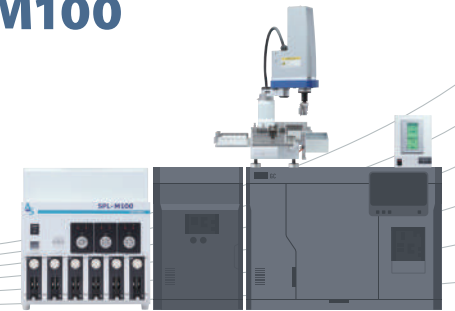




固相誘導体化法ガイドブック

メタボローム分析用オンラインSPE-GCシステム

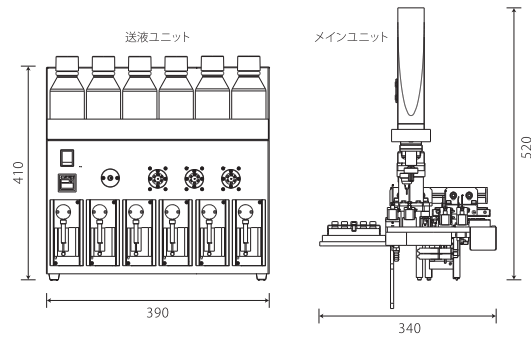
SPL-M100



SPL-M100



□ 寸法図 (単位:mm)



□ SPL-M100 仕様

大きさ	メインユニット 幅340 mm 奥行560 mm 高さ520 mm (設置面よりの高さ) 送液ユニット 幅390 mm 奥行570 mm 高さ410 mm
電源・消費電力	100 V (500 VA)
ソフト用PCスペック	Windows 7 以降
処理検体数	最大50検体
送液	シリンジ方式
使用ガス	N ₂ ガスまたは不活性ガス
設置環境	温度: 18~28 °C 湿度: 40~70 %RH ただし結露しないこと。 その他: 塵、振動、空間ノイズ、腐食性ガスなどの妨害要素の少ない環境が望ましい。 別途GC用大量注入口装置LVI-S250 (別売) が必要です。 (LVI-S200をお持ちの場合はアップグレードで対応可)

製品の仕様・外観・構成等は改善のため予告なしに変更する場合があります。カタログ中に記載の社名または製品名は各社の登録商標または商標です。
製品に対するお問合せは弊社または代理店までご連絡ください。

株式会社 アイスティサイエンス

【本社】
〒640-8390 和歌山県和歌山市有本18-3
TEL.073-475-0033 FAX.073-497-5011
【東日本営業所】
〒351-0033 埼玉県朝霞市浜崎1丁目1-31 アドバンス610
TEL.048-424-8384 FAX.073-497-5011

www.aisti.co.jp

2024年8月27日版

metabolomics

メタボロミクス

株式会社 アイスティサイエンス

AISTi SCIENCE

メタボロミクスとは

メタボロミクス (metabolomics) とは、生体内で合成・消費される様々な代謝物 (メタボローム: metabolome) を網羅的に解析する学問 (オミクス: omics) の呼称、ならびにその分析技術を指します。低分子の有機酸・アミノ酸などの代謝物が生体内でどのように代謝されるかを調べることで、血漿や血清といった生体試料での特定の病気の早期発見や薬効の調査であったり、食品試料の品質管理などに応用されています。

メタボロミクスの課題と目的

メタボローム分析の前処理は難しく、分析技術の習得にも時間がかかります。また、メタボロミクスではあらゆる物質の代謝を把握するために、網羅的に多くの物質を一度に測定することが望まれています。代表的な代謝物であるアミノ酸や有機酸、糖類などは極性が高い不揮発性物質であるため、通常はLCの測定対象物質ですが、それぞれ異なる物性を持っているため、LCにおいて一斉に分析することは難しいとされています。

前処理操作

遠心濃縮・凍結乾燥・誘導体化等の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。

多検体測定

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う。

研究・製品開発のPDCAサイクルの加速

- ・ 分析の時間短縮により 研究開発のスピードが上がる
- ・ 分析の精度向上により 正確な評価ができる
- ・ 分析のハイスループットにより 多くの情報を得られる

新技術による精度向上および迅速化は、さまざまな分野の研究開発に貢献するだけでなく、生命・食・環境の課題を解決することを目的として、人の暮らしや産業に役立ち、特に生命科学の分野で大きく貢献できます。

省力化・効率化・高感度を実現するために

固相誘導体化法

自動化・オンライン化

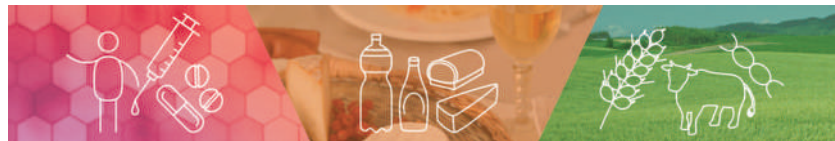
SPE-GCにより誘導体化から測定までをオンライン化

「固相誘導体化法」では、異なる物性をもつ不揮発性物質を「誘導体化」することで揮発性の物質に変化させ、GCによる一斉分析を行います。これは、アミノ酸・有機酸・糖類が網羅的に分析できるという点から重要です。

医療・製薬

食品・飲料

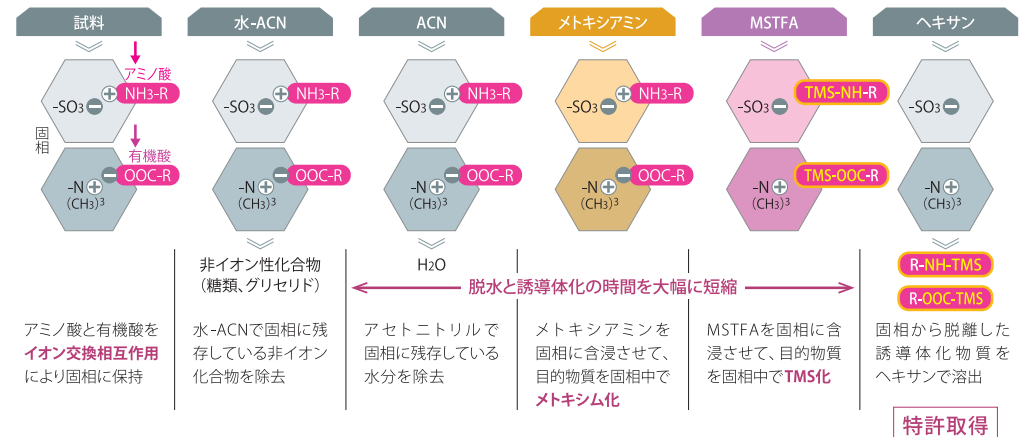
農業・畜産・バイオ



オンライン固相誘導体化法の原理

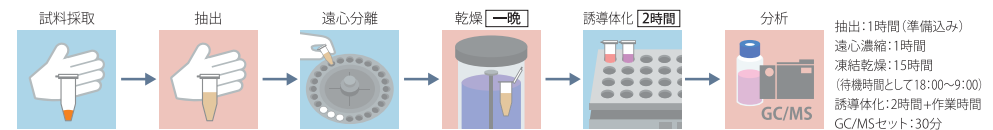
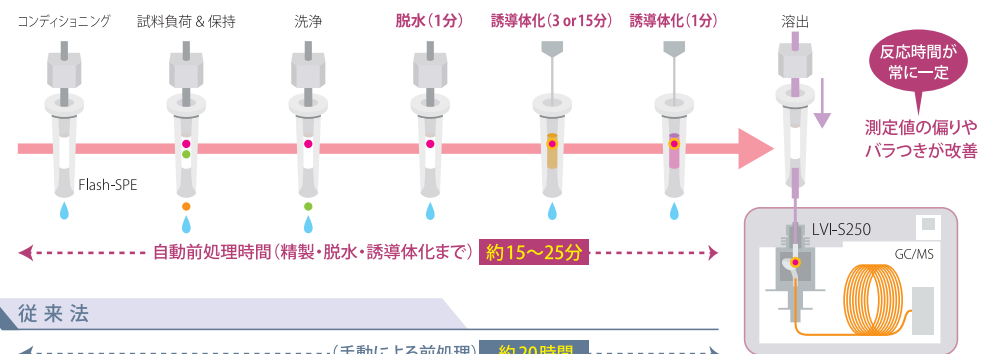
アミノ酸と有機酸のTMS化

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、GC/MSでの測定を可能にします。



従来法と本法の前処理比較

オンライン固相誘導体化法 ※前処理～測定までを自動化



- 1) 除タンパク処理 & 代謝物抽出
試料に抽出溶媒を加え振とう後 (~30分)、回収した上清に超純水を加え相分離させ、上層 (水-メタノール層) を抽出液とする。
- 2) 乾燥
遠心エバポレータ (30分~60分) で抽出液に含まれるメタノールを気化させる。ディープフリーザーまたは液体窒素で水分を完全に凍結させ、凍結乾燥機で処理 (一晩)。
- 3) 誘導体化
凍結乾燥試料にメトキシアミンピリジン溶液を加え、乾固物とよく混合する (ボルテックスまたは超音波処理)。加温振とう器でメトキシ化処理 (30℃、90分)。続いてMSTFAを加え、加温振とう器でTMS化処理 (37℃、30分)。反応液をバイアルに回収し、GC/MS分析。

固相誘導体化法による対象成分

約250成分以上

アミノ酸:AMI-a (15成分)

Alanine, Glycine, Proline, Threonine, Methionine, Phenylalanine, Serine, Tyrosine, Lysine, Valine, Leucine, Isoleucine, Aspartic acid, Glutamic acid

アミノ酸:AMI-b (18成分)

Asparagine, Cysteine, Dihydrotyrosine, Histidine, Homocysteine, Homoserine, Kynurenine, 1-Methylhistidine, Monoisotytrosine, N-Acetylglycine, Norleucine, Norvaline, Ornithine, Tryptophan, Hydroxylysine, 2-Aminoasipic acid, 2-Aminobutyric acid, 5-Hydroxytryptophan

アミノ酸:AMI-c (11成分)

Alanyl-glycine, Cysteine, Cysteinylglycine, Ethanolamine, Dihydrobiopterin, Carbamoylaspartic acid, Glycylglycine, Homocystine, N2-acetylornithine, N-Acetylglutamine, Urea

フェニルアミン:AMI-Ph (7成分)

Histamine, Phenethylamine, N-methyltyramine, N-methylphenethylamine, Synephrine, Tyramine, 3-Methoxytyramine

ポリアミン:PAM (4成分)

Cadaverine, Putrescine, Spermidine, Spermine

カテコール:CT (7成分)

Adrenaline, Noradrenaline, Gallic acid, Dihydroxymandelic acid, Dihydroxyphenylacetic acid, Dopamine, Dopa

リン酸エステル:PE (4成分)

Pyrophosphoric acid, Pyridoxal phosphate, Phosphohydroxypruvic acid, Phosphoserine

糖リン酸:SUP (6成分)

Fluctose-6-phosphate, Glucose-6-phosphate, Glucopyranose-1-phosphate, Ribose-5-phosphate, Glucopyranose-6-phosphate, 6-Phosphogluconic acid

糖酸:SUC (9成分)

Galacturonic acid, Glucuronic acid, Threonic acid, N-Acetylmuramic acid, N-Acetylneuraminic acid, Glucuronic acid-g-lactone, Glyceric acid, Glucuronic acid

多価カルボン酸:CA-a (14成分)

cis-Aconitic acid, Citric acid, Ethylmalonic acid, Fumaric acid, Glutaric acid, Isocitric acid, Maleic acid, Malic acid, Malonic acid, Methylmalonic acid, Oxalic acid, Oxoglutaric acid, Succinic acid, Tartaric acid

アミノカルボン酸:CA-AM (12成分)

Creatinine, Hippuric acid, Hydroxyproline, Pipecolic acid, 3-Aminobutyric acid, 4-Aminobutyric acid, Urocanic acid, Sarcosine, N-Acetylaspartate, N-Carbamoylaspartate, Carbamoylaspartic acid, 5-Aminolevulinic acid

フェニルカルボン酸:CA-Ph (10成分)

Homovanillic acid, Kynurenic acid, Nicotinic acid, Vanillylmandelic acid, Hydroxyphenyllactic acid, Phthalic acid, Picolinic acid, Quinolinic acid, Orotic acid

ヒドロキシカルボン酸:CAH (9成分)

Glycolic acid, Mevalonic acid, 2-Hydroxybutyric acid, 3-Hydroxybutyric acid, 2-Hydroxy-2-methylbutyric acid, Lactic acid, Hydroxypropionic acid, 2-Hydroxyisobutyric acid, 3-Hydroxyisovaleric acid

ケト酸:CAMO (7成分)

Glyoxylic acid, 2-Oxobutyric acid, 4-Hydroxyphenylpyruvic acid, Pyruvic acid, Phenylpyruvic acid, 2-Oxoisocaproic acid

短鎖脂肪酸:FAS (10成分)

Propanoic acid, Isobutyric acid, Butyric acid, Isovaleric acid, Valeric acid, Hexanoic acid, Heptanoic acid, Octanoic acid, Nonanoic acid, Decanoic acid

長鎖脂肪酸:FAL (21成分)

Undecanoic acid (C11), Dodecanoic acid (C12), Tridecanoic acid (C13), Myristic acid (C14), Pentadecanoic acid (C15), Palmitic acid (C16), Palmitoleic acid (C16:n-7), Heptadecanoic acid (C17), Stearic acid (C18), Oleic acid (C18:n-9), Linoleic acid (C18:2, n-6), α -Linolenic acid (C18:3, n-3), γ -Linolenic acid (C18:3, n-6), Nonadecanoic acid (C19), Arachidic acid (C20), Dihomo- γ -linolenic acid (C20:3, n-6), Arachidonic acid (C20:4, n-6), Eicosapentaenoic acid (C20:5, n-3), Heneicosanoic acid (C21), Docosapentaenoic acid (C22:n-3), Docosahexaenoic acid (C22:n-3)

核酸塩基:NUB (4成分)

Adenine, Cytosine, Guanine, Xanthine

ヌクレオシド:NUS (4成分)

Adenosine, Deoxyguanosine, Deoxyinosine, Xanthosine

糖類:SUG1 (18成分)

Arabinose, Fructose, Fucose, Galactitol, Galactose, Glucitol, Glucopyranose, Glucose, Lyxose, Mannitol, Mannose, myo-Inositol, Rhamnose, Ribitol, Ribose, Xylitol, Xylose, 2-Deoxyglucose

二糖類:SUG2 (6成分)

Galactinol, Lactose, Maltose, Melibiose, Sucrose, Trehalose

胆汁酸:BA (6成分)

Cholic acid, Lithocholic acid, Ursodeoxycholic acid, Deoxycholic acid, Hyodeoxycholic acid, Chenodeoxycholic acid

ステロール類:ST1 (10成分)

Androstenedione, Androstene, Testosterone, Progesterone, Dihydrotestosterone, Estril, Estrone, Estradiol, Pregnenolone, Dehydroepiandrosterone

ステロール類:ST2 (10成分)

β -Sitosterol, β -Glucosyl sitosterol, Campesterol, Cholecalciferol, Cholesterol, Dihydrolanosterol, Ergosterol, Lanosterol, Stigmasterol, 7-Dehydrocholesterol

フラボノイド:FLV (5成分)

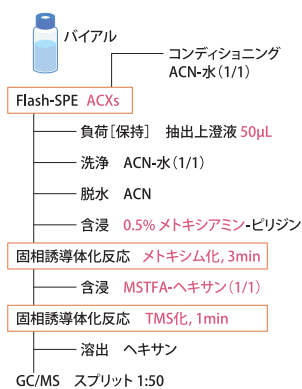
Daidzein, Formononetin, Genistein, Glycitein, Quercetin

疎水性ビタミン:V-DK (4成分)

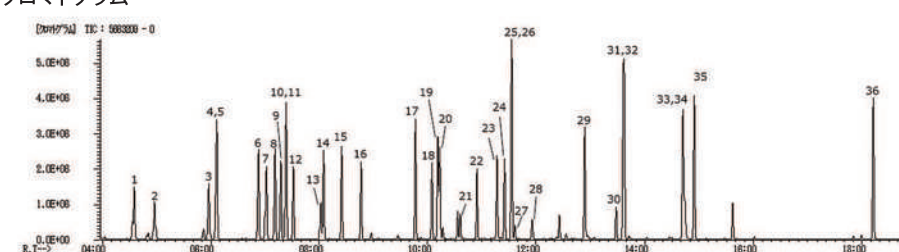
Phytonadione, α -Tocopherol, γ -Tocopherol, δ -Tocopherol

アミノ酸・有機酸

前処理フロー



クロマトグラム



1. Alanine_2TMS	11. Glycine_3TMS	21. Oxoglutaric acid_1MO_2TMS_1	31. Citric acid_4TMS
2. Oxalic acid_2TMS	12. Succinic acid_2TMS	22. Oxoglutaric acid_1MO_2TMS_2	32. Isocitric acid_4TMS
3. Malonic acid_2TMS	13. Fumaric acid_2TMS	23. Pimelic acid_2TMS	33. Lysine_4TMS
4. Valine_2TMS	14. Serine_2TMS	24. Glutamic acid_3TMS	34. Histidine_4TMS
5. Methylmalonic acid_2TMS	15. Threonine_3TMS	25. Tartaric acid_4TMS	35. Tyrosine_3TMS
6. Leucine_2TMS	16. Glutaric acid_2TMS	26. Phenylalanine_2TMS	36. Cystine_4TMS
7. Ethylmalonic acid_2TMS	17. Malic acid_3TMS	27. 2-Oxoadipic acid_1MeOX_2TMS_1	
8. Isoleucine_2TMS	18. Adipic acid_2TMS	28. 2-Oxoadipic acid_1MeOX_2TMS_2	
9. Proline_2TMS	19. Aspartic acid_3TMS	29. cis-Aconitic acid_2TMS	
10. maleic acid_2TMS	20. Methionine_2TMS	30. Azelaic acid_2TMS	

再現性

No.	Compound name	RT min	1	2	3	4	5	6	avg	RSD, %
1	Alanine_2TMS	4.59	2.796457	2.740757	2.908211	2.945750	3.004590	2.819434	2.767124	2.7
2	Oxalic acid_2TMS	4.97	1.433569	1.467448	1.612187	1.621832	1.673343	1.574003	1.563814	4.0
3	Malonic acid_2TMS	5.97	2.885096	2.856364	3.118479	2.949409	3.159205	2.819550	2.964717	4.3
4	Valine_2TMS	6.11	3.792220	3.757500	4.000488	4.153348	4.164040	3.797391	3.942847	3.2
5	Methylmalonic acid_2TMS	6.11	3.216706	3.269100	3.425462	3.315429	3.491980	3.213251	3.331720	3.2
6	Leucine_2TMS	6.88	3.881185	3.822139	4.060396	4.155562	4.171368	3.904054	3.998357	3.7
7	Ethylmalonic acid_2TMS	7.02	3.047504	3.084252	3.211158	3.076374	3.326485	2.989000	3.122484	3.7
8	Isoleucine_2TMS	7.18	3.663868	3.666025	3.827550	3.904952	3.902472	3.669337	3.722467	3.5
9	Proline_2TMS	7.30	3.978149	4.021887	4.173805	4.297405	4.400630	4.076584	4.157774	4.0
10	maleic acid_2TMS	7.38	1.875644	1.825958	1.903559	1.861127	1.893506	1.753546	1.855405	2.0
11	Oxycitric acid_2TMS	7.38	4.417506	4.121809	4.354644	4.852310	4.183844	4.743858	4.444457	6.0
12	Succinic acid_2TMS	7.52	3.249408	3.318054	3.425971	3.525091	3.594063	3.175138	3.340255	4.2
13	Fumaric acid_2TMS	8.02	8.737588	8.834647	9.225251	8.793591	9.57324	8.83431	8.92762	4.6
14	Serine_2TMS	8.07	1.674335	1.752221	1.772483	1.788152	1.917059	1.683341	1.764599	5.0
15	Threonine_3TMS	8.40	4.645598	4.739088	4.792263	4.863236	4.957875	4.835257	4.806716	4.9
16	Glutamic acid_2TMS	8.76	1.892273	1.940682	1.972436	1.875291	2.070120	1.826889	1.929435	4.5
17	Maleic acid_2TMS	9.77	1.898465	1.902416	1.950773	1.871083	2.025701	1.852427	1.918381	4.5
18	Adipic acid_2TMS	10.67	2.674876	2.706807	2.76389	2.82331	2.86724	2.581379	2.684428	3.0

分析条件 (M100)

SPE-GC Interface SPE-M100 (AIST Science)
SPE Cartridge Flash-SPE ACXs
Sampling Volume 50μL
PTV Injector LVI-S250 (AIST Science)
Insert Type Spiral Insert
Injector Temp. 220°C (0.5min)-50°C/min-290°C (16min)

分析条件 (GC/MS)

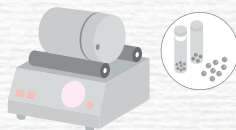
GC
Inlet Mode Split 1:50
Flow Mode Constant Flow, 1ml/min
Pre-Column 0.25mm i.d. x 1m
Column VF-5ms, 0.25mm i.d. x 30m, df:0.25μm
Oven Temp. 100°C (2min) - 10°C/min - 320°C (2min)
Trans. Line Temp. 290°C
MS
MS Method SCAN, m/z:70-600

粉碎と抽出について

食品分析に共通する重要事項の一つに「試料の均一性」があげられます。例えば残留農薬分析では食品に残留している農薬が偏在または点在している場合、均一性の悪さは定量性の悪さに直結します。同じ試料を分取しても分析のたびに定量値が異なると基準値判定が難しくなり、また近年分析装置の高感度化に伴い分析試料の少量化が進んでおり、より試料均一化の重要性が増しています。

ボールミル

- ・少量サンプルでも粉碎可能
- ・押しつぶす動きで硬い組織も破壊
- ・多検体処理が可能



予冷式ドライアイス凍結粉碎法

- ・凍結乾燥ではなく、水分を含んだまま凍結粉碎
- ・食品全体の成分をパウダー状に粉碎し均一化
- ・水分を含んだ成分濃度の分析に適している
- ・大がかりな装置を必要としない

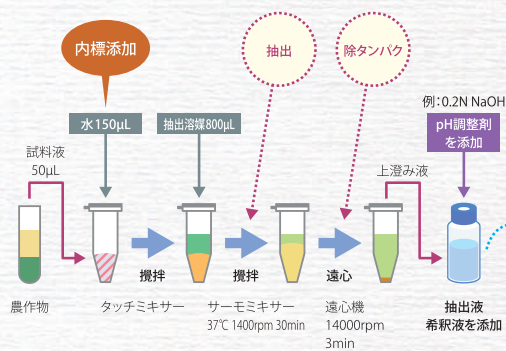


すじや繊維質が多い試料もパウダー状に粉碎できます。水分と固形物が均一化された状態のため、秤量誤差が低減します。また、常温粉碎に比べ、低温で粉碎することで試料中の酵素活性を抑えて、代謝物の変性を防ぎます。



農作物中のアミノ酸・有機酸一斉分析用前処理フロー

抽出と除タンパク



内標および指標

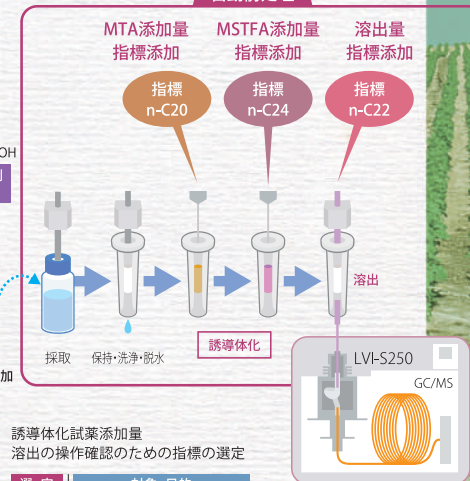
選定	対象・目的
ノルロイシン	アミノ酸
アジピン酸	有機酸
リビトール	糖類
ヘキサ酸-d11	短鎖脂肪酸

※上表は1例で、工程管理のためのモニター指標

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)

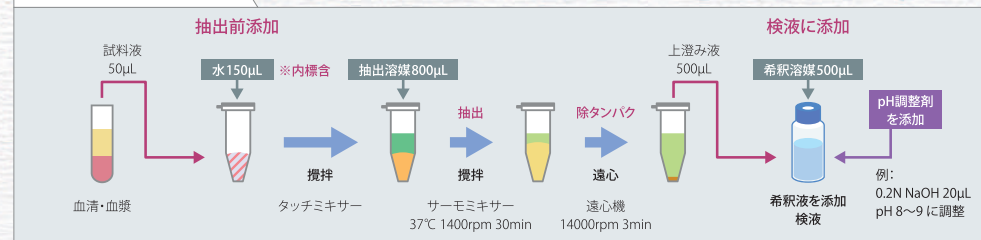
誘導体化試薬添加量
溶出の操作確認のための指標の選定

自動前処理

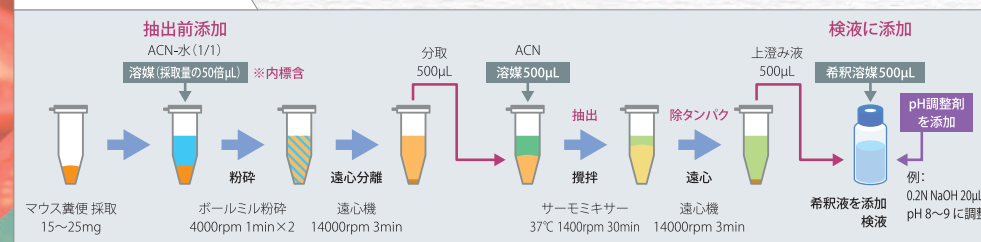


抽出方法と内標添加 (添加回収試験)

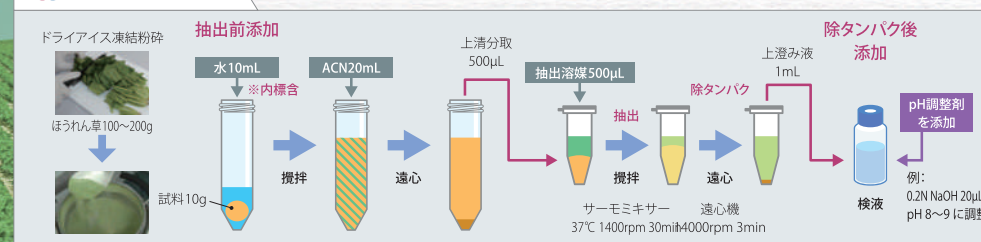
血清・血漿



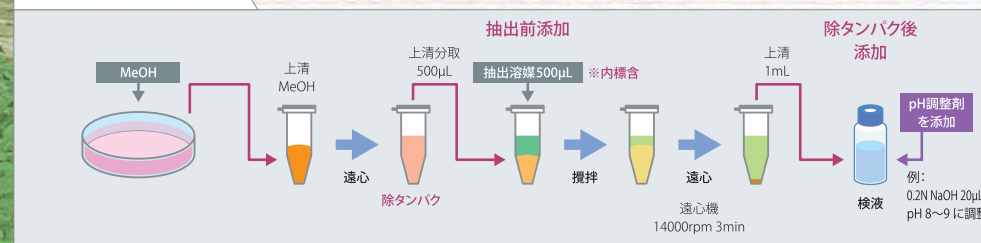
糞便(マウス)



ほうれん草



培地



固相誘導体化法

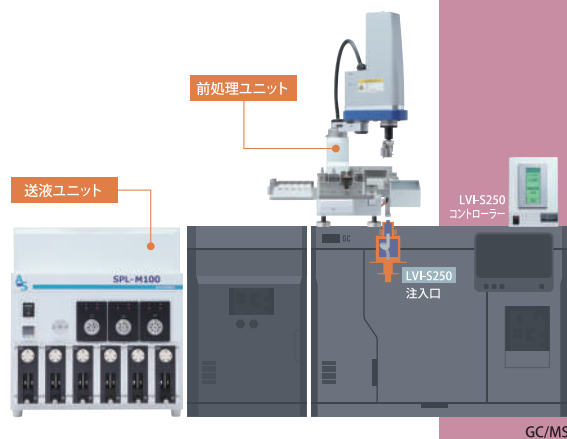


目的物質を固相に保持した状態で誘導体化し、GC/MS測定までをオンライン分析

固相抽出からGC測定までを 完全自動化

オンラインとは

前処理と測定を切り分けることなく、
GCやLCに自動で直接注入するシステムです。



メタボローム分析用オンラインSPE-GCシステム

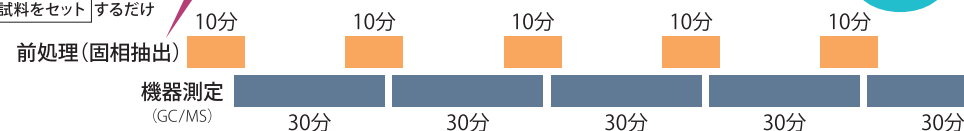
SPL-M100
For Gas Chromatography



溶媒と
固相カートリッジを用意

試料をセットするだけ

START

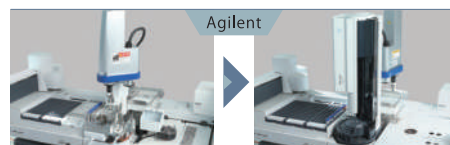


前処理と測定がオーバーラップ
ハイスループットの分析

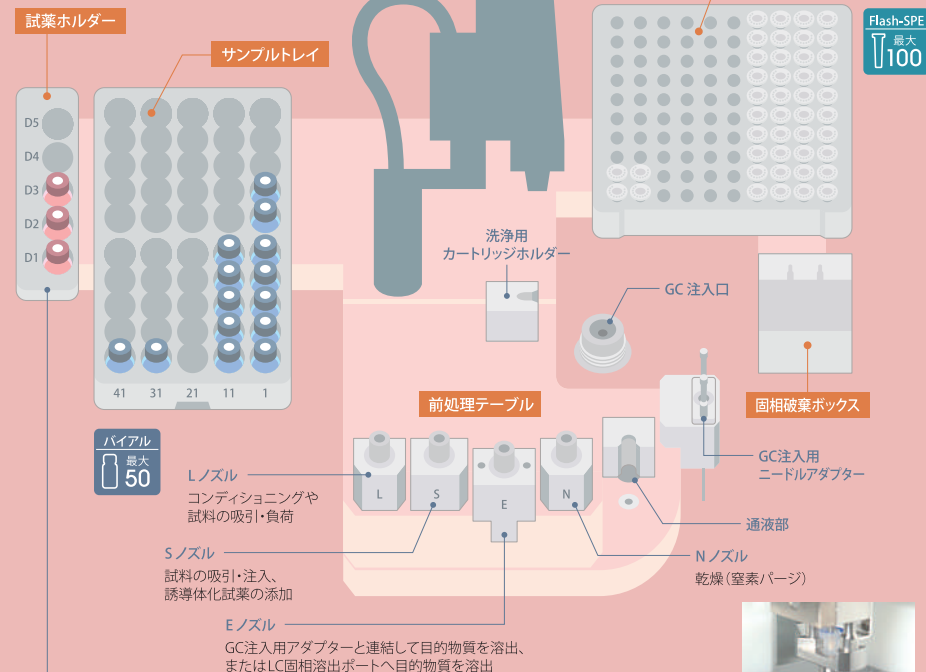
分析完了

通常のインジェクターの使用

前処理テーブルを取り外すことにより、通常のインジェクターと注入口(フロント)を用いた分析も可能です。



前処理ユニット



誘導体化試薬(最大5本)

- D1: MSTFA-ヘキサン(1/1)
- D2: 0.5%メトキシアミン
- D3: 10%メトキシアミン
- D4: MTBSTFA-ヘキサン(1/1)
- D5: n-アルカン(保持指標計算用)



誘導体化試薬ホルダー



各ノズルと通液部

専用のノズルで各種通液、通気(コンディショニング、試料吸引・負荷、洗浄、乾燥、溶出)を行います。



固相溶出液を直接GCに注入

送液ユニット

シリンジポンプを用いた送液

各溶液ごとに独立したシリンジポンプを用いることで、
混液の心配がなく効率の良い送液が可能です。

バルブで流路を切り替え

メソッドに応じてポジションを
自由に切り替えて使用することができます。



シリンジポンプとバルブ



ボトルラック

メンテナンスについて

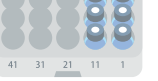
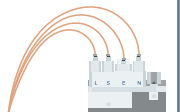
分析機器を正常に稼働させるには日常メンテナンスと定期メンテナンスを、しっかりと行う必要があります。

機器のメンテナンスを実施していただくことで、継続的に精度の高い分析結果を確保できます。

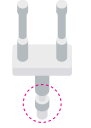
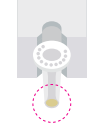
また定期的に消耗品を交換いただくことで未然にトラブルを防ぎ、安定した運用につながります。

SPL-M100をご導入された際に必要となるメンテナンス項目をご紹介します。

日常のメンテナンス 装置運転前に以下の項目をご確認ください。

溶媒の確認	誘導体化試薬の確認	固相の確認	サンプルの確認
- 残量の確認 - チューブの浮き上がり - 溶媒の入れ替え 	- 残量の確認 - セットポジション - 試薬の入れ替え 	- 検体数分の固相の確認 - 固相廃棄ボックスの確認 	- 検体番号の確認 - セプタムのスリット確認 
窒素ガスの圧力確認	ノズル配管の固定	送液時の確認 ※メンテナンスメニューの「溶媒の入れ替え」を実行	
圧力メータの数値を確認 	配管の絡まり、引っ掛かりが無いかを確認 	- シリンジの増し締め - シリンジ内のエア噛み - ノズル先端からの液吐出し確認 - シリンジ、バルブの配管接続部からの液漏れ 	

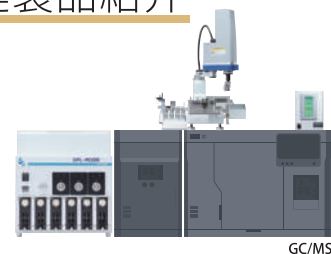
定期メンテナンス 一週間に1回、以下の項目をご確認ください。

送液シリンジ	注入ニードルアダプタの洗浄	洗浄カートリッジの交換	N/ノズルの洗浄
プランジャーやバルブ内部の汚れを定期的に拭き取り洗浄してください。 	アダプタ内部を洗浄 	100回運転毎に交換 	ノズルを拭き取り洗浄 

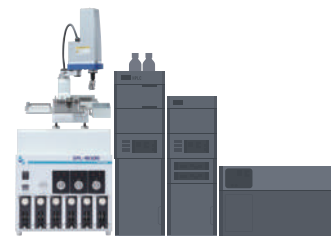
消耗品の定期交換 下記は目安ですので、実際の使用状況に応じて交換してください。

・スパイラルインサート	100回注入毎	・Flash-SPE洗浄用カートリッジ	100回毎
・アドバンスドグリーンセプタム	100回注入毎	・N/ノズル用Oリング	6か月毎
・プレカラム	3か月毎	・SPLアーム用バッテリー	2年毎
・トラップ管	6か月毎	・ロボット用モーターバッテリー	4年毎

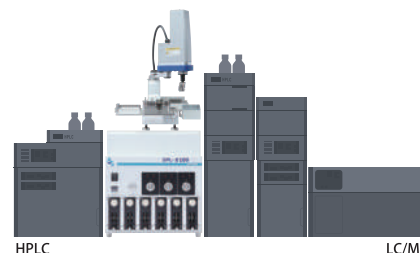
関連製品紹介



GC/MS



LC/MS



HPLC



GC/MS

固相捕集-溶媒溶出法によるおの分析システム

におい分析用SPE-GCシステム **SPL-M100FE**

におい分析で前処理からGC/MS分析まで『完全自動化』

分野	におい、異臭、カビ臭
試料	食品、飲料等
対象成分	各種におい成分

固相抽出装置とHPLC・LC/MSをオンラインで接続

オンラインSPE-LCシステム **SPL-W100**

さまざまな分野で前処理からLC/MS分析まで『完全自動化』

分野	固相抽出 → HPLC、LC/MS
試料	各種液体試料および抽出液
対象成分	HPLC、LC/MS対象成分

固相抽出→HPLCによる分離・分取→LC/MS測定までオンライン分析

オンラインSPE-LC-LCシステム **SPL-X100L**

夾雑物が多い試料中の単・数成分のターゲット分析を『完全自動化』

分野	単離精製、分離・分画・分取
試料	複雑なマトリックスから単成分・数成分の分離分析
対象成分	各種HPLC、LC/MS対象成分

固相抽出→HPLCによる分離・分取→GC/MS測定までオンライン分析

オンラインSPE-LC-GCシステム **SPL-X100G**

夾雑物が多い試料中の単・数成分のターゲット分析を『完全自動化』

分野	単離精製、分離・分画・分取
試料	複雑なマトリックスから単成分・数成分の分離分析
対象成分	各種GC、GC/MS対象成分

試料の均一性、大量試料の粉碎に優れる

凍結粉碎機フレストント **FST-4000**

薬物野菜・ニンジン・トマト・鶏胸肉・お弁当までさまざまなサンプルに対応

本体セット	本体、容器、蓋、カッター
備品	ドライアイス保管用ボックス 20kgまで

ドライアイス凍結粉碎用備品セット
(スコップ、予冷容器、試料用スプーン2種×5本)



試料がパウダー状に