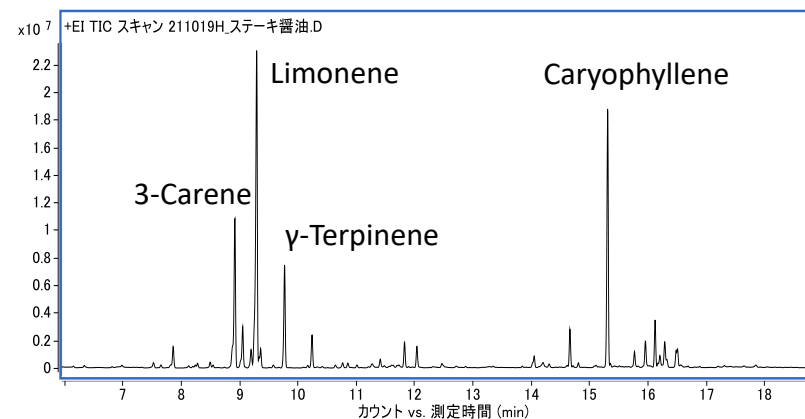
ステーキ醬油の成分分析とにおい成分分析

固相誘導体化法による ステーキ醬油の成分分析



- | | |
|-------------------------|----------------------------|
| 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 |

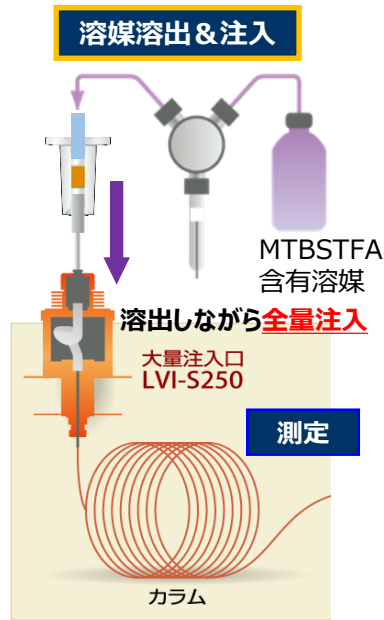
固相捕集-溶媒溶出法による ステーキ醬油のにおい成分分析



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

納豆：におい-誘導体化分析

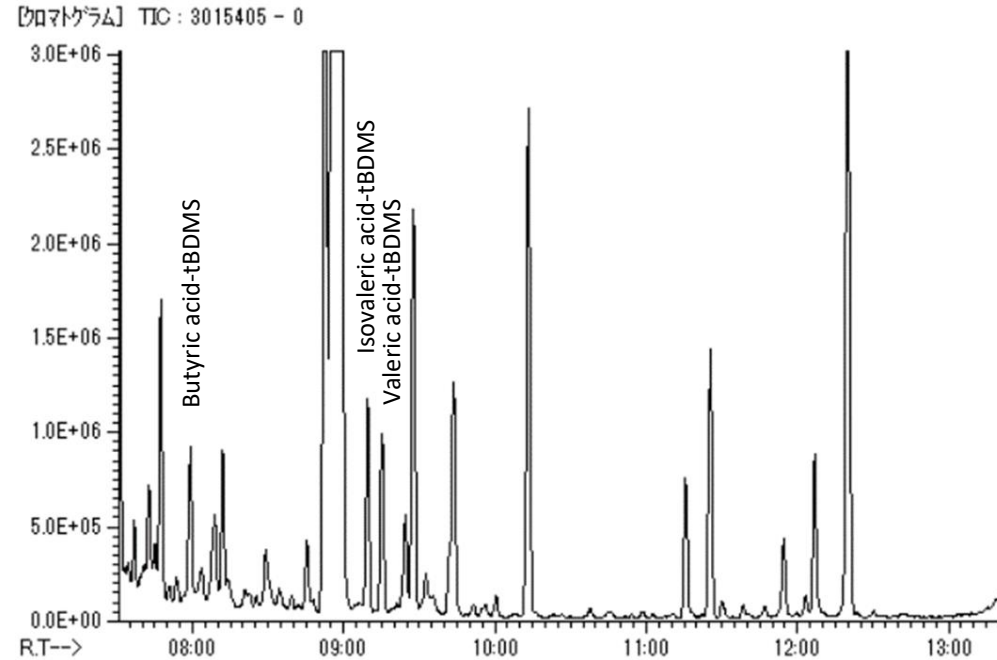
誘導体化



誘導体化

誘導体化試薬を含有した溶媒で溶出しながら胃袋型インサートを備えたGC注入口へその溶出液を導入し、インサート中で誘導体化。

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。



におい成分を誘導体化することでこれまで見えていなかった成分が見えてくる。

糞便中短鎖脂肪酸分析への応用などいろいろな分析の可能性。