

# 固相誘導体化法を用いたメタボローム分析の紹介



2023年

株式会社アイスティサイエンス

佐々野僚一

Beyond your Imagination

# 株式会社アイスティサイエンス

## ・所在地

本社・ラボ：和歌山県和歌山市

東日本営業所：埼玉県朝霞市

## ・事業内容：分析機器および周辺機器製造の販売



Analytical instrument developed by Saika Technological Institute

※雑賀技術研究所（和歌山市）

# 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

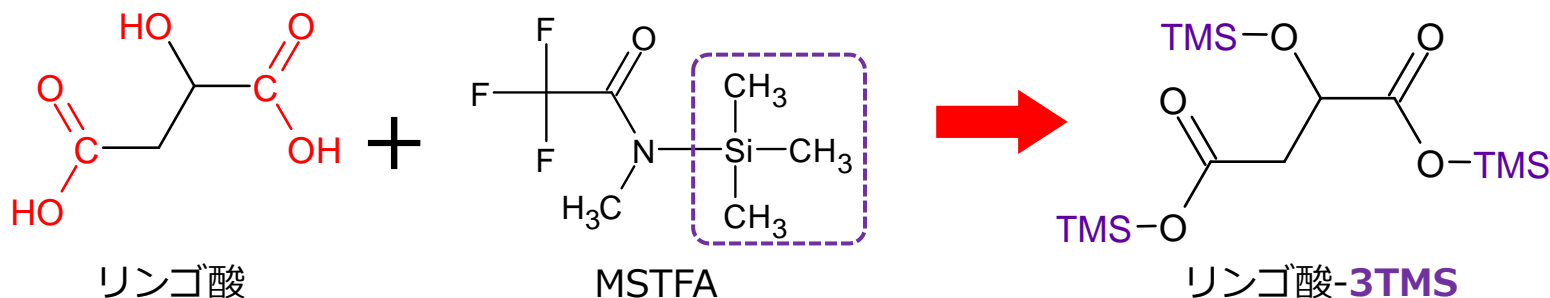
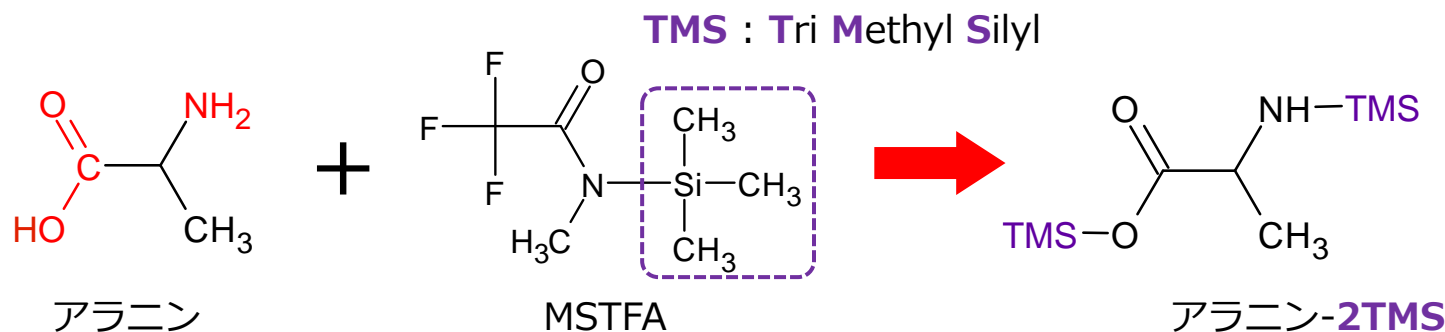
## 本研究の目的

**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**

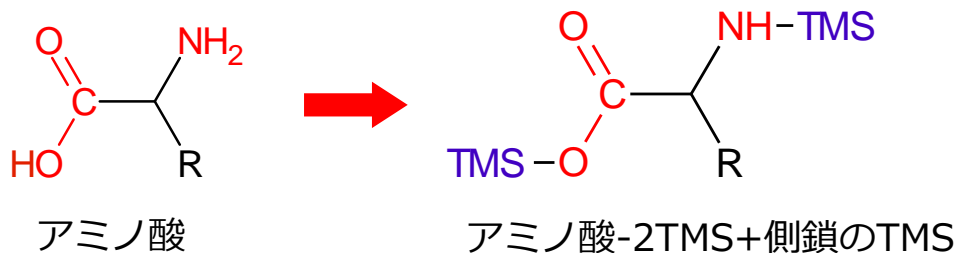
# アミノ酸と有機酸のTMS (Tri Methyl Silyl) 化

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

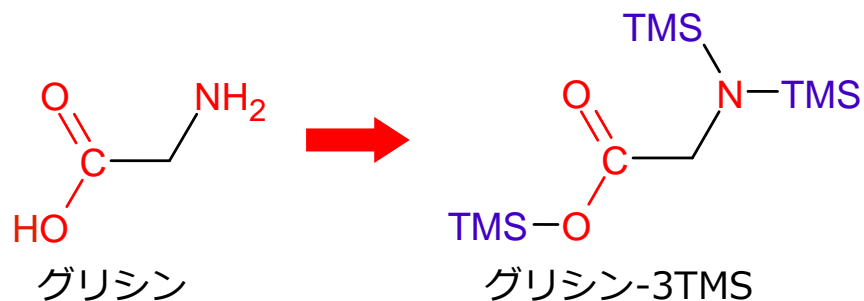
参考文献 :  
 小川茂, ぶんせき, 2006, 7, 332-336



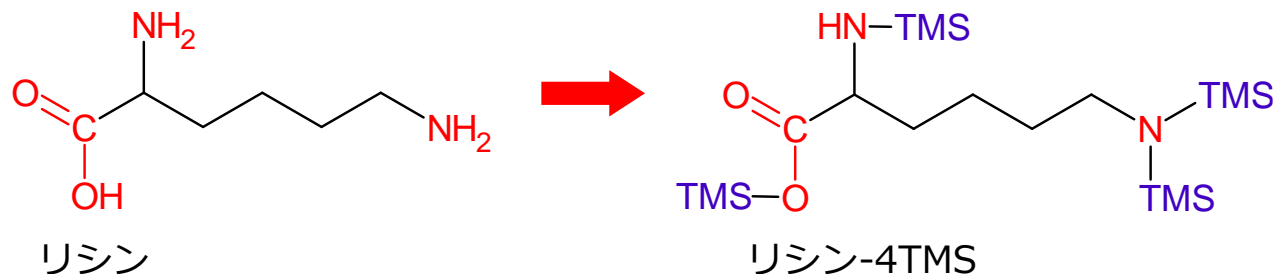
# アミノ酸のTMS化について



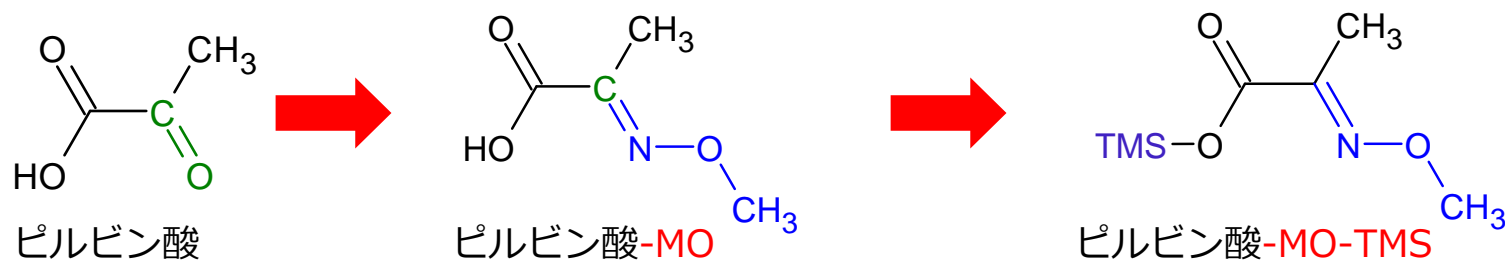
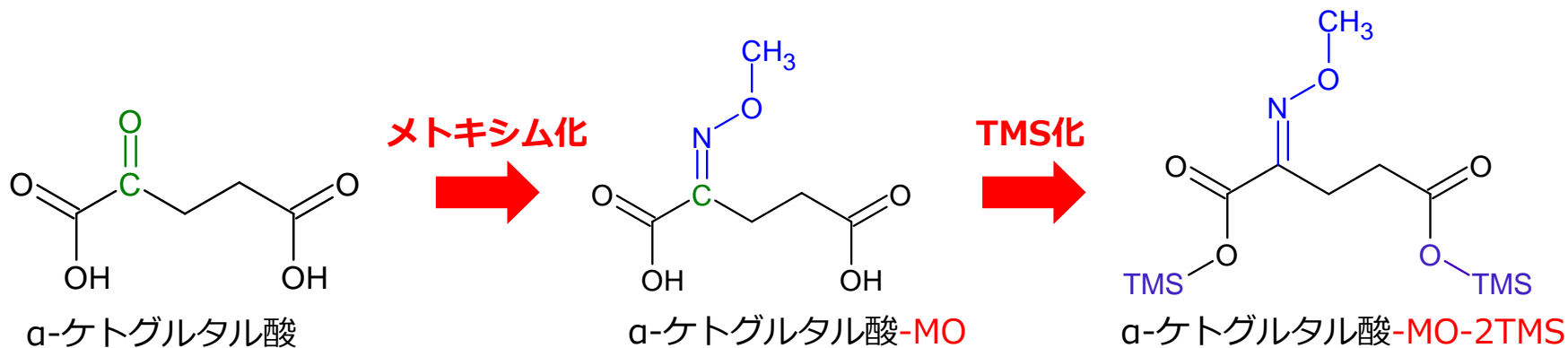
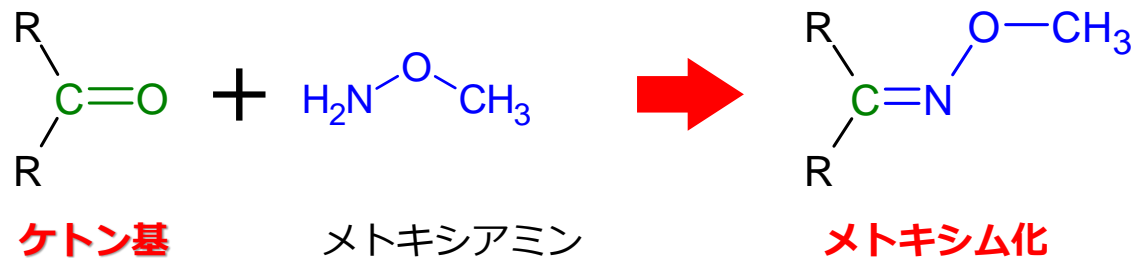
**α炭素にRが結合している場合**  
 α炭素に結合しているアミンには  
**1つのTMS**しか結合しない。



**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。

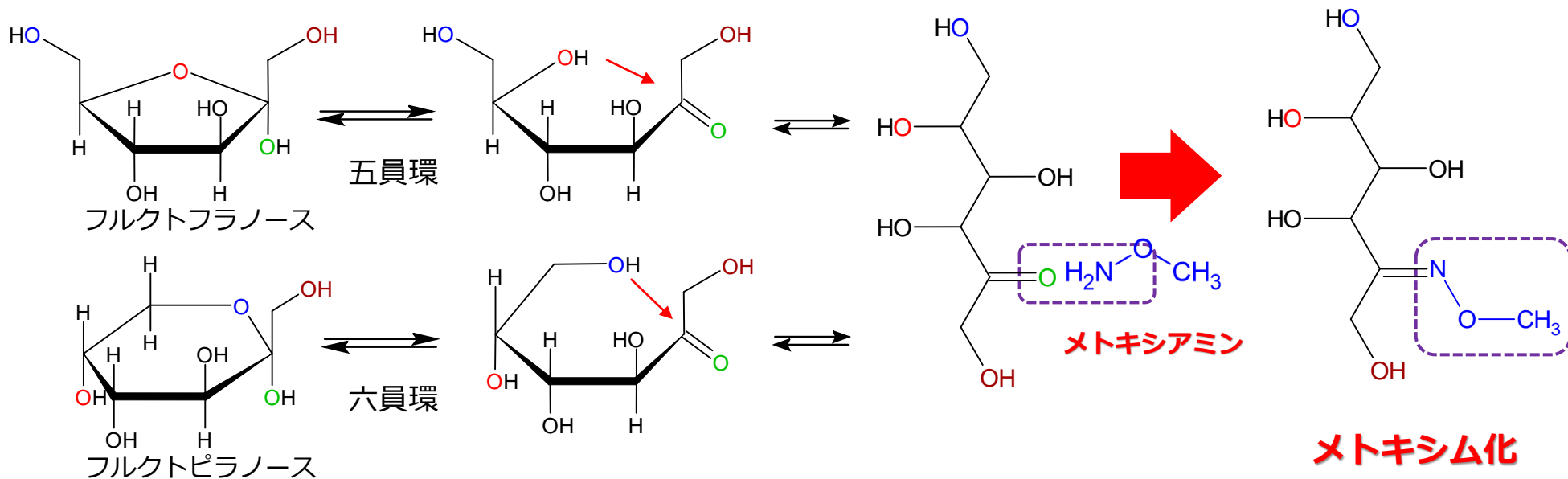


# メトキシシム化について



# 糖類の異性体とメトキシシム化

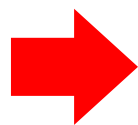
## ■フルクトースの場合



環状構造

直鎖構造（開環構造）

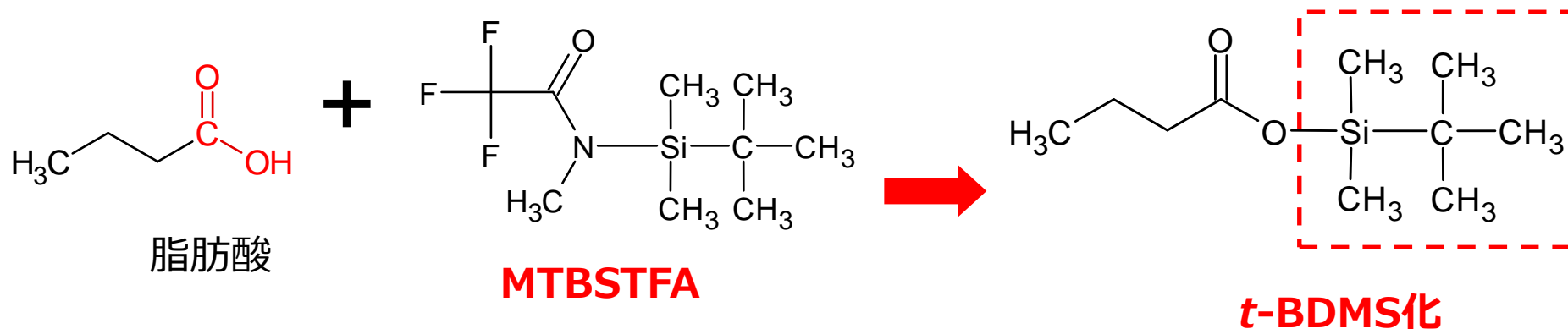
糖類は多くの異性体を持つため、そのままTMS化するとピークがいくつも出現してしまう。



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。

# 短鎖脂肪酸の t-BDMS誘導体化

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

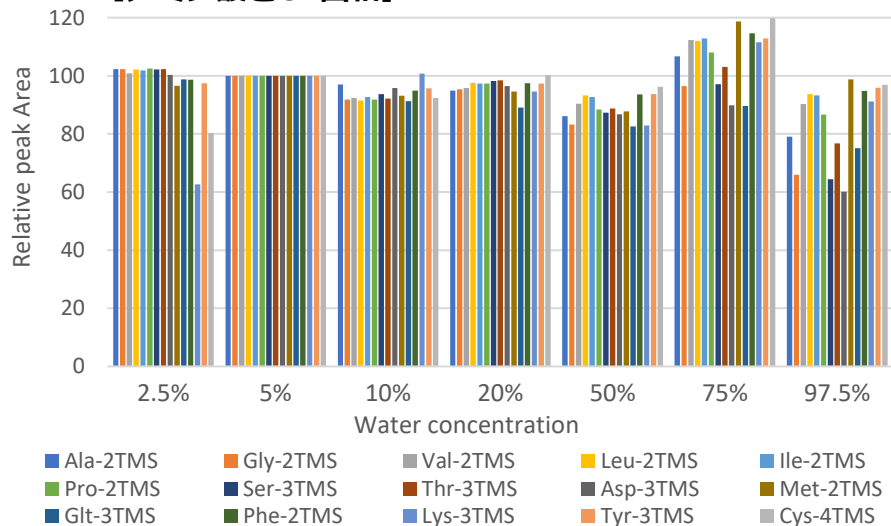


- t-BDMS化はTMS化より質量数が大きくなり、分析しやすくなる。
- TMS 誘導体は加水分解されやすいのに対し、t-BDMS 誘導体は加水分解に対し安定している。
- 分子量に近いところでのフラグメントイオンを得られるため解析しやすい。

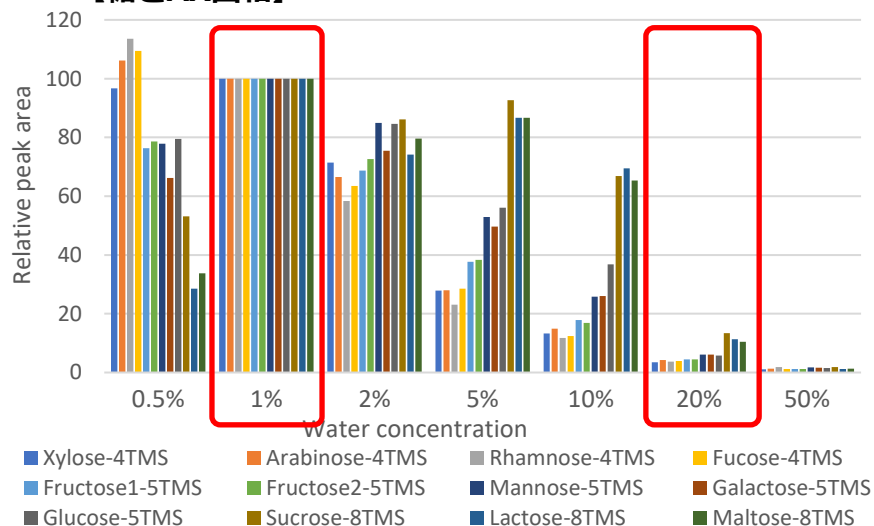


# 試料負荷時の水濃度と固相への保持について

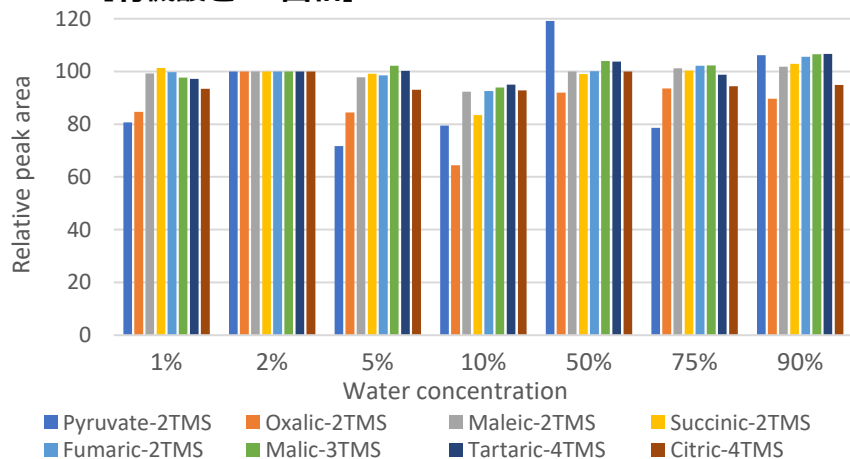
【アミノ酸とCX固相】



【糖とAX固相】



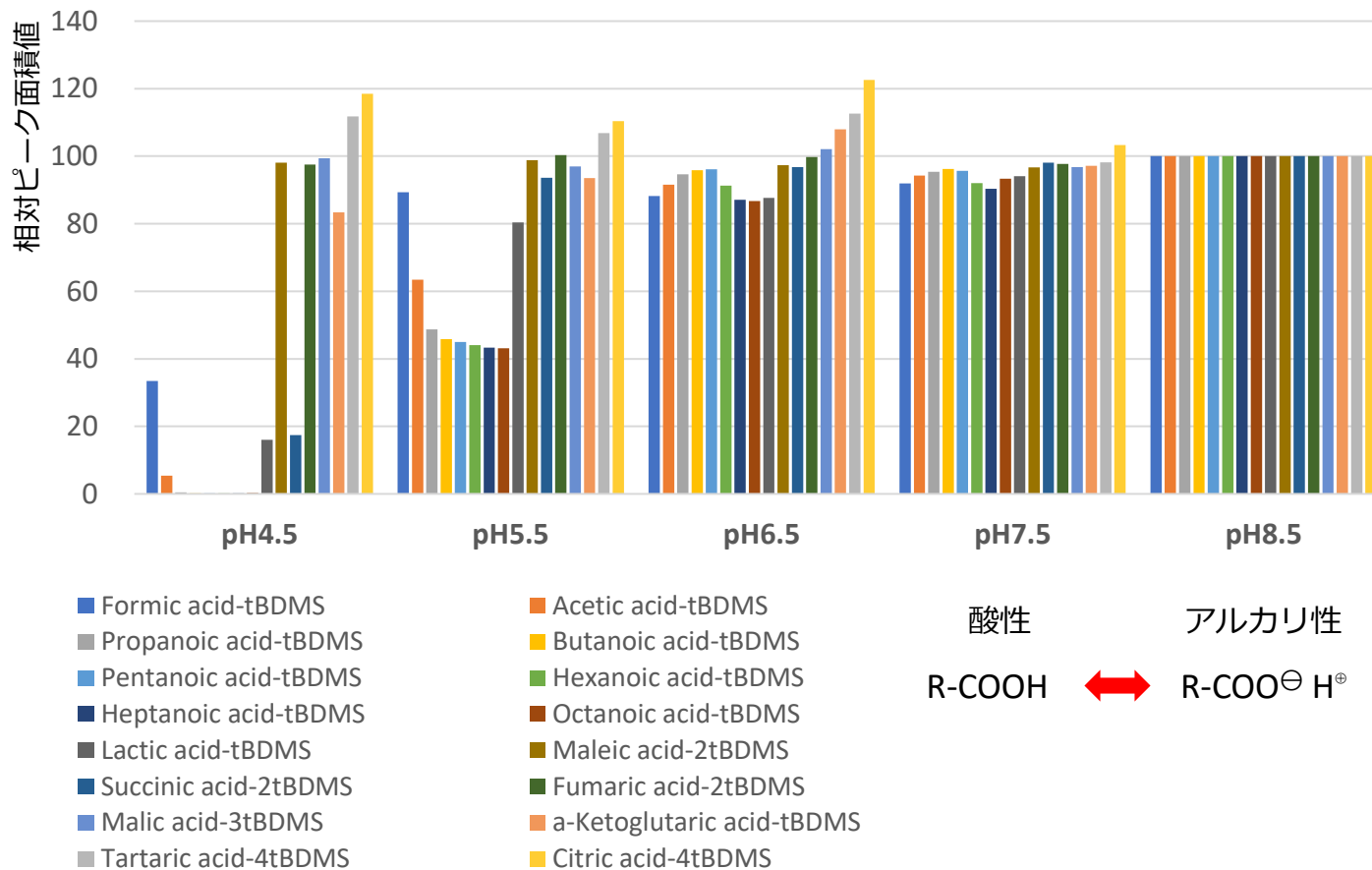
【有機酸とAX固相】



アミノ酸と有機酸は水濃度 (in ACN) に関係なく保持するが、糖類は水濃度が高くなるほど保持が弱くなる。

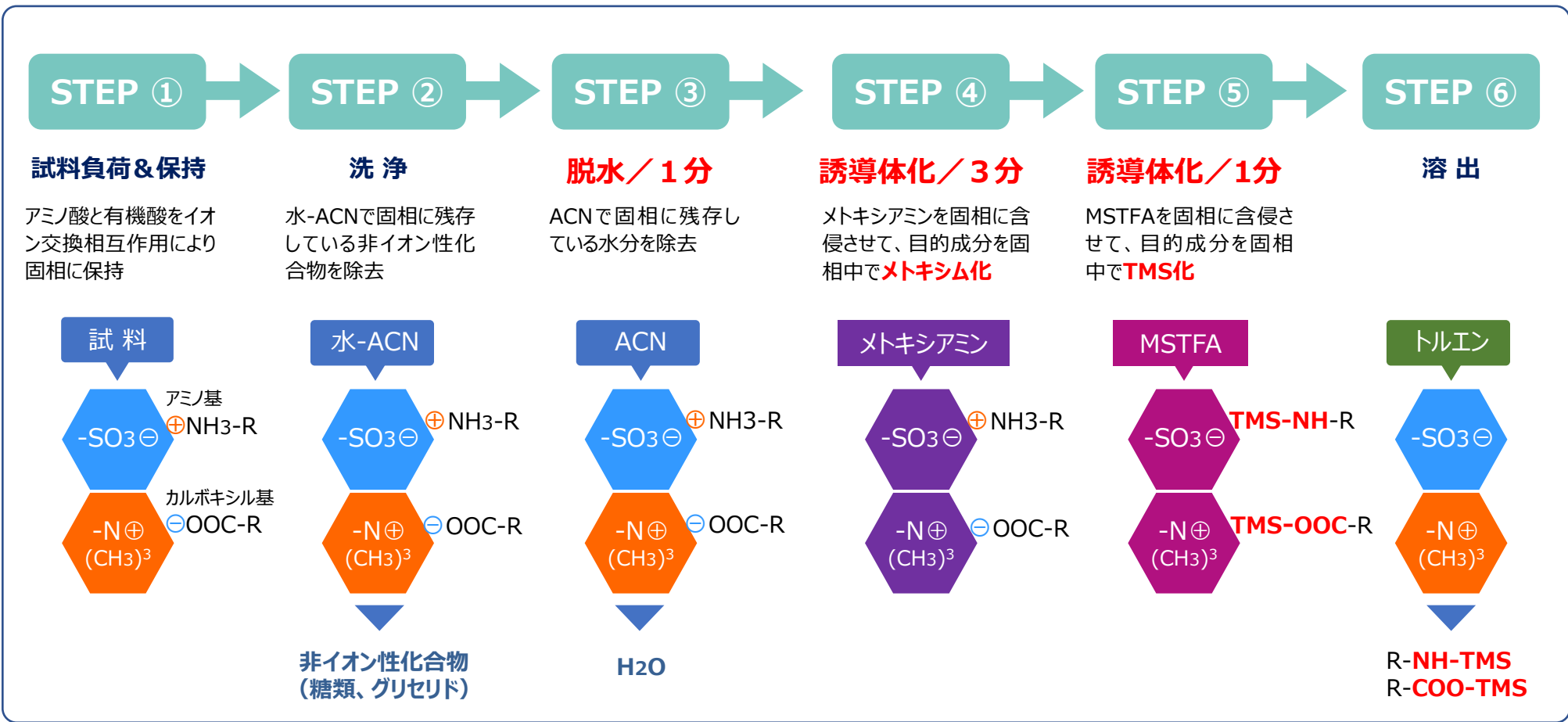
# 抽出液のpH調整について

- 抽出液にNaOH水を添加してpHを8（7～9）ぐらいに調整する



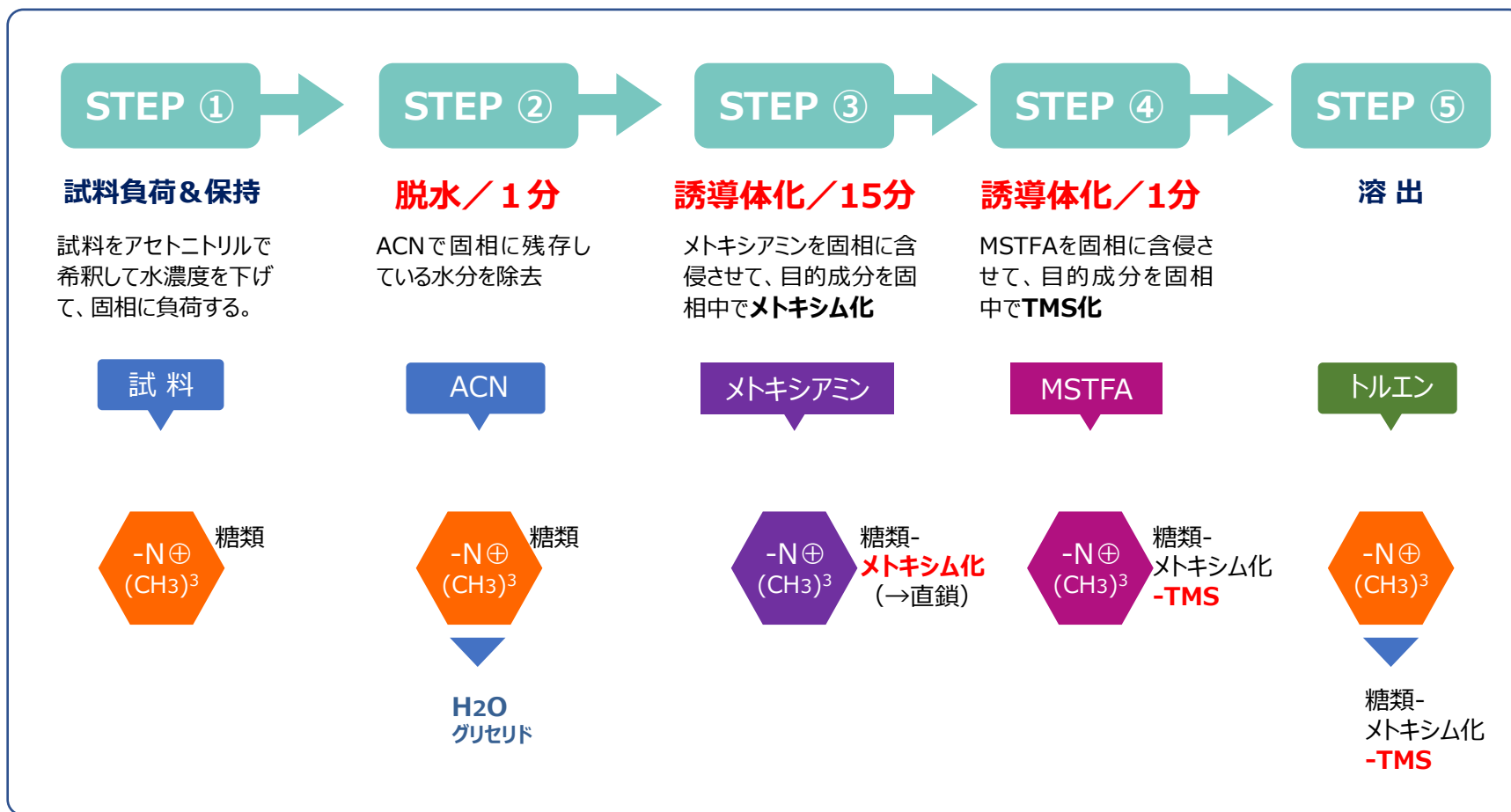
- 1 Formic acid pKa = 3.7
- 2 Acetic acid pKa = 4.6
- 3 Propanoic acid pKa = 4.8
- 4 Butanoic acid pKa = 4.8
- 5 Pentanoic acid pKa = 4.8
- 6 Hexanoic acid pKa = 5.1
- 7 Heptanoic acid pKa = 5.1
- 8 Lactic acid pKa = 3.8
- 9 Octanoic acid pKa = 5.2
- 10 Maleic acid pKa = 3.1
- 11 Succinic acid pKa = 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

# 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

# 固相誘導体化法：糖類



特許登録：(株)アイスティサイエンス

# メトキシアミンによる誘導体化反応時間

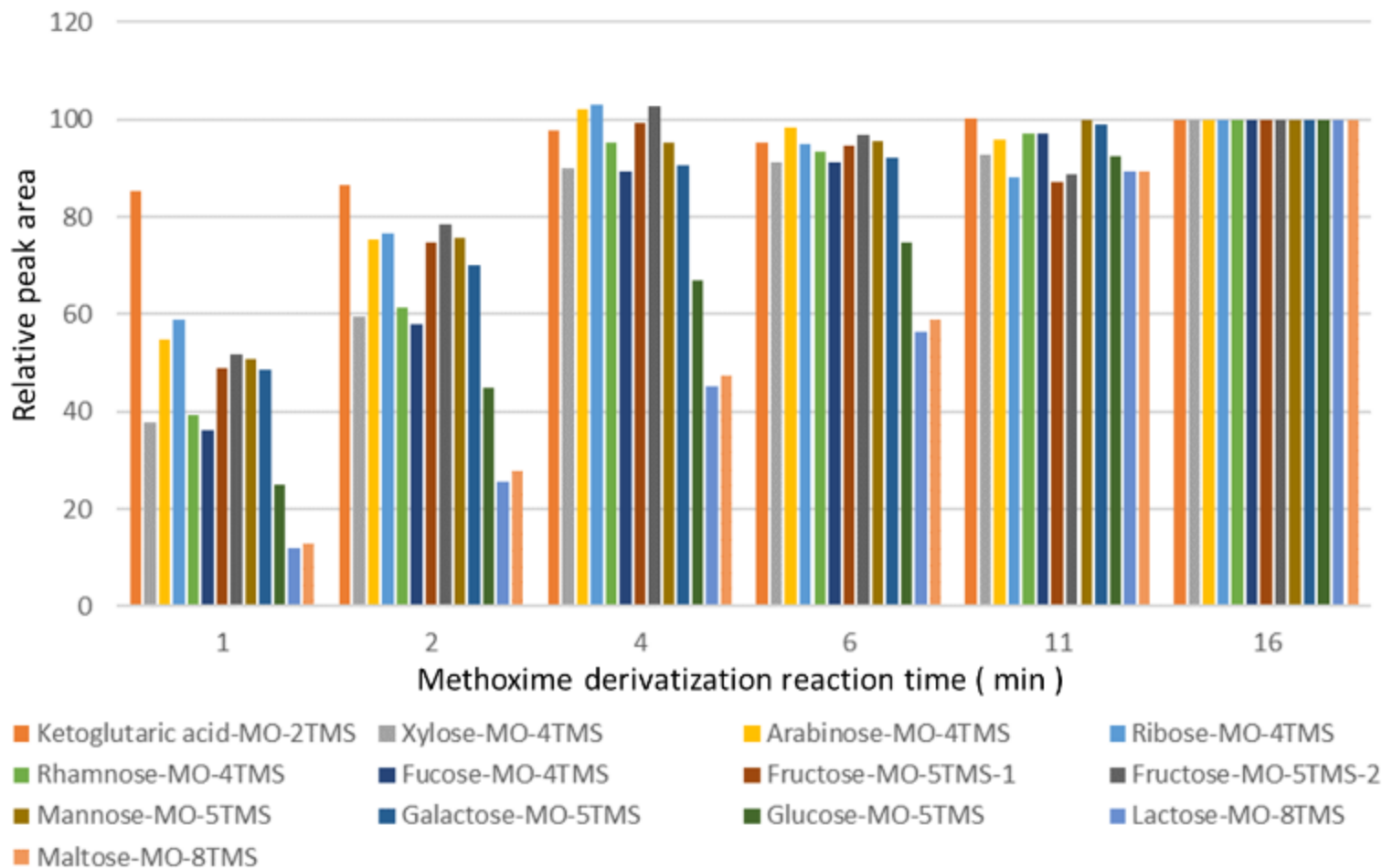


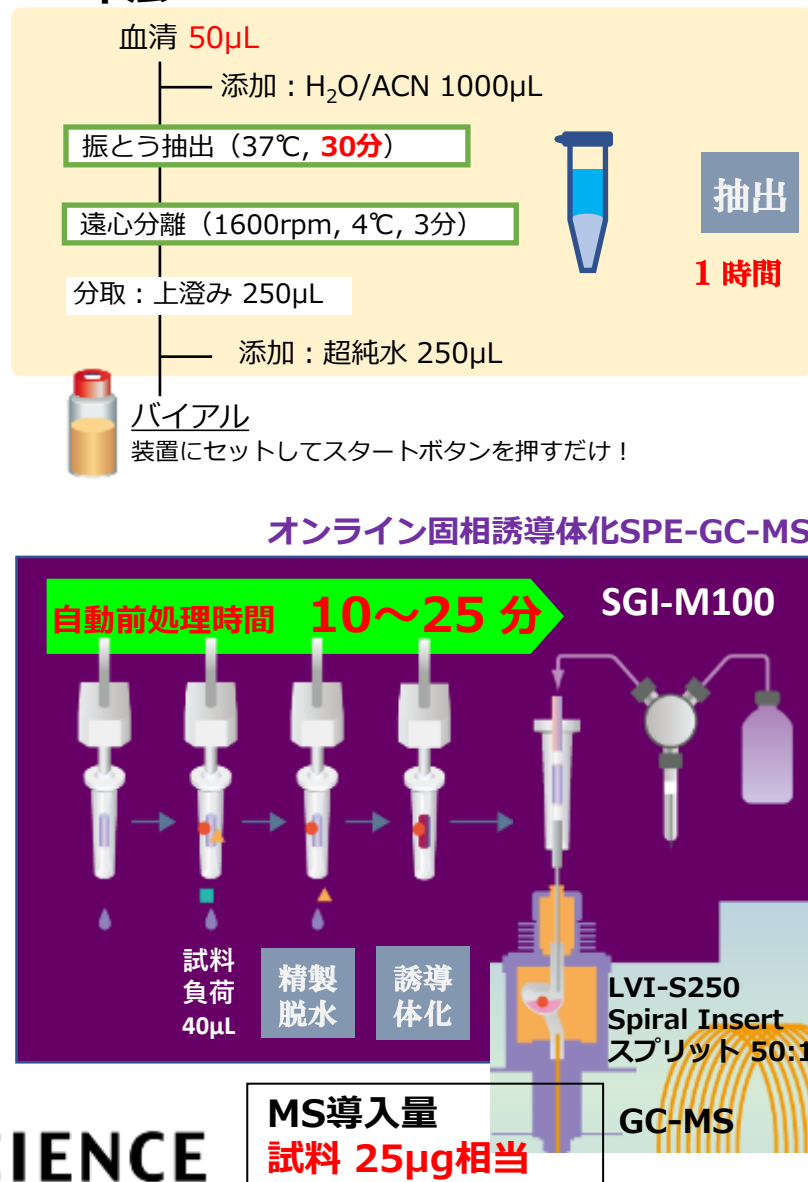
Fig. 3. Relations of methoxime derivatization reaction time in sorbent and the relative peak area

# 従来法と本法の前処理比較

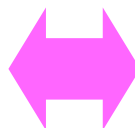
## ■ 従来法



## ■ 本法

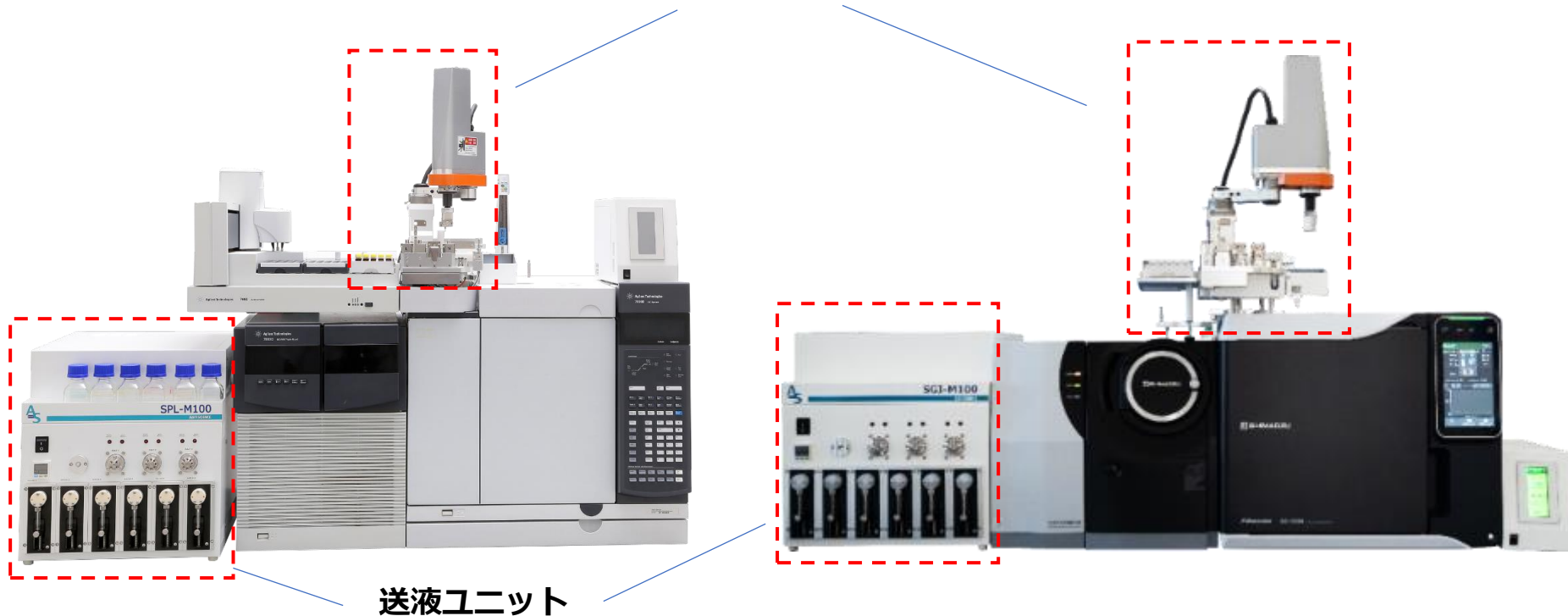


20 時間



# オンラインSPE-GC-MSシステム

前処理ユニット



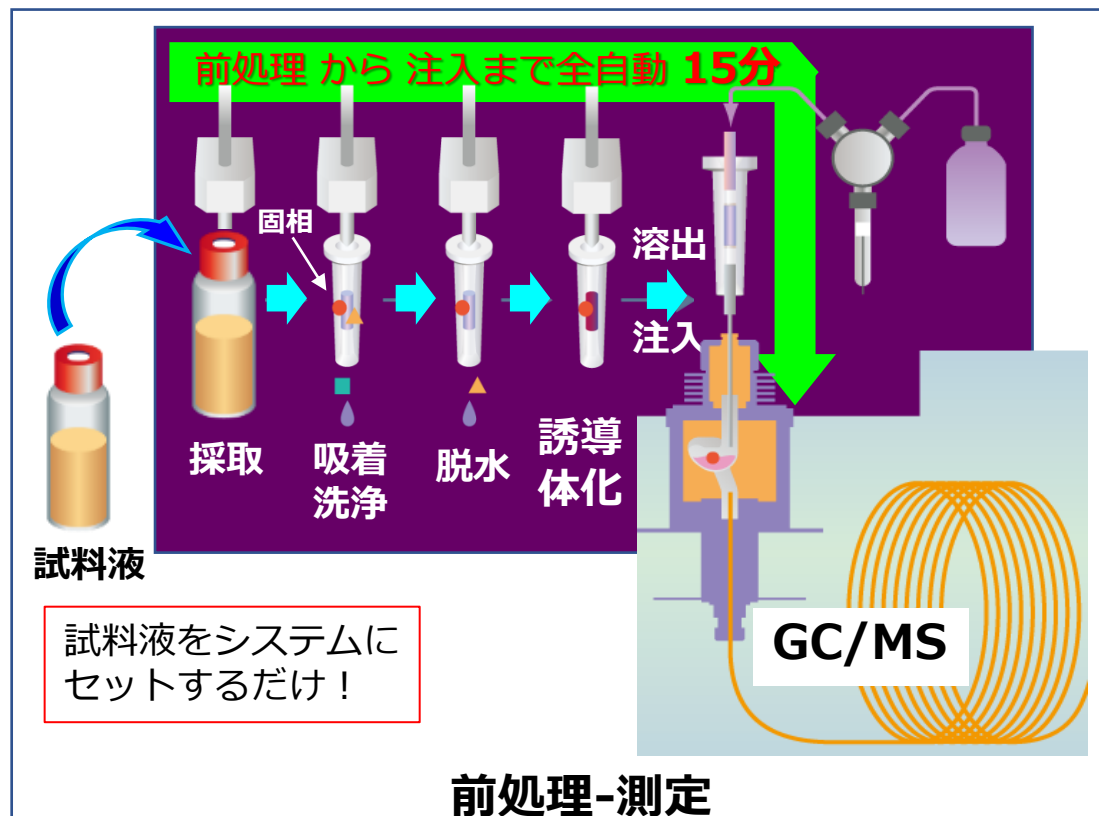
送液ユニット

**SPL-M100とアジレント社製GCMS**

**SPL-M100と島津社製GCMS**

# 本システムによるメリット

## ■ 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**

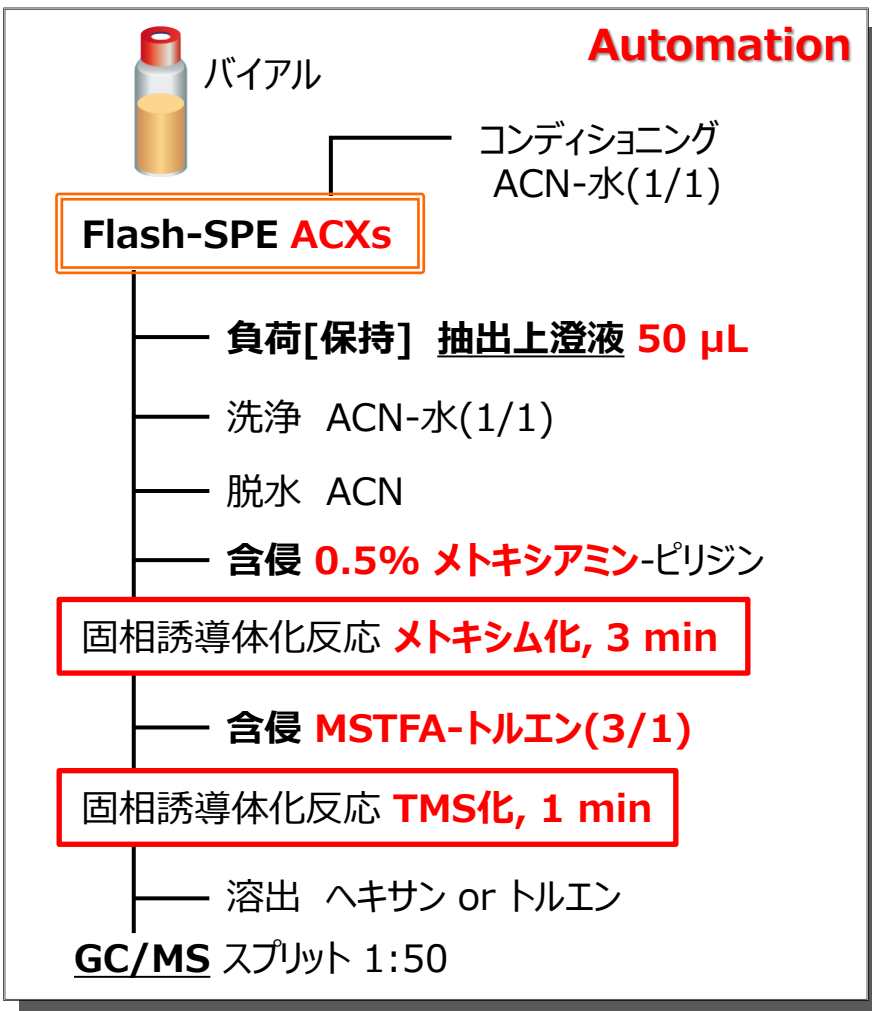
### ポイント⑥

多検体の**ハイスループット**

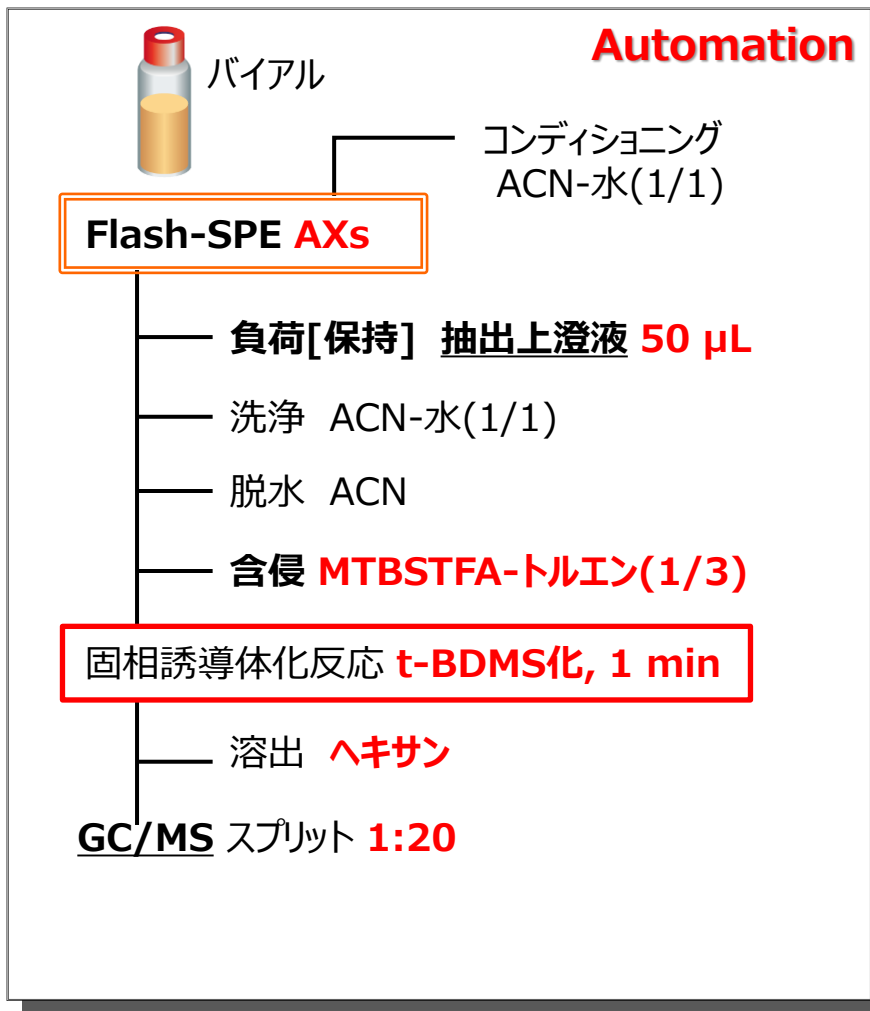


# 前処理フロー

## ■ アミノ酸/有機酸

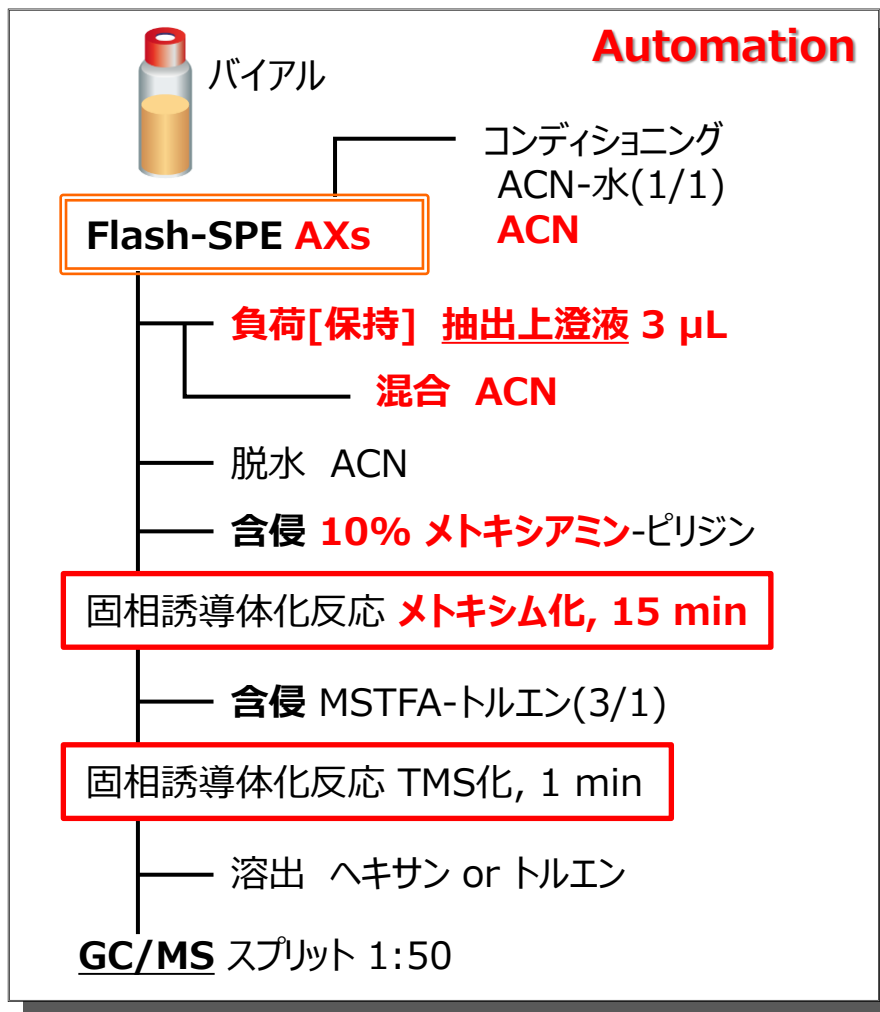


## ■ 短鎖脂肪酸



# 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-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

---

## 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)

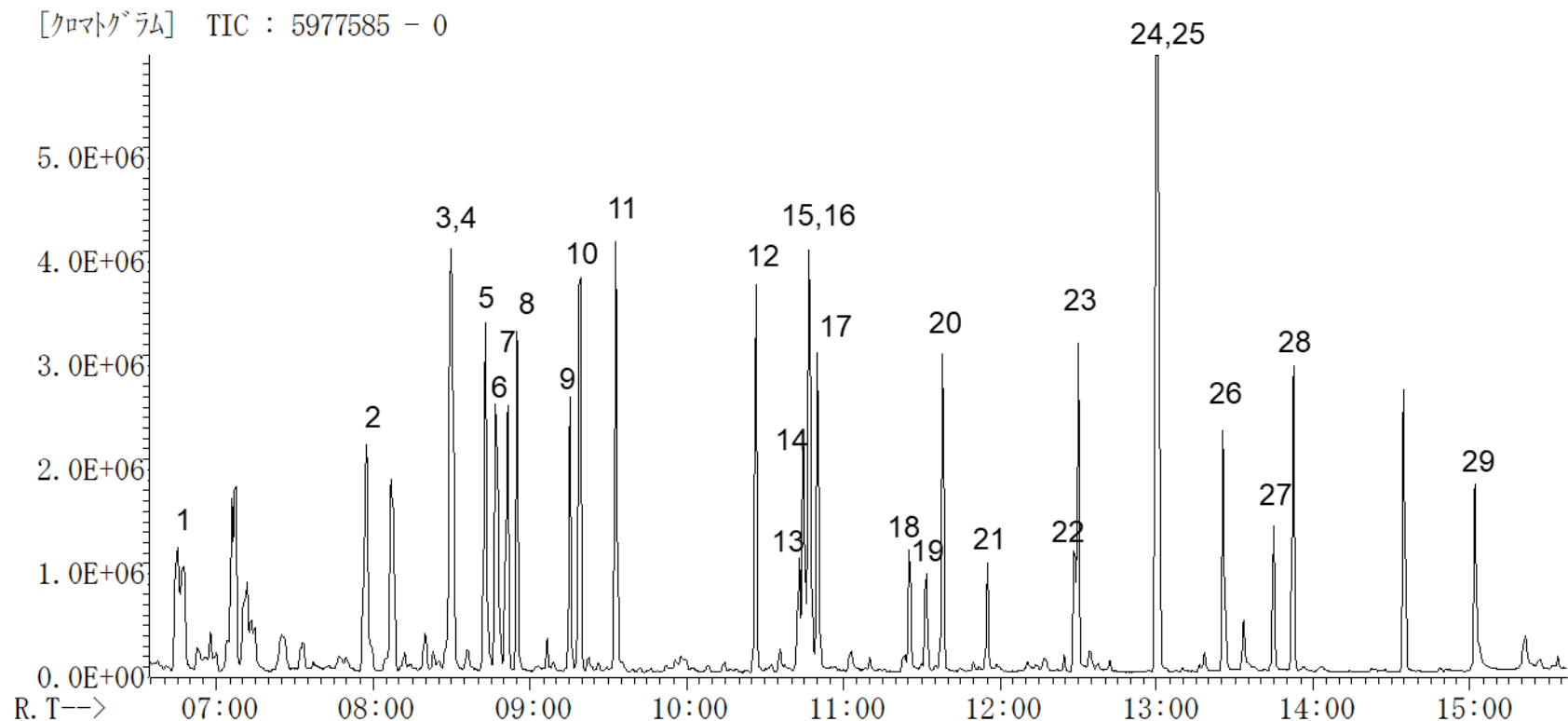
Trans. Line Temp. 290°C

### **MS**

MS Method SCAN, m/z;70-470

---

# 本法によるアミノ酸・有機酸のSCAN-TIC



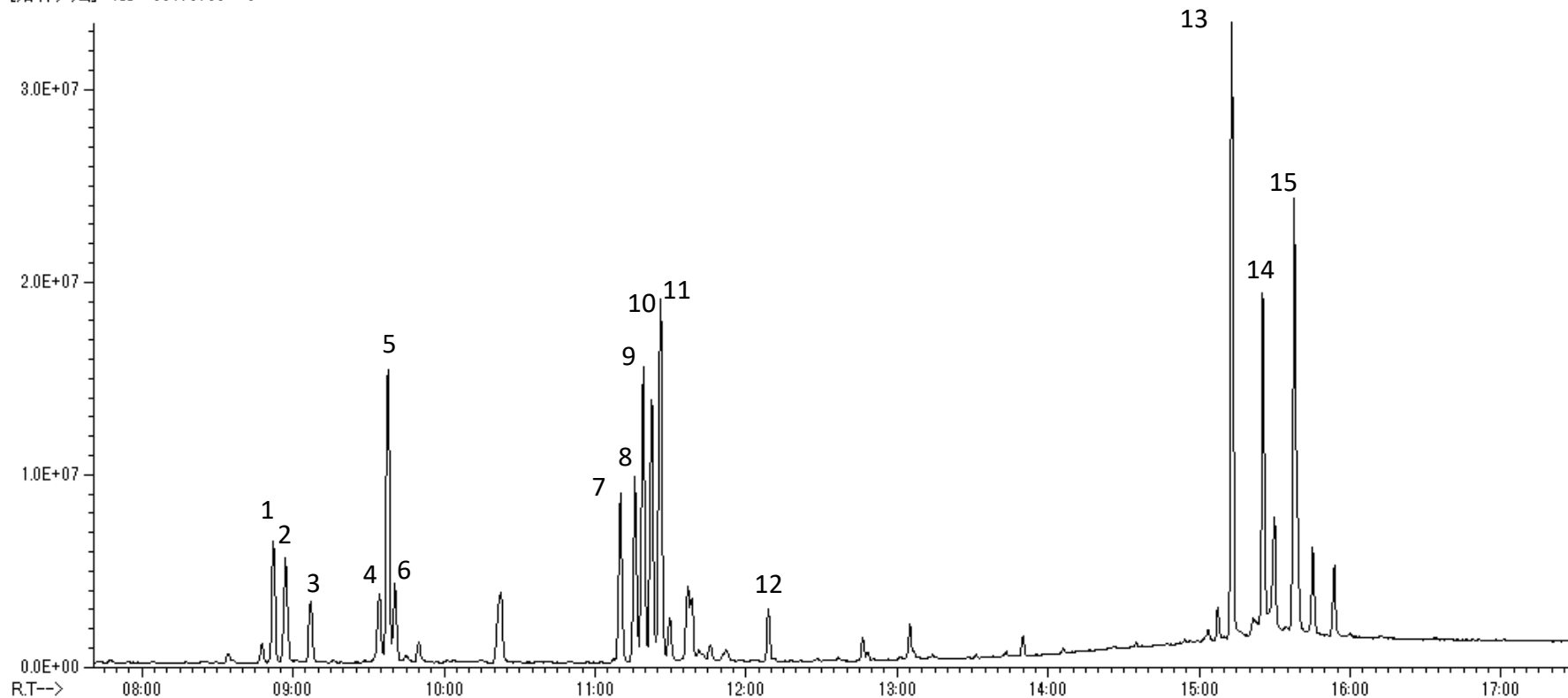
- |                    |                       |                        |                            |                        |                   |
|--------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|-------------------|
| 1. Alanine-2TMS    | 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



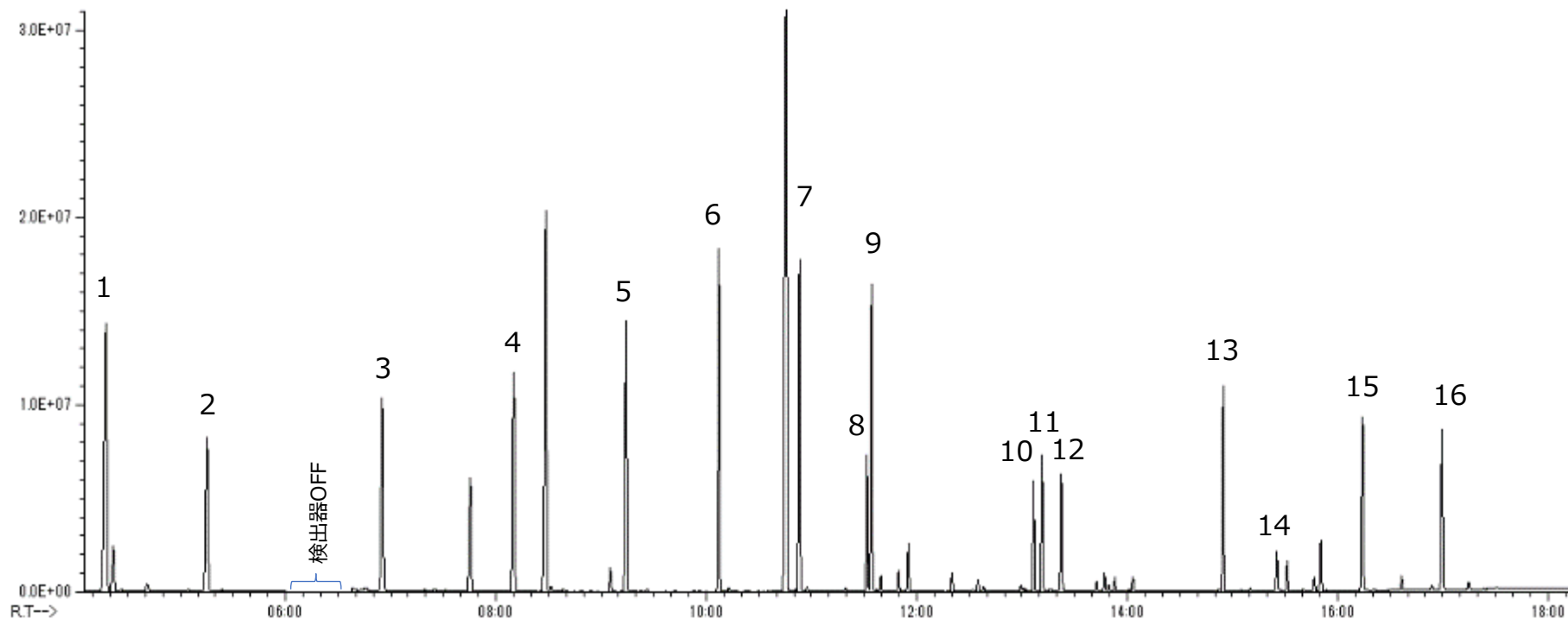
1	Xylose-MO-4TMS
2	Arabinose-MO-4TMS
3	Ribose-MO-4TMS
4	Rhamnose-MO-4TMS
5	Ribitol-5TMS

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

# 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

# 本法による標準溶液の再現性

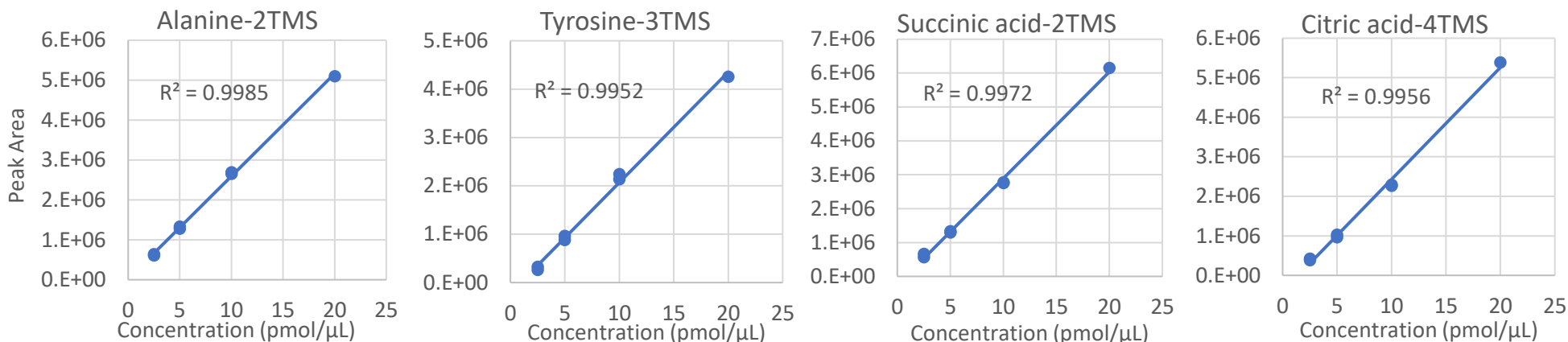
Table Reproducibility of peak area with standard solution using SPE-GC-MS system.

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。

# 内標および指標について

## ● 各グループ毎の内標となる代謝物の選定

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
n-C20	メトキシアミン/ピリジン溶液
n-C22	トルエン (溶出液)
n-C24	MSTFA-トルエン(3/1)

## ● 安定同位体の選定

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- <sup>13</sup> C5, <sup>15</sup> N	グルタミン酸の安定同位体
グルタミン- <sup>15</sup> 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

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。

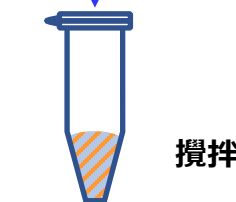
# 試料の抽出方法

## 血清/血漿



試料液  
50  $\mu\text{L}$

水(内標含有)  
150  $\mu\text{L}$



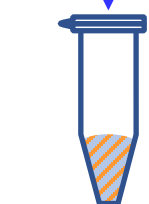
攪拌

タッチミキサー

## 尿

10  $\mu\text{L}$

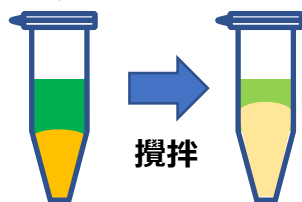
水(内標含有)  
190  $\mu\text{L}$



攪拌

タッチミキサー

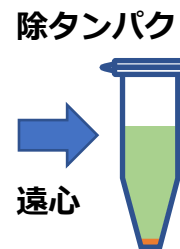
抽出溶媒  
800  $\mu\text{L}$



抽出

攪拌

サーモミキサー  
37 $^{\circ}\text{C}$   
1400rpm  
30min



除タンパク

遠心

遠心機  
14000rpm  
3min

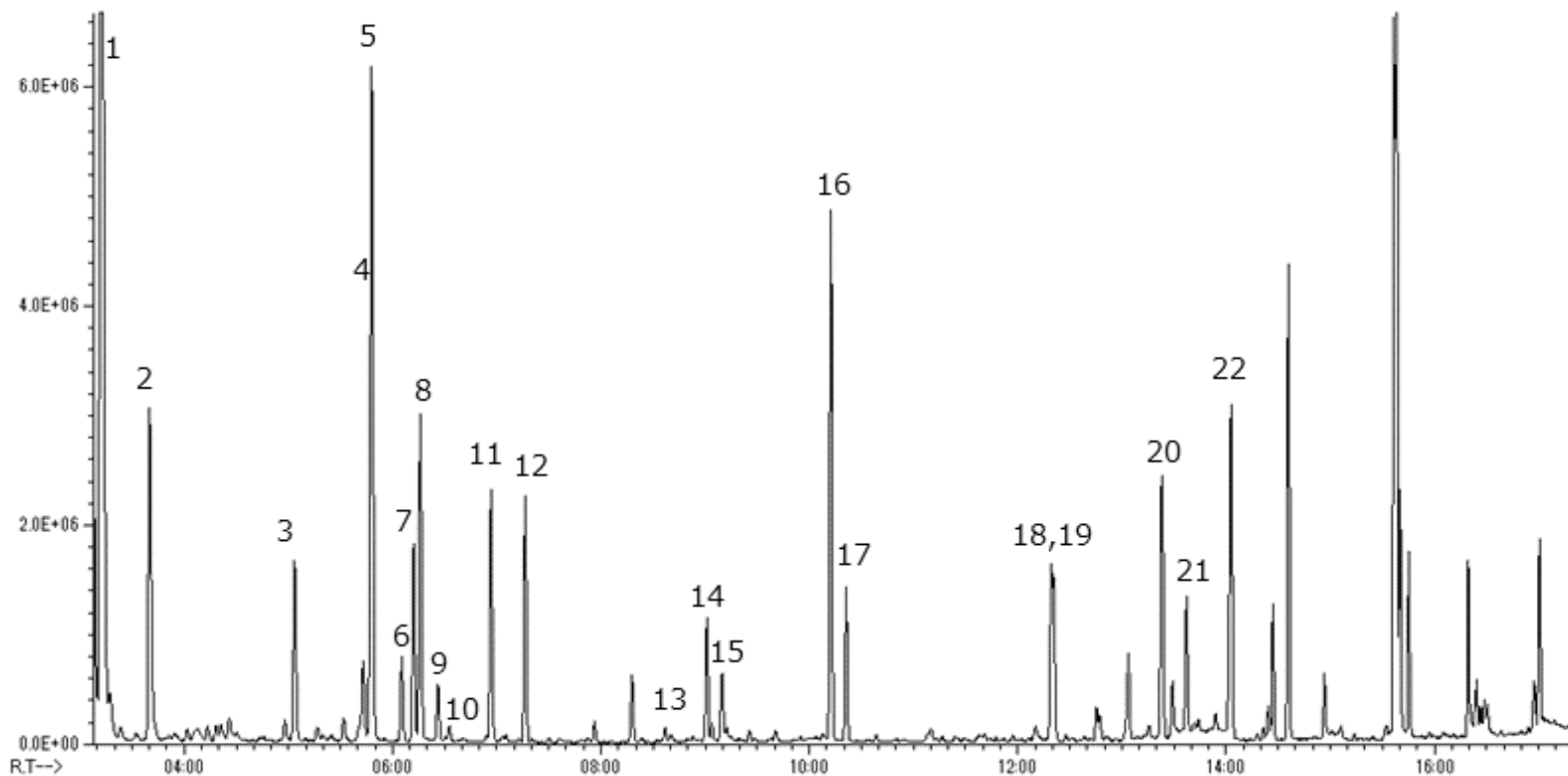
上澄み液



抽出液

pH調整剤を添加してpH8ぐらいに  
例：0.2N NaOHを10~30 $\mu\text{L}$

# 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 | ⑳ 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	<b>77</b>
6	Valine-2TMS	3,223,917	8,177	2,224,994	5,182,605	<b>92</b>
9	Leucine-2TMS	3,806,169	9,760	3,940,497	7,217,079	<b>86</b>
10	Isoleucine-2TMS	3,483,014	5,009	958,681	4,444,077	<b>100</b>
11	Proline-2TMS	3,349,273	6,613	3,008,108	5,928,827	<b>87</b>
12	Glycine-3TMS	2,822,020	38,903	3,192,716	5,175,424	<b>71</b>
14	Succinic acid-2TMS	5,442,569	51,260	607,407	6,159,930	<b>103</b>
15	Fumaric acid-2TMS	1,886,256	3,365	11,533	1,967,128	<b>104</b>
16	Serine-3TMS	1,763,290	19,550	1,451,277	3,032,036	<b>91</b>
17	Threonine-3TMS	584,437	2,454	484,176	957,064	<b>81</b>
18	Malic acid-3TMS	610,728	1,773	18,302	629,151	<b>100</b>
20	Aspartic acid-3TMS	2,929,674	5,116	784,543	3,822,406	<b>104</b>
21	Methionine-2TMS	321,403	1,578	77,627	321,294	<b>76</b>
22	4-Hydroxyproline-3TMS	2,400,683	122	54,733	1,997,473	<b>81</b>
23	GABA-3TMS	808,381	5,804	9,875	776,441	<b>96</b>
25	Threonic acid-4TMS	331,448	417	27,125	202,330	<b>53</b>
27	Glutamic acid-3TMS	2,350,172	2,555	3,437,586	6,150,075	<b>116</b>
28	Phenylalanine-2TMS	1,457,813	1,404	690,541	2,098,341	<b>97</b>
31	Putrescine-4TMS	4,356,542	1,610	9,512	4,597,459	<b>105</b>
33	Citric acid-4TMS	911,581	660	216,437	1,160,422	<b>104</b>
36	Lysine-4TMS	1,587,702	1,259	940,190	2,675,748	<b>109</b>
37	Histidine-3TMS	2,194,472		10,446	3,240,581	<b>147</b>
38	Tyrosine-3TMS	4,650,501	1,959	1,175,034	5,939,201	<b>102</b>
41	Tryptophan-3TMS	230,794	0	29,096	398,017	<b>160</b>
43	Cystine-4TMS	2,142,088	0	14,728	2,196,172	<b>102</b>

## アミノ酸、有機酸メソッドでの再現性、耐久性試験 マウス血清 100回の連続測定×2回

	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）

# 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

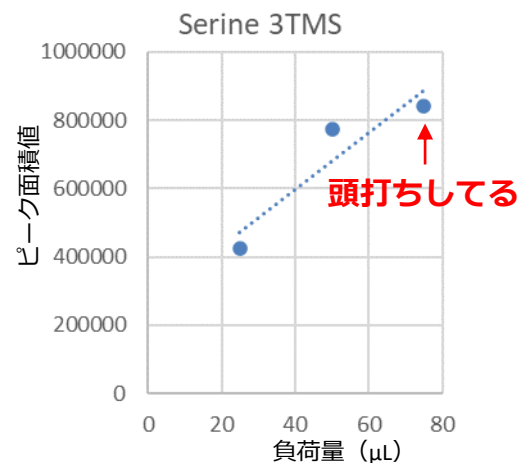
添加 0.1N NaOH

抽出上澄液

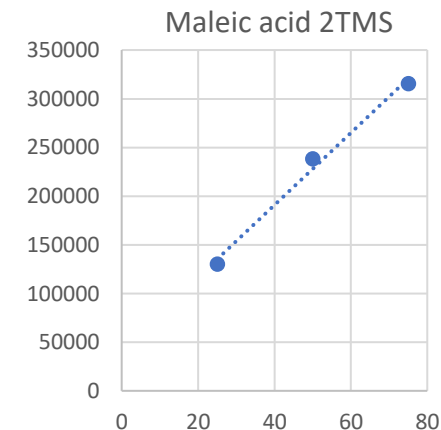
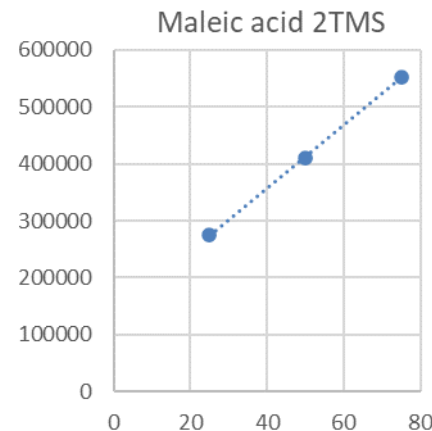
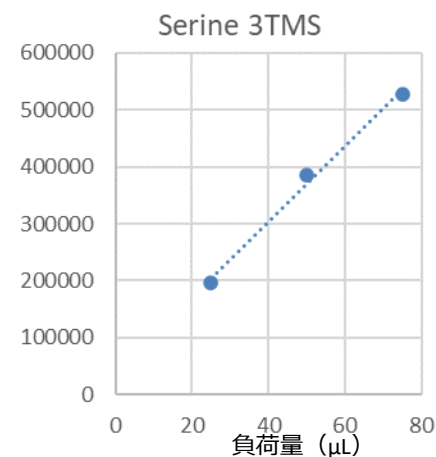


■ 負荷量試験：固相への負荷量を25, 50, 75 $\mu\text{L}$ でのピーク面積値

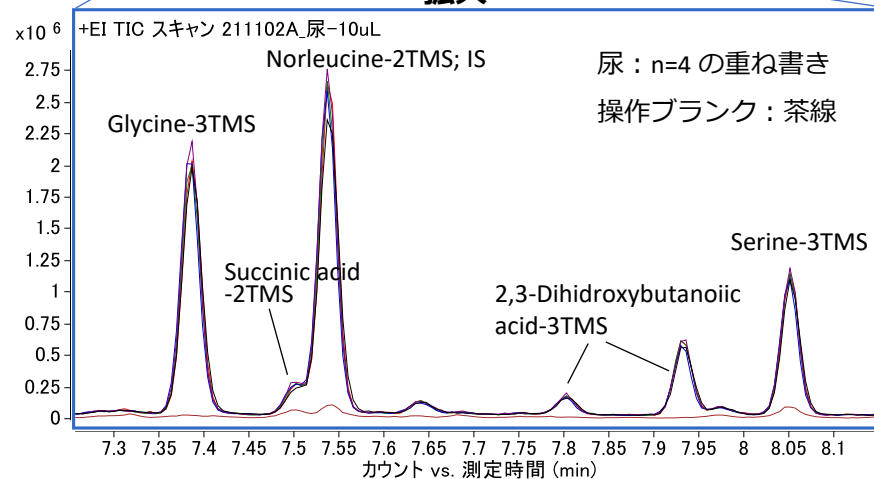
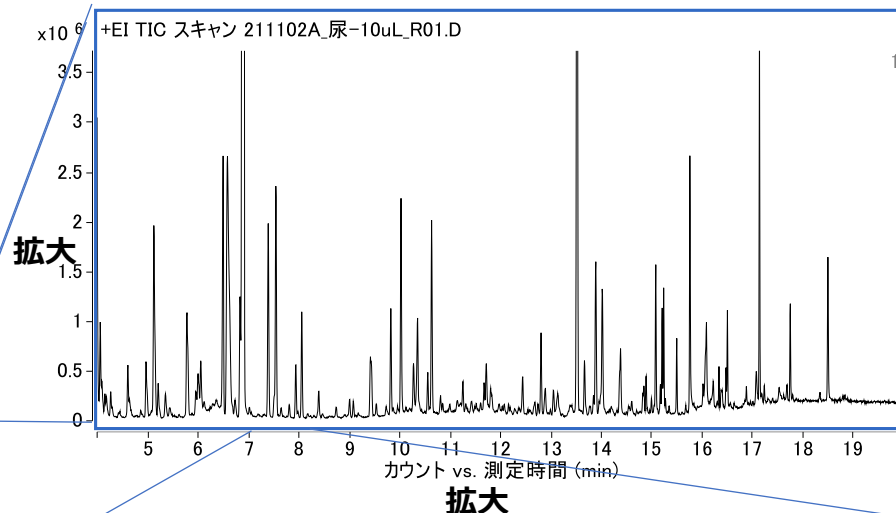
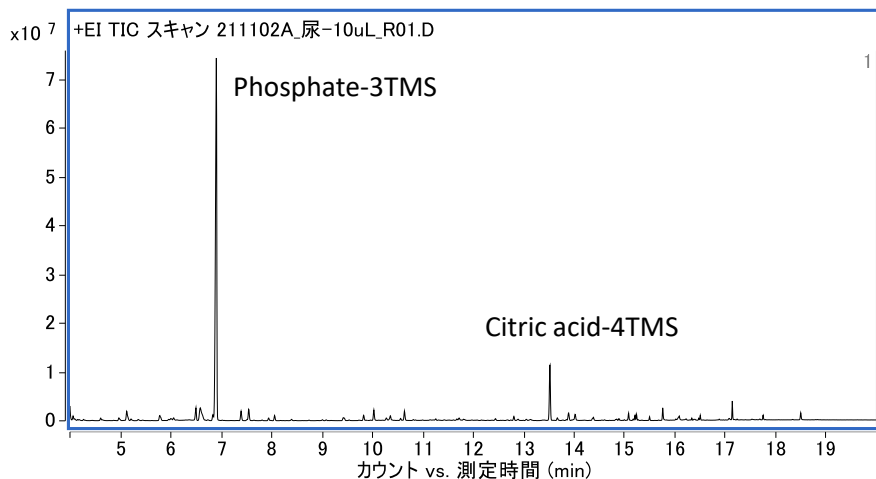
50 $\mu\text{L}$ 採取×2倍希釈



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

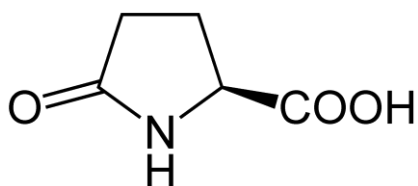
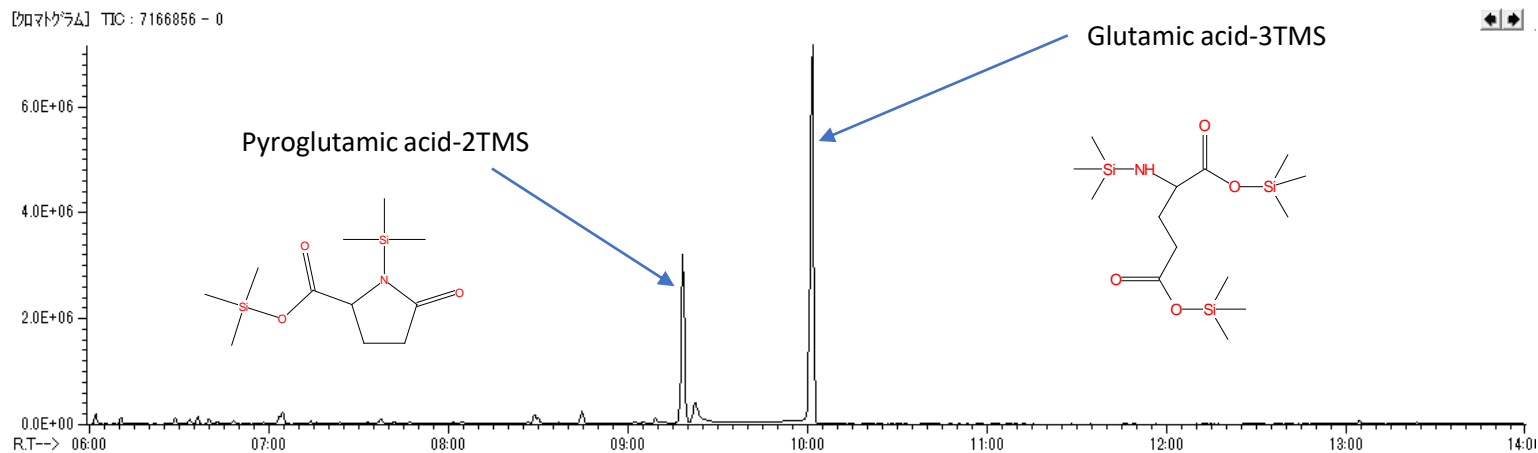
**ピーク面積値（絶対値）**

の結果です。

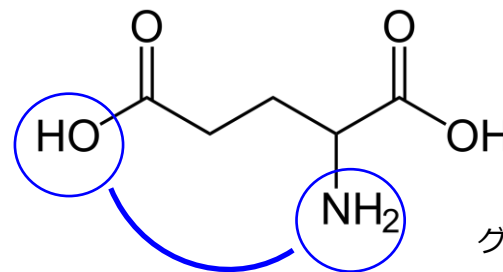
内標による補正はしていません。

# グルタミン酸とピログルタミン酸について

## ■ グルタミン酸の単成分分析結果 (SCANトータルイオンクロマトグラム)



ピログルタミン酸

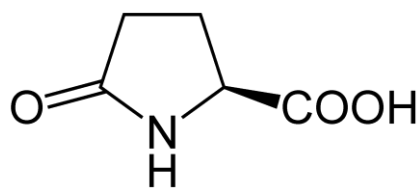
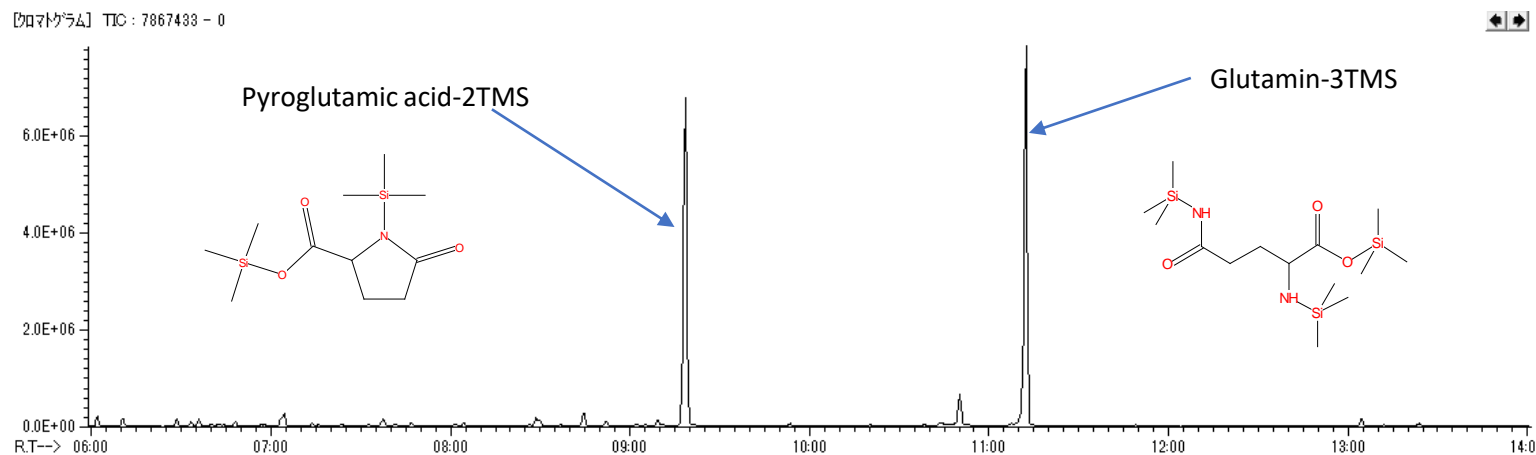


グルタミン酸

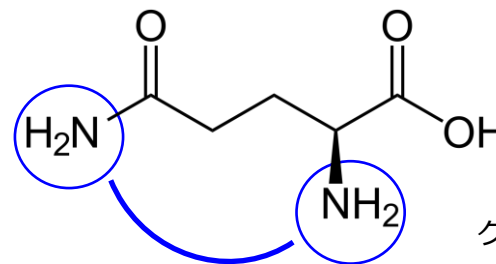
ピログルタミン酸は、グルタミン酸のカルボキシル基とアミノ基が分子内縮合反応を起こして、ラクタムを形成したアミノ酸である。wikipedia

# グルタミンとピログルタミン酸について

## ■ グルタミンの単成分分析結果 (SCANトータルイオンクロマトグラム)



ピログルタミン酸



グルタミン

# 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)

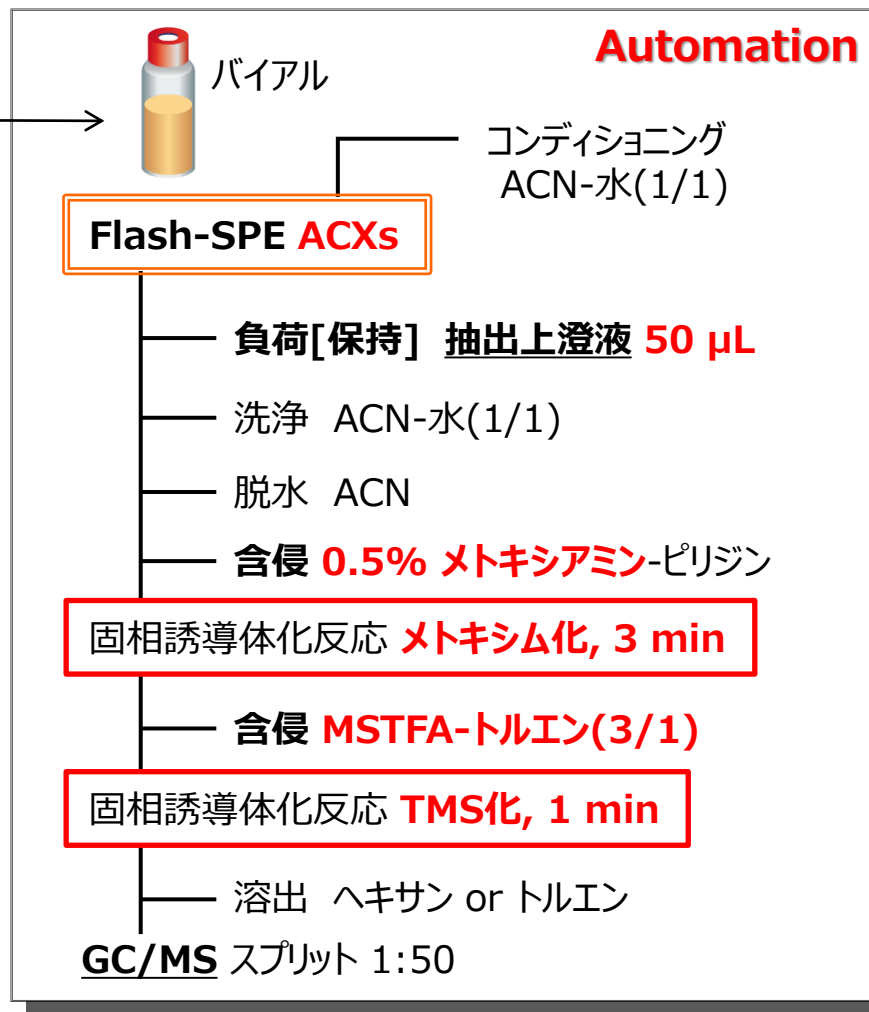
遠心分離 14000 rpm, 3 min

— 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。

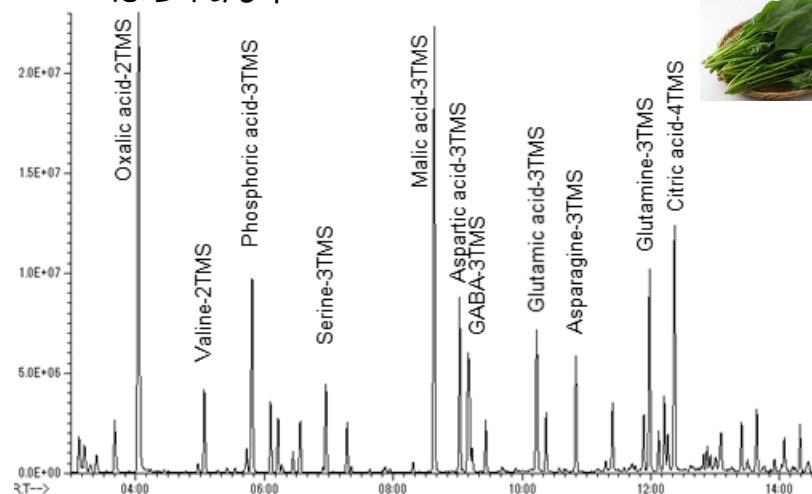
## B. トマト

**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。

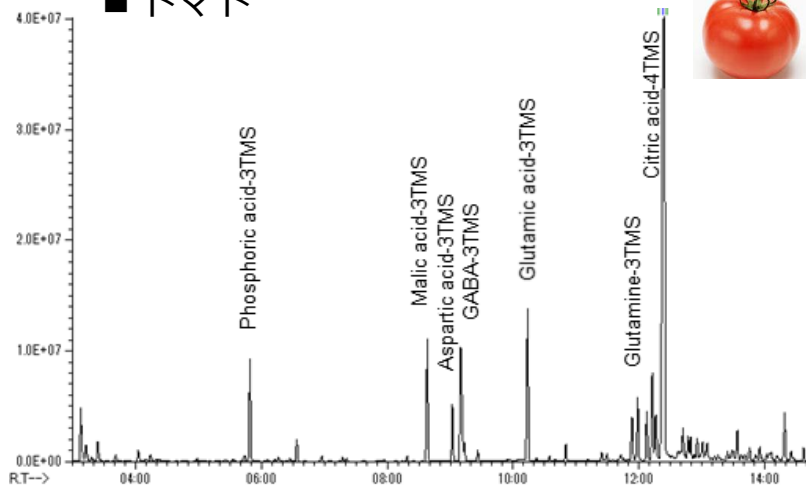
## C. うめ

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。

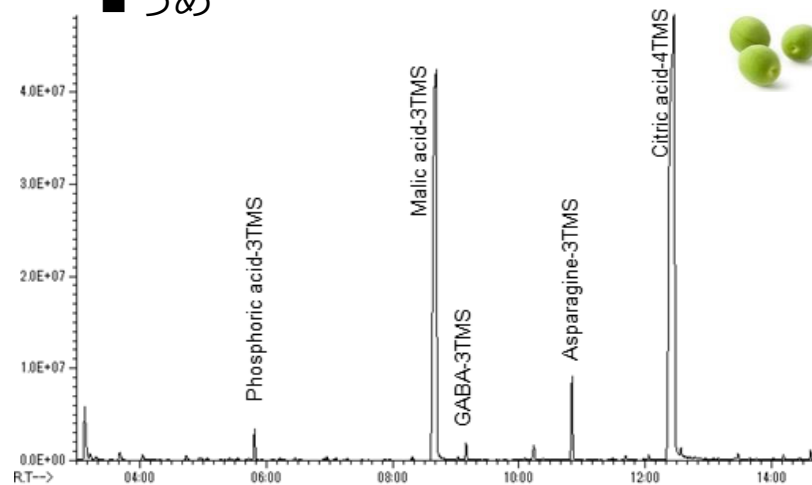
### ■ ほうれん草



### ■ トマト



### ■ うめ

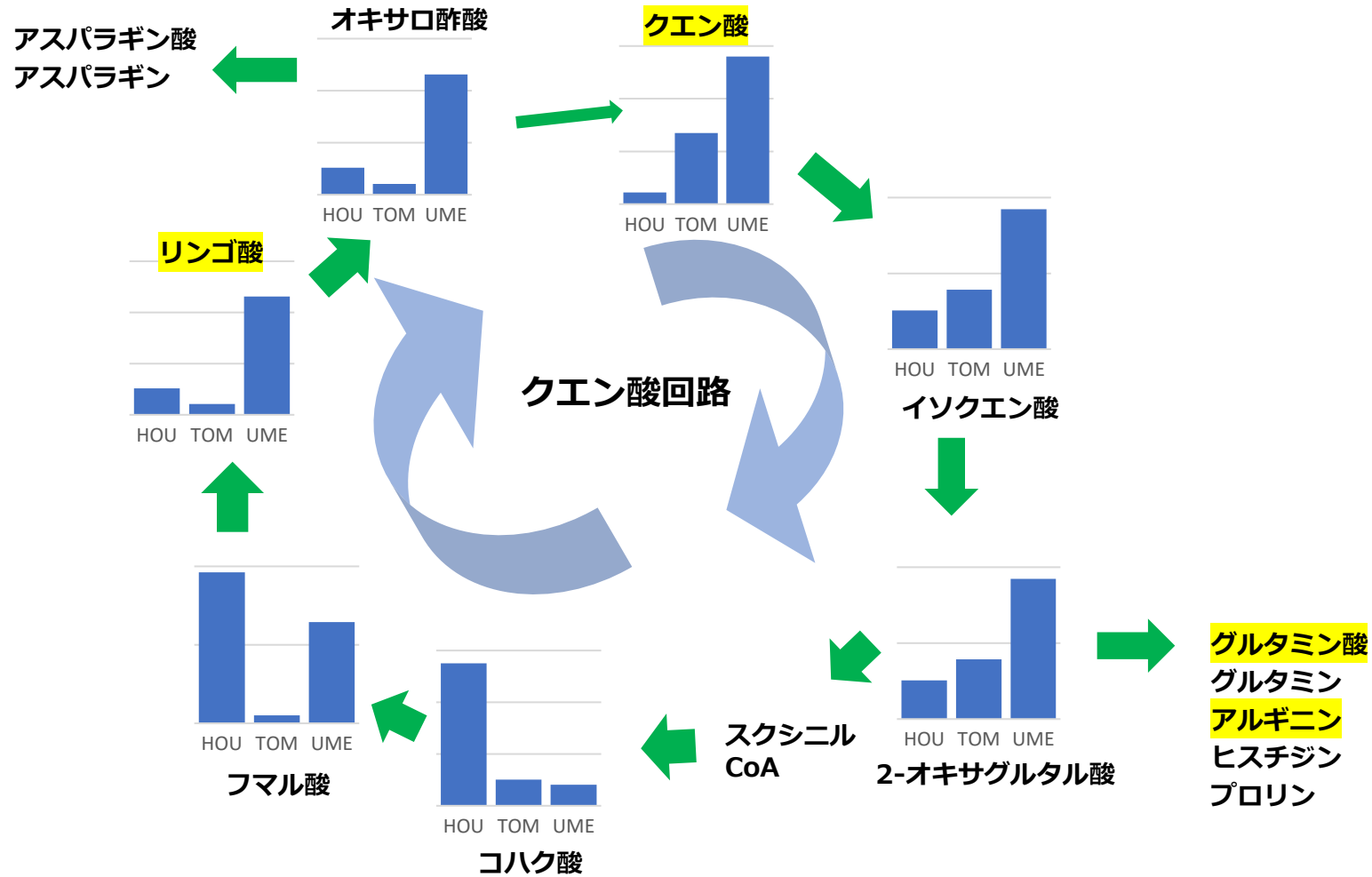


# 各農作物の成分量比較



HOU : ほうれん草  
 TOM : トマト  
 UME : うめ

# 代謝マップ

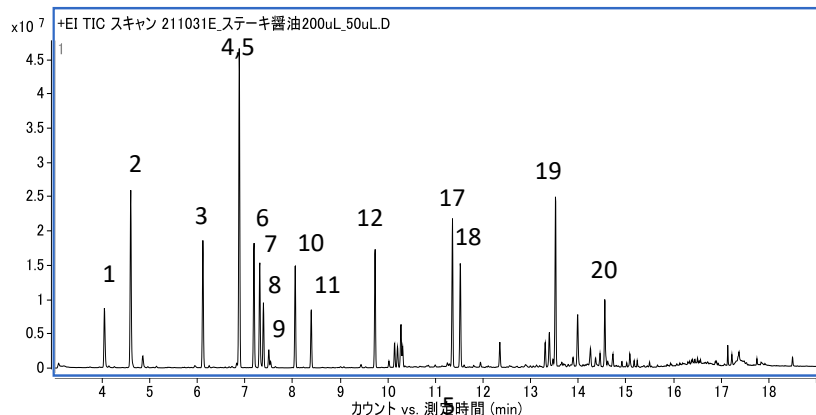




# SPL-M100FE

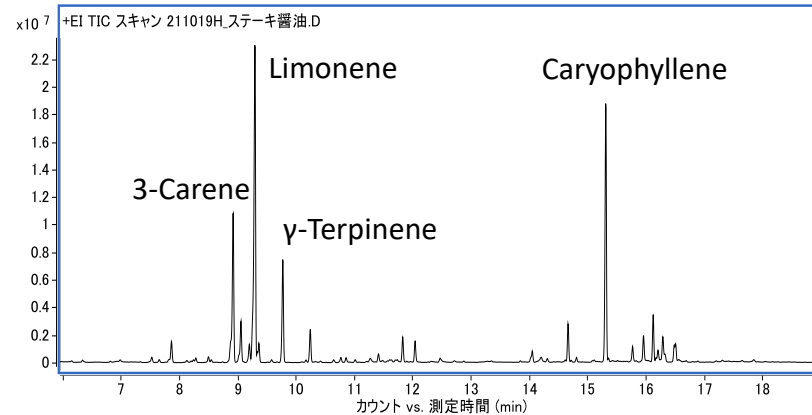
## ステーキ醤油の成分分析とにおい成分分析

### 固相誘導体化法による ステーキ醤油の成分分析



- |                         |                            |
|-------------------------|----------------------------|
| 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 ステーキ醤油のにおい成分分析

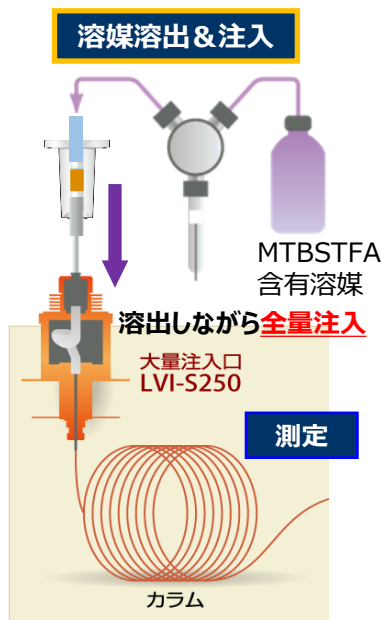


- |                                  |                 |
|----------------------------------|-----------------|
| 1. Camphene                      | 9. 4-terpineol  |
| 2. Terpinolene                   | 10. Terpineol   |
| 3. Cymene                        | 11. Elemene     |
| 4. Eucalyptol        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

# SPL-M100FE

## 納豆：におい-誘導体化分析

### 誘導体化

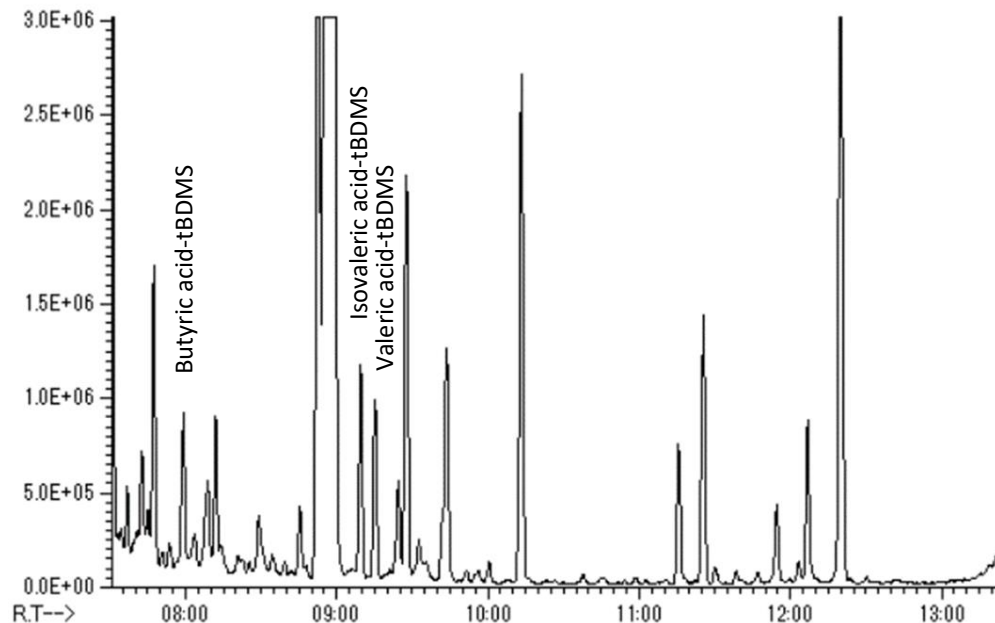


### 誘導体化

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。

[グラフグラム] TIC: 3015405 - 0



におい成分を誘導体化することでこれまで見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。

# SPL-W100

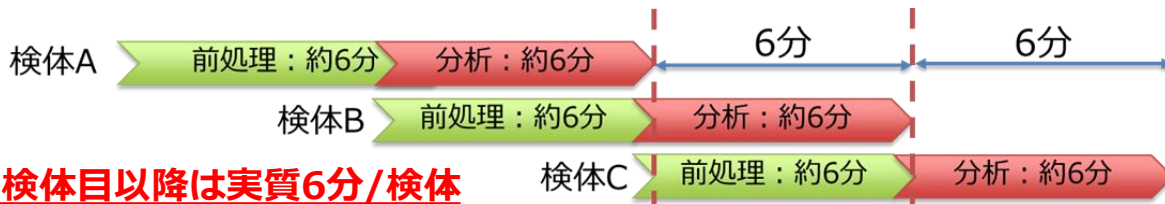
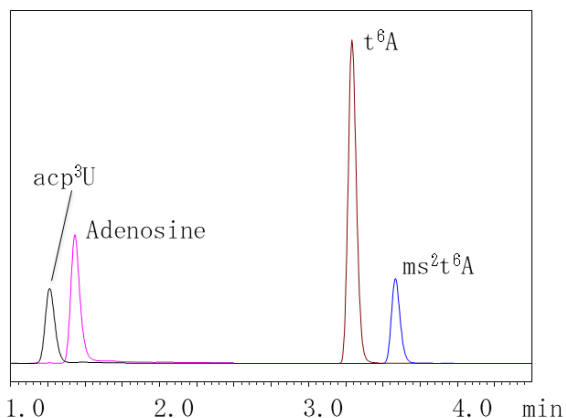
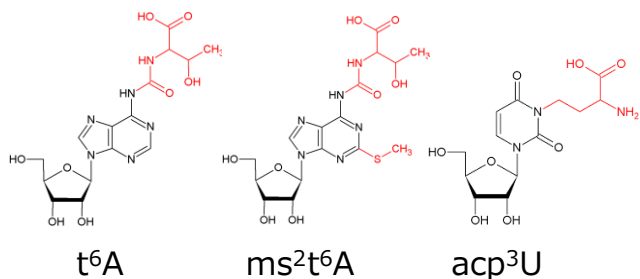
## SPE-LC/MSによる修飾ヌクレオシドの分析

### 修飾ヌクレオシド分析システムの概要

- ・ サンプル量 : 尿 10  $\mu$ L、血清 50  $\mu$ L
- ・ 前処理、分析、解析 : 自動
- ・ 分析時間 : 6-12分

化学工学会発表：2021年

「LC/MS/MSによるCOVID-19重症化に関連する修飾ヌクレオシド分析法の開発」（熊本大学、島津製作所、アイスティ）



### 特長

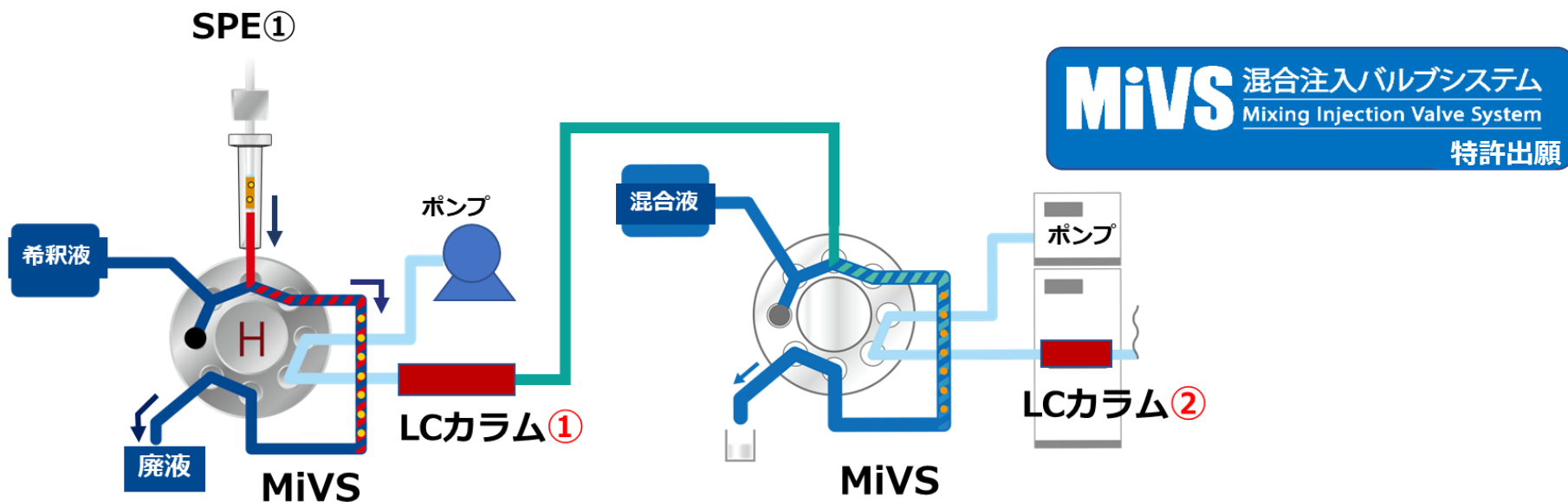
- ・ 新型コロナウイルス感染症の重症化への関連性が示唆されるバイオマーカー候補を**6分で測定可能**
- ・ 前処理の自動化により、検体の**前処理が不要**
- ・ 前処理から分析までを**全自動**で実施

図1. LC/MS/MS分析により得られたクロマトグラム

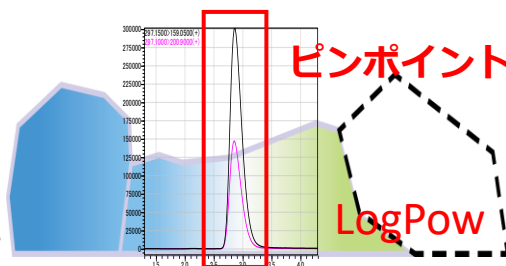
# SPL-W100

## オンラインSPE-LC-LCを用いた尿中代謝物の分析

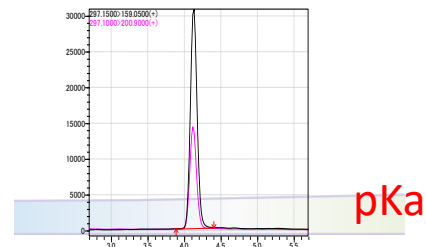
**SPE** → **LC (逆相)** → **LC (イオン交換系)**



予め目的物質のリテンション時間を調べておき、その時間に合わせて分取する。



① 疎水性C18のLCカラム



② イオン交換系のLCカラム

# 尿中代謝物の測定結果

SPE : Flash-SPE C18

LCカラム① : Inertsil ODS-3, 3 $\mu$ m, 2.1mm x 75 mm

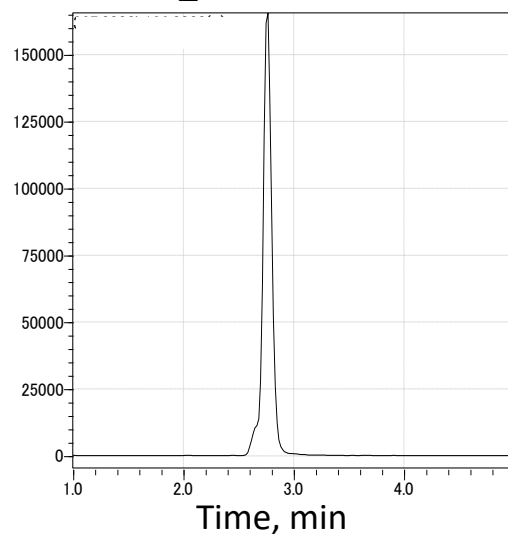
LCカラム② : InertSustain AX-C18 5 $\mu$ m, 2.1mm x 100 mm

分析時間 : 15分

試料処理 : 尿10 $\mu$ Lを10%アセトニトリル-水990 $\mu$ Lに添加

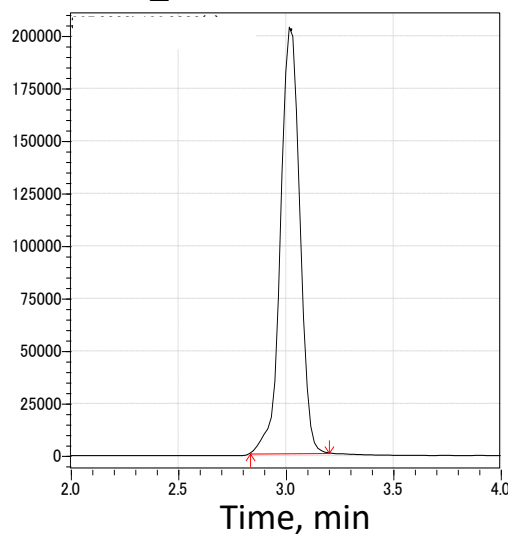
固相負荷量 : 20 $\mu$ L

水添加\_代謝物-安定同位体



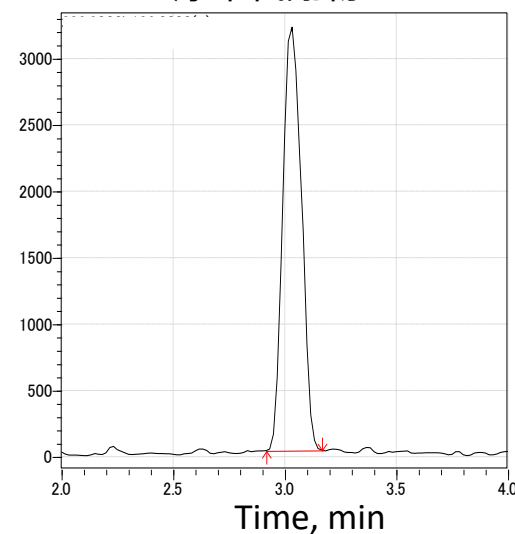
オンラインSPE-LC/MSによる  
LCカラム①のリテンションタイム確認のクロマトグラム

水添加\_代謝物-安定同位体



オンラインSPE-LC-LC/MS  
によるクロマトグラム

尿中代謝物

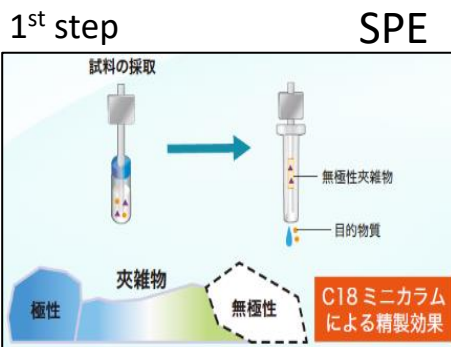


オンラインSPE-LC-LC/MS  
によるクロマトグラム

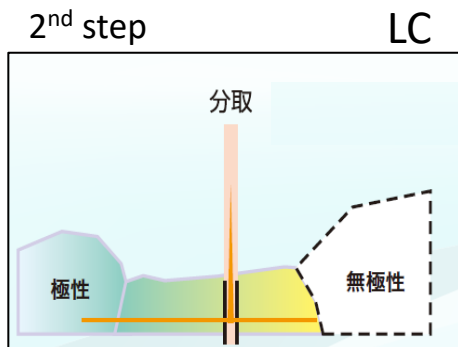
# SPL-X100

## オンラインSPE-LC-誘導体化-GC/MS分析法による コイの血清中エストラジオールの分析

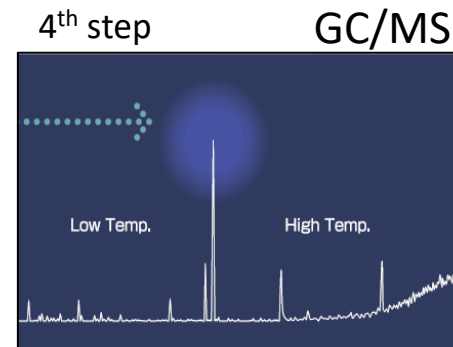
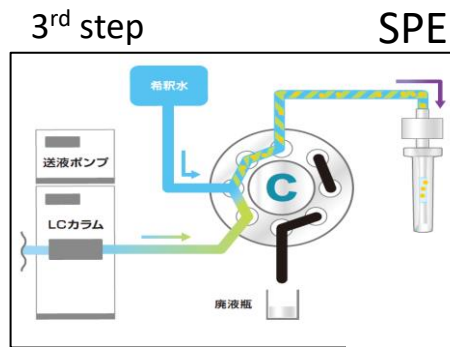
### 固相抽出による精製



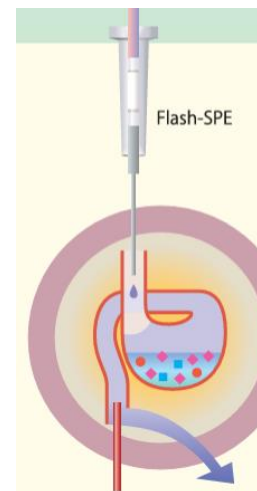
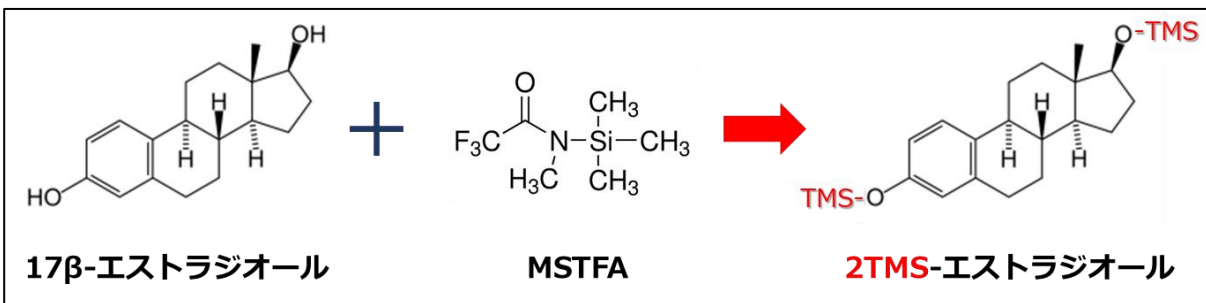
### LCによる分離・分取



### GC/MS測定



### 誘導体化

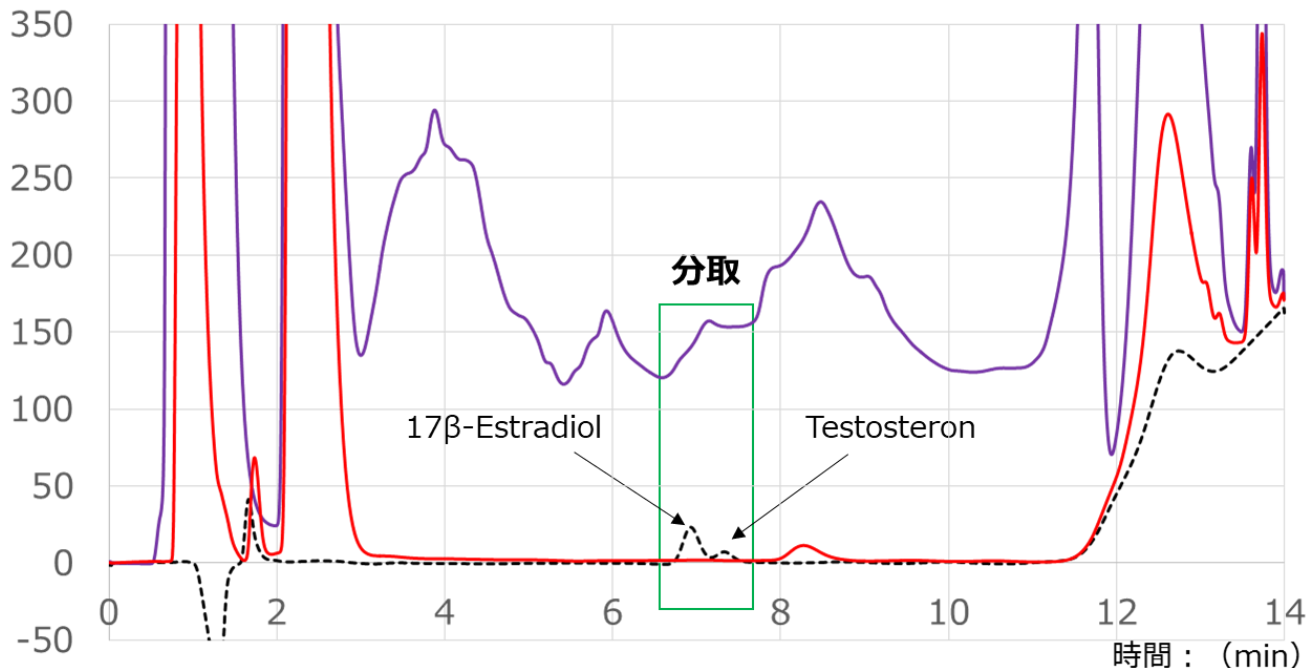


### 誘導体化

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。

# HPLC-UVクロマトグラム比較

強度 (UV:210nm)



■ 前処理 : ACN-固相

■ 前処理 : STQ法

ACN溶媒抽出  
遠心分離  
(除タンパク)



ACN溶媒抽出  
食塩  
クエン酸バッファー  
無水硫酸Mg  
遠心分離  
(除タンパク)

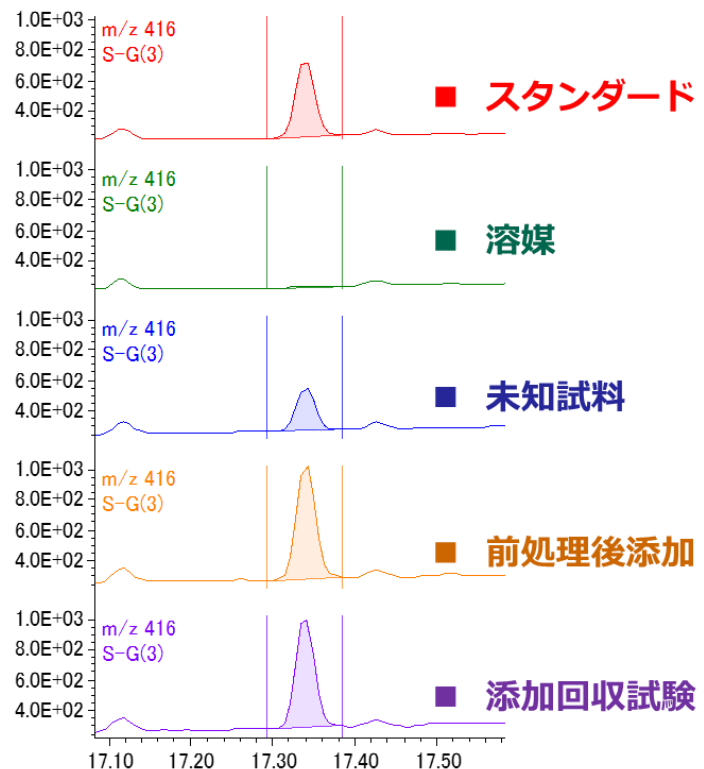


ACN層

試料層  
タンパク質含む

水層  
水溶性の夾雑物

# 多段階添加回収試験と測定結果



## 定量イオンクロマトグラム比較

### 繰り返し添加回収試験 (n=5)

No.	1	2	3	4	5	Ave.	RSD (%)
回収率 (%)	96	103	98	96	93	97	<b>3.8</b>

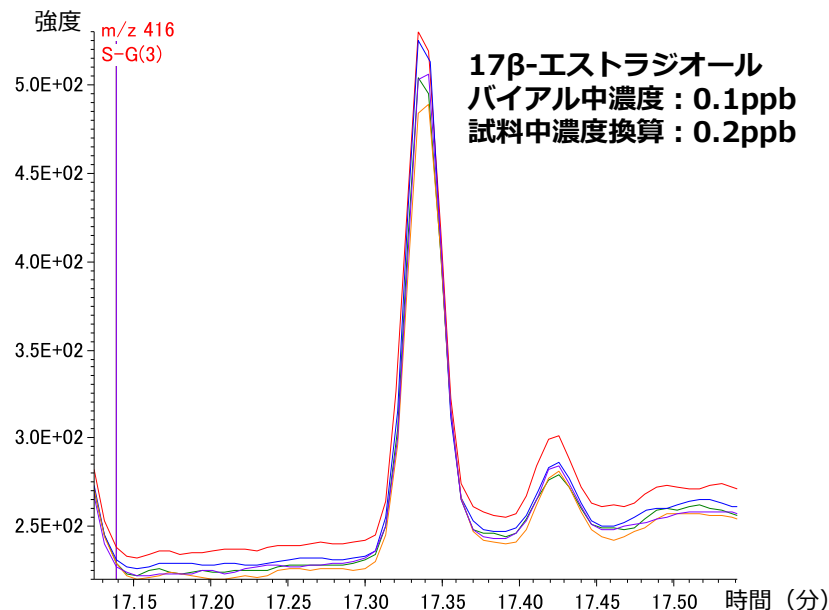


表. HPLC-GC/MSによる繰り返し測定による  
定量イオンクロマトグラム重ね描き (n=5)

表. HPLC-GC/MSによる繰り返し測定結果 (再現性)

No.	1	2	3	4	5	Ave.	RSD (%)
ピーク面積値	949	910	951	890	913	922	<b>2.88</b>