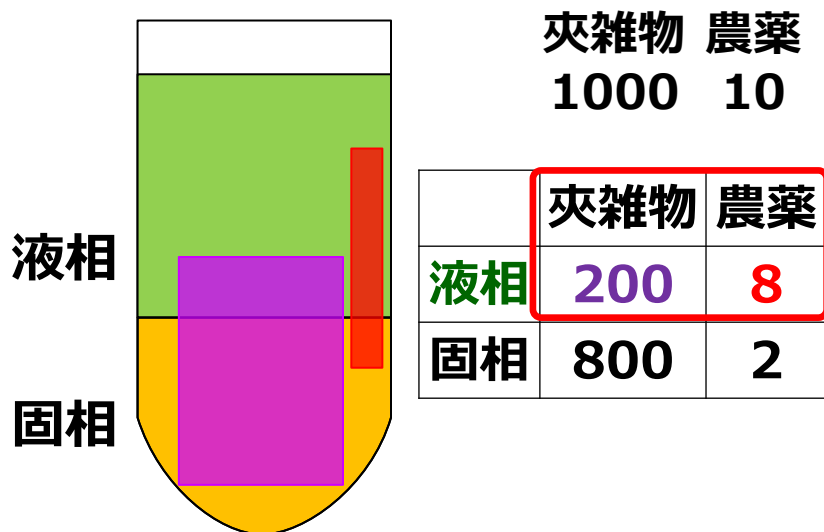


# STQ法の固相カートリッジによる精製効果について

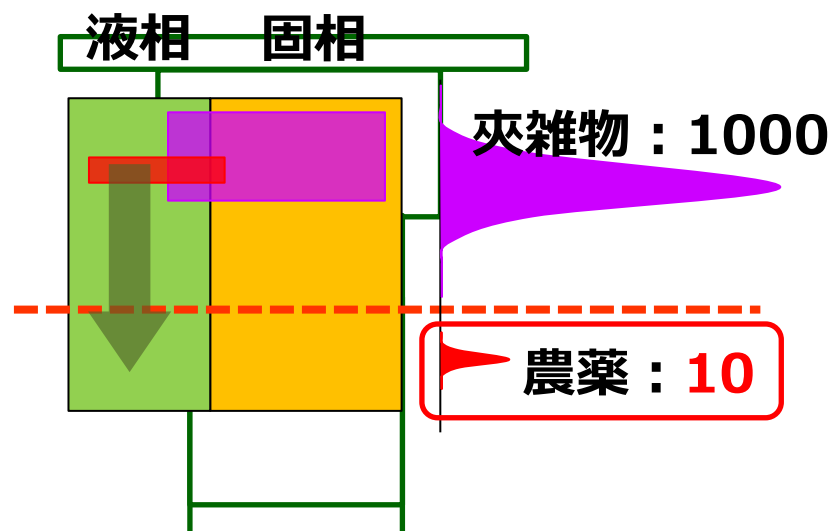
# QuEChERS法とSTQ法の違い

(分配型と分配分離型。それぞれの固相抽出法)

## 分配型-固相抽出法 (QuEChERS法)



## 分配分離型-固相抽出法 (STQ法)

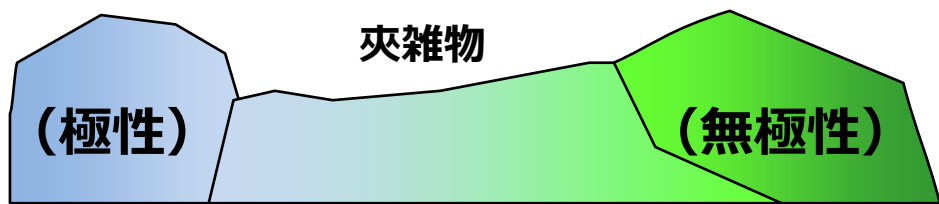


分散SPEは分配のみによる精製だが、固相カートリッジは分配に**分離機能**が加わるため夾雑物から農薬を効率よく精製することができる。

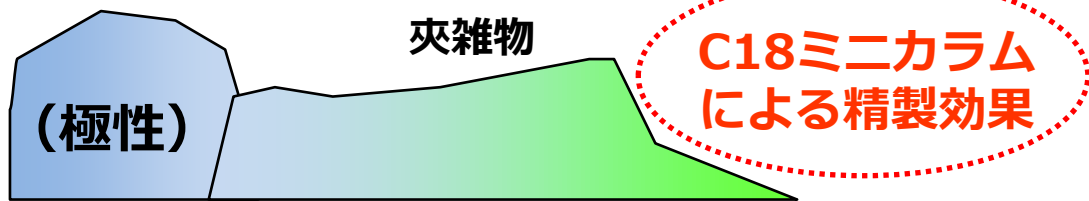
# C18精製によるLC分析カラムの負担軽減

## □ 固相C18を用いない場合

ACN : 水 (5:95)  $\xrightarrow{\text{グラジエント分析}}$  ACN : 水 (95:5)



## □ 固相C18による精製の場合



★アセトニトリル濃度による精製効果の違い



100%ACN



80%ACN/水



C18による除去成分

- 低極性の夾雑物
- 高級脂肪酸エステル
- 緑色素を除去。

メリット

- HPLCカラムの劣化を防ぐ
- ピーク形状の維持
- 分析時間の短縮

# グリホサート・グリホシネートの分析法の検討

# 構造と物性

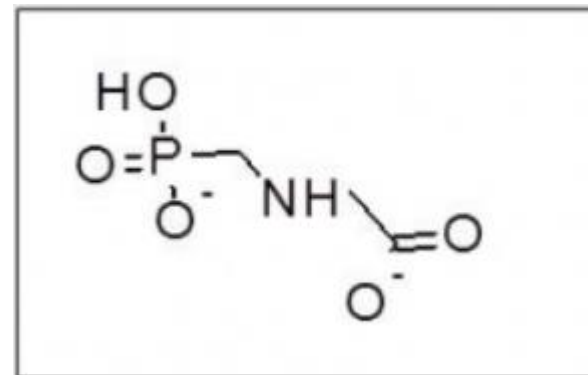
## グリホサート : Glyphosate

化学式 : C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>5</sub>P

分子量 : 169.1

LogPow = <-3.2 (pH 2-5, 20°C)

pKa = 5.77 ± 0.03, 2.18 ± 0.02 (20 ± 0.2°C)



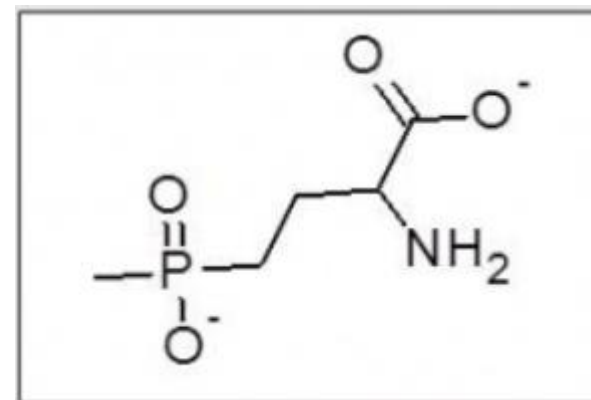
## グルホシネート : Glufosinate

化学式 : C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>4</sub>P

分子量 : 181.1

LogPow : アンモニウム塩のLogPow : <0.1 (pH 7, 22°C)

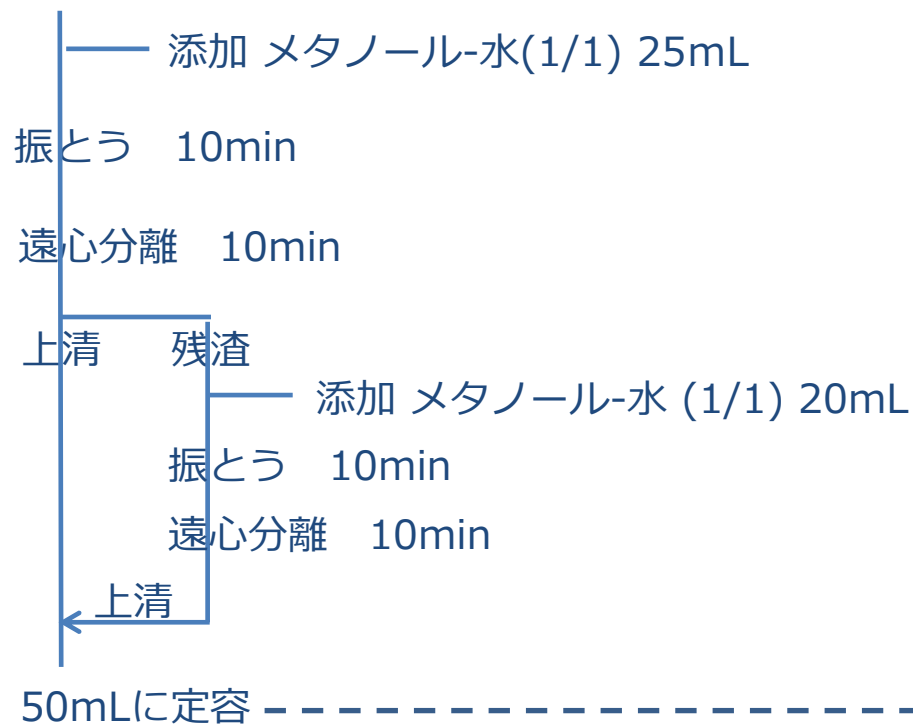
pKa<sub>1</sub> < 2, pKa<sub>2</sub> < 2.9, pKa<sub>3</sub> < 9.8



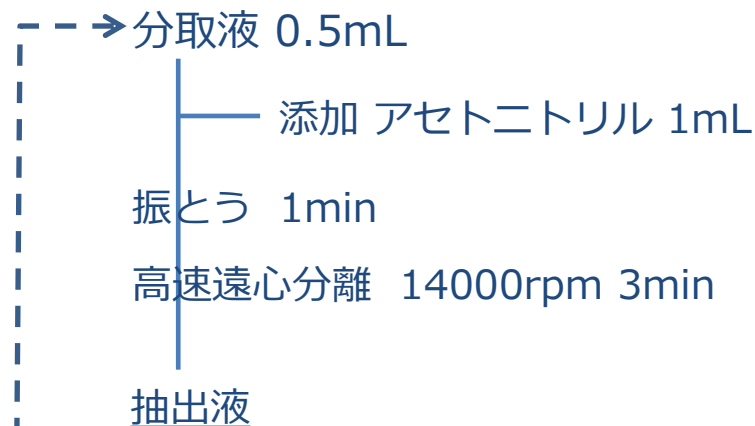
# 前処理のフロー

## 抽出

試料10g ( 穀類 5g + 水10mL)



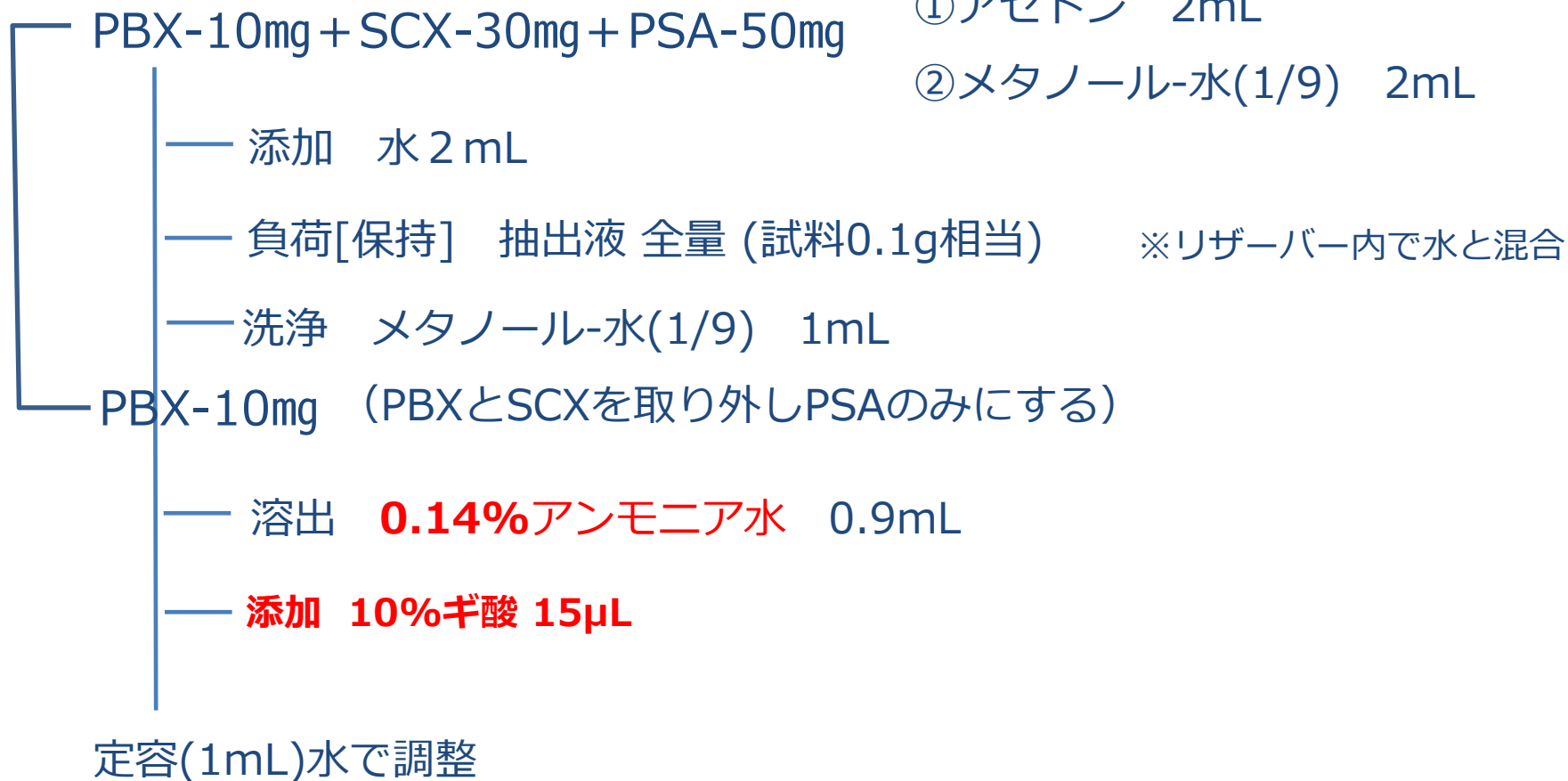
## 除たんぱく (検討中)



# 前処理フロー

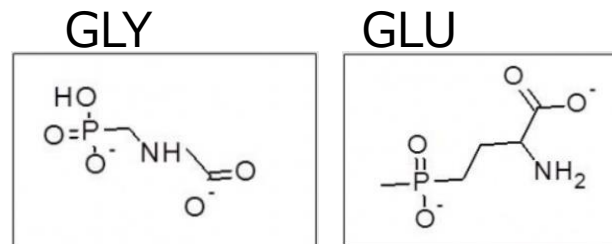
## 【コンディショニング】

- ①アセトン 2mL
- ②メタノール-水(1/9) 2mL



# 精製工程

それぞれの固相の機能と役割



GLY・GLU

①PBX-10mg

脂質など低極性夾雑物を吸着して 除去

②SCX-30mg  
(陽イオン交換)

陽イオン夾雑物を吸着して 除去

③PSA-50mg  
(陰イオン交換)

グリホサート・グリホシネート（リン酸,カルボニル基： $\ominus$ ）をPSA（アミノ基： $\oplus$ ）で保持

溶出

③PSA-50mg  
(陰イオン交換)

0.14%アンモニア水

GLY・GLU

塩基性水溶液を通液することで、PSAの官能基（アミノ基）を非解離とし、グリホサートのイオン結合を切り離す



# 測定条件

装置：UHPLC(Nexera X2)及びLCMS-8045 (島津製作所)

分析カラム：TSKgel Super**IC-AP** (4.6mmID×75mm) (4級アミン基)

移動相：(A) 2mMギ酸アンモニウム-水

(B) 0.2%ギ酸-水(pH2-3)

流速：0.8mL/min.

注入量：2μL

カラム温度：40℃

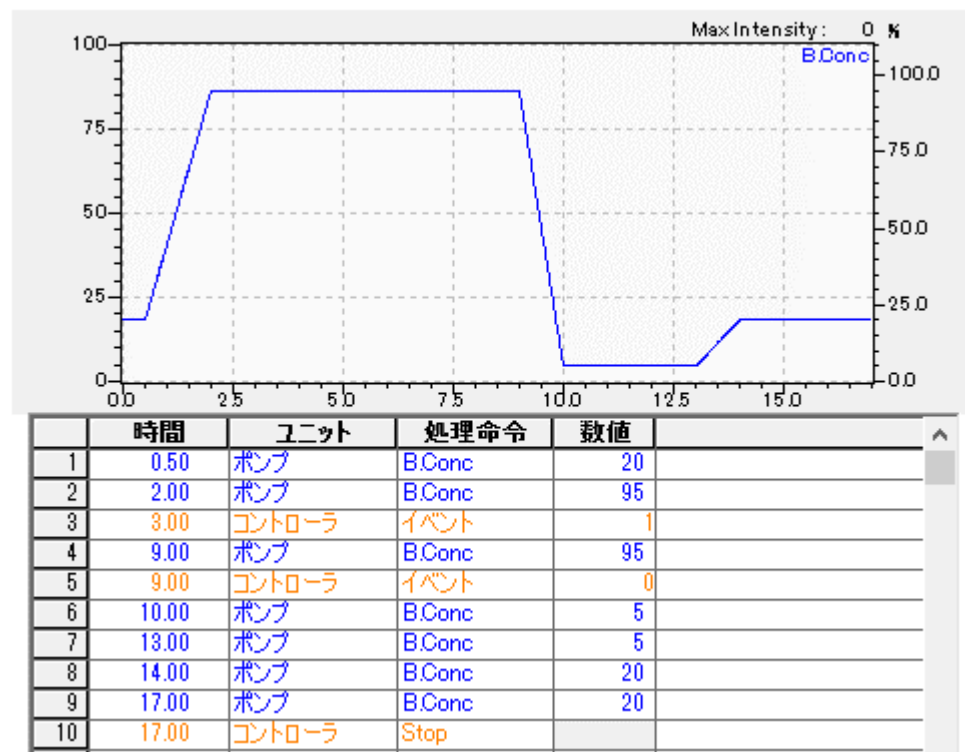
分析時間：17分

グラジエントプログラム：

B.Conc 20%(0.5min)→95%(2-9min)

→5%(10-13min)→20%(14-17min)

MRM:pos



# LC配管のリン酸コーティング方法と注意点

## リン酸コーティング

プローブとエレクトロードを引き抜いた状態で、  
2%のリン酸を0.05mL/minで12時間通液する。

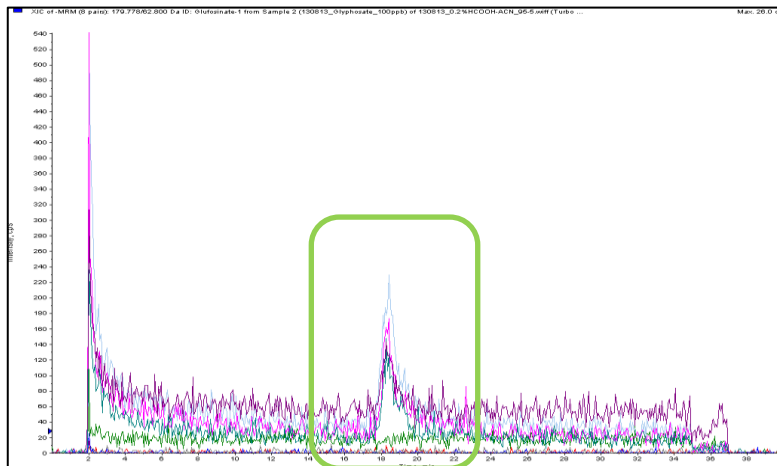
**(絶対にリン酸をMS部に導入しないでください)**

※石渡氏（ホクレン農業協同組合）の資料より。

当該方法をお試しの前に、まずは、ご使用のLC-MS/MSメーカーにグリホサート測定条件のご確認をお勧めいたします。メタルフリーの配管等が販売されている可能性があります。リン酸コーティングをお試しの際は、分析カラムを外してください。コーティング後は、水および測定移動相を2時間程度送液し、流路系からリン酸を除いてください。コーティングの効果は数カ月以上維持を確認しております。（当社使用装置の場合）

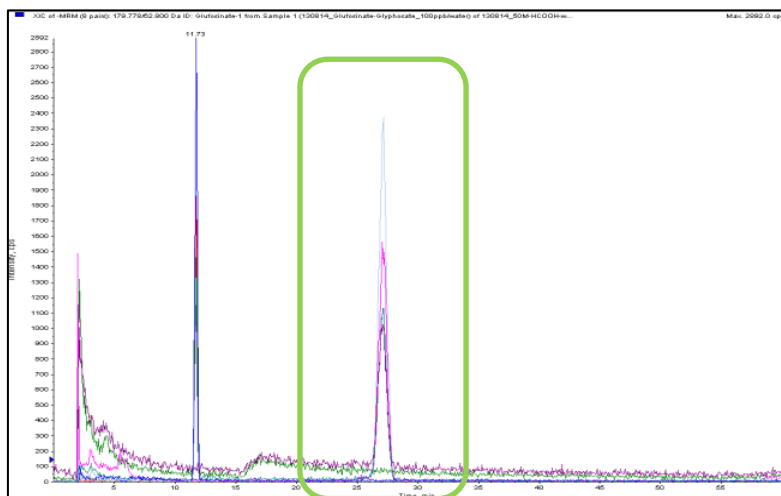
# LC-MS/MS測定

## LC配管のリン酸コーティングについて



LC流路にグリホサートのリン酸基が吸着し、感度低下、ピークがブロード

リン酸コーティング

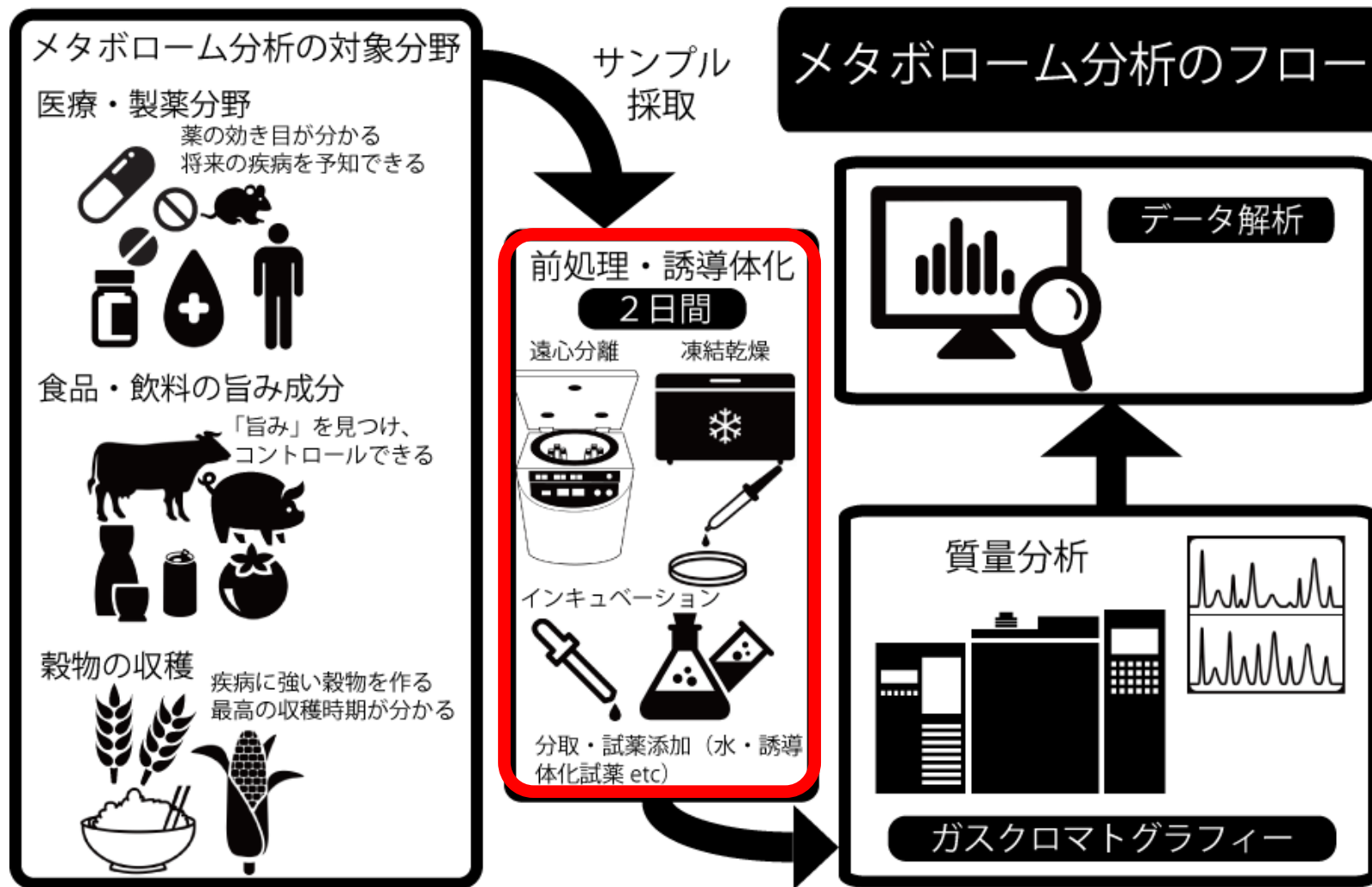


流路をリン酸コーティングすることで、吸着が抑制され、感度上昇、ピーク形状改善

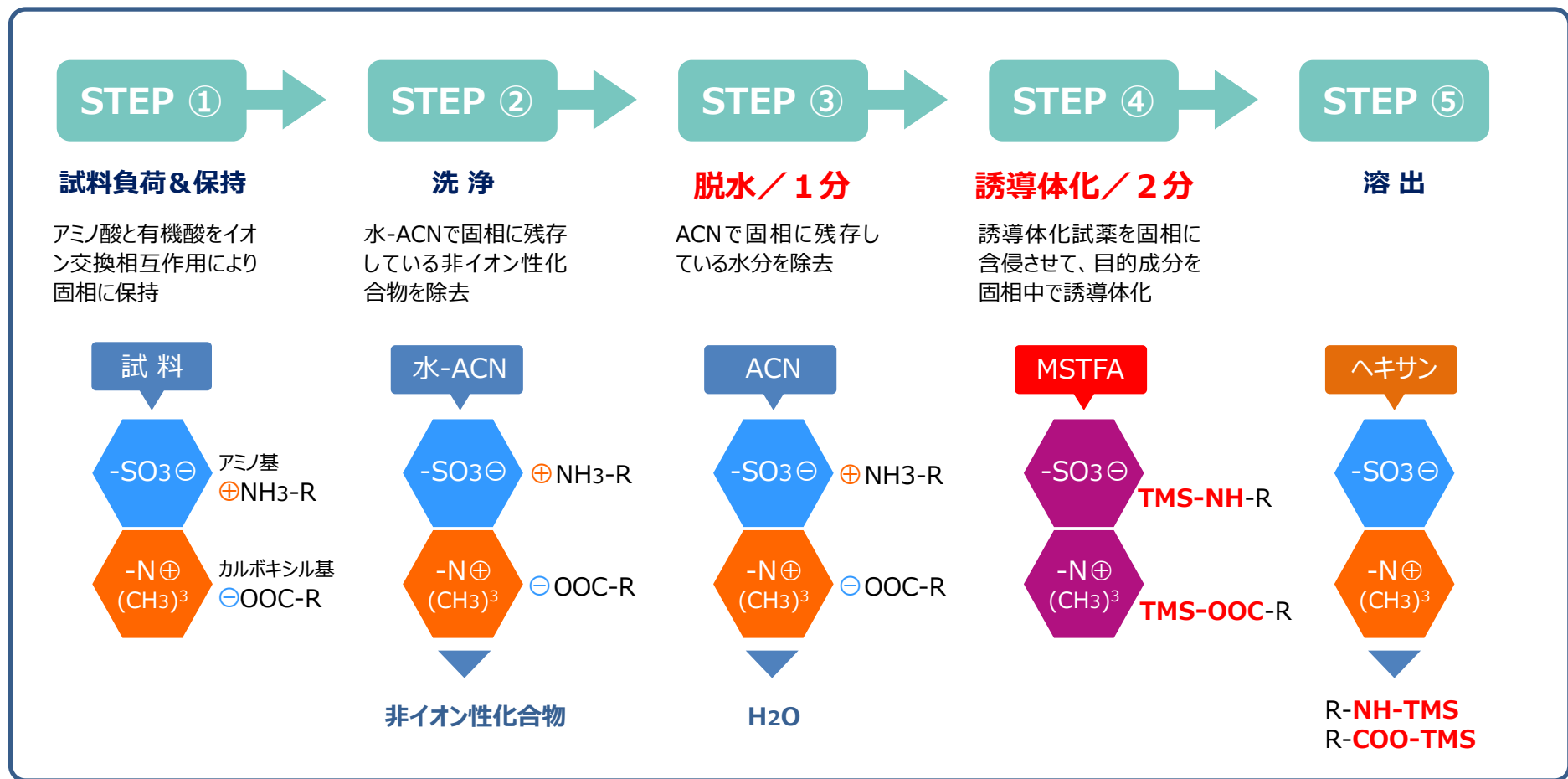
誘導体化せずにLC-MS/MS測定可能となった

# 固相誘導体化法を用いた オンラインSPE-GC/MSシステムの紹介

# メタボロミクスの現状



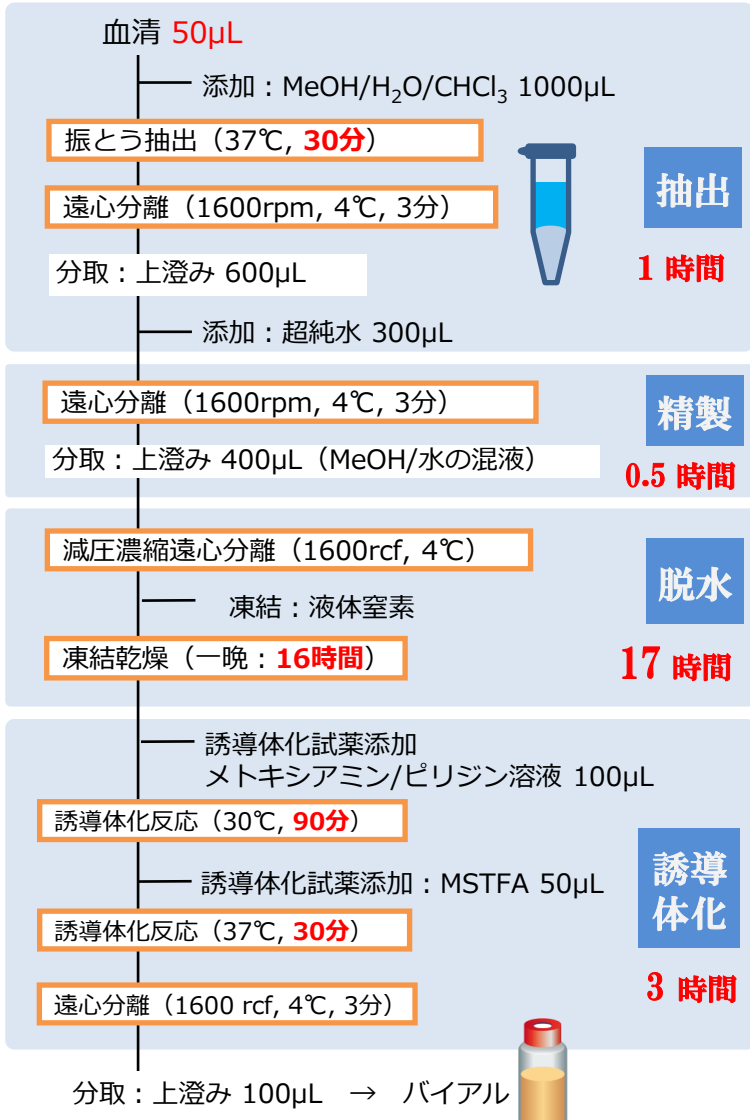
# 固相誘導体化法



特許登録：(株)アイスティサイエンス

# 従来法と本法の前処理比較

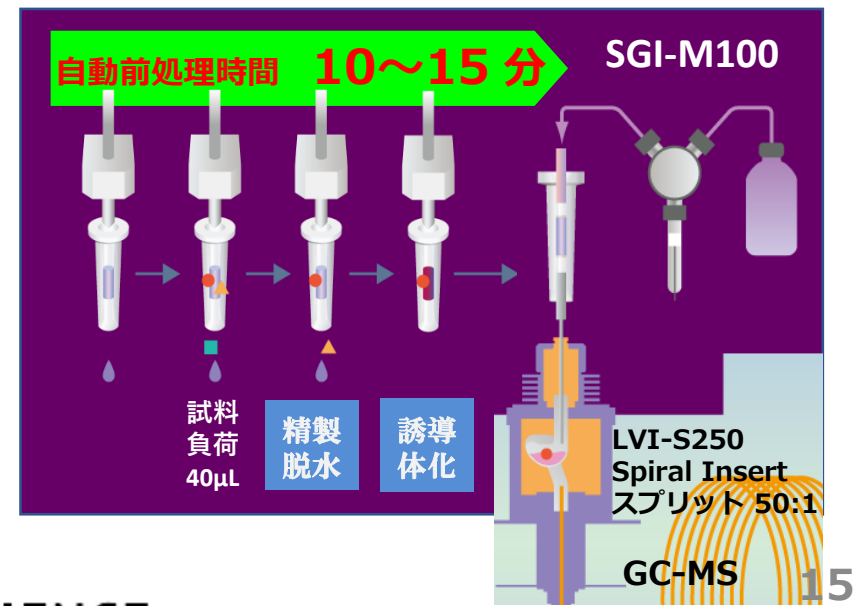
## ■ 従来法



## ■ 本法

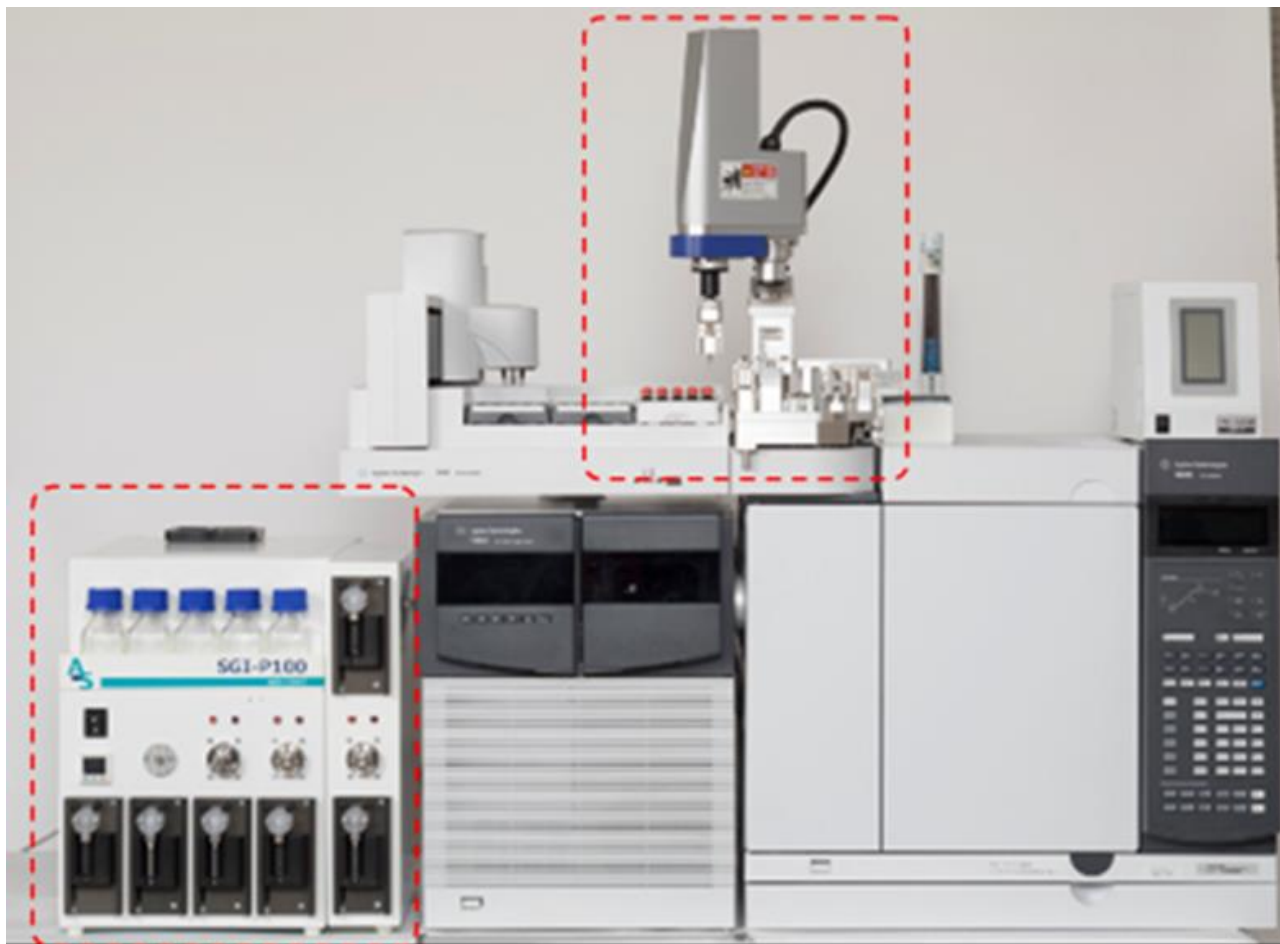


## オンライン固相誘導体化SPE-GC-MS



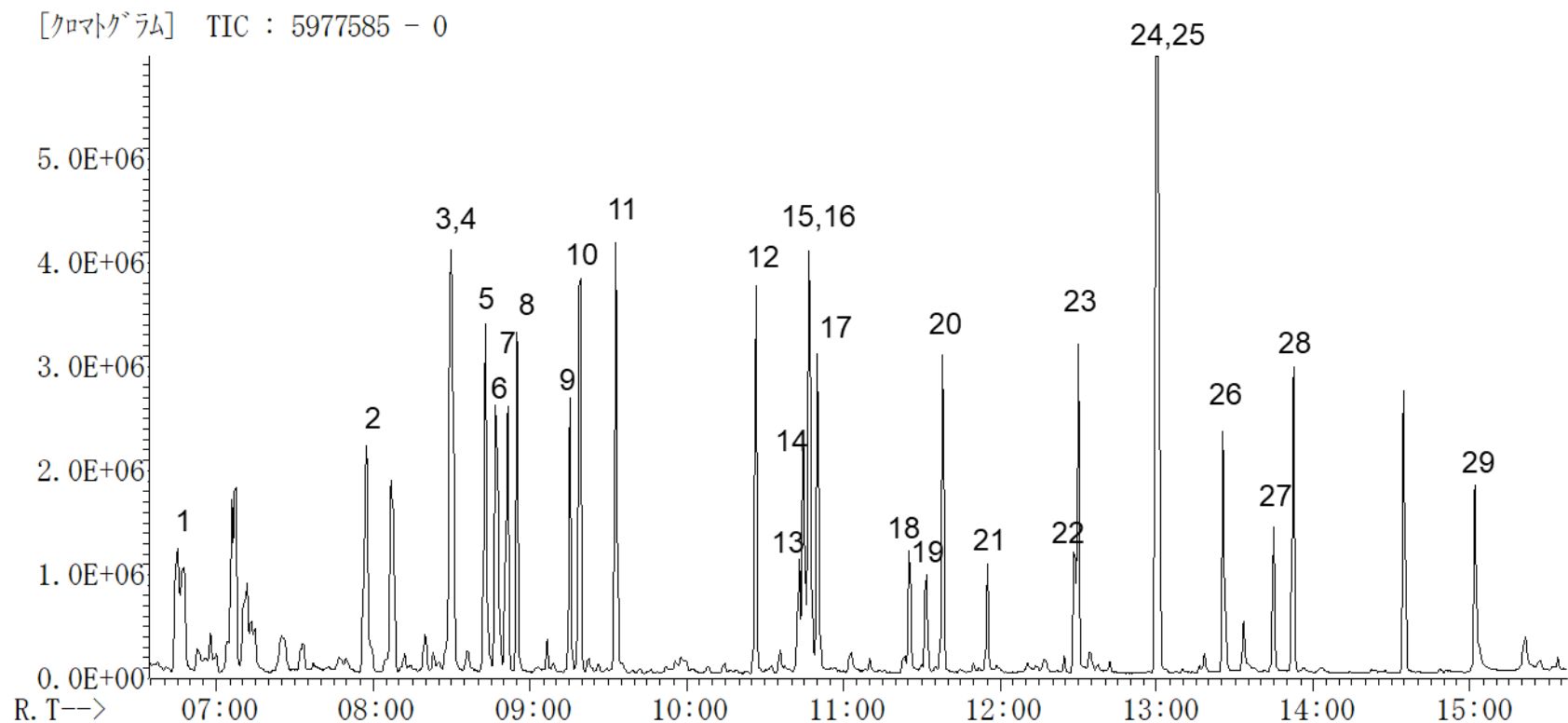
測定 : GC/MS : 注入1µL (スプリット 25:1)

# SPE-GC-MS system





# 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/μL

# 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

# 野菜ジュースのトータルイオンクロマトグラム

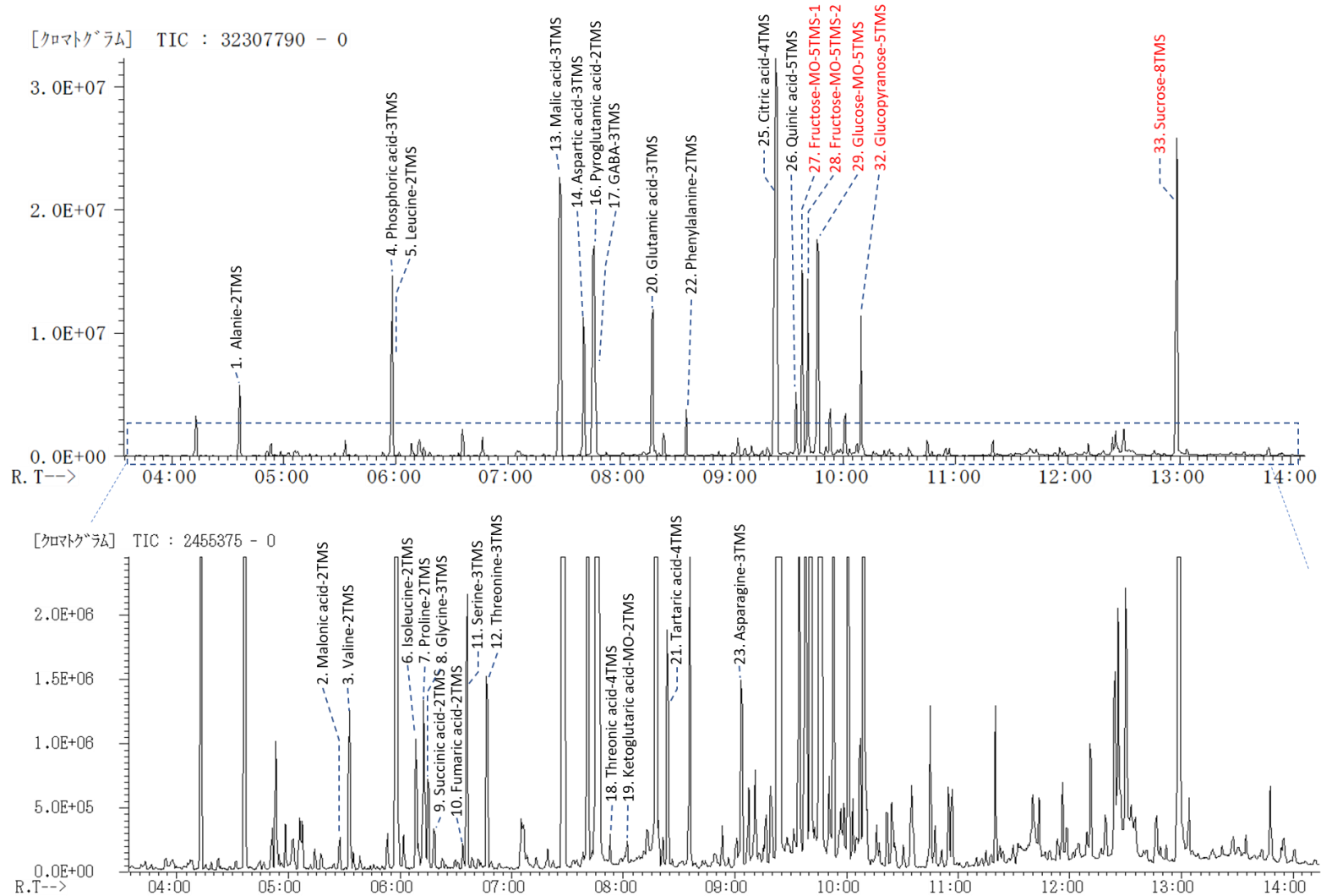
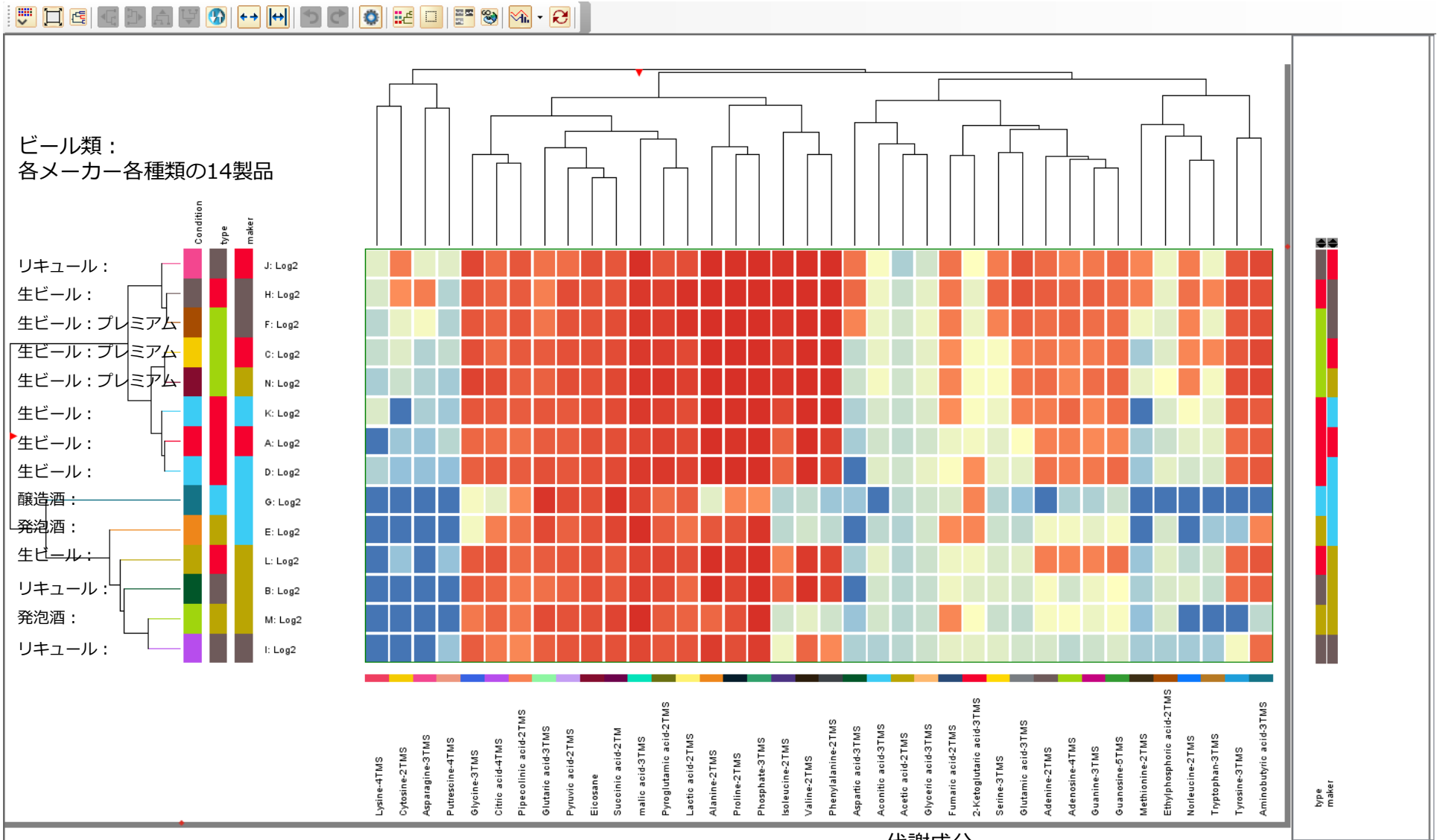


Fig. 4. The SCAN total ion chromatogram of the Vegetable juice using SPE-GC-MS system with automated solid-phase derivatization method

# ビール14製品のメタボローム分析の結果

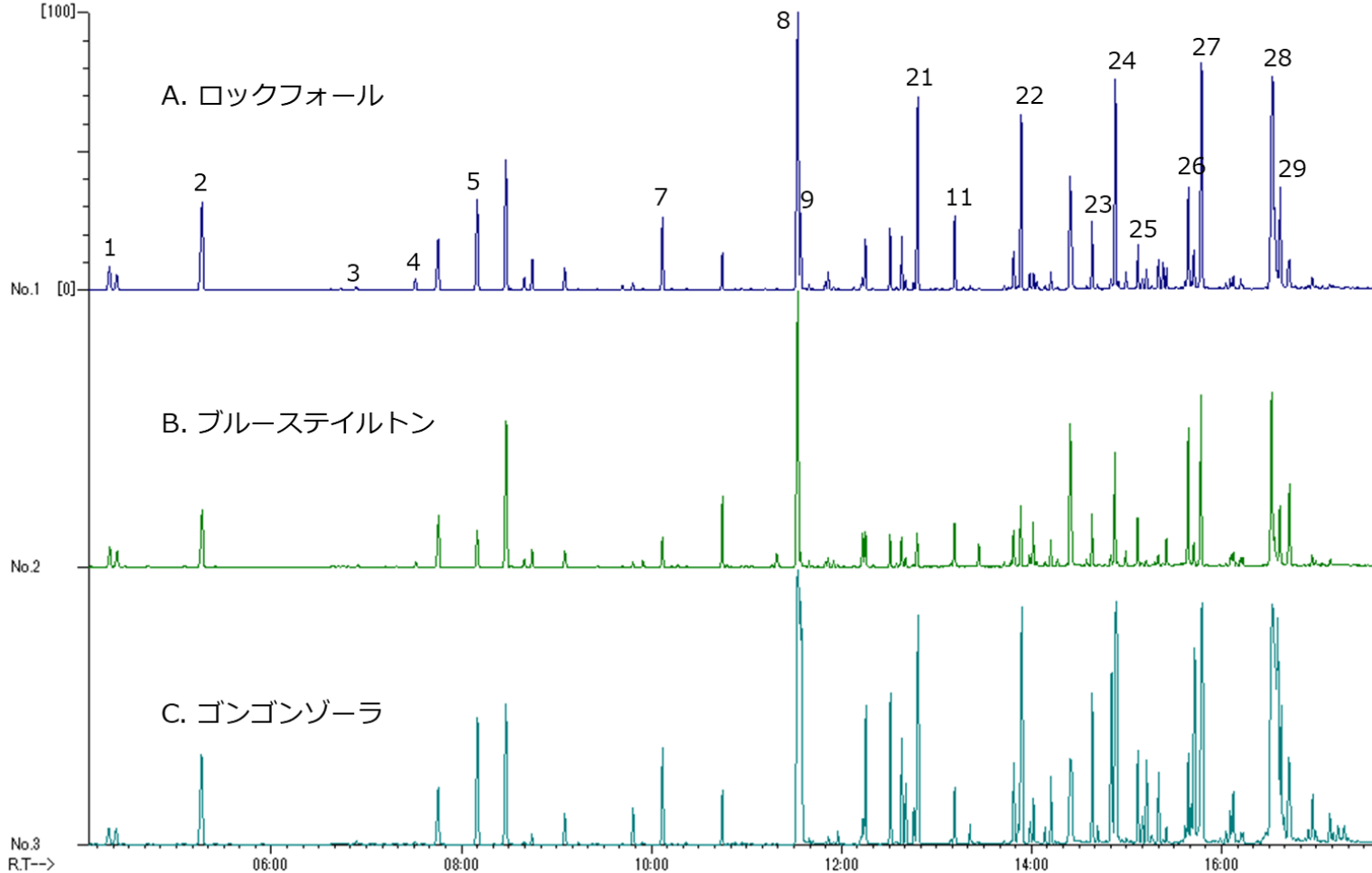


代謝成分

# ブルーチーズ3種のSCANトータルイオンクロマトグラム比較

有機酸系（短鎖脂肪酸、ジカルボン酸類）誘導体化試薬：MTBSTFA

【クロマトグラム】 TIC Y軸：相対値(%)



試料：ブルーチーズ3種



C B A

- 1 Methanoic acid-tBDMS
- 2 Ethanoic acid-tBDMS
- 3 Propanoic acid-tBDMS
- 4 Butanoic acid-tBDMS
- 5 Pentanoic acid-tBDMS
- 7 Heptanoic acid-tBDMS
- 8 Lactic acid-2tBDMS
- 9 Octanoic acid-tBDMS
- 11 Succinic acid-2tBDMS
- 21 Decanoic acid-tBDMS
- 22 Dodecanic acid-tBDMS
- 24 Tetradecanoic acid-tBDMS
- 25 Aspartic acid-3tBDMS
- 26 Glutamic acid-3tBDMS
- 27 Hexadecanoic acid-tBDMS
- 28 cis-9-Octadecenoic acid
- 29 Stearic acid-tBDMS