

2017年11月9日 第113回 日本食品衛生学会学術講演会 技術セミナー

食品におけるメタボローム分析 ～固相誘導体化技術による簡易化、自動化～



株式会社アイスティサイエンス

Beyond your Imagination

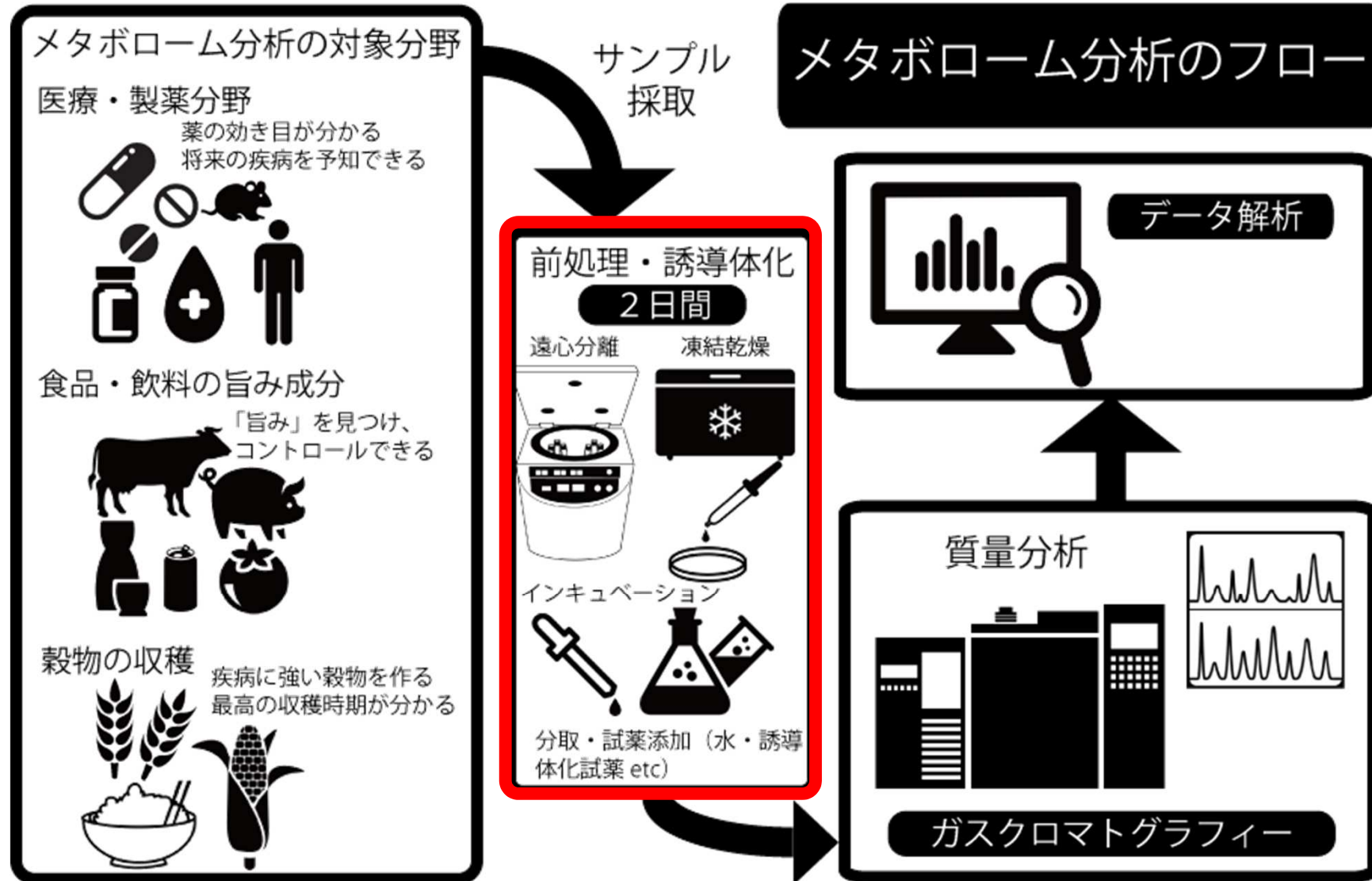
本日の内容

- 1, 従来法との比較
- 2, 固相誘導体化技術とは その1
～アミノ酸、有機酸～
- 3, 固相誘導体化技術とは その2
～アミノ酸、有機酸と糖の一斉分析～
- 4, 固相誘導体化の自動化

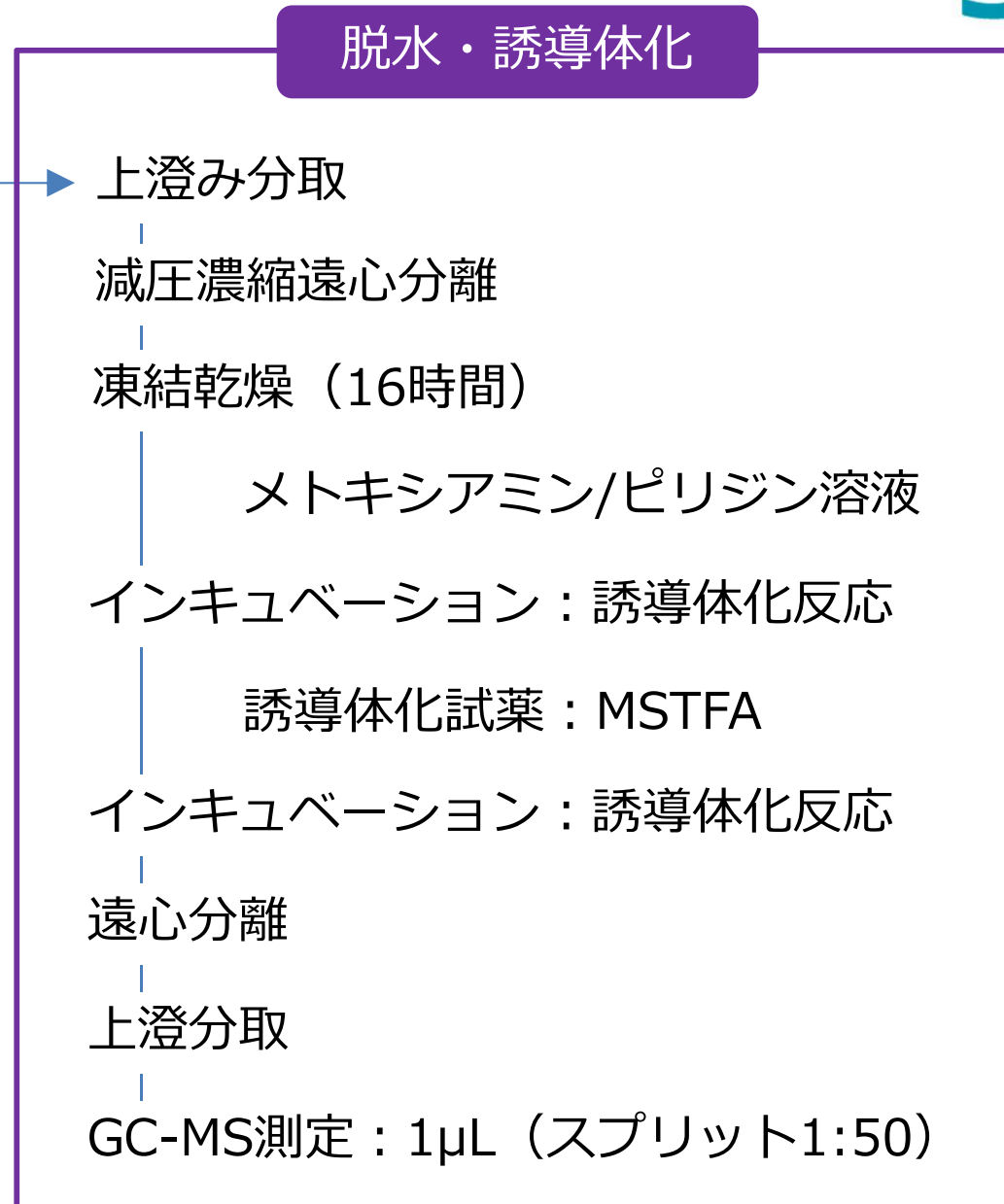
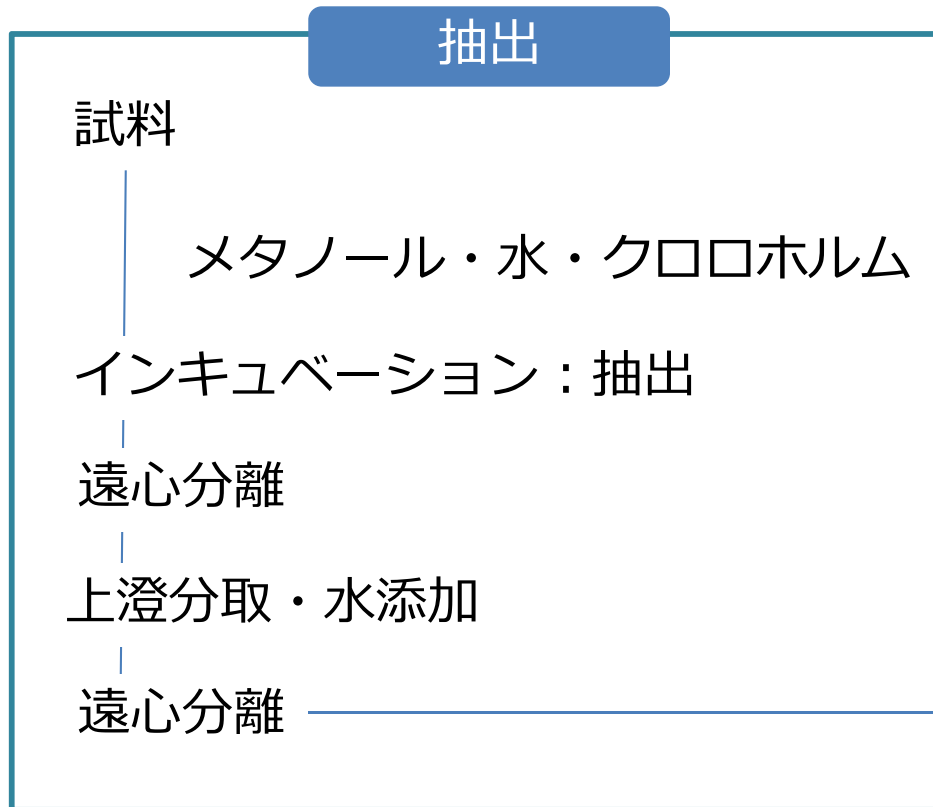
1, 従来法との比較

～操作性向上、時間短縮～

メタボロミクスの現状と課題



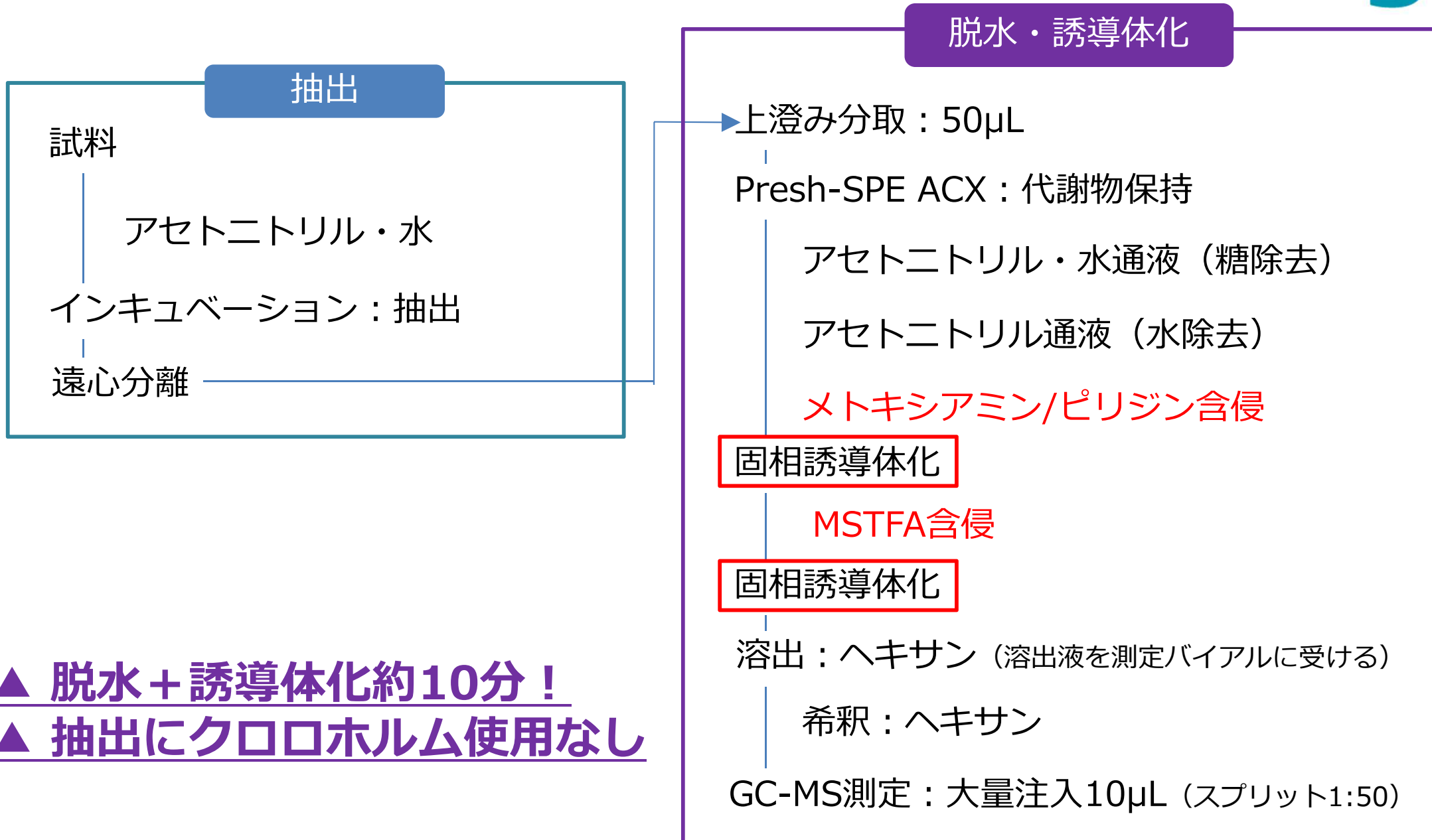
従来の前処理法の課題



▲ 脱水に一晚(16時間)

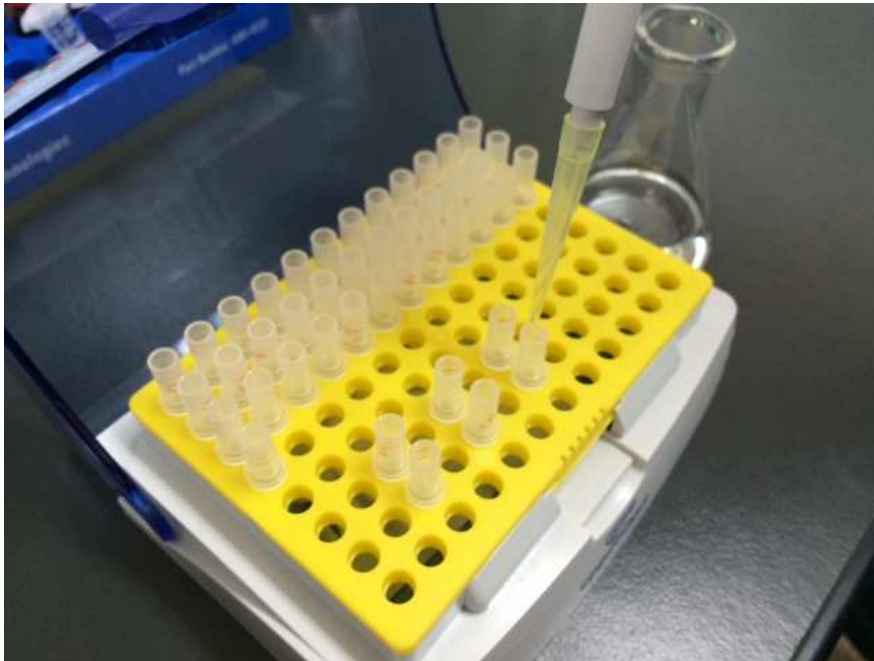
▲ 誘導体化に2時間

当社提案分析法



- ▲ 脱水 + 誘導体化約10分！
- ▲ 抽出にクロロホルム使用なし

操作写真



固相誘導体化法 お試しキット



Beyond your Imagination

固相誘導体化法

メタボローム分析前処理 お試しキット

(アミノ酸・有機酸一斉分析用)

脱水と誘導体化を「固相」で行う画期的技術



今まで半日近くかかっていた
メタボローム分析の前処理作業を
わずか10分程度に短縮する新技術。
(特許取得)



AiSTI SCIENCE



メタボローム分析の前処理時間

従来法は半日～1日

これからは
約10分!

答えは固相での誘導体化にありました。
前処理革命を体験してください。

前処理フロー (例)



Presh-SPE 固相

- 上澄み50μL
- アセトニトリル100μL
洗淨、脱水効果
- 誘導体化試薬を含まず
固相誘導体化反応
- 試薬：メトキシアミン/ピリジン
+MSTFA混合
- 溶出：ヘキサン

検液
GC/MS：大量注入10μL
※80 進入口 LVI-5250 (アイステイサイエンス製)
※90 検液メタボローム分析に使用する標準物質を含む試薬
※100 検液メタボローム分析に使用する標準物質を含む試薬



株式会社 アイステイサイエンス
本社
〒640-8341 和歌山市黒田 120-6 アソート黒田 2F
TEL:073(475-0033) FAX:073(497-5011)
東日本営業所
〒351-0033 埼玉県草加市浜崎 1 丁目 3-31 アドバンス 410
TEL:048-424-8364 FAX:073-497-5011 (本社：和歌山)
www.aisti.co.jp

セット内容

- ①ピペットチップ用ボックス
Presh-SPE 専用ピペットチップボックス、専用封入紙。
- ②プラスチック製シリンジ
容量 1mL のプラスチック製シリンジ、スネア入り。
- ③Presh-SPE
Presh-SPE ラインナップから
お好みの試薬を選択してください。



Presh-SPE ラインナップ

製品名	入数	型番	価格	対象物質
Presh-SPE A05	100個	SA-5579-003	¥33,800	アミノ酸・有機酸・糖
Presh-SPE AMI	100個	SA-5575-003	¥29,800	アミノ酸
Presh-SPE SSR	100個	SA-5571-003	¥29,800	有機酸・糖
Presh-SPE C18	100個	SA-5110-003	¥29,800	脂質(脂肪酸・色素除去)

お試しキットラインナップ

製品名	型番	価格
メタボローム分析前処理お試しキット(固相10個入)	SS-5040-010	¥9,800
メタボローム分析前処理お試しキット(固相20個入)	SS-5040-020	¥13,000

Presh-SPE 脱水効果

従来法は…
凍結乾燥
5時間～半日

アセトニトリル
アセトニトリル溶液
による脱水 10秒

Presh-SPE 固相誘導体化反応

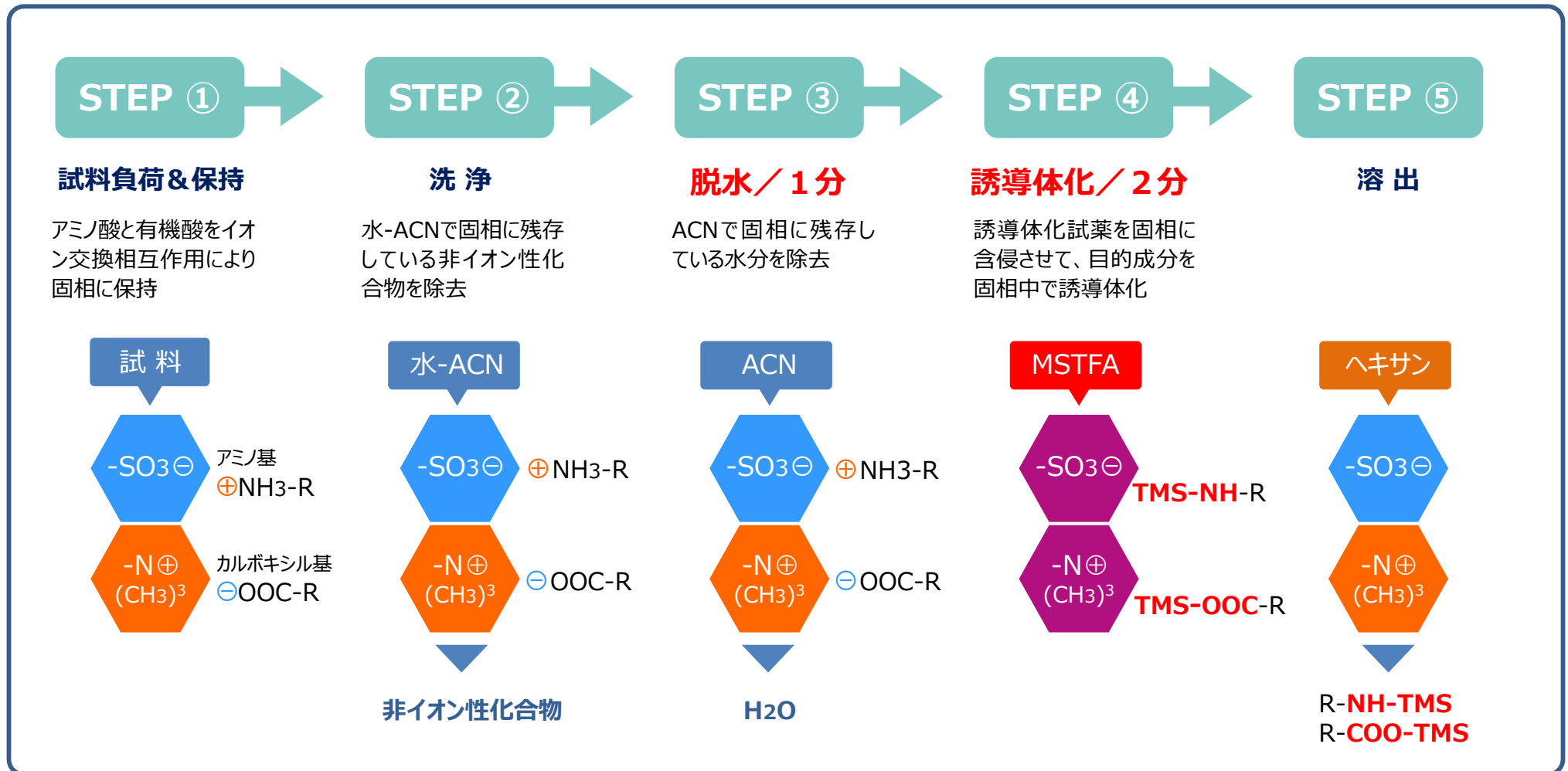
従来法は…
インキュベーション
30～90分

誘導体化試薬を
Presh-SPE 固相に含まず
固相内で誘導体化
30秒

2, 固相誘導体化技術とは その1

～アミノ酸、有機酸～

固相誘導体化法 (アミノ酸、有機酸など)



特許登録：(株)アイスティサイエンス

高濃度の糖類が分析に及ぼす影響

【測定機器について】

- ・注入口が汚れる
- ・フィラメントが切れやすくなる
- ・感度低下
- ・メンテナンス頻度が高い
- ・GCへの注入量を増やせない。

【解析について】

- ・定量イオンが限定される。
- ・ピーク形状が崩れる。
- ・低濃度の目的成分が分析できない。
- ・解析に時間が掛かる。
- ・リテンションタイムが重なると解析できなくなる。
- ・リテンションタイムが重なる物質は測定対象から除外する。
- ・リテンションタイムがずれる。



糖類を除いた

「アミノ酸」と「有機酸」の分析

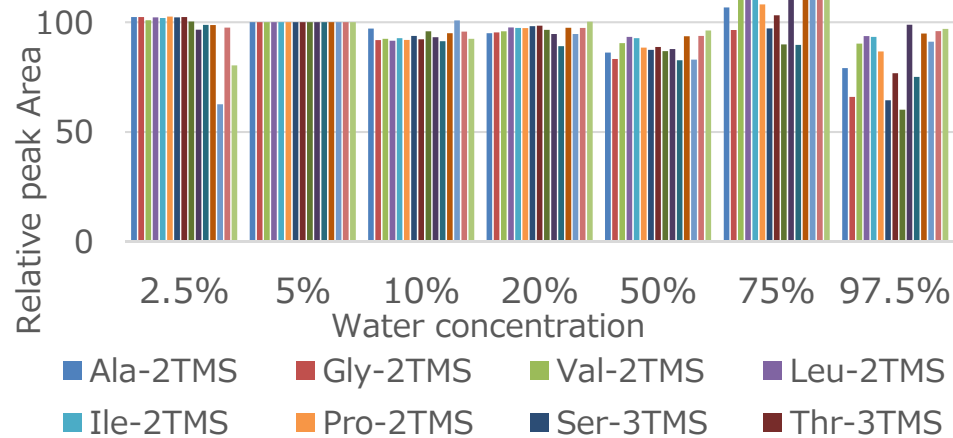
測定機器を安定に保ち、メンテナンス頻度を下げられ、短時間分析が可能となる。

解析の時間短縮が図れ、精度の高い分析が可能となる。

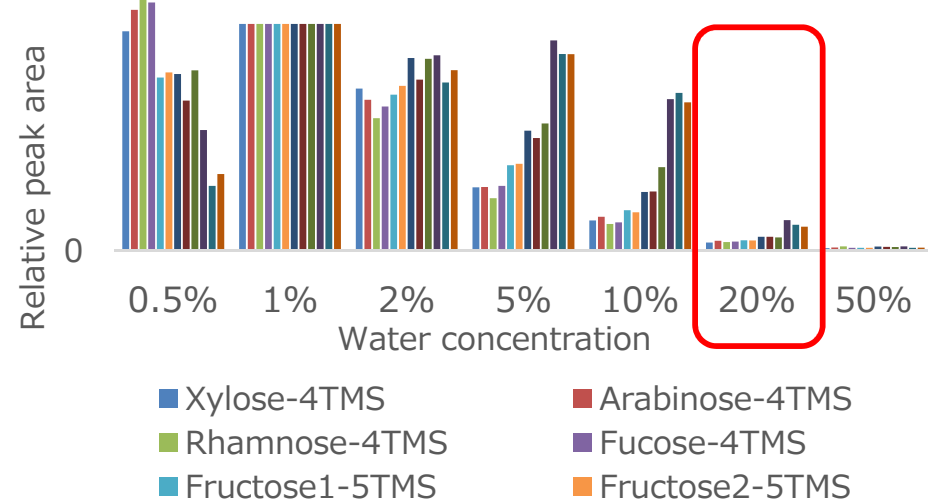
低濃度のアミノ酸や有機酸が測定できるようになり、アミノ酸や有機酸の網羅的な分析枠が広がる可能性がある。

試料負荷時の水濃度と固相への保持について

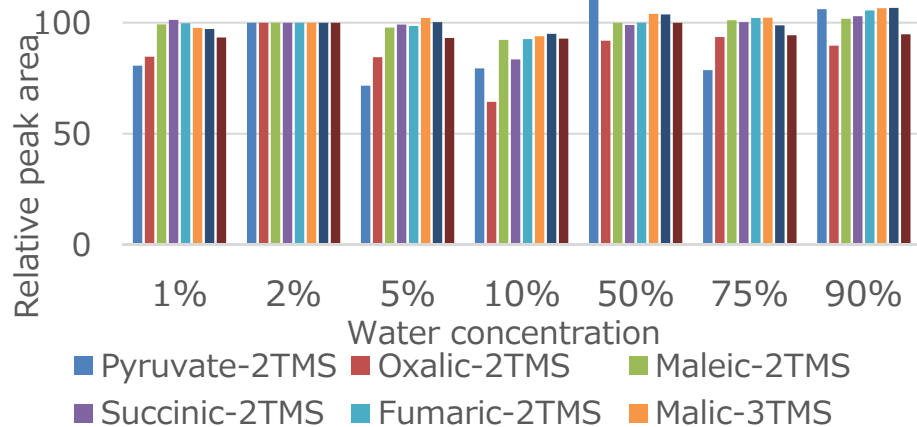
【アミノ酸とCX固相】



【糖とAX固相】

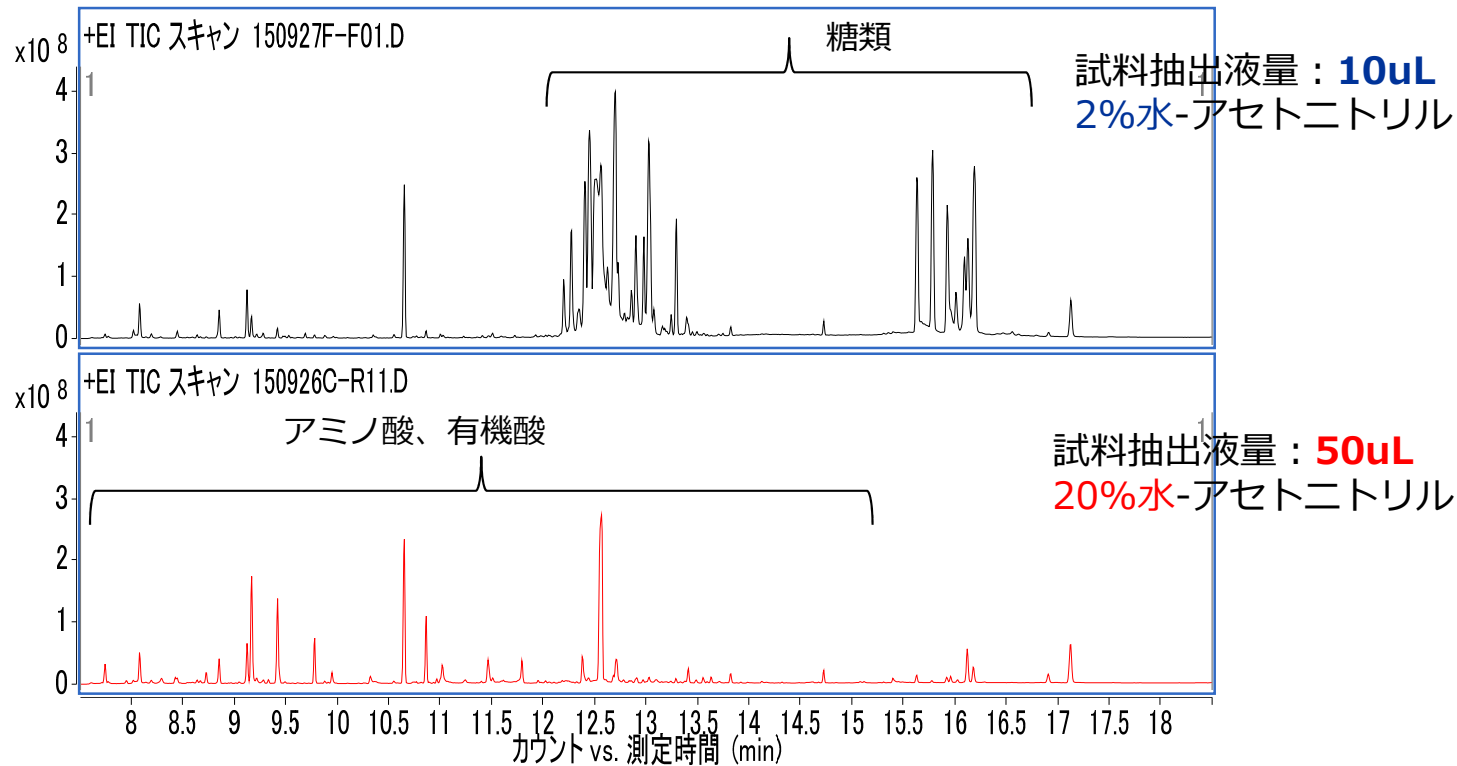


【有機酸とAX固相】



20%水-アセトニトリル溶液では
糖類を除去して、
アミノ酸と有機酸を保持することが可能。

固相抽出技術による糖類の除去効果



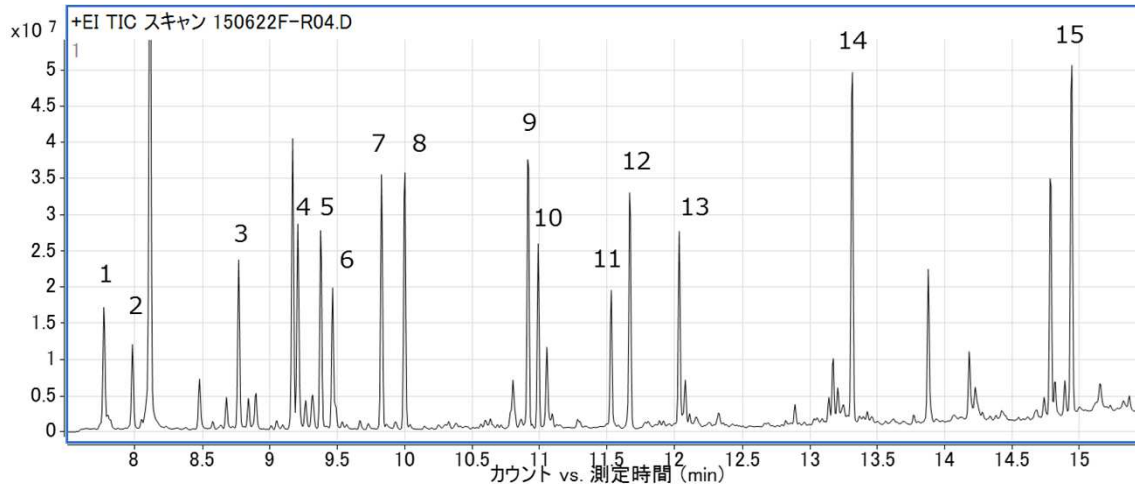
SCANトータルイオンクロマトグラム比較

測定機器を安定に保ち、メンテナンス頻度を下げられ、短時間分析が可能となる。

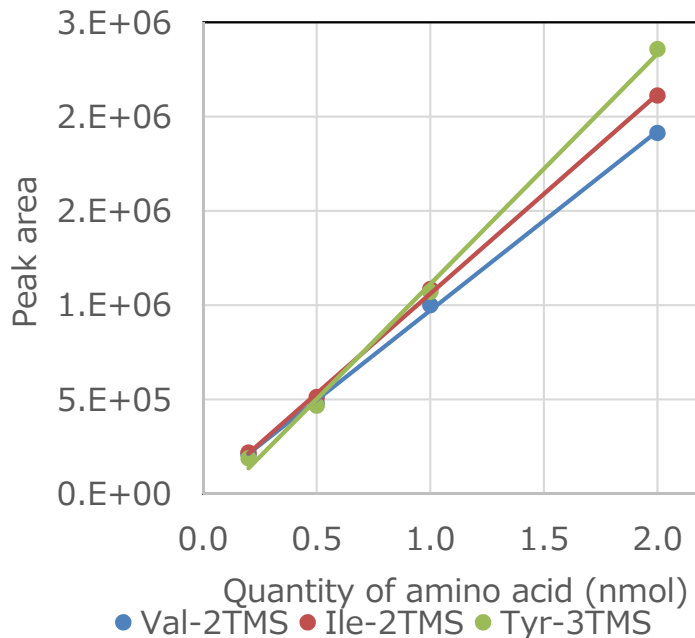
解析の時間短縮が図れ、精度の高い解析が可能となる。

低濃度のアミノ酸や有機酸が測定できるようになり、アミノ酸や有機酸の網羅的な分析枠が広がる可能性がある。

CX固相誘導体化前処理法（アミノ酸）の評価



SCANトータルイオンクロマトグラム



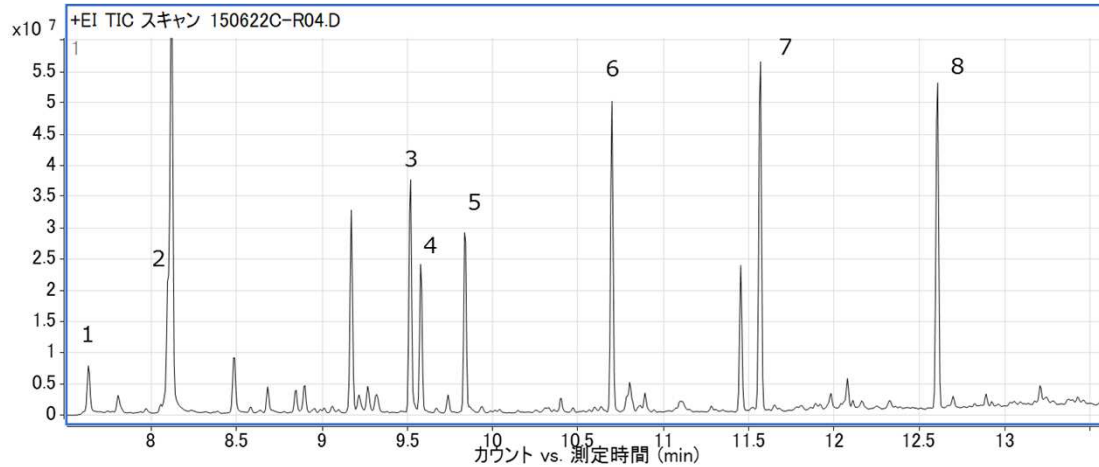
アミノ酸量とピーク面積値の関係

目的成分量
0.2, 0.5, 1.0, 2.0 nmol

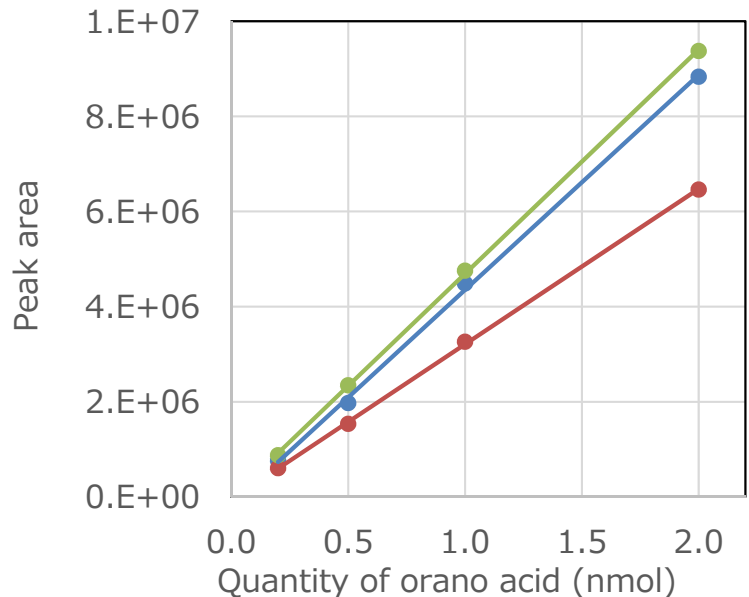
直線性 (R2) と再現性 (RSD, n=6)

No.	Amino acid	R2	RSD n=6, %
1	Ala-2TMS	0.9996	7.4
2	Gly-2TMS	0.9958	13.1
3	Val-2TMS	0.9993	7.5
4	Leu-2TMS	0.9992	6.7
5	Ile-2TMS	0.9995	6.2
6	Pro-2TMS	0.9982	12.5
7	Ser-3TMS	0.9988	5.5
8	Thr-3TMS	0.9990	4.7
9	Asp-3TMS	0.9989	4.9
10	Met-2TMS	0.9991	7.5
11	Glt-3TMS	0.9911	8.8
12	Phe-2TMS	0.9996	5.6
13	Lys-3TMS	0.9927	32.2
14	Tyr-3TMS	0.9977	4.8
15	Cys-4TMS	0.9950	29.2

AX固相誘導体化前処理法（有機酸）の評価



SCAN トータルイオンクロマトグラム

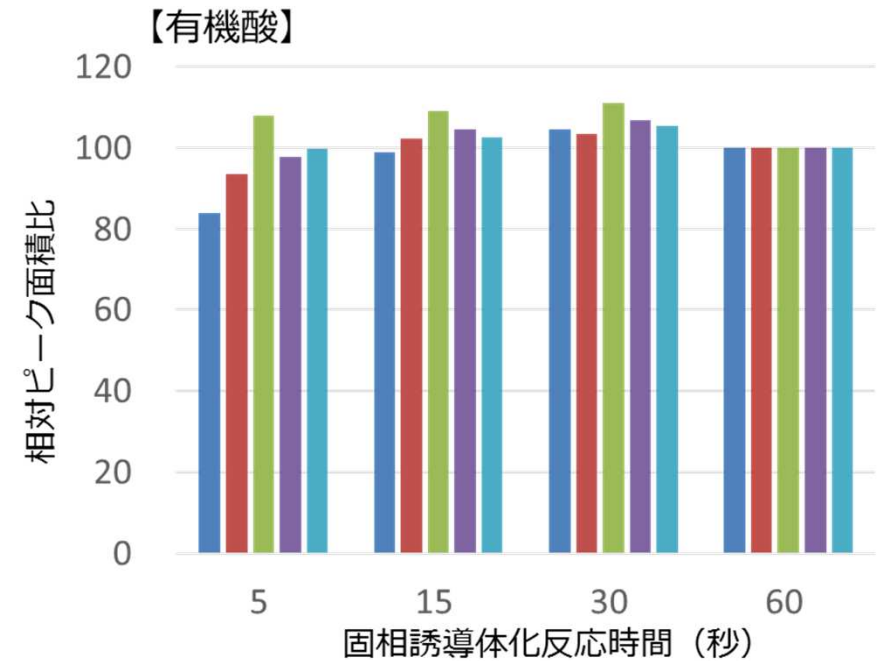
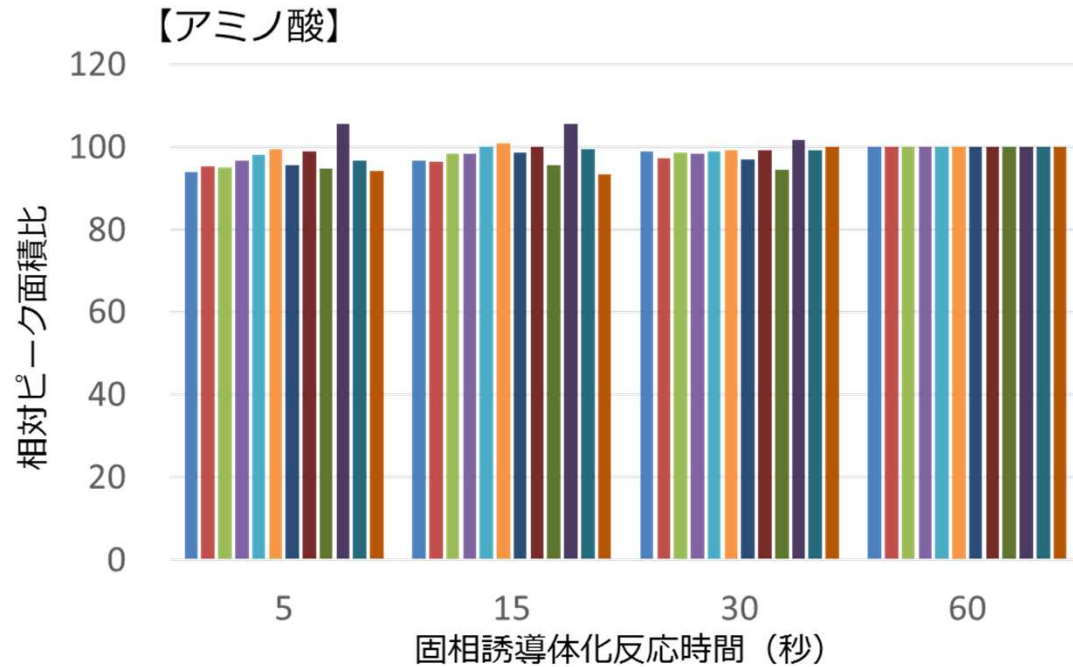


● Fumaric-2TMS ● Tartaric-4TMS ● Citric-4TMS

直線性 (R2) と再現性 (RSD, n=6)

No.	Organic acid	R2	RSD n=6, %
1	Pyruvate-2TMS	0.9998	15.1
2	Oxalic-2TMS	0.9946	6.2
3	Maleic-2TMS	0.9991	1.8
4	Succinic-2TMS	0.9588	22.0
5	Fumaric-2TMS	0.9991	2.2
6	Malic-3TMS	0.9997	2.1
7	Tartaric-4TMS	0.9998	1.9
8	Citric-4TMS	0.9998	2.5

固相誘導体化反応時間について



- Alanine-2TMS
- Isoleucine-2TMS
- Threonine-3TMS
- Glutamic acid-3TMS
- Valine-2TMS
- Proline-2TMS
- Aspartic-3TMS
- Phenylalanine-2TMS
- Leucine-2TMS
- Serine-3TMS
- Methionine-2TMS
- Tyrosine-2TMS

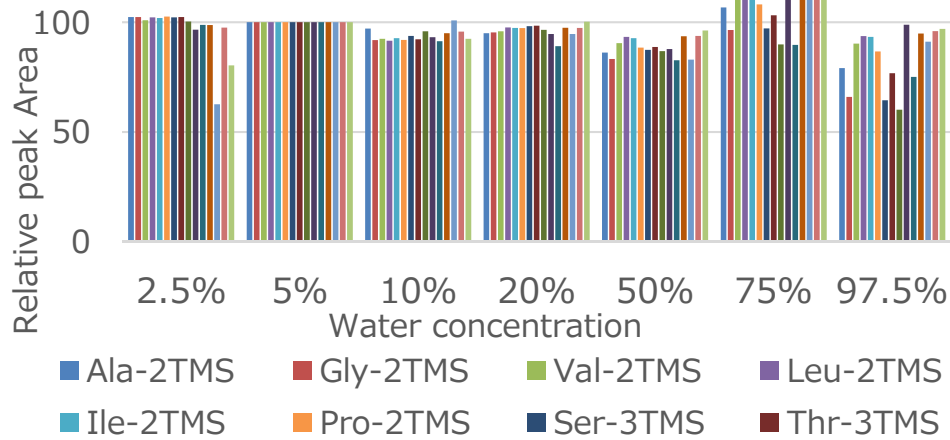
- Fumaric acid-2TMS
- Ketoglutaric acid-3TMS
- Citric acid-4TMS
- Malic acid-3TMS
- Tartaric acid-4TMS

3, 固相誘導体化技術とは その2

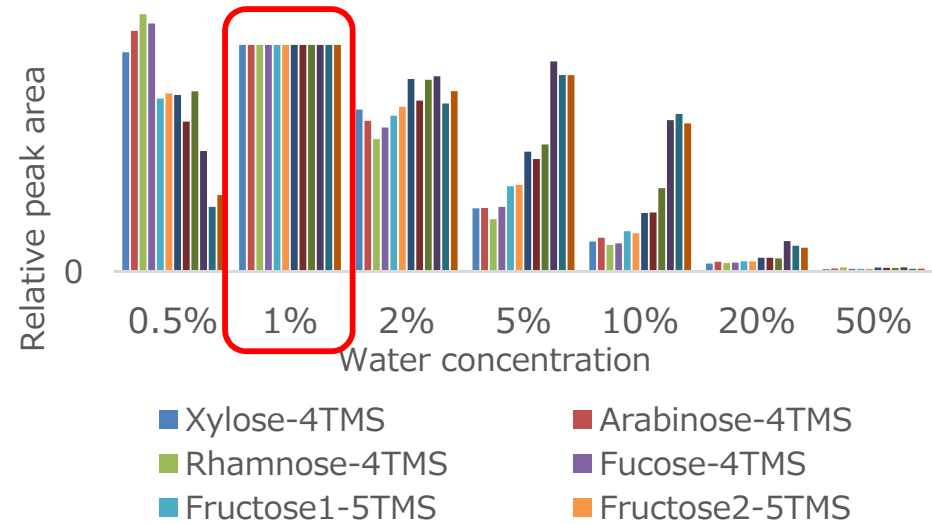
～アミノ酸、有機酸と糖の一斉分析～

試料負荷時の水濃度と固相への保持について

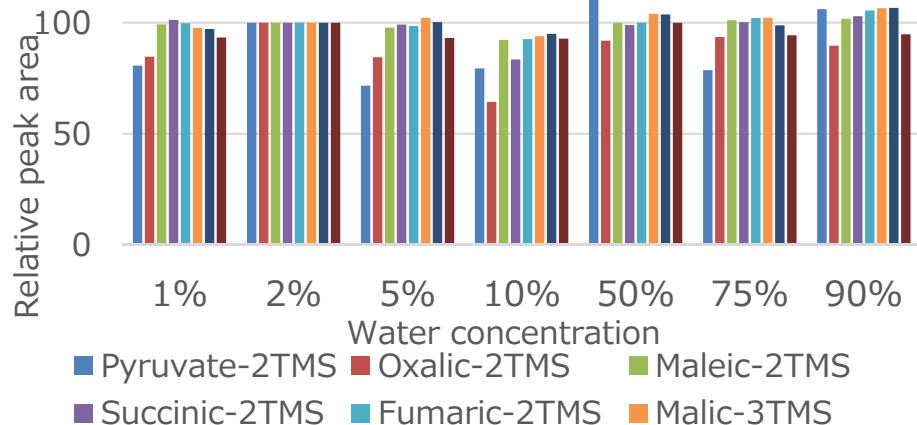
【アミノ酸とCX固相】



【糖とAX固相】



【有機酸とAX固相】



1%水-アセトニトリル溶液では
アミノ酸と有機酸と糖類を保持することが可能。

アミノ酸、有機酸 + 糖と対象とする場合

野菜ジュース

試料 10 μ L (10mg)

— 添加：水 190 μ L

— 添加：ACN 800 μ L

インキュベーション (37 $^{\circ}$ C, 30min)

遠心分離 (14000rpm, 5min)

試料抽出液

(20%水-アセトニトリル)



※適宜希釈

※NaOH水溶液を添加してpH 7になるように調整

1回目分取

試料抽出液分取 **100 μ L** (20%水-アセトニトリル)

Presh-SPE **ACX-3mg** (アミノ酸と有機酸を保持)

— 洗浄：20%水-ACN 50 μ L (糖類を洗浄)

— 洗浄：ACN 100 μ L (脱水効果)

2回目分取

試料抽出液分取 **5 μ L** (1%水-アセトニトリル)

— 希釈：ACN 100 μ L (糖の保持効果)

Presh-SPE **ACX-3mg** (アミノ酸と有機酸を保持した状態)
(糖類を保持)

— 洗浄：ACN 100 μ L (脱水効果)

— 誘導体化試薬を含浸 **メトキシアミン/ピリジン** 5 μ L

固相誘導体化反応 3min

— 誘導体化試薬を含浸 **MSTFA** 25 μ L

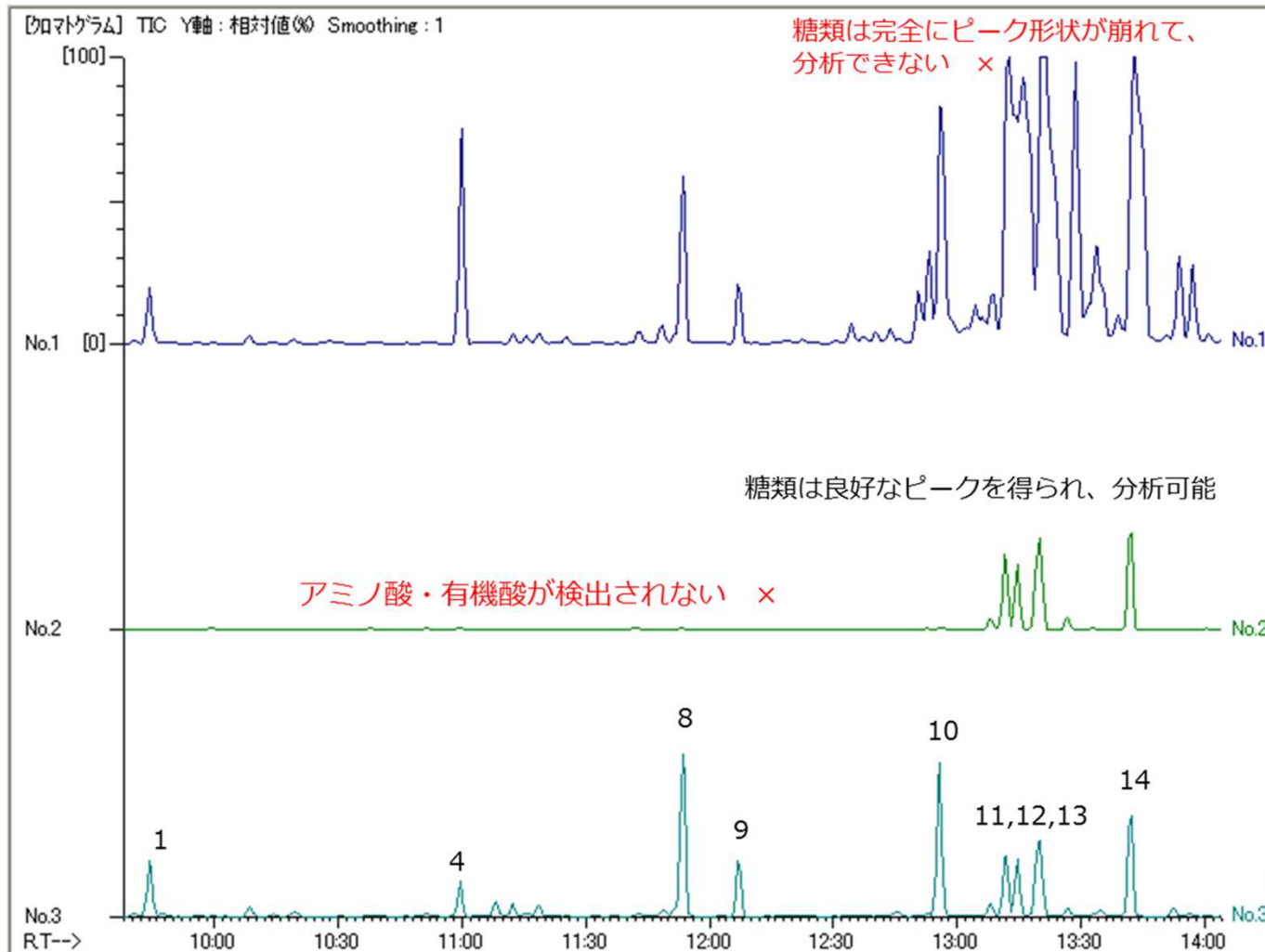
固相誘導体化反応 1min

— 溶出：ヘキサン 100 μ L

— 添加：ヘキサン 400 μ L

検液 GC/MS：大量注入10 μ L

フルーツジュースを用いた各法による SCANトータルイオンクロマトグラム比較



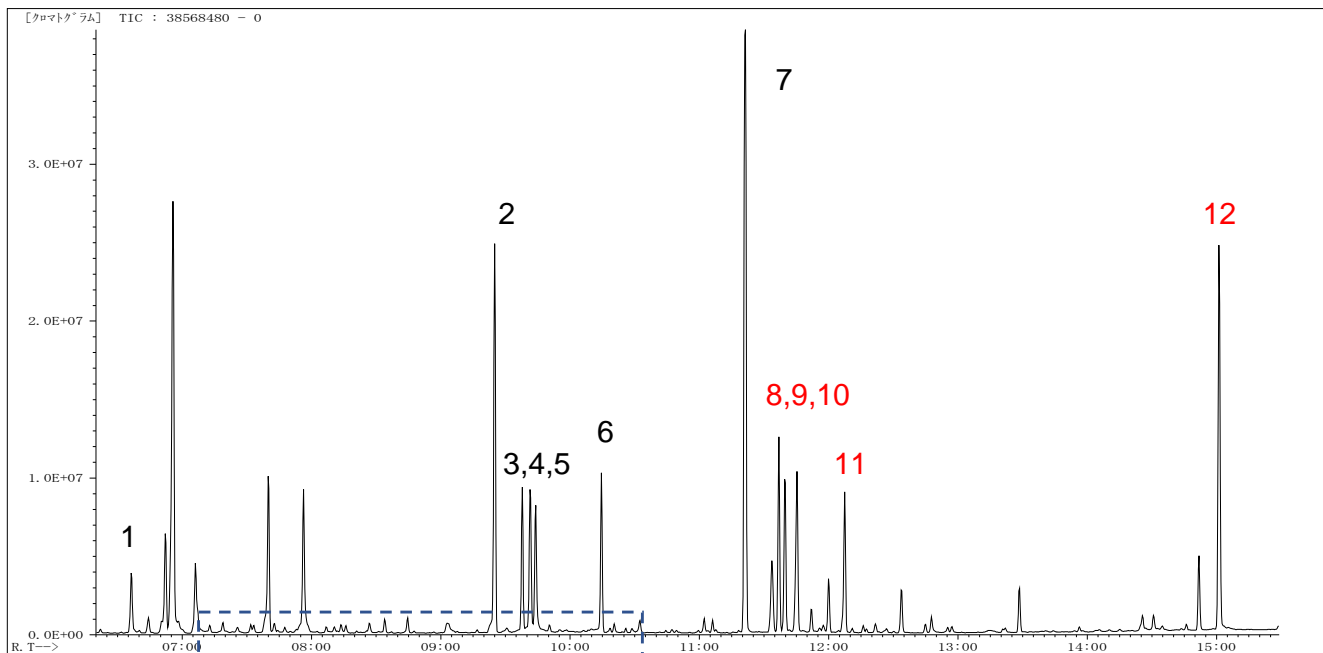
従来法A
試料量：大
MS導入量
アミノ酸・有機酸・糖類
： **試料40μg相当**

従来法B
試料量：小
MS導入量
アミノ酸・有機酸・糖類
： **試料0.4μg相当**

本法
2段階試料採取法
MS導入量
アミノ酸・有機酸： **試料40.4μg相当**
糖類： **試料0.4μg相当**

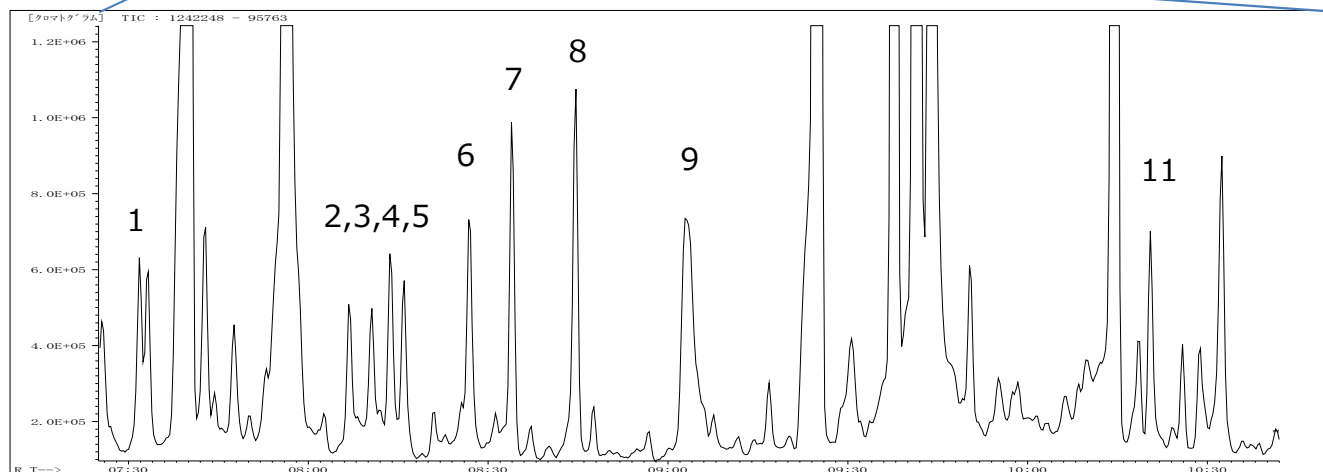
- | | | | | |
|-------------------|---------------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|
| 1. Proline-2TMS | 4. Maric acid-3TMS | 7. Glutamic acid-3TMS | 10. Citric acid-4TMS | 13. Glucose-5TMS |
| 2. Serine-3TMS | 5. Aspartic acid-3TMS | 8. Tartaric acid-4TMS | 11. Fluctose-5TMS | 14. Glucopyranose-5TMS |
| 3. Threonine-3TMS | 6. Aminobutyric acid-3TMS | 9. Asparagine-3TMS | 12. Fluctose-5TMS | |

本法による野菜ジュースのSCANトータルイオンクロマトグラム



1. Alanine-2TMS
2. Malic acid-3TMS
3. Asparatic acid-3TMS
4. Pyroglutamic acid-2TMS
5. GAVA-3TMS
6. Glutamic acid-3TMS
7. Citric acid-4TMS
8. Fructose1-MO-5TMS
9. Fructose2-MO-5TMS
10. Glucose-MO-5TMS
11. Glucopyronose-5TMS
12. Sucrose-8TMS

拡大



1. Valine-2TMS
2. Isoleucine-2TMS
3. Proline-2TMS
4. Glycine-3TMS
5. Succinic acid-2TMS
6. Fumaric acid-2TMS
7. Serine-3TMS
8. Threonine-3TMS
9. Asparatic acid-3TMS
10. Tartaric acid-4TMS
11. Phenylalanine-2TMS

本法による標準溶液を用いた再現性

No.	化合物名	アミノ酸および有機酸 0.05nmol/uL 50uL						No.	化合物名	糖類 0.2nmol/uL 5uL					
		ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	Ave	RSD(%)			ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	Ave	RSD(%)
1	Pyruvic acid-MO-TMS	326,078	272,621	255,639	303,726	289,516	10.9	26	Xylose-MO-4TMS	1,829,954	1,697,406	1,884,760	1,854,972	1,816,773	4.6
2	Oxalic acid-2TMS	228,791	247,419	238,435	229,875	236,130	3.7	27	Arabinose-MO-4TMS	2,058,363	1,927,036	2,180,936	2,151,136	2,079,368	5.5
3	Maleic acid-2TMS	2,101,596	2,201,338	2,189,384	2,277,568	2,192,472	3.3	28	Rhamnose-MO-4TMS	1,133,837	1,058,002	1,208,867	1,172,861	1,143,392	5.7
4	Succinic acid-2TMS	1,545,773	1,811,758	1,531,092	1,741,508	1,657,533	8.5	29	Fucose-MO-4TMS	915,640	846,252	950,447	926,120	909,615	4.9
5	Fumaric acid-2TMS	1,736,037	1,888,235	1,729,101	1,903,735	1,814,277	5.2	30	Fructose1-MO-5TMS	2,097,758	2,064,597	2,148,115	2,143,372	2,113,461	1.9
6	Malic acid-3TMS	652,172	715,041	633,750	696,375	674,335	5.6	31	Fructose2-MO-5TMS	1,643,276	1,635,447	1,695,825	1,747,072	1,680,405	3.1
7	Ketoglutaric acid-M-2TMS	1,743,632	1,766,843	1,692,053	1,836,823	1,759,838	3.4	32	Mannose-MO-5TMS	4,836,740	4,851,336	4,937,350	5,090,237	4,928,916	2.4
8	Tartaric acid-4TMS	1,373,960	1,441,944	1,313,024	1,419,340	1,387,067	4.1	33	Galactose-MO-5TMS	3,865,132	3,869,771	3,920,023	3,996,825	3,912,938	1.6
9	Citric acid-4TMS	1,230,029	1,294,887	1,202,971	1,273,394	1,250,320	3.3	34	Glucose-MO-5TMS	3,379,203	3,121,917	3,190,987	3,180,244	3,218,088	3.5
10	Alanine-2TMS	8,640,462	9,028,803	9,243,813	9,480,040	9,098,280	3.9	35	Glucopyranose-5TMS	548,010	654,027	630,117	691,119	630,818	9.6
11	Valine-2TMS	1,643,565	1,598,273	1,795,816	1,983,400	1,755,264	9.9	36	Sucrose-8TMS	2,622,777	2,662,113	2,631,348	2,696,903	2,653,285	1.3
12	Leucine-2TMS	524,794	517,891	555,474	589,075	546,809	6.0	37	Lactose1-MO-8TMS	3,725,973	3,468,644	3,464,426	3,533,066	3,548,027	3.5
13	Isoleucine-2TMS	2,145,613	2,184,722	2,256,030	2,403,115	2,247,370	5.0	38	Lactose2-8TMS	4,602,143	5,581,471	5,268,097	5,638,305	5,272,504	9.0
14	Proline-2TMS	5,966,070	5,815,625	6,337,728	6,947,649	6,266,768	8.0	39	Maltose1-MO-8TMS	4,552,684	4,072,476	4,110,055	4,065,236	4,200,113	5.6
15	Glycine-3TMS	465,546	464,208	486,616	491,786	477,039	3.0	40	Maltose2-8TMS	3,659,795	4,138,740	3,773,779	4,336,212	3,977,132	7.9
16	Serine-3TMS	6,733,940	6,765,371	7,090,181	7,561,905	7,037,849	5.5								
17	Threonine-3TMS	1,638,309	1,692,383	1,725,648	1,806,406	1,715,687	4.1								
18	Aspartic acid-3TMS	7,876,615	7,698,440	8,112,766	8,337,593	8,006,354	3.5								
19	Methionine-2TMS	401,614	403,554	416,804	439,198	415,293	4.2								
20	Glutamic acid-3TMS	1,775,455	1,595,572	1,826,798	1,865,958	1,765,946	6.8								
21	Phenylalanine-2TMS	6,911,026	6,847,395	7,029,301	7,367,841	7,038,891	3.3								
22	Tyrosine-2TMS	5,707,831	5,797,850	5,428,516	6,026,842	5,740,260	4.3								
23	Lysine-4TMS	1,480,711	1,440,106	1,686,430	1,684,583	1,572,958	8.3								
24	Histidine-3TMS	138,428	132,212	152,731	157,374	145,186	8.1								
25	Tyrosine-3TMS	371,747	362,896	416,279	423,004	393,482	7.8								

本法による野菜ジュースを用いた再現性

No.	化合物名	野菜ジュース 10uL/1mL 4倍希釈							Ave	RSD(%)
		PJ- 1	PJ- 2	PJ- 3	PJ- 4	PJ- 5	PJ- 6	PJ- 7		
1	Succinic acid-2TMS	53,618	48,219	53,185	55,224	50,265	53,965	51,095	52,224	4.7
2	Fumaric acid-2TMS	13,489	11,865	12,732	12,848	11,804	12,087	13,646	12,639	5.9
3	Malic acid-3TMS	794,415	724,411	793,269	803,023	722,560	788,610	791,110	773,914	4.5
4	Ketoglutaric acid-MO-2TMS	10,287	9,840	10,415	10,414	9,592	10,145	10,393	10,155	3.2
5	Tartaric acid-4TMS	9,313	8,245	8,340	8,706	7,902	8,655	8,584	8,535	5.2
6	Citric acid-4TMS	1,966,814	1,935,224	1,934,789	1,938,684	1,909,637	1,948,231	1,949,949	1,940,475	0.9
7	Alanine-2TMS	2,845,774	2,768,258	2,657,313	2,774,700	2,662,174	2,694,419	2,777,270	2,739,987	2.6
8	Valine-2TMS	101,107	88,755	87,413	92,007	74,199	87,422	102,797	90,529	10.6
9	Leucine-2TMS	15,321	14,916	12,936	14,241	12,279	14,520	14,842	14,151	7.9
10	Isoleucine-2TMS	63,155	50,295	53,582	58,315	47,137	49,470	57,837	54,256	10.6
11	Proline-2TMS	458,672	393,806	425,565	442,178	347,122	412,539	434,530	416,345	8.9
12	Glycine-3TMS	21,668	22,811	20,153	23,835	22,879	21,285	20,946	21,940	5.9
13	Serine-3TMS	476,122	443,964	407,985	449,604	381,791	429,997	474,545	437,715	7.8
14	Threonine-3TMS	78,341	78,139	72,696	78,255	70,169	74,558	77,714	75,696	4.3
15	Aspartic acid-3TMS	4,686,933	4,643,713	4,436,285	4,519,353	4,386,816	4,574,875	4,786,882	4,576,408	3.1
16	Glutamic acid-3TMS	4,736,619	4,882,719	4,744,648	4,812,985	4,716,805	4,689,354	4,954,272	4,791,057	2.0
17	Phenylalanine-2TMS	257,196	257,661	234,500	255,148	244,192	261,769	278,415	255,554	5.4
18	Tyrosine-2TMS	31,487	35,662	32,902	37,777	33,518	39,844	43,109	36,328	11.5
19	Fructose1-MO-5TMS	2,062,980	1,994,412	2,042,655	1,997,072	2,008,716	2,003,833	2,146,394	2,036,580	2.7
20	Fructose2-MO-5TMS	1,711,374	1,647,589	1,673,083	1,650,628	1,653,134	1,638,625	1,689,720	1,666,308	1.6
21	Mannose-MO-5TMS	51,091	49,298	51,429	49,616	49,484	49,335	50,989	50,177	1.9
22	Glucose-MO-5TMS	2,535,728	2,186,072	2,194,972	2,152,255	2,144,596	2,346,947	2,809,710	2,338,611	10.7
23	Glucopyranose-5TMS	742,148	786,844	801,596	816,807	827,676	759,322	625,699	765,727	9.0
24	Sucrose-8TMS	1,847,061	1,746,771	1,728,064	1,720,861	1,710,034	1,725,824	1,789,754	1,752,624	2.8

まとめ

固相カートリッジを用いた新規GC/MSメタボローム解析用試料調製法を開発した。

当該固相誘導体化法を用いることで

1. 固相に対象物質を保持させて、洗浄することで、脱水操作を簡易かつ迅速に行うことが可能となった。
2. 対象物質を保持した強イオン交換系固相に誘導体化試薬メトキシアミン溶液およびMSTFA誘導体化試薬を直接添加して含浸させることにより、固相上で速やかに誘導体化反応が進んだ。
3. 水分除去及び誘導体化の操作時間は10分と従来法(19時間)に比べて大きく短縮された。

4, 固相誘導体化の自動化

オンラインSPE-GC/MSシステム



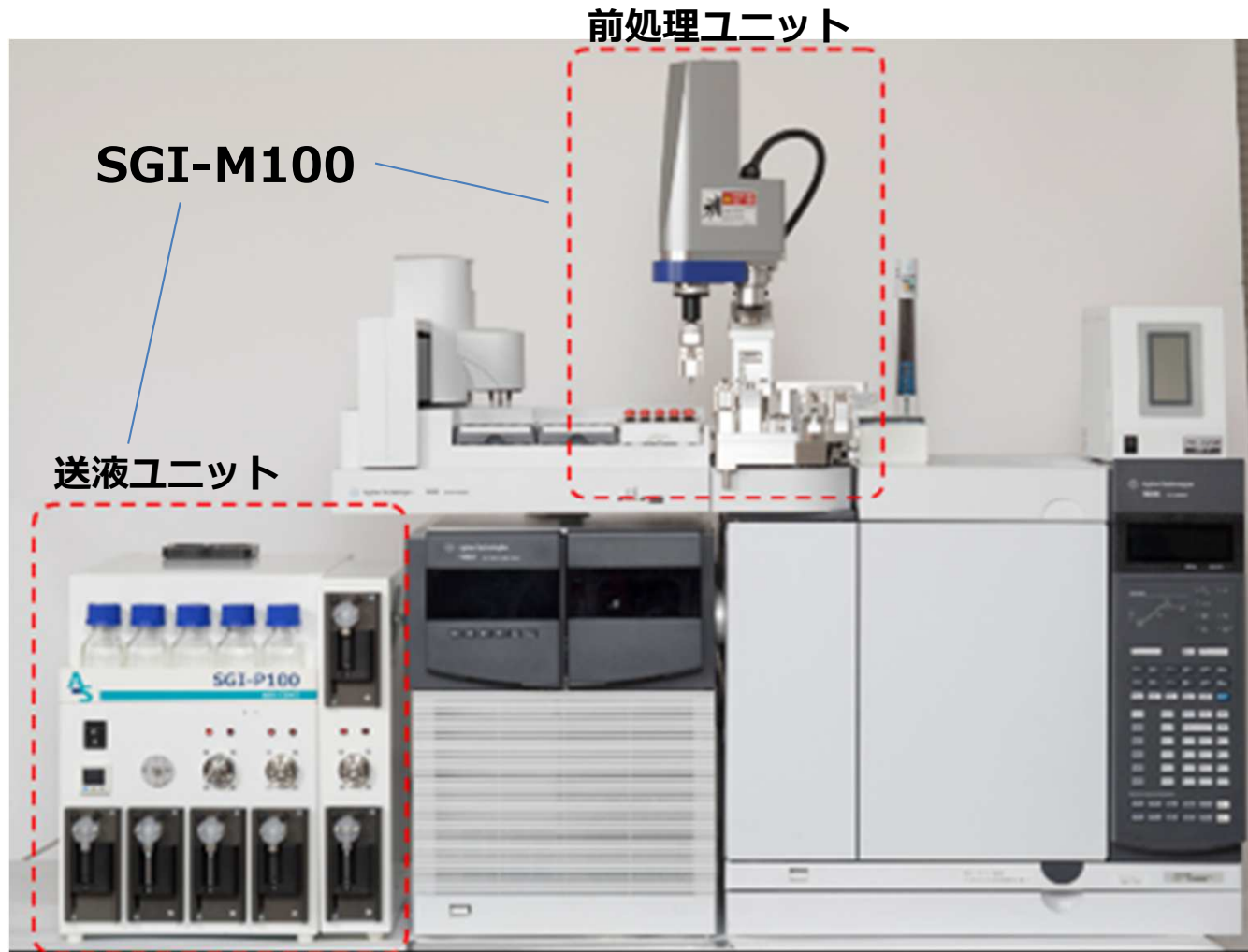
目的

従来のメタボローム分析は、採取した試料を溶媒抽出、遠心濃縮、凍結乾燥、誘導体化等の前処理工程が煩雑であるため、長時間を要するとともに熟練された技術が必須となる。

また、多検体の前処理をバッチ処理した場合、GC/MSでの測定はそれらの検体を順次測定していくため、それら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。これらは分析バッチ間の系統誤差の要因となり、多サンプルのメタボローム解析を遂行する上で致命的な短所である。

そこで、本研究では、迅速な自動誘導体化とその誘導体化からGCMSへの直接試料導入を目指して、固相誘導体化法を用いたオンラインSPE-GC/MSシステムの開発を行ったので報告する。

オンラインSPE-GC-MSシステム



Sampling



Flash-SPE



Injection

Online SPE-GC-MS System

なぜGC-MSなのか

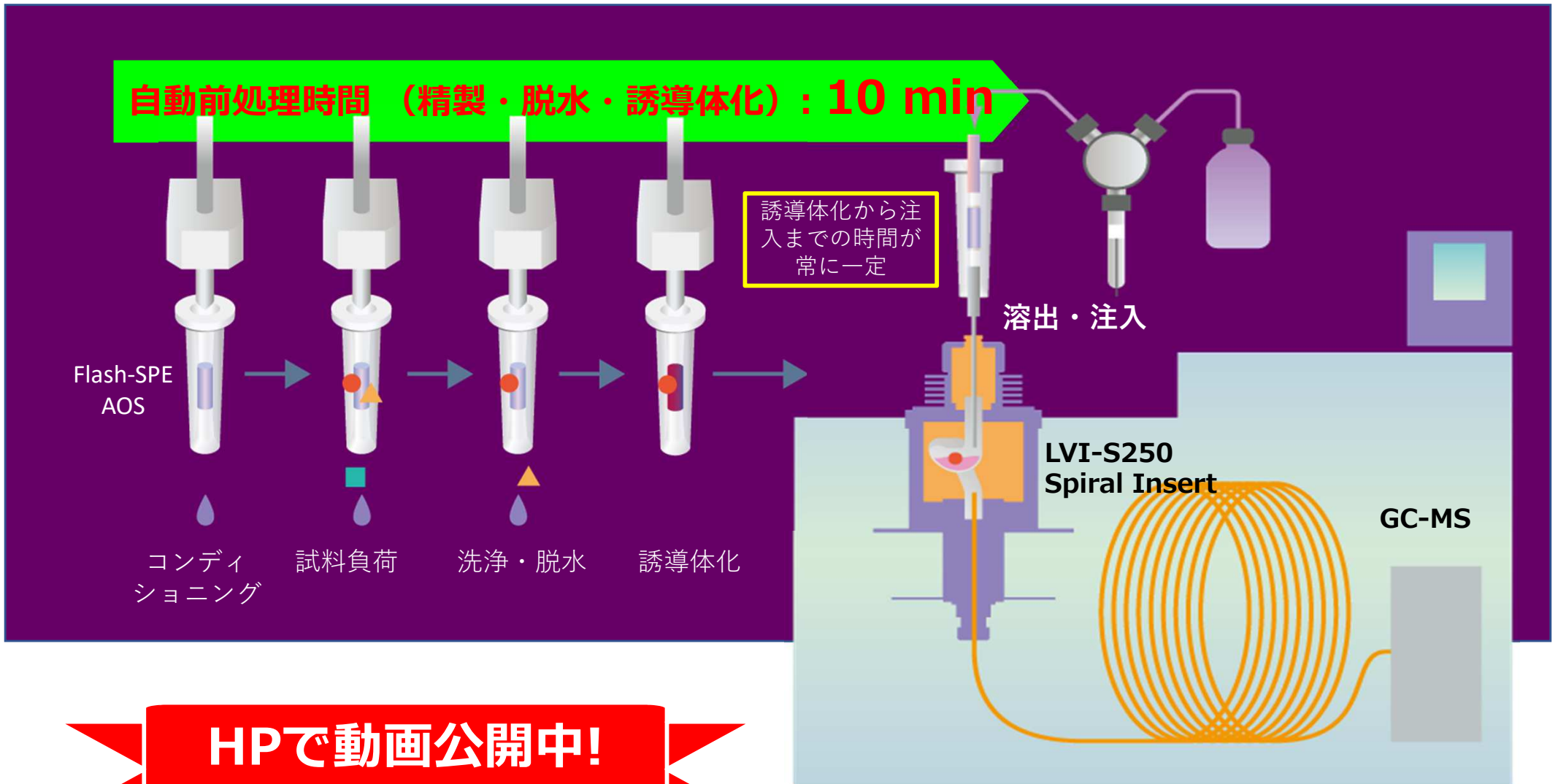
メタボローム分析におけるGC-MS測定のメリット

- ・ 幅広い成分を対象とできる
- ・ フラグメントから化合物を同定（推定）可能
（ライブラリが充実）

欠点と解決法

- ・ 煩雑な誘導体化が必要 → 自動化が解決！
- ・ 水分除去がシビア → 固相抽出が解決！
- ・ 誘導体化後の再現性 → 自動化が解決！

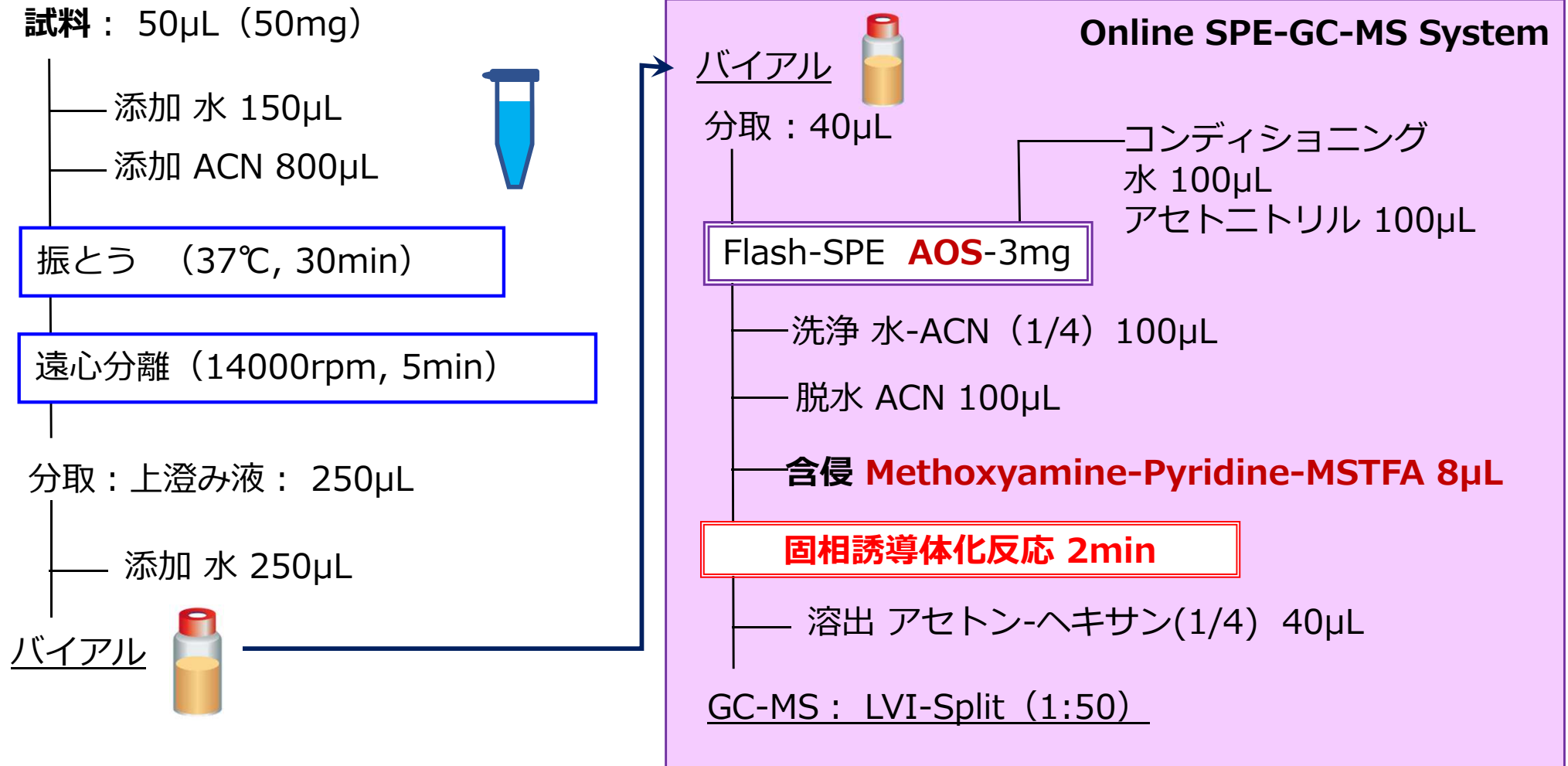
自動固相誘導体化オンラインSPE-GC-MSシステム



HPで動画公開中!

前処理フロー

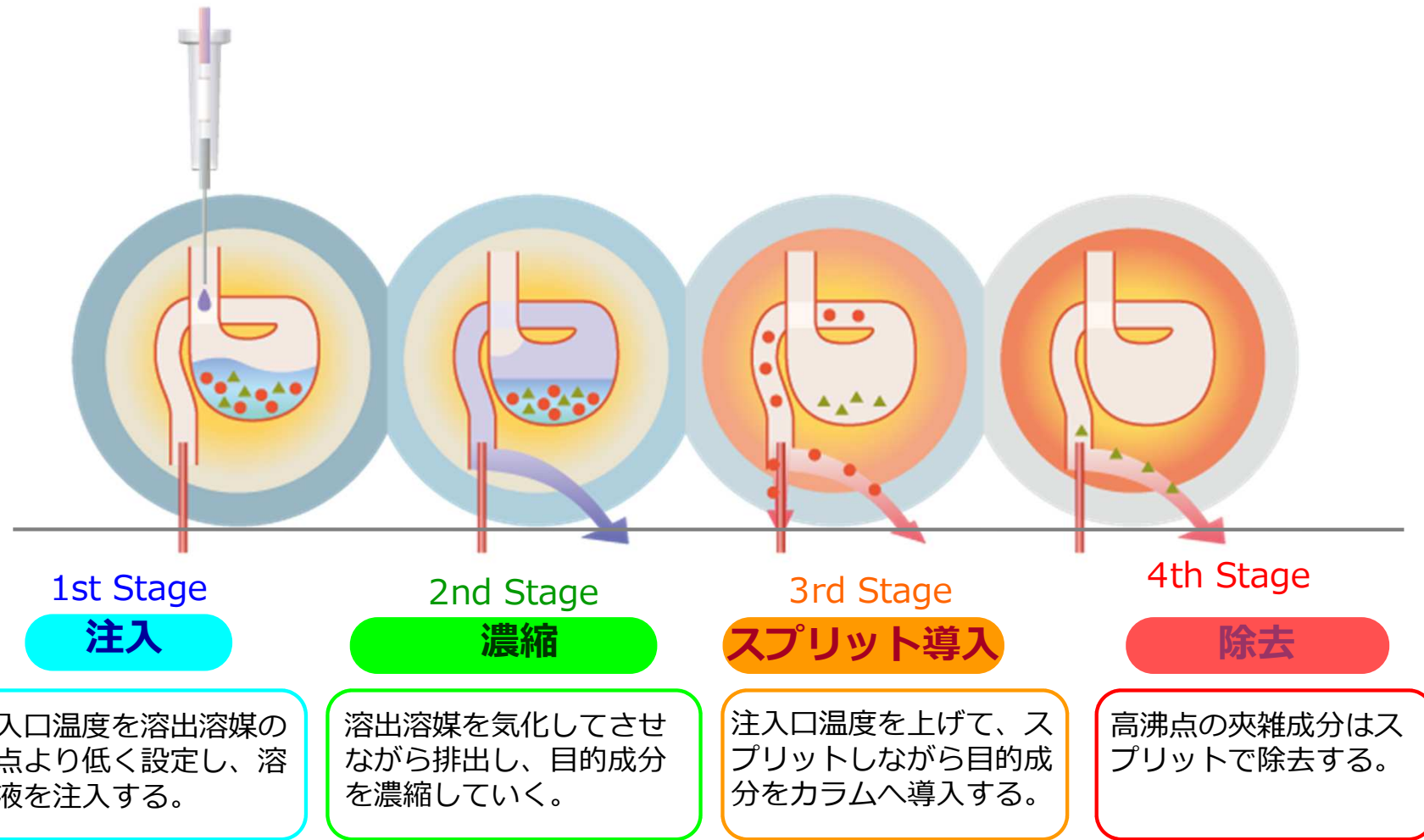
Automation



SPE-GC-MS条件

SPE-GC Interface	SGI-M100 ;AiSTI Science
SPE Cartridge	Flash-SPE AOS ;AiSTI Science
Sample Volume	40 μ L
PTV Injector	LVI-S250 ;AiSTI Science
Insert	Spiral Insert ;AiSTI Science
Injector Temp.	80 $^{\circ}$ C(0.2min)-50 $^{\circ}$ C/min-290 $^{\circ}$ C(38min)
GC	Agilent 7890B
Pre-column	Deactivated silica capillary tube, 0.25mm \times 0.3m
Column	DB-5MS, 0.25mm i.d. \times 30m, df; 0.25 μ m
Column Oven Temp.	60 $^{\circ}$ C(2min)-15 $^{\circ}$ C/min-240 $^{\circ}$ C-20 $^{\circ}$ C/min-310 $^{\circ}$ C(1min)
Inlet Mode	Split
Split ratio	50
Gas Saver Flow	15 mL/min
Gas Saver Time	6 min
MS	Agilent 5977B
Detector Temp.	290 $^{\circ}$ C
MS Method	SCAN; 70 - 500 m/z

大量注入-スプリットモード



スパイラルインサートの形状は固相カートリッジからの溶出液全量を一時的に受け止めることができる。

固相誘導體化時間

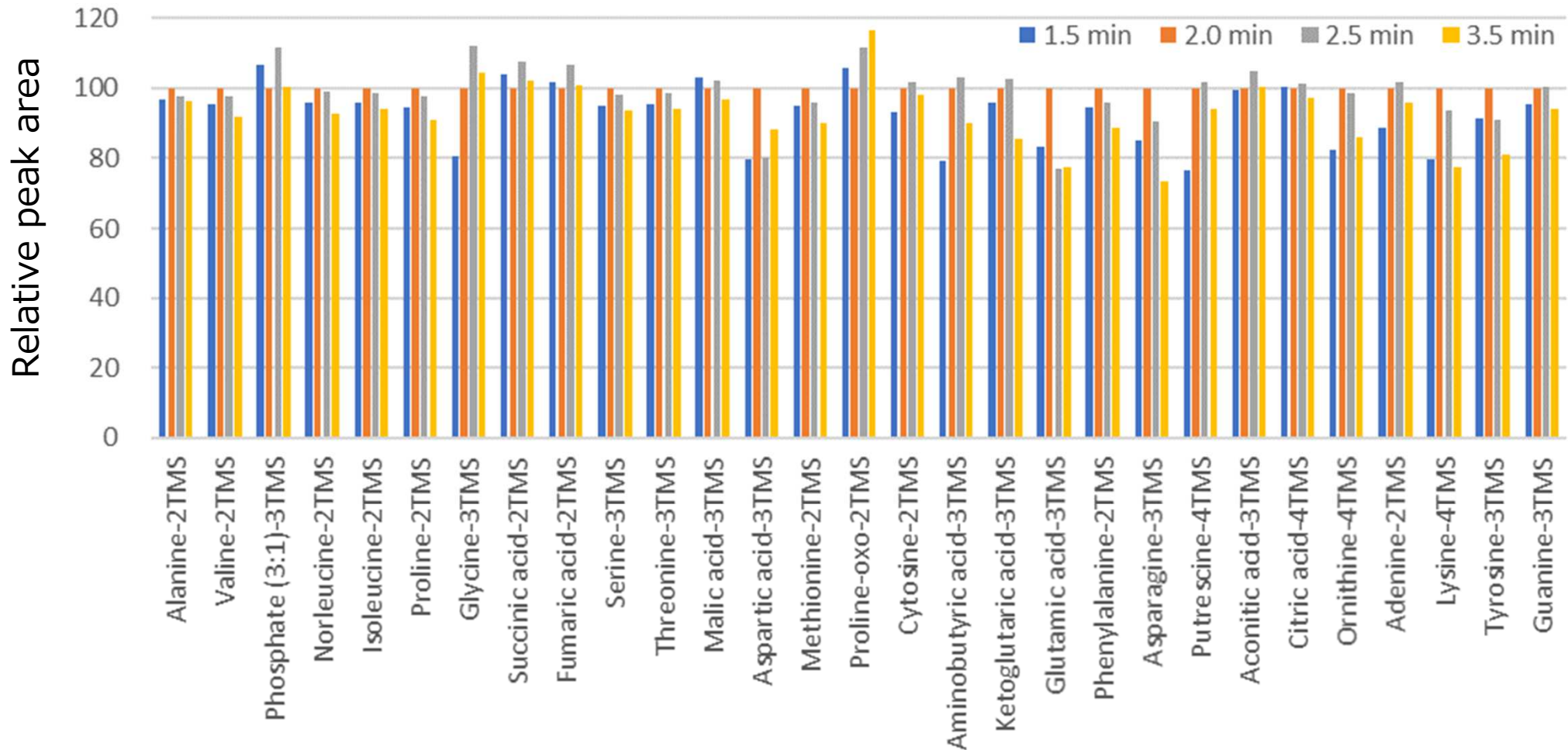


Fig. 1. Relations of derivatization time in sorbent and the relative peak area.

誘導体化試薬について

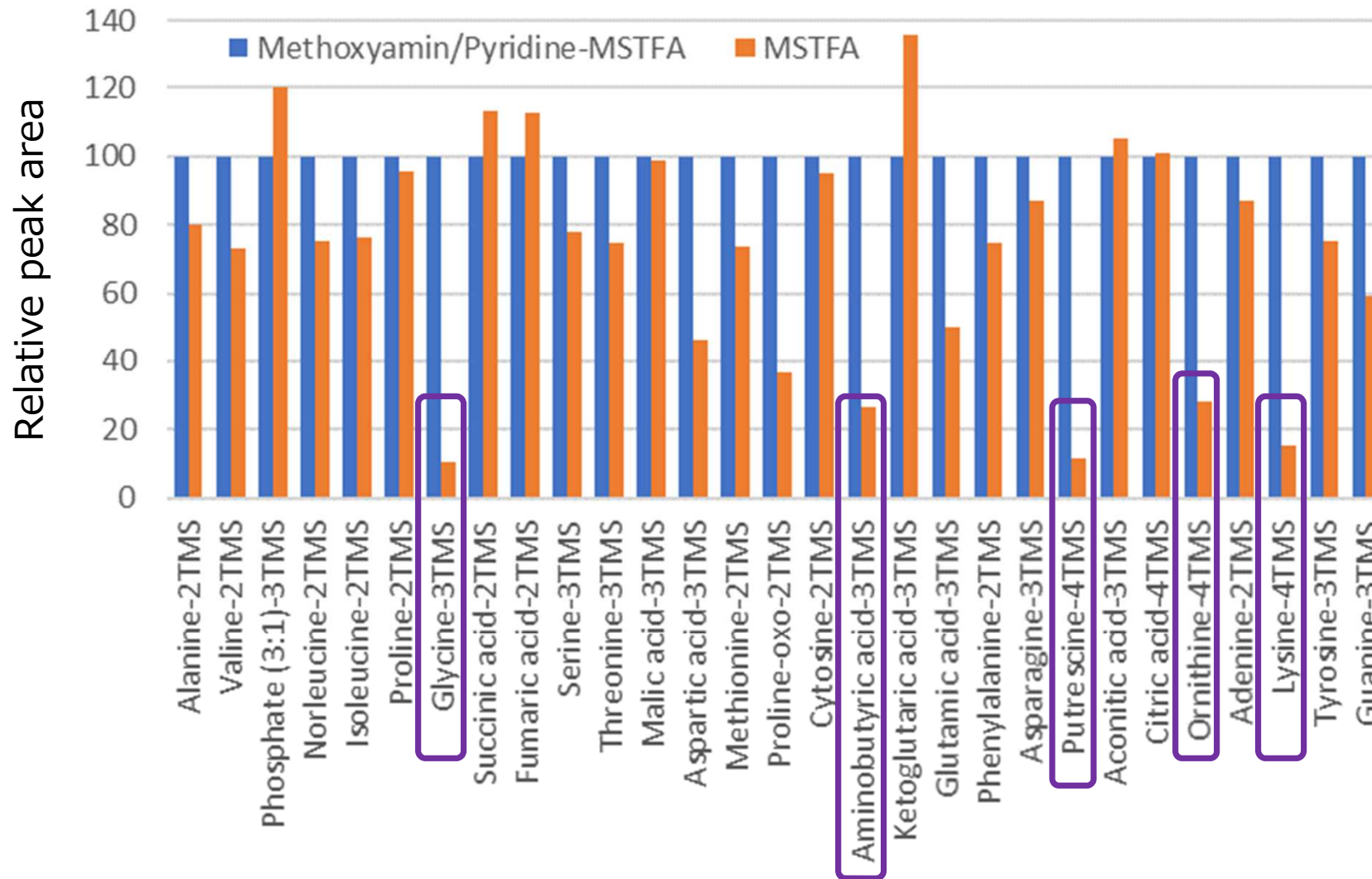
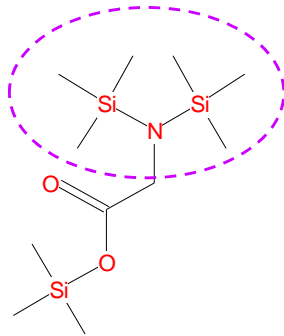
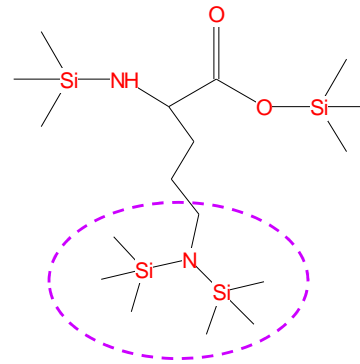


Fig. 2. Relations of the derivatization reagent and the relative peak area.

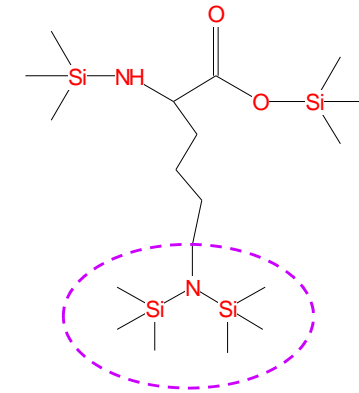
Methoxyamin / Pyridine-MSTFAの効果



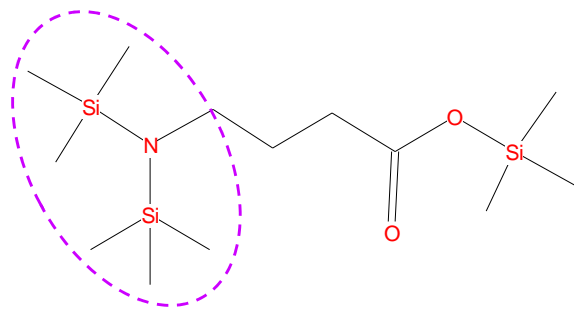
Glycine-3TMS



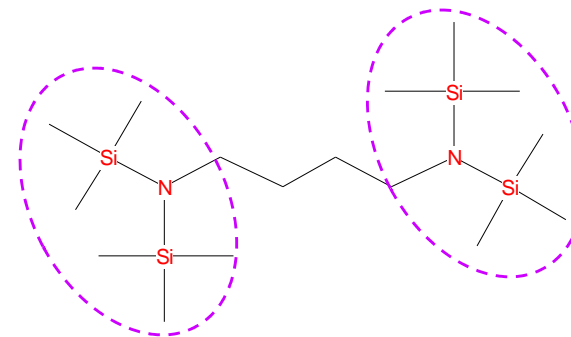
Ornithine-4TMS



Lysine-4TMS



Aminobutyric acid-3TMS

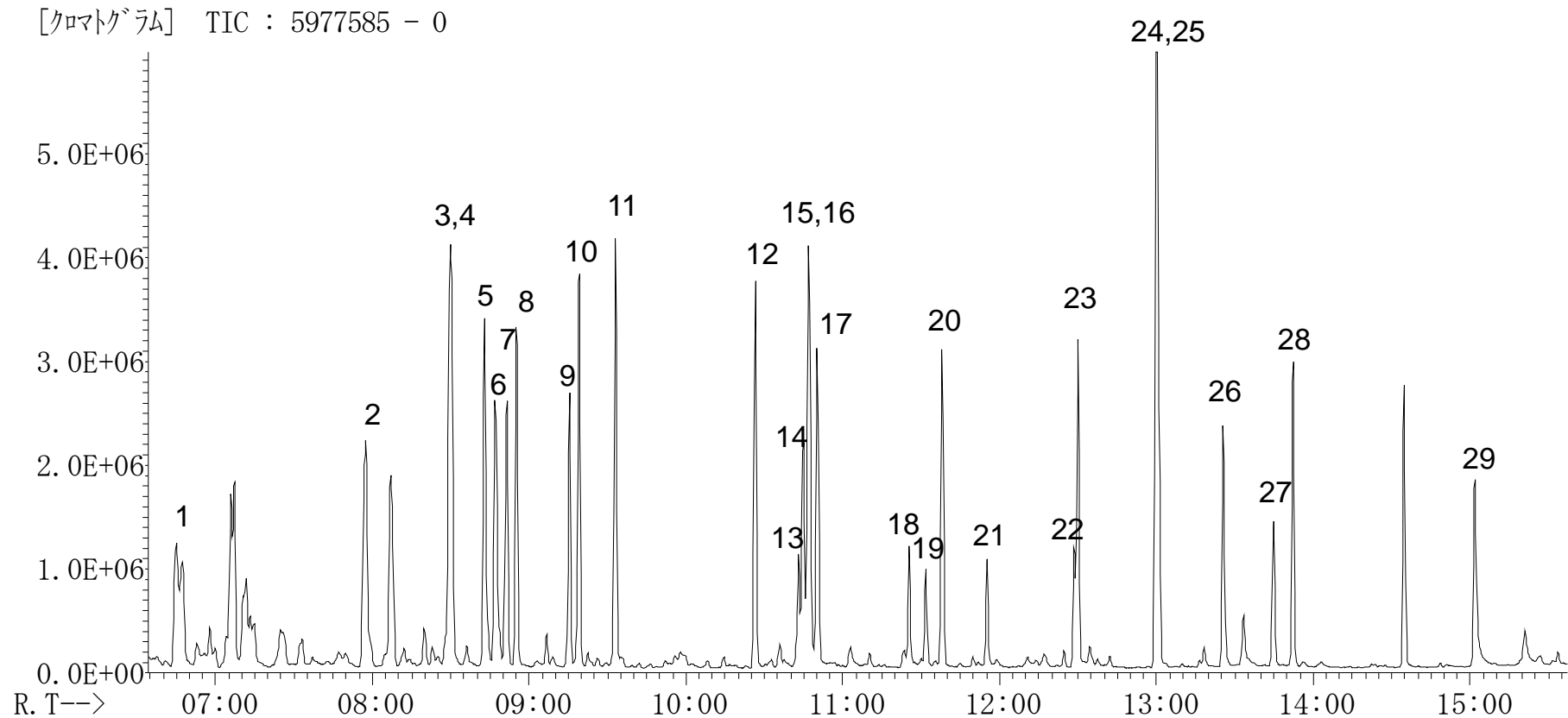


Putrescine-4TMS

Methoxyamin/pyridineをMSTFAに混合することで誘導体化が促進された物質

-CH₂-NH₂の基に対してしっかりと-CH₂-N-2TMSに、グリシンの立体障害を受けないC(-NH₂)-についてもC(-N-2TMS)-になりました。

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 1. 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)

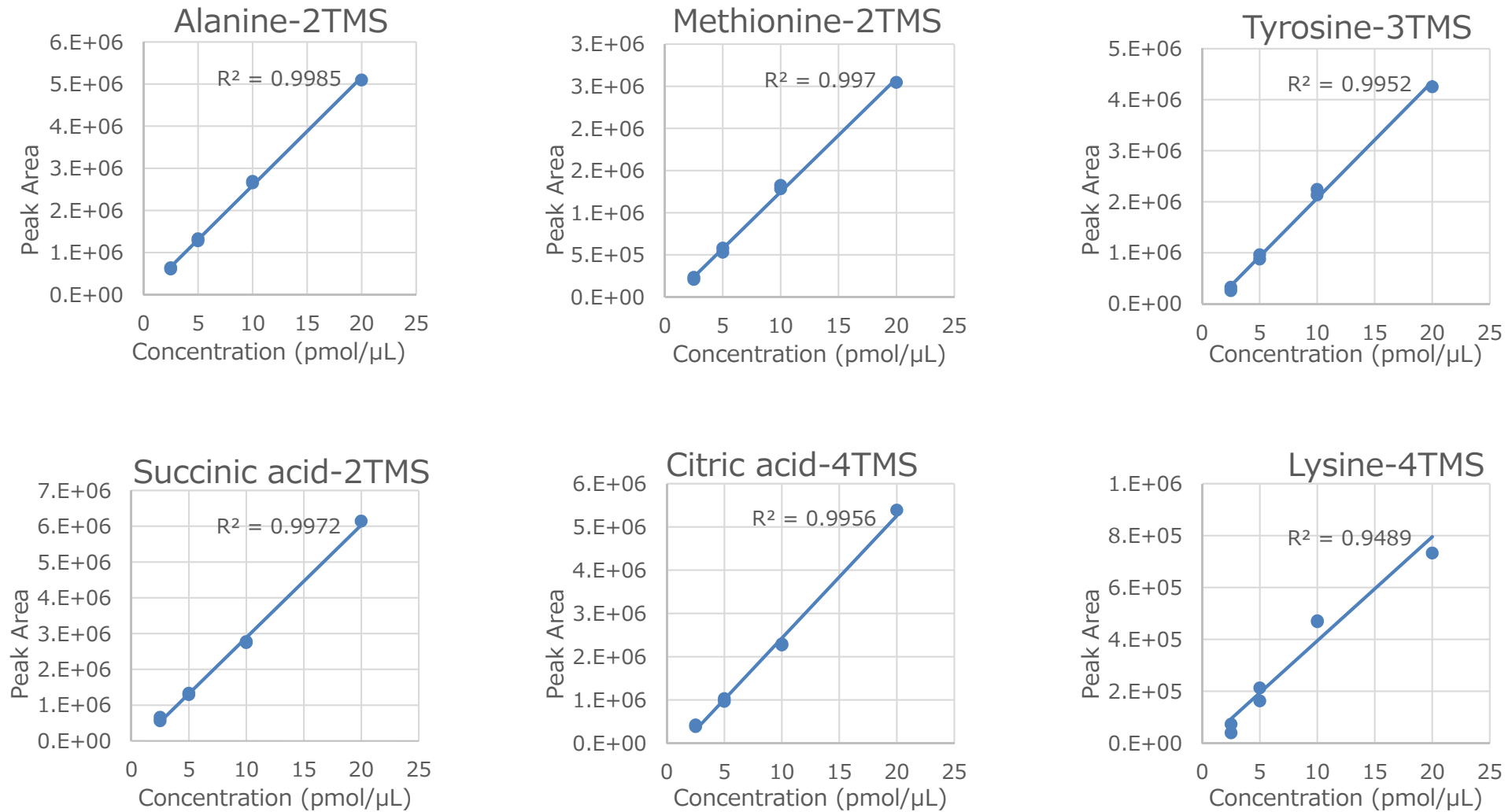


Fig. 4. Relations of concentration in vial and the peak area.

本法によるマウス血清のトータルイオンクロマトグラム

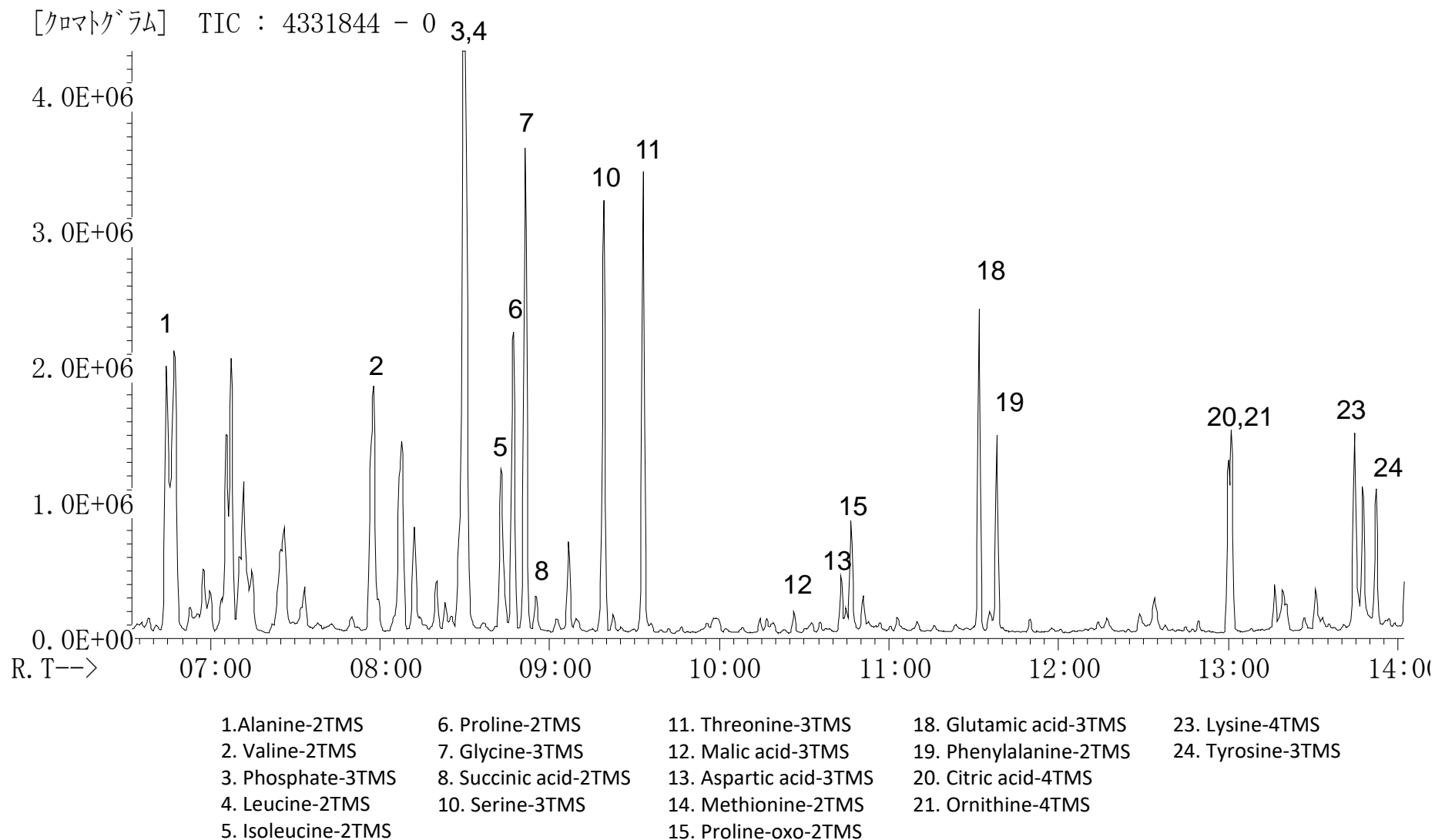


Fig. 5. The SCAN total ion chromatogram of the mouse serum using SPE-GC-MS system with automated SPE-based derivatization method.

本法によるマウス血清のピーク面積値の再現性



Table 2. Reproducibility of peak area with the mouse serum using SPE-GC-MS system.

No.	Compound	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Ave.	RSD, %
1	Alanine-2TMS	5,541,262	5,554,574	5,750,943	5,697,229	5,588,344	5,721,789	5,850,742	5,681,853	5,706,369	5,677,012	1.8
2	Valine-2TMS	2,755,712	2,771,037	2,893,545	2,911,101	2,803,596	2,871,371	2,926,797	2,853,359	2,867,084	2,850,400	2.1
3	Phosphate (3:1)-3TMS	4,201,912	4,356,822	4,434,444	4,412,647	4,201,988	4,259,611	4,389,792	4,266,977	4,210,194	4,303,821	2.2
4	Norleucine-2TMS	4,056,211	4,080,919	4,276,463	4,306,038	4,157,663	4,270,224	4,312,737	4,223,433	4,227,870	4,212,395	2.2
5	Isoleucine-2TMS	1,078,007	1,080,660	1,131,523	1,141,625	1,094,518	1,124,087	1,139,671	1,121,838	1,118,968	1,114,544	2.2
6	Proline-2TMS	2,990,521	3,000,081	3,191,334	3,154,192	3,053,991	3,162,046	3,244,535	3,101,102	3,103,402	3,111,245	2.8
7	Glycine-3TMS	3,037,839	2,895,879	3,107,951	3,217,887	3,354,424	3,293,368	3,059,023	3,070,554	3,113,071	3,127,777	4.5
8	Succinic acid-2TMS	29,040	29,234	29,610	29,118	26,403	27,322	28,530	28,003	27,169	28,270	3.9
9	Fumaric acid-2TMS	14,400	13,605	14,528	13,757	13,469	13,211	12,847	12,142	11,996	13,328	6.7
10	Serine-3TMS	1,617,736	1,601,793	1,691,622	1,701,792	1,664,881	1,718,251	1,759,025	1,685,417	1,696,241	1,681,862	2.9
11	Threonine-3TMS	854,196	855,270	914,762	923,062	882,377	911,832	928,177	920,805	914,839	900,591	3.2
12	Malic acid-3TMS	20,457	20,641	21,151	21,808	19,071	20,283	20,751	19,941	19,094	20,355	4.4
13	Aspartic acid-3TMS	195,512	183,707	208,840	210,072	204,684	225,449	240,856	233,191	238,539	215,650	9.3
14	Methionine-2TMS	93,568	94,791	100,427	104,122	101,698	103,386	105,816	97,718	99,320	100,094	4.2
15	Proline-oxo-2TMS	719,078	784,164	740,721	869,323	610,496	641,127	674,841	868,861	839,473	749,787	13.0
16	Cytosine-2TMS	5,878	5,728	5,647	5,592	5,629	5,516	4,974	5,028	5,413	5,489	5.6
17	Aminobutyric acid-3TMS	87,027	83,832	70,197	83,924	75,857	76,002	85,355	82,175	87,546	81,324	7.3
18	Glutamic acid-3TMS	1,268,042	1,206,401	1,296,449	1,342,892	1,281,052	1,393,273	1,513,486	1,405,403	1,516,263	1,358,140	8.0
19	Phenylalanine-2TMS	699,562	714,084	762,498	773,628	724,391	758,118	786,916	753,925	773,827	749,661	4.0
20	Citric acid-4TMS	335,441	333,534	337,541	334,091	312,166	321,946	322,681	314,421	317,960	325,531	3.0
21	Ornithine-4TMS	663,367	673,444	787,729	789,718	771,470	808,655	771,975	652,659	737,745	739,640	8.2
22	Adenine-2TMS	4,077	3,243	3,358	3,410	3,217	2,885	3,216	2,978	3,005	3,265	10.8
23	Lysine-4TMS	384,118	400,505	466,485	466,911	449,562	483,398	450,203	364,748	433,653	433,287	9.5
24	Tyrosine-3TMS	739,551	763,670	838,110	848,309	773,737	850,307	875,807	790,095	852,336	814,658	5.9
25	Guanine-3TMS	3,773	3,789	3,207	3,438	2,485	2,720	2,968	3,136	2,457	3,108	16.1

本法によるマウス血清の添加回収試験

No.	Compound	Standard	Mause	Mause +ST	REC, % (A-M)/ST
		ST	M	A	
1	Alanine-2TMS	2,395,769	5,539,074	7,703,074	90
2	Valine-2TMS	2,857,898	2,759,114	5,744,538	104
3	Phosphate (3:1)-3TMS	1,691,961	4,279,367	6,787,045	148
4	Norleucine-2TMS	3,402,608	4,067,823	7,424,476	99
5	Isoleucine-2TMS	2,801,029	1,086,415	4,096,438	107
6	Proline-2TMS	3,037,141	2,998,133	6,301,408	109
7	Glycine-3TMS	1,800,878	2,966,859	4,603,320	91
8	Succinic acid-2TMS	2,958,640	224,256	3,375,441	107
9	Fumaric acid-2TMS	1,676,379	13,946	1,869,217	111
10	Serine-3TMS	1,769,642	1,608,041	3,632,037	114
11	Threonine-3TMS	900,834	852,911	1,865,424	112
12	Malic acid-3TMS	475,088	20,319	551,360	112
13	Aspartic acid-3TMS	440,006	190,845	795,480	137
14	Methionine-2TMS	1,186,002	93,758	1,417,378	112
15	Proline-oxo-2TMS	1,684,508	740,135	3,085,018	139
16	Cytosine-2TMS	1,069,383	5,948	1,182,673	110
17	Aminobutyric acid-3TMS	1,425,778	82,936	1,774,441	119
18	Ketoglutaric acid-3TMS	162,941		163,614	100
19	Glutamic acid-3TMS	381,767	1,237,713	1,524,345	75
20	Phenylalanine-2TMS	1,361,973	705,325	2,285,882	116
21	Asparagine-3TMS	212,637		291,982	137
22	Putrescine-4TMS	928,721	35,714	1,124,501	117
23	Aconitic acid-3TMS	482,874	3,083	544,525	112
24	Citric acid-4TMS	2,365,829	334,488	3,143,411	119
25	Ornithine-4TMS	741,337	668,406	1,295,449	85
26	Adenine-2TMS	1,710,221	3,660	1,966,746	115
27	Lysine-4TMS	344,472	389,645	680,111	84
28	Tyrosine-3TMS	2,171,566	748,544	3,535,152	128
29	Guanine-3TMS	1,112,060	3,595	1,479,513	133

Table 3. Recoveries of metabolites added to mouse serum

* 添加濃度 : 0.01nmol/ μ L (バイアル中換算)

サンプル抽出液の負荷量とピーク面積値

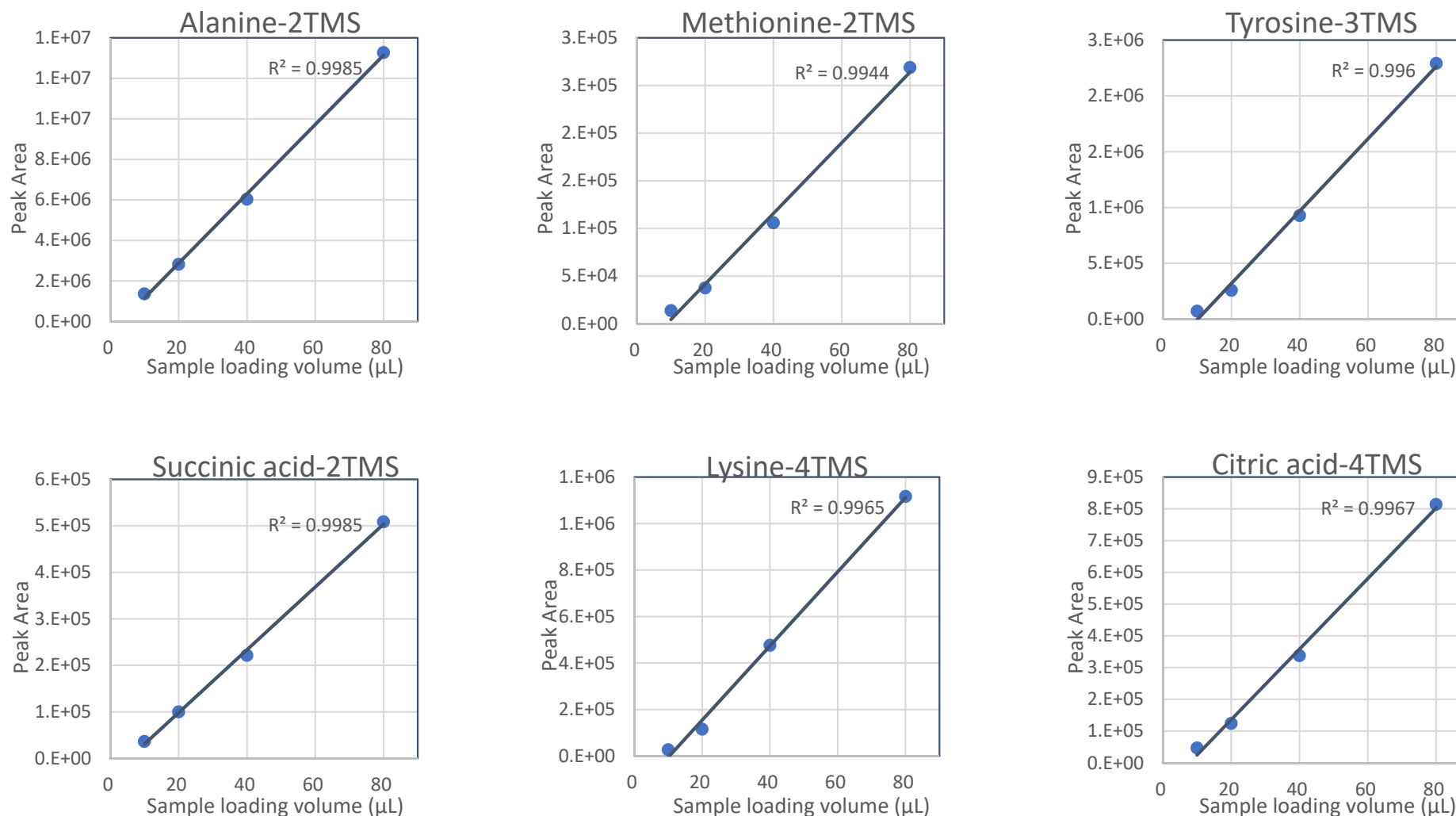


Fig. 7. Relations of sample loading volume and the peak area.

本法によるマウス血清の定量イオンクロマトグラム の再現性 (重ね描き, n=9)

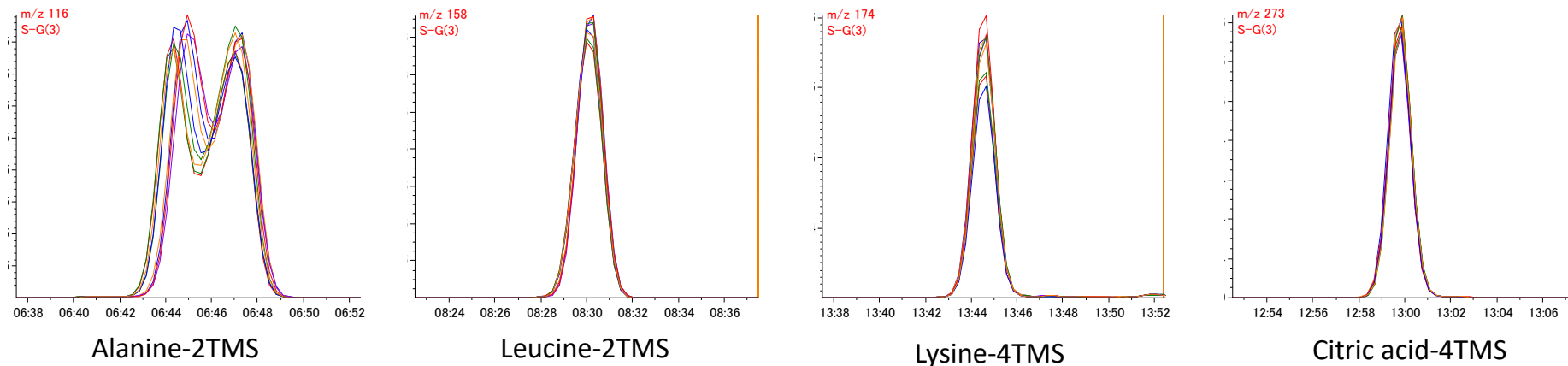


Fig. 6. Reproducibility of ion chromatogram of the mouse serum using SPE-GC-MS system (n = 9).

分析システムパッケージ

AiSTI 製品ラインナップ

装置

No.	製品名 / 機種	型番
1	メタボローム分析用 SPE-GC インターフェース / SGI-M100	PA-6230-000
2	GC 大量注入口装置 / LVI-S250	LA-6011-250

消耗品

No.	製品名	型番
3	固相カートリッジ Flash-SPE AOS 100 個入 ※アミノ酸・有機酸・糖類	SA-4579-003
4	固相カートリッジ Flash-SPE AMI 100 個入 ※アミノ酸	SA-4575-003
5	固相カートリッジ Flash-SPE SOR 100 個入 ※有機酸・糖類	SA-4571-003
6	スパイラルインサート 中 100 µL 10 本入	LA-5010-124

付属品

No.	製品名	型番
7	メタボローム分析用 SGI-M100 メソッド	—
8	メタボローム分析用 前処理および SGI-M100 操作マニュアル	—



SGI-M100



LVI-S250



Flash-SPE

スパイラル
インサート

Agilent 製品ラインナップ

装置

No.	製品名 / 機種	型番
1	ガスクロマトグラフ / Agilent 7890B	—
2	シングル四重線型質量分析装置 / Agilent 5977B	—
3	トリプル四重線型質量分析装置 / Agilent 7000D	—

消耗品

No.	製品名	型番
4	キャピラリーカラム DB-5ms 30m x 0.25mm, d.f.0.25 µm	122-5532
	キャピラリーカラム DB-5ms DG 30m x 0.25mm, d.f.0.25 µm	122-5532G
5	Agilent Fiehn GC/MS Metabolomics Standards Kit	400505
6	アミノ酸標準試料 1nmol/µL 1mL 10 本入り	5061-3330
7	アミノ酸補助キット	5062-2478

付属品

No.	製品名	型番
8	Fiehn メタボロミクス用簡易マニュアル	—
9	AiSTI メタボローム分析用解析マニュアル	—
10	Fiehn 2013 メタボロミクスライブラリ	G1676AA
11	AiSTI メタボローム分析用ライブラリ	—



Agilent 7890B/5977B



DB-5ms



Metabolomics Standards Kit

製品に対するお問い合わせは各メーカーまでご連絡ください。

株式会社アイスティサイエンス
TEL 073-475-0033 FAX 073-497-5011
www.aisti.co.jp

アジレント・テクノロジー株式会社
フリーダイヤル 0120-477-1111
www.agilent.com/chem/jp

本製品は一律的な実験用途での使用を想定して
おり、既製品検査用途等に適用する管理は行って
いただきません。本文書に記載の検査、診断、製薬
仕様等は予告なく変更される可能性があります。

Printed in Japan, November 1, 2017

AiSTI SCIENCE - Agilent Technologies

メタボロミクスソリューションパッケージ

オンライン固相吸着法によるメタボローム分析用 SPE-GC/MS システム

分析システムパッケージ

メタボロミクスを簡単にするアイスティサイエンスとアジレント・テクノロジーの「オンライン固相誘導体化法」ソリューションパッケージ

誘導体化作業が煩雑、凍結乾燥が長時間、脱水が不安、再現性が悪い、サンプルが少量のため再分析ができない、装置が汚れやすい…
解析条件の作成が面倒、定性の信頼性が不安、解析に時間がかかる、解析結果がわかりにくい…
アイスティサイエンスとアジレント・テクノロジーのソリューションパッケージが、従来の問題や悩みを解決します。

- オンライン固相誘導体化法
- 迅速化：10分!
 - 自動化：再現性の向上
 - 精製効果：精度向上
 - 簡易化：生産性向上

1. 抽出

- 試料：50 μ L (50 mg)
- 添加水 150 μ L
 - 添加 ACN 800 μ L
- 振とう (37°C, 30 min)
- 遠心分離 (14000 rpm, 5 min)
- 分取：上澄み液：250 μ L
- 添加水 250 μ L
- バイアル サンプルトレイにセットするだけ

▶ 試薬

Fiehn GC/MS Metabolomics Standards Kit

Fiehn ライブラリを使用するための、リナクションインテックス用試薬や誘導体化試薬が入っているスターターキットです。

※メトキシアミン塩酸塩は含まれません。

FAME 混合溶液、Myristic acid- d_{18} 、ピリジン、MSTFA+TMCS

アミノ酸標準試料

- 1 nmol/ μ L 混合溶液 1 mL \times 10 本

グリシン	L-セリン	L-アルギニン
L-シスチン	L-アラニン	L-トレオニン
L-ヒスチジン	L-フェニルアラニン	L-バリン
L-チロシン	L-グルタミン酸	L-リジン
L-ロイシン	L-プロリン	L-アスパラギン酸
L-メチオニン	L-イソロイシン	

- アミノ酸補助キット (参考)

ノルバリン、サルコシン、アスパラギン、グルタミン、トリプトファン、 α -ヒドロキシプロリン 各 1 g

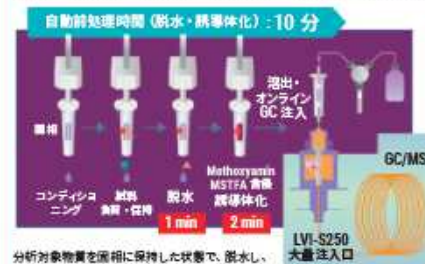
2. 自動誘導体化・測定



メタボローム分析用 SPE-GC/MS システム

- SPE-GC システム：SGI-M100 (アイスティサイエンス)
- シングル or トリプル四重極 GC/MS (アジレント・テクノロジー)

▶ オンライン固相誘導体化 (SGI-M100)



WEB サイトにて「オンライン固相誘導体化法」を公開中!
<http://www.alsti.co.jp/product/spe-gc/> [URL 内の「動画」をクリック]

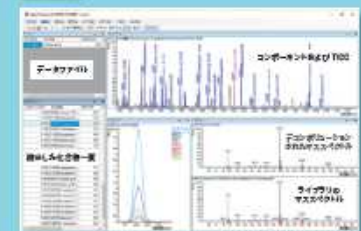
3. 解析：MassHunter ソフトウェアによる解析

分析対象物質が決まっている場合は定量重視の Quant による解析



分析対象物質の定量精度の他に、再現性でライブラリ内のマススペクトルとの比較が可能で、一致率を確認することができます。定量メソッドはパッケージに含まれていますが、ライブラリや「未知サンプルの解析」結果からも作成することができます。

分析対象物質が決まっていない場合は定性重視の未知サンプルの解析



デコンボリューションによるピーク抽出とライブラリサーチを同時に行えるツールで、複数データファイルを一括して処理することが可能です。ライブラリは複数選択することが可能です。さらに RT、RI による絞り込みも可能です。

▶ 解析メソッド / ライブラリ

① 定量メソッドファイルを使用した解析

- あらかじめ化合物名、RT、定量イオンなど必要な情報が登録された定量用ファイルをご提供します。
- 測定後すぐに解析を始めることができます。

② ライブラリから作成

- あらかじめ化合物名、RT、マススペクトルなど必要な情報が登録された AlSTI メタボロミクスライブラリをご提供します。
- 化合物の追加が簡単にできます。
- ライブラリから定量メソッドの作成が可能です。

③ Intelligent ツールから作成

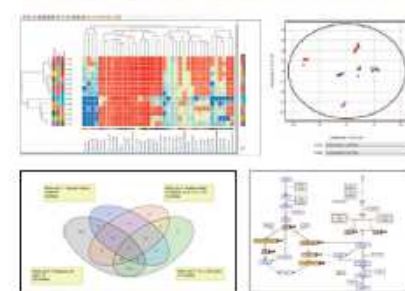
- 複数の測定条件、化合物グループを登録することができ、SIM や MRM などの測定メソッド作成から定量メソッド作成までをウィザードに促して作成することができます。

Fiehn メタボロミクスライブラリ

Oliver Fiehn 博士 (UC Davis) により開発
アミノ酸、有機酸、糖、脂肪酸を中心に
約 1,400 化合物のエントリー
RT, RI 情報付き



▶ 多変量解析



多変量解析ソフト MPP (オプション)

質量分析計から得られたデータを多変量解析するためのソフトウェアです。差のある代謝物を統計的に処理したり、視覚的に判断することが可能です。

まとめ

- 抽出後の本システムによる誘導体化を含めた前処理時間は10分で、かつ、その前処理からGC-MSによる測定まで完全に自動で行うことができた。
- 誘導体化してから注入するまでの時間が常に一定であるため、多検体においても安定した結果を得られると考えられる。
- 本システムを用いて、スタンダードおよびマウス血清による再現性、直線性を評価したところ、共に良好な結果を得た。
- 開発したオンライン自動固相誘導体化SPE-GC/MSシステムはメタボローム分析に有効であることがわかった。

- ・ Metabolomics Conference 2017 2017.06.25-29 in Brisbane

Development of online SPE-GC-MS system with automated SPE-based derivatization method for metabolome analysis.

Ryoichi SASANO¹, Koji MACHITANI², Shusuke OSAKI², Masahiro FURUNO³, Eiichiro FUKUSAKI³
1; Aisti Science co., Ltd., 2; Industrial Technology Center of Wakayama prefecture,3; Osaka University

- ・ 第65回質量分析総合討論会, ポスター発表

固相誘導体化を用いた低濃度のアミノ酸および有機酸と高濃度の糖類を含む試料の一斉分析法の開発

○佐々野僚一¹・大崎秀介²・古野正浩³・福崎英一郎³

アイスティサイエンス¹・和歌山県工業技術センター²・阪大院工³