

第75回日本食品保蔵科学会大会
2026年6月28日（日）16:15～
講演番号：2Cp12

オンラインSPE-GCシステムと 固相脱水誘導体化法を用いた 貯蔵ハッサク果実のメタボローム解析

○新川翔也^{*1}・佐々野僚一^{*1}・森口仁文^{*2}・尾崎嘉彦^{*3}
(アイスティサイエンス^{*1}, 和歌山県農業協同組合^{*2}, 近大生物理工^{*3})

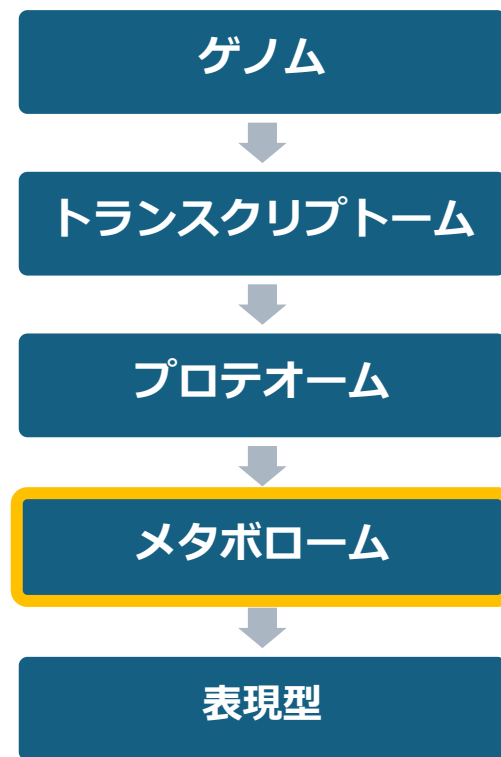


Beyond your Imagination

AiSTI SCIENCE

メタボローム解析

生体に内在する低分子代謝物の総体を網羅的に解析する技術



分子量：～1500

- ・ アミノ酸
- ・ 有機酸、脂肪酸
- ・ 糖類（単糖、二糖）
- ・ 核酸関連物質
- ・ 脂質

メタボロームの特徴

- ・ 表現型に近い物質である
- ・ 多種多様な化学構造
- ・ 幅広い濃度レンジで存在

応用例

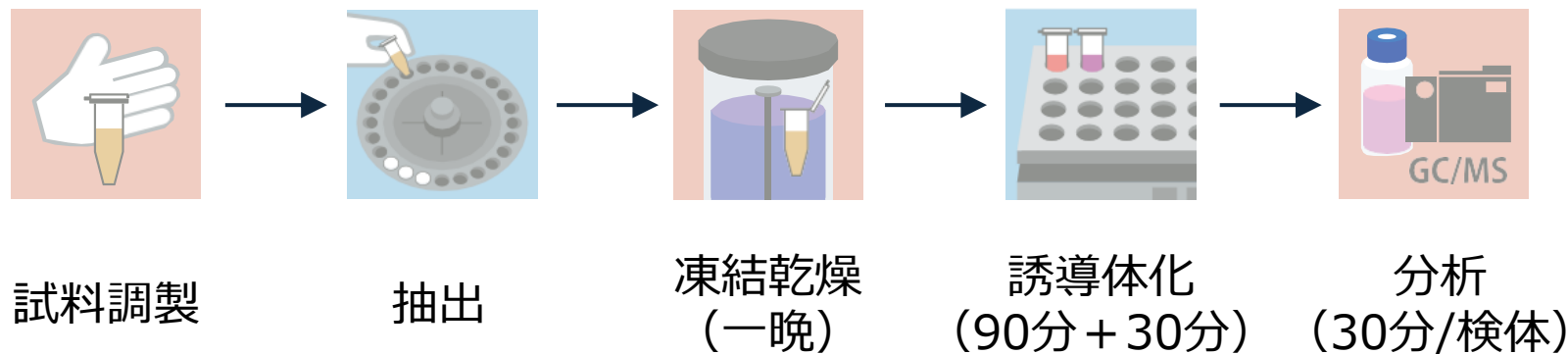


食品の品質・特性評価



栽培・保蔵条件の最適化

GC/MSによるメタボローム解析



課題①：前処理が煩雑で
時間がかかる

課題②：分析待ち中に
誘導体化物が変わる

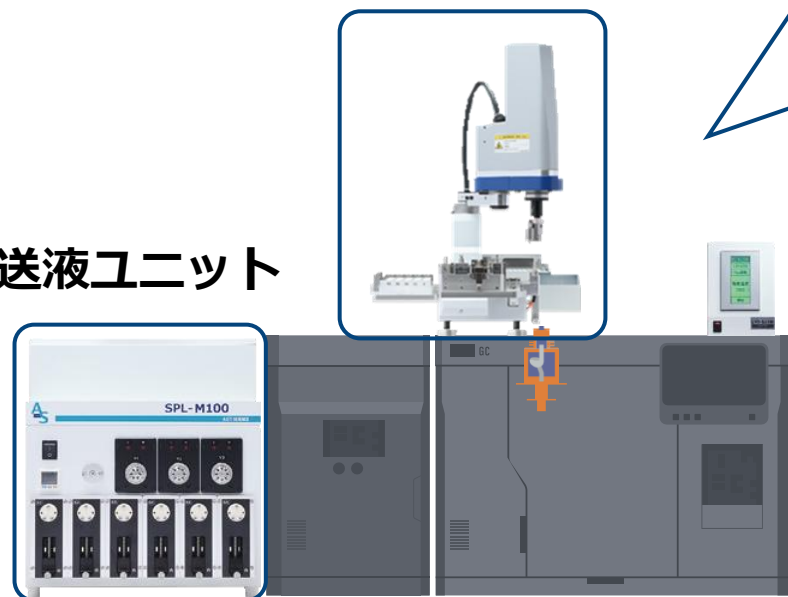
全自動オンライン固相抽出-GC/MSシステム（オンラインSPE-GC/MSシステム）
および固相脱水誘導体化法（SPDhD法）による分析

オンラインSPE-GCシステムと固相脱水誘導体化法

固相抽出・固相脱水誘導体化を行い
GC注入までを自動化するシステム

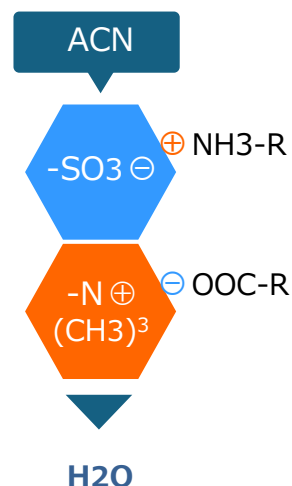
前処理ユニット

送液ユニット



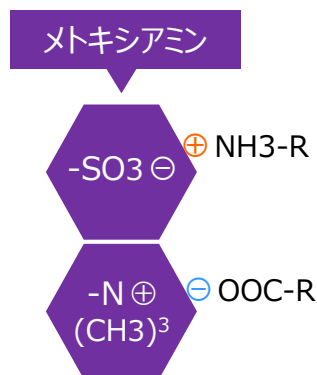
脱水／1分

ACNで固相に残存している水分を除去



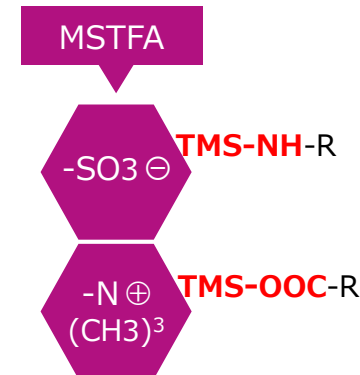
誘導体化／3分

メトキシアミンを固相に含浸させ、目的成分を固相中でメトキシ化

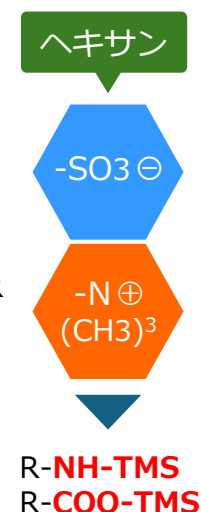


誘導体化／1分

MSTFAを固相に含浸させ、目的成分を固相中でTMS化

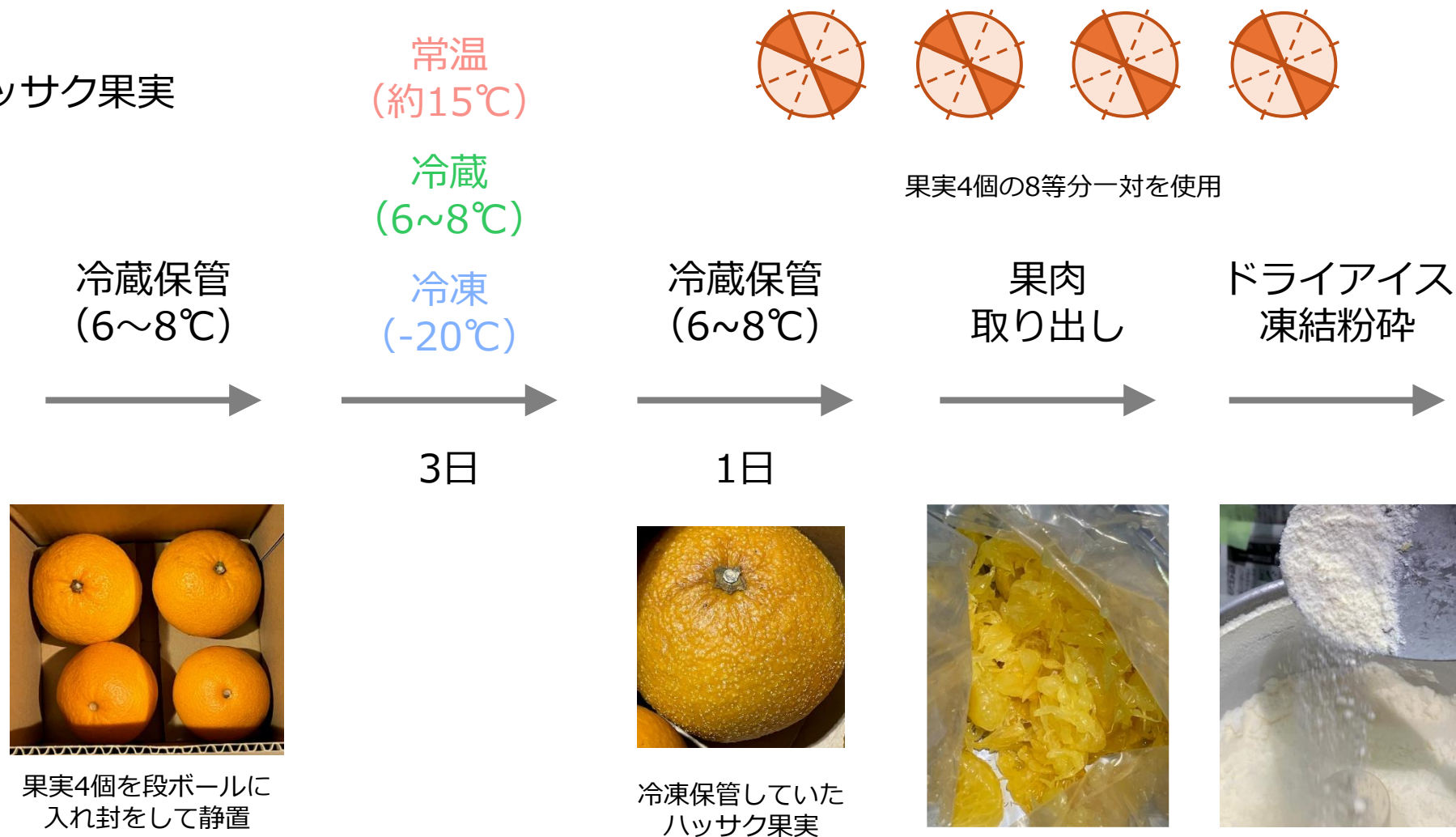


溶出



サンプル処理

試料：ハッサク果実



前処理手順（アミノ酸・有機酸・糖類）

凍結粉碎試料 0.2~0.3 g

— 添加：IS-水 試料当量

分取：50 μ L

— 添加：ACN 200 μ L

振盪（37°C, 1000 rpm, 10 min）

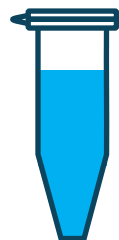
遠心分離（14000 rpm, 3 min）

試料抽出液

試料抽出液 100 μ L

— 希釈：ACN-水(4/1) 900 μ L

— pH調整：0.2M NaOH 20 μ L



希釈倍率：100倍
pH：8~9

検液 50 μ L

Flash-SPE ACXs（保持）

— 洗浄：ACN-水(1/1)

— 脱水：ACN

検液 3 μ L（ACNと固相上部で混合）

— 脱水：ACN 100 μ L

— 乾燥：窒素パージ

— 誘導体化試薬を含浸（固相誘導体化反応）
20 mg/mL メトキシアミン-ピリジン溶液 4 μ L, 15分

— 誘導体化試薬を含浸（固相誘導体化反応）
MSTFA/ヘキサン(1/1) 10 μ L, 1 min

溶出：ヘキサン（全量注入）

測定：GC/MS スプリット注入 50:1

コンディショニング
水
ACN-水(1/1)

全自動前処理

約25分/検体

GCMS分析条件

PTV Injector

Instrument	LVI-S250 (AiSTI Science)
Insert type	Spiral insert
Injector temp.	220°C (0.5 min) -100°C/min-290°C

GC

Instrument	7890B (Agilent)
Split	50:1
Flow mode	Constant flow, 1.0 mL/min
Pre-column	0.25 mm i.d. × 0.5 m
Column	InertCap-5HT, 0.25 mm i.d. × 30 m, df=0.25 µm
Oven temp.	100°C (2 min) -10°C/min-320°C (2 min) , Total 26.0 min
Transferline temp.	290°C

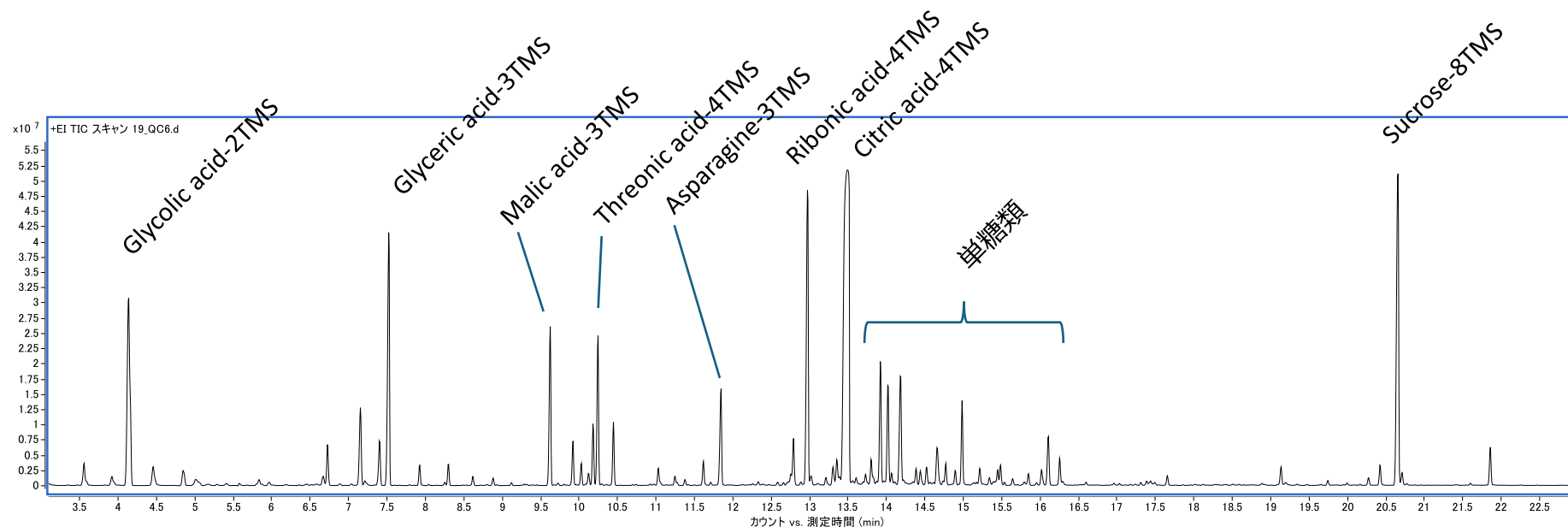
MS

Instrument	5977B (Agilent)
Ion source temp.	260°C
Acquisition mode	Scan (m/z 70-600)

トータルイオンクロマトグラム

Pooled Quality Control 試料

... すべての抽出液を混合し、分析バッチ内で一定時間ごとに測定される試料



**試料負荷を2回（50 μ L : アミノ酸・有機酸、3 μ L : 糖類）に分けることで
糖類の多い果実試料でもアミノ酸・有機酸・糖類を一斉分析可能**

検出ピークおよび同定結果

有機酸（14ピーク）

Oxalic acid_2TMS
 Malonic acid_2TMS_major
 Glyceric acid_3TMS
 Fumaric acid_2TMS
 Malonic acid_3TMS_minor
 Malic acid_3TMS
 Threonic acid_4TMS
 Oxoglutaric acid_1MO_2TMS_major
 Glutamic acid_3TMS
 cis-Aconitic acid_3TMS
 Citric acid_4TMS
 Gluconic acid_6TMS
 Glucaric acid_6TMS_major
 Linoleic acid(C18:2 n-6)_1TMS

アミノ酸（14ピーク）

N-Methylalanine_2TMS
 Valine_2TMS
 Isoleucine_2TMS
 Proline_2TMS
 Glycine_3TMS
 Serine_3TMS
 Threonine_3TMS
 Aspartic acid_3TMS
 Pyroglutamic acid_2TMS
 γ-Aminobutyric acid_3TMS
 Asparagine_4TMS_minor
 Phenylalanine_2TMS
 Asparagine_3TMS_major
 Tyrosine_3TMS

糖類（11ピーク）

Fructose_1MO_5TMS_1
 Fructose_1MO_5TMS_2
 Mannose_1MO_5TMS_major
 Glucose_1MO_5TMS_major
 Galactose_1MO_5TMS_minor
 Glucopyranose_5TMS_minor
 myo-Inositol_6TMS
 Fructose-6-phosphate_1MO_6TMS
 Glucose-6-phosphate_1MO_6TMS_minor
 Sucrose_8TMS
 Trehalose_8TMS

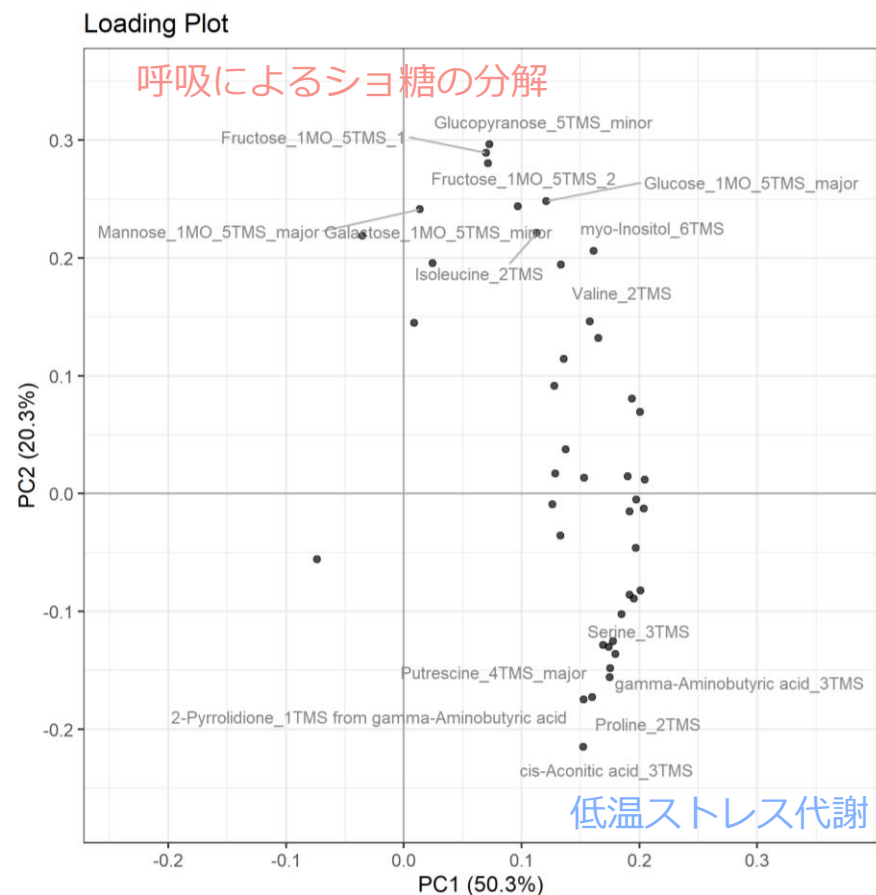
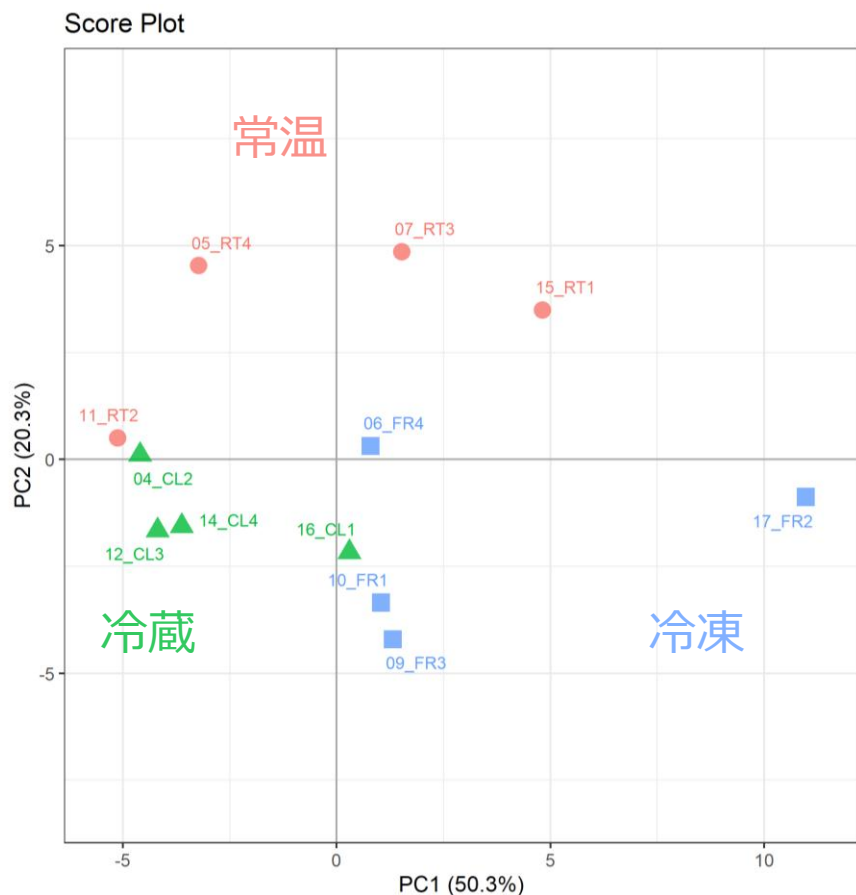
その他（4ピーク）

2-Pyrrolidione_1TMS
 Ethanolamine_3TMS
 Phosphoric acid_3TMS
 Putrescine_4TMS_major

合計 43 ピーク

※ インハウスライブラリによる類似検索結果
（EIマススペクトルおよび保持指標）

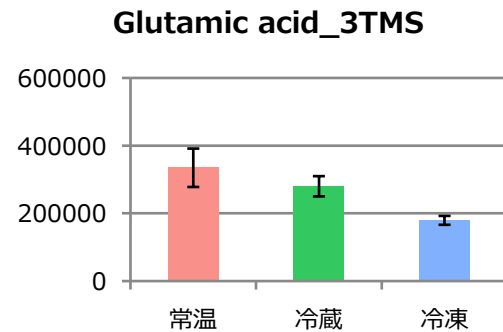
主成分分析結果



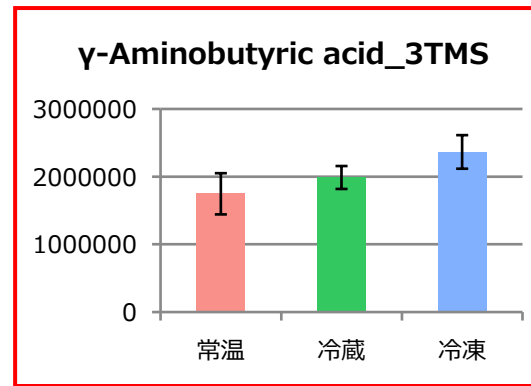
Transform: None | Scaling: Auto scaling | Filter: Unknown Excluded = TRUE

保蔵温度に応じたクラスターが確認 → 異なる代謝反応が観察された

保蔵温度依存的変化が見られた成分

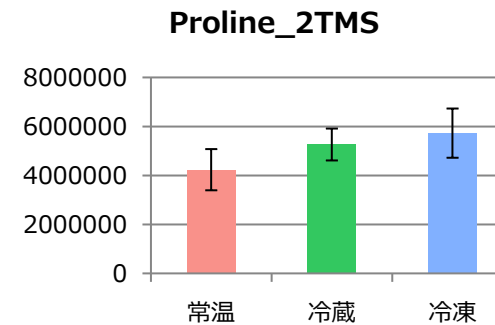
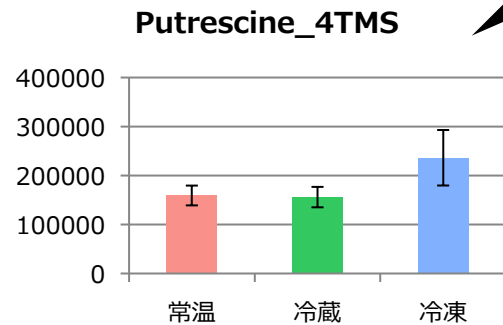


H⁺の消費による
酸性化抑制



低温ストレス耐性
(浸透圧調整、活性酸素の除去)

Δ1-Pyrroline

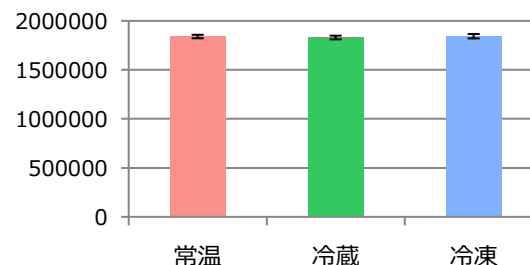


Xu M *et al.*, Front Plant Sci. (2022) doi: 10.3389/fpls.2022.1035414

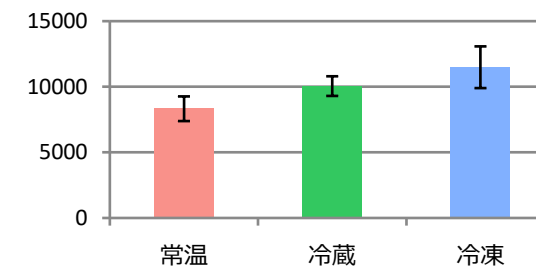
TCA回路

Oxaloacetic acid

Citric acid_4TMS

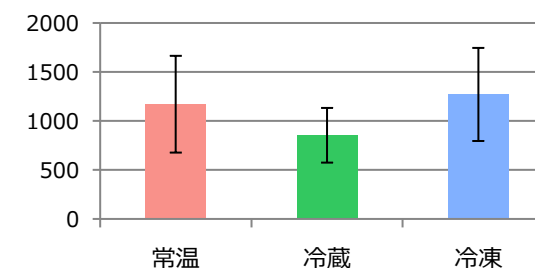


cis-Aconitic acid_3TMS



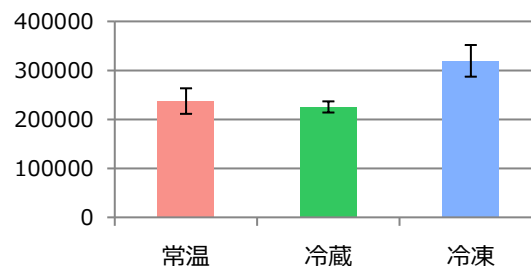
α-Isocitric acid

Oxoglutaric acid_1MO_2TMS



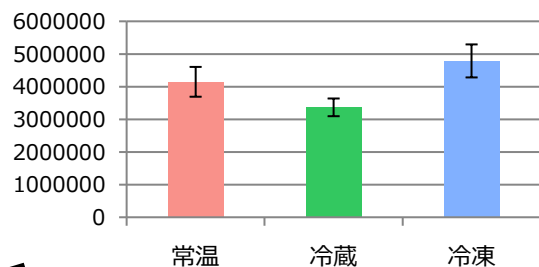
Succinyl-CoA

Succinic acid_2TMS

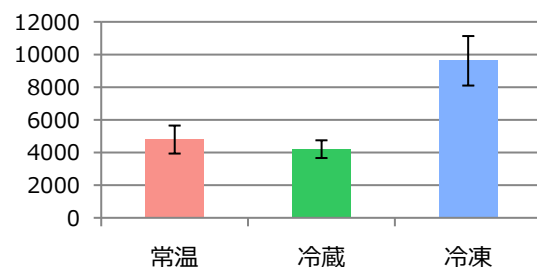


AiSTI SCIENCE

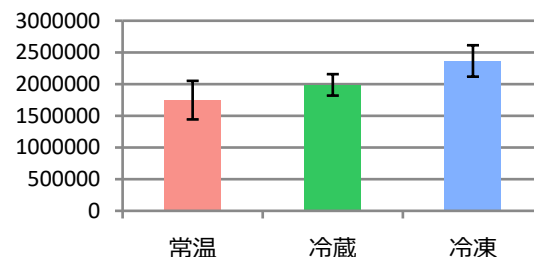
Malic acid_3TMS



Fumaric acid_2TMS



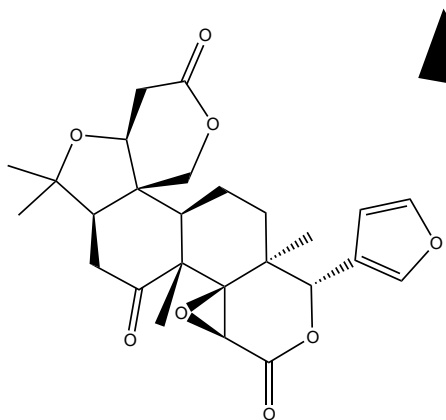
γ-Aminobutyric acid_3TMS



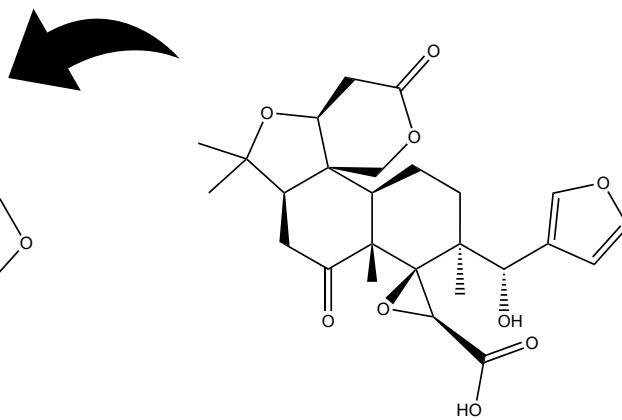
リモノイド類の検出

柑橘が冷凍障害などを受けると苦味成分であるリモノイド類が増加する

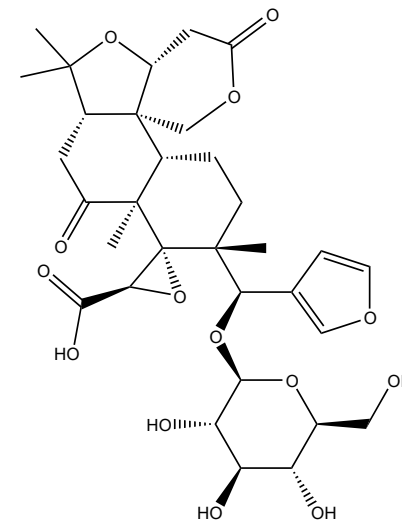
酸性、酵素反応



Limonin

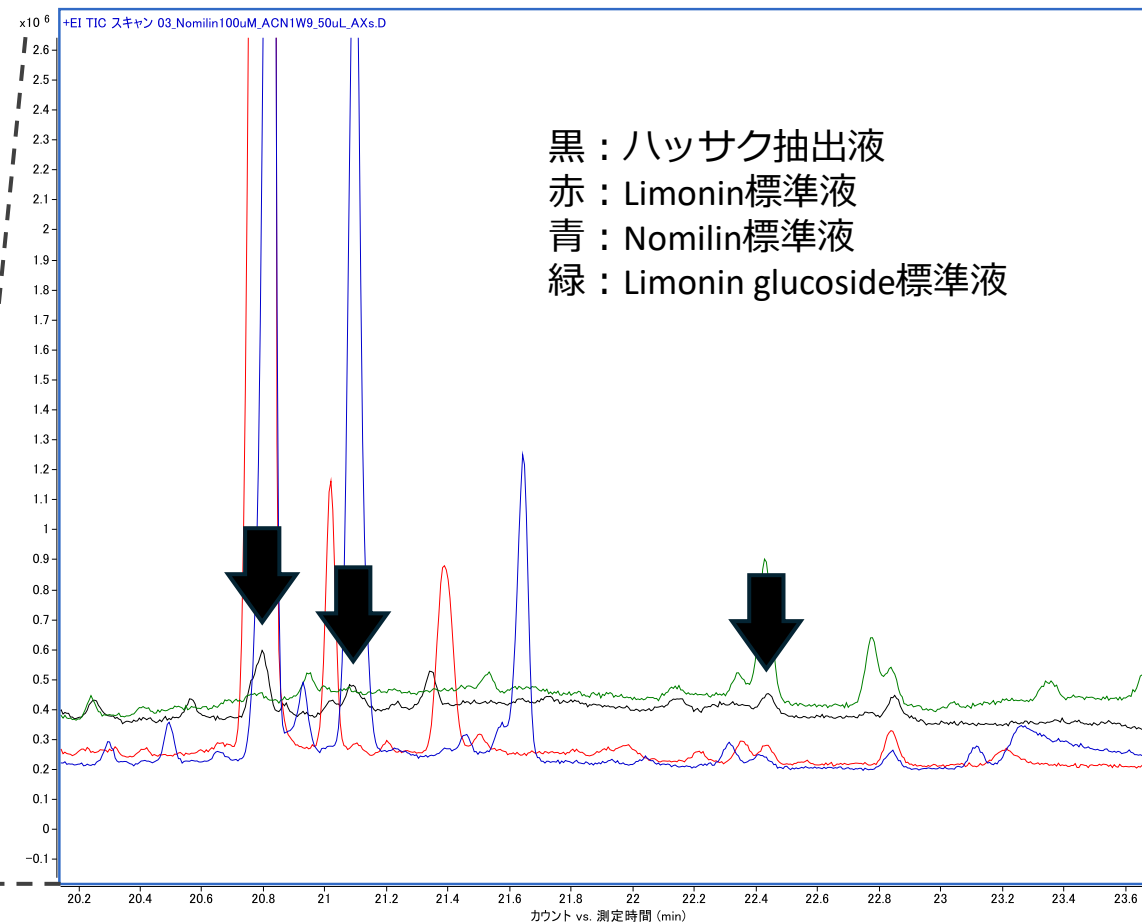
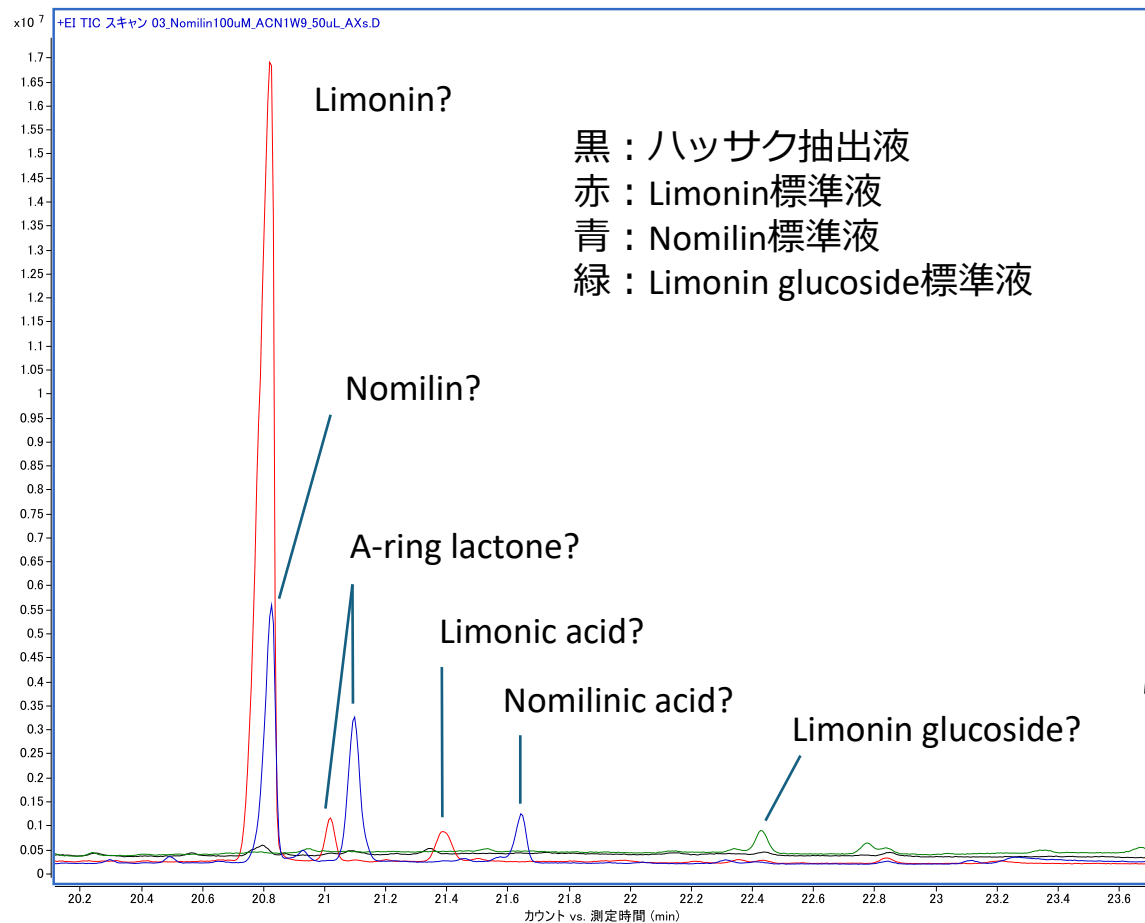


Limonoate A-ring lactone

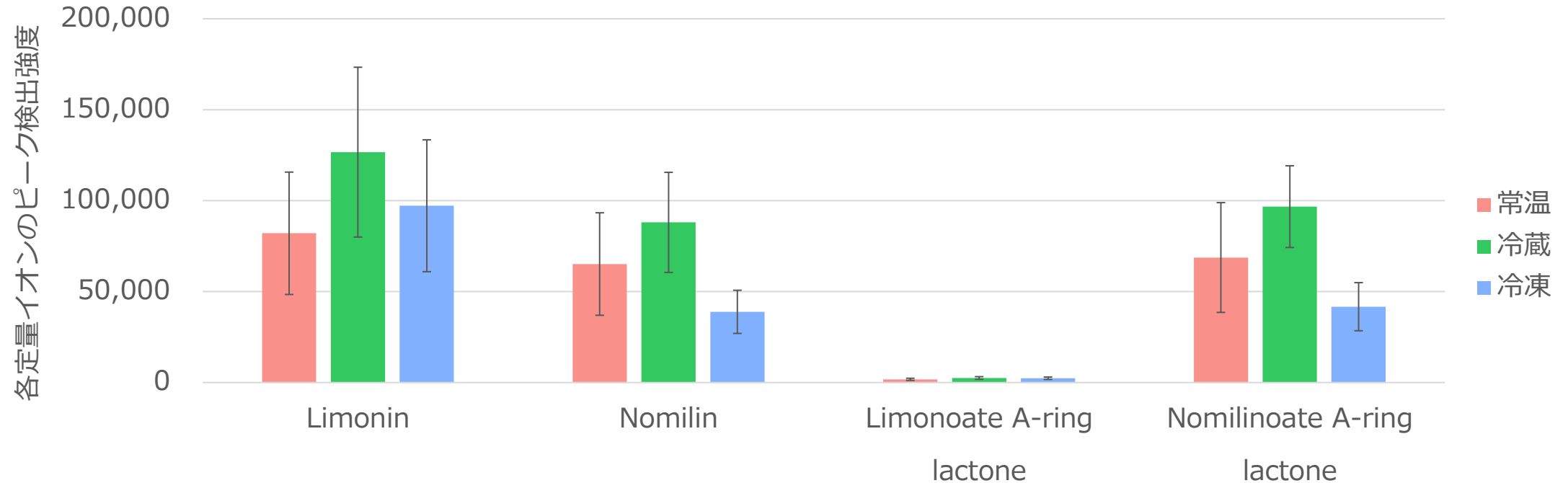


Limonin glucoside

トータルイオンクロマトグラム



保蔵温度条件に対するリモノイド類の検出強度



実試料からリモノイド類と推定されるピークを検出可能であった

まとめ

- オンラインSPE-GC/MSシステムおよび固相脱水誘導体化法によるメタボローム解析をハッサク果実に適用した。
- 炭水化物比率の高い果実においてもアミノ酸や有機酸などの成分を網羅的に検出することが可能であった。
- 主成分分析の結果、保蔵温度依存的に存在量に変化する成分を見出し、ハッサク果実が低温ストレスに適応する代謝反応が観察できた。
- オンラインSPE-GC/MSシステムが柑橘類の主要な苦味成分であるリモノイド類の検出にも適用可能であることを確認した。