

固相誘導体化研究会_第2回

2026年3月12-13日, 和歌山市

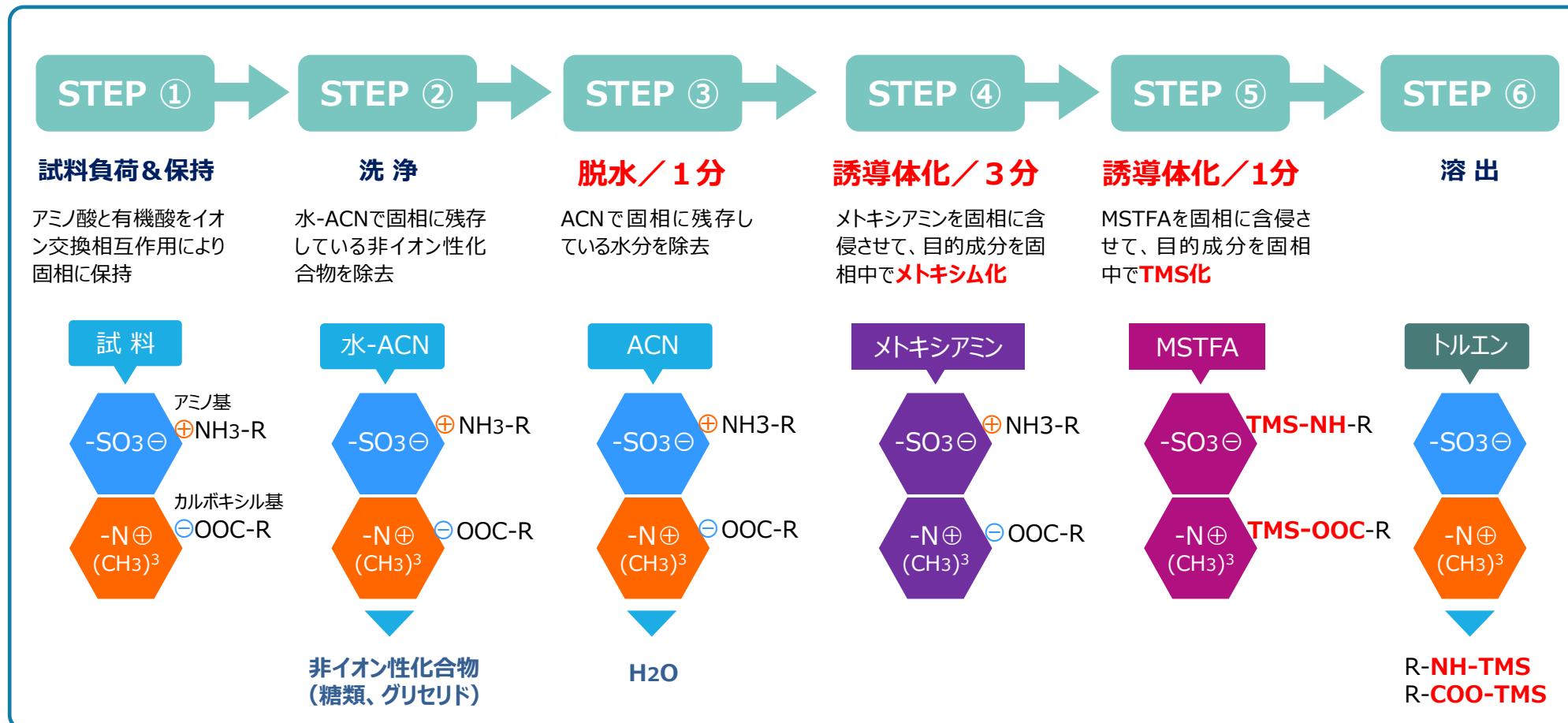
固相脱水誘導体化法 (SPDhD)の原理

TMS誘導体のスペクトルの解析 フラグメントイオンの計算

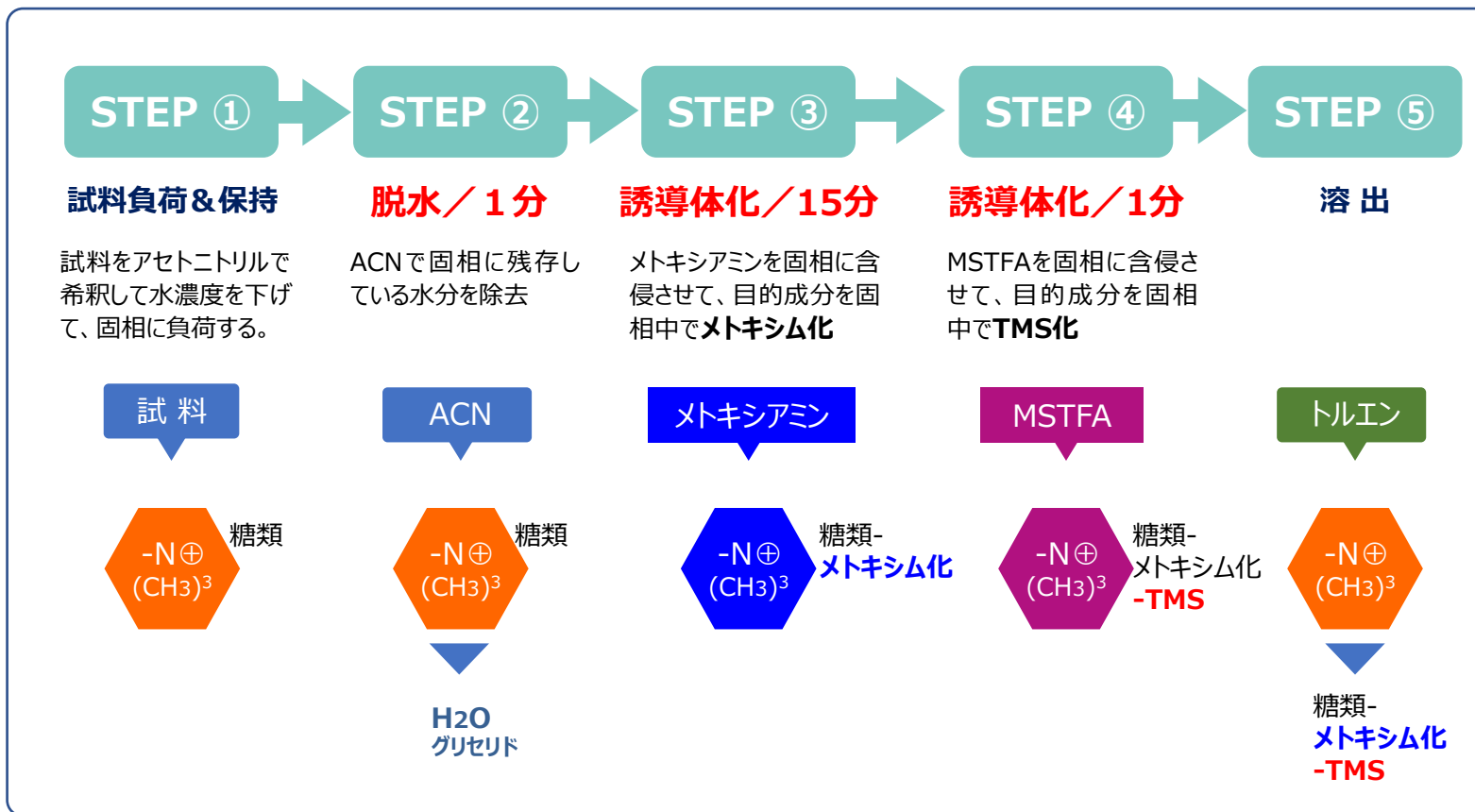
株式会社アイスティサイエンス
佐々野 僚一



固相脱水誘導体化法：アミノ酸/有機酸

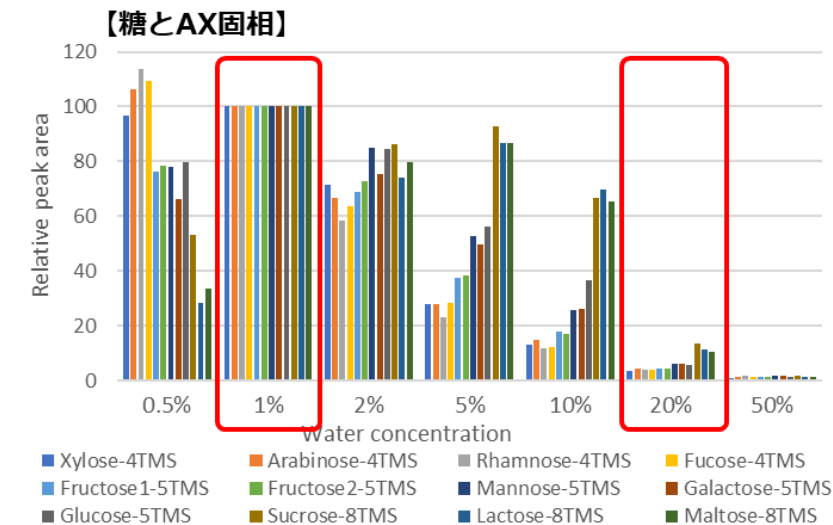


固相脱水誘導体化法：糖類



特許登録：（株）アイスティサイエンス

■ 試料負荷時の水濃度と固相への保持について



■ メトキシアミンによる誘導体化反応時間

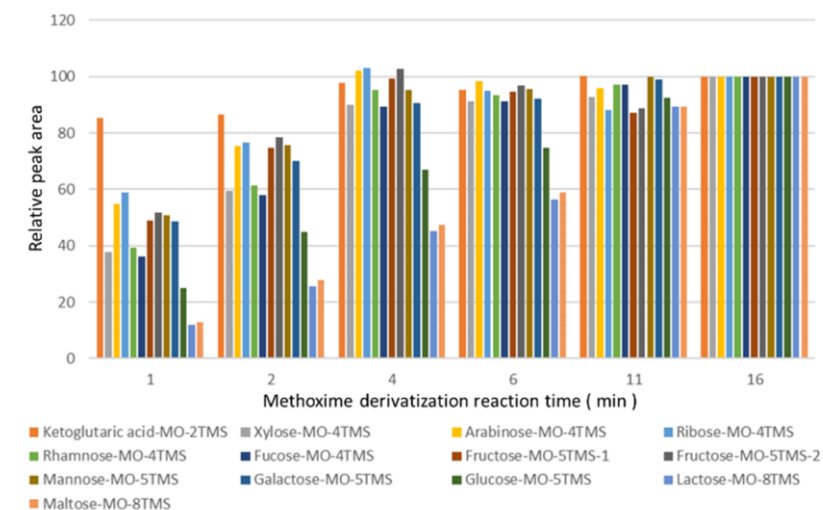
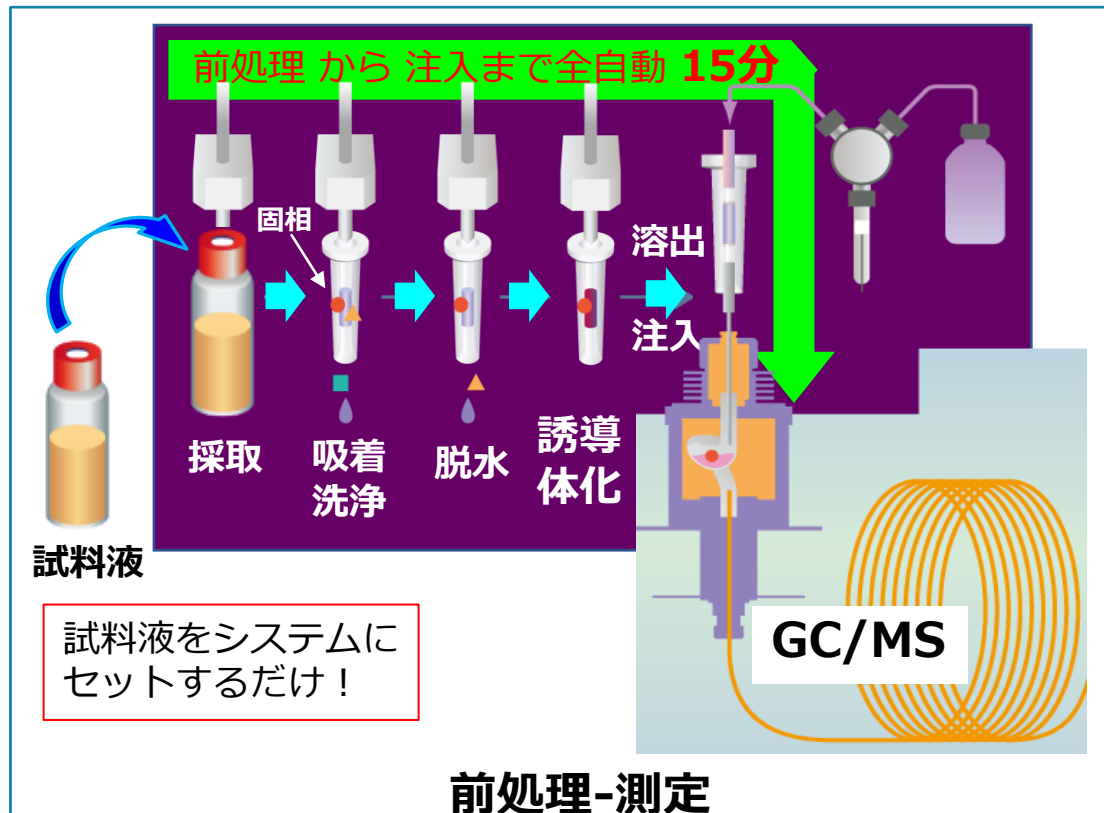


Fig. 3. Relations of methoxyamine derivatization reaction time in sorbent and the relative peak area

革新性2 固相からの溶出液を直接GCへ全量注入する「オンラインSPE-GC」の発明（特許）

■ 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。

■ 本システムによる社会的効果

- 分析の時間短縮により研究**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。



社会の研究/開発、
産業発展に大きく貢献

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

誘導体化からGC注入までの**時間が一定**

ポイント⑤

多検体の**ハイスループット**

```

graph TD
    A[血清 50μL] --> B[振とう抽出 (37℃, 30分)]
    B --> C[遠心分離 (1600rpm, 4℃, 3分)]
    C --> D[分取：上澄み 600μL]
    D --> E[添加：超純水 300μL]
    E --> F[遠心分離 (1600rpm, 4℃, 3分)]
    F --> G[分取：上澄み 400μL (MeOH/水の混液)]
    G --> H[減圧濃縮遠心分離 (1600rcf, 4℃)]
    H --> I[凍結：液体窒素]
    I --> J[凍結乾燥 (一晩：16時間)]
    J --> K[誘導体化試薬添加  
メトキシアミン/ピリジン溶液 100μL]
    K --> L[誘導体化反応 (30℃, 90分)]
    L --> M[誘導体化試薬添加：MSTFA 50μL]
    M --> N[誘導体化反応 (37℃, 30分)]
    N --> O[遠心分離 (1600 rcf, 4℃, 3分)]
    O --> P[分取：上澄み 100μL → バイアル]
    P --> Q[測定：GC/MS：注入1μL (スプリット 25:1)]
  
```

血清 50μL

添加：MeOH/H₂O/CHCl₃ 1000μL

振とう抽出 (37℃, 30分)

遠心分離 (1600rpm, 4℃, 3分)

分取：上澄み 600μL

添加：超純水 300μL

遠心分離 (1600rpm, 4℃, 3分)

分取：上澄み 400μL (MeOH/水の混液)

減圧濃縮遠心分離 (1600rcf, 4℃)

凍結：液体窒素

凍結乾燥 (一晩：16時間)

誘導体化試薬添加
メトキシアミン/ピリジン溶液 100μL

誘導体化反応 (30℃, 90分)

誘導体化試薬添加：MSTFA 50μL

誘導体化反応 (37℃, 30分)

遠心分離 (1600 rcf, 4℃, 3分)

分取：上澄み 100μL → バイアル

測定：GC/MS：注入1μL (スプリット 25:1)

The flowchart illustrates the sample preparation process for SPE-GC-MS:

- 血清 50 μ L** (Serum 50 μ L)
- 添加 : H_2O /ACN 1000 μ L (Addition: H_2O /ACN 1000 μ L)
- 振とう抽出 (37 $^{\circ}$ C, 30分) (Vortex extraction (37 $^{\circ}$ C, 30 min))
- 遠心分離 (1600rpm, 4 $^{\circ}$ C, 3分) (Centrifugation (1600rpm, 4 $^{\circ}$ C, 3 min))
- 分取 : 上澄み 250 μ L (Aliquot: Supernatant 250 μ L)
- 添加 : 超純水 250 μ L (Addition: Ultrapure water 250 μ L)
- バイアル** (Vial)
- 装置にセットしてスタートボタンを押すだけ！ (Simply set the device and press the start button!)

オンライン固相誘導体化SPE-GC-MS (Online solid-phase derivatization SPE-GC-MS)

自動前処理時間 10~25 分 (Automatic pretreatment time 10~25 min)

SGI-M100

試料 40 μ L (Sample 40 μ L)

精製脱水 (Purification and dehydration)

誘導体化 (Derivatization)

LVI-S250 Spiral Insert スプリット 50:1 (LVI-S250 Spiral Insert Split 50:1)

GC-MS

MS導入量 試料 25 μ g相当 (MS introduction amount: Sample equivalent to 25 μ g)

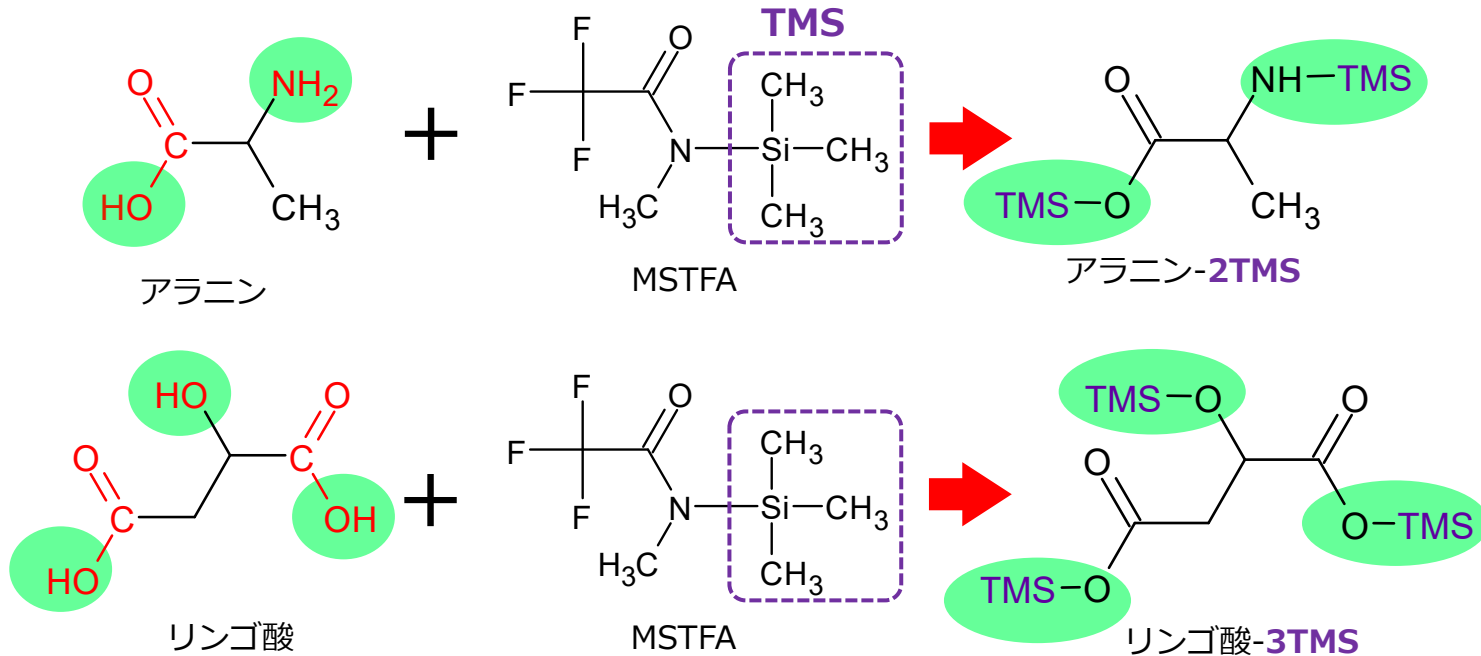
アミノ酸と有機酸のTMS化

TMS化：反応する官能基 $-\text{OH} > -\text{Phenol} > -\text{COOH} > -\text{NH}_2$

反応するアミンについて： $\text{R}-\text{NH}_2 > \text{R}-\text{NH}-\text{R}$

参考文献：

小川茂, ぶんせき, 2006, 7, 332-336

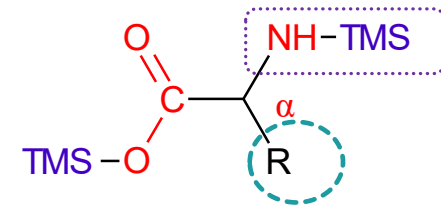


TMS化により揮発しにくい目的成分を気化しやすい物質に変化させることで、GCMSでの測定が可能となる。

★アミノ酸のTMS化について

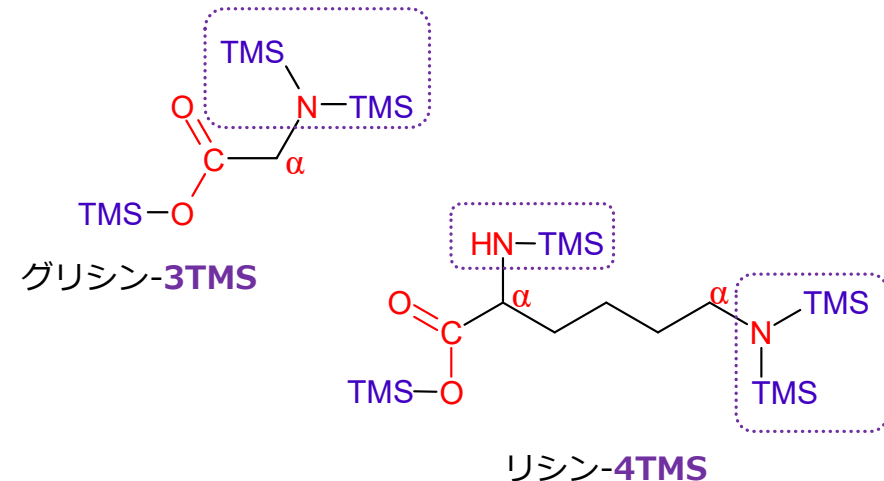
■ α 炭素にRが結合している場合

アミンには**1つのTMS**しか結合しない。

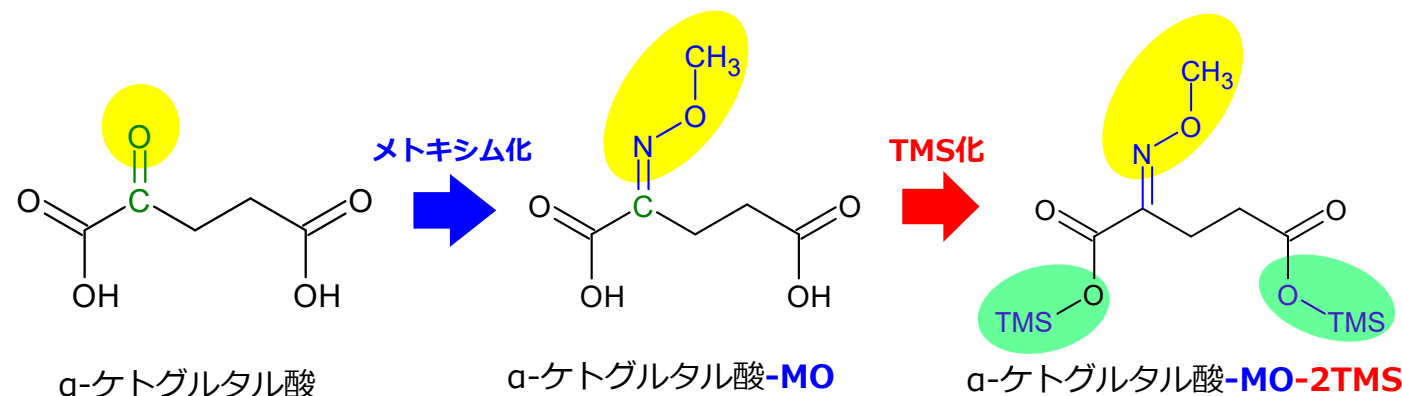
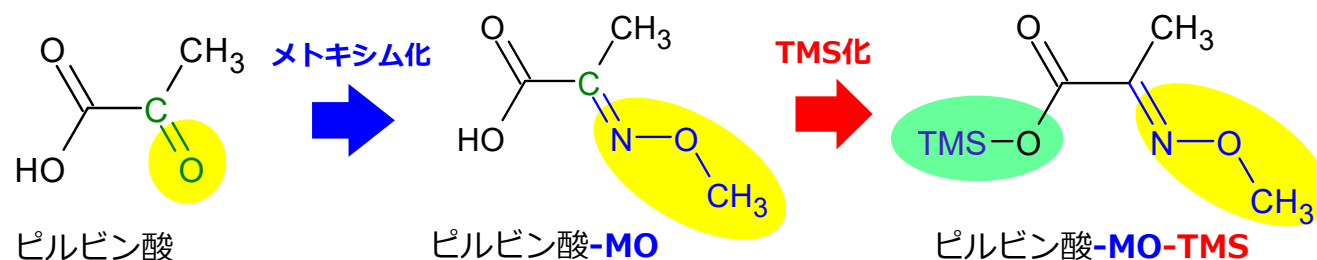
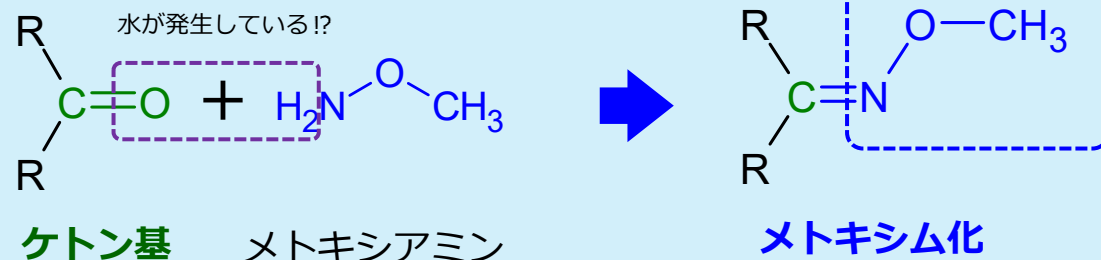


■ α 炭素にRが結合していない場合

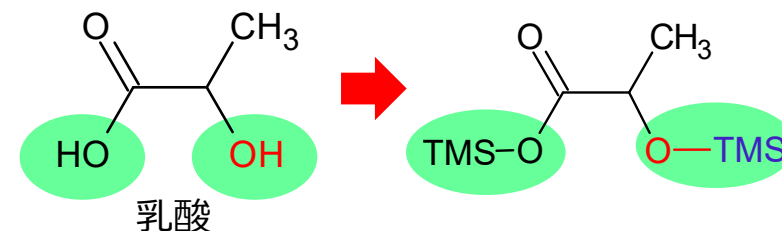
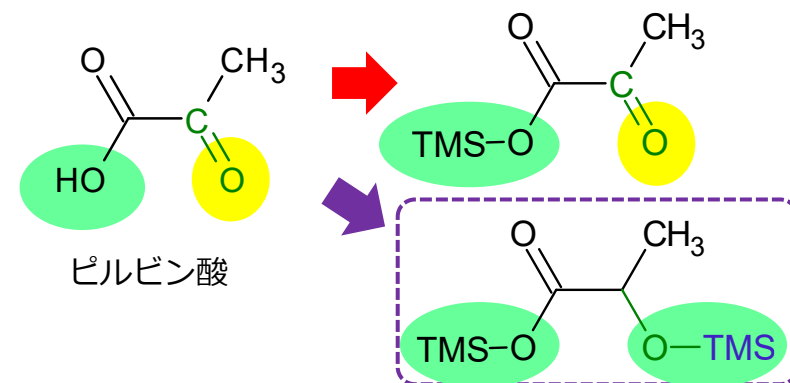
アミンには**2つのTMS**が結合する。



メトキシム化について



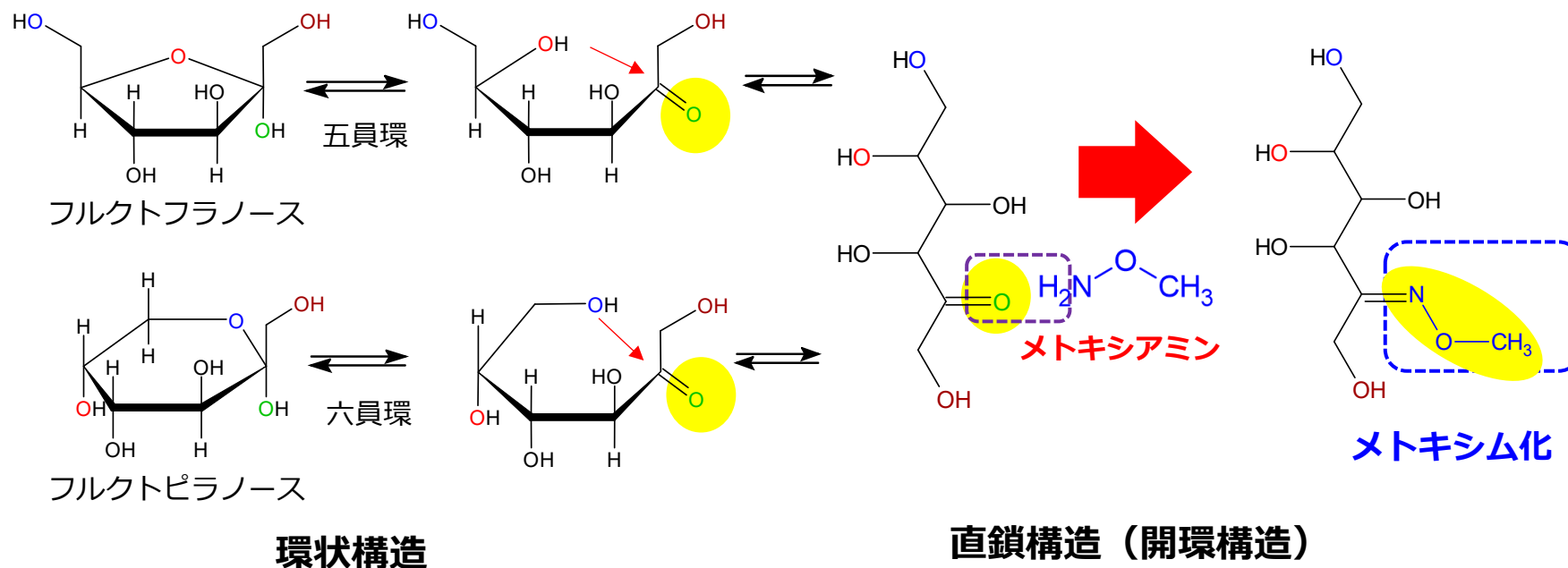
■ メトキシム化しなかったら



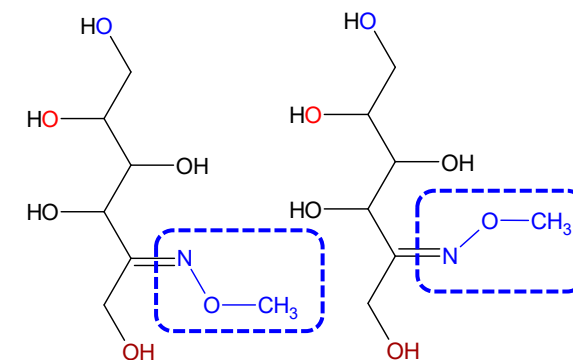
ピルビン酸-2TMSと乳酸-2TMSが同じ構造となり
どちら由来のものか判断できない。

糖類の異性体とメトキシム化

■フルクトースの場合



■メトキシム化では
2本のピークが出現しやすい

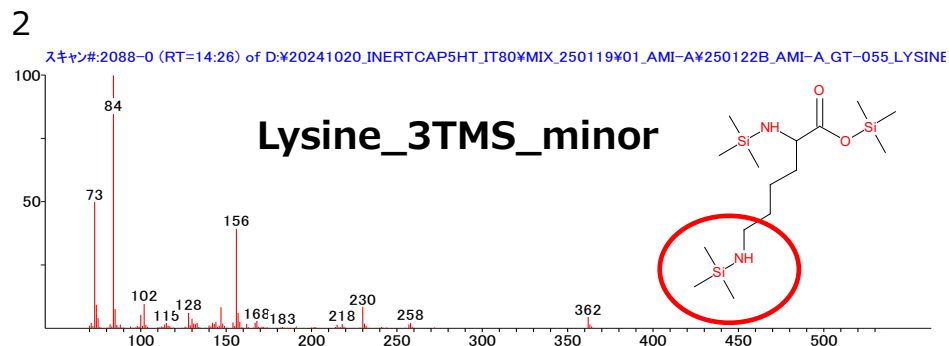
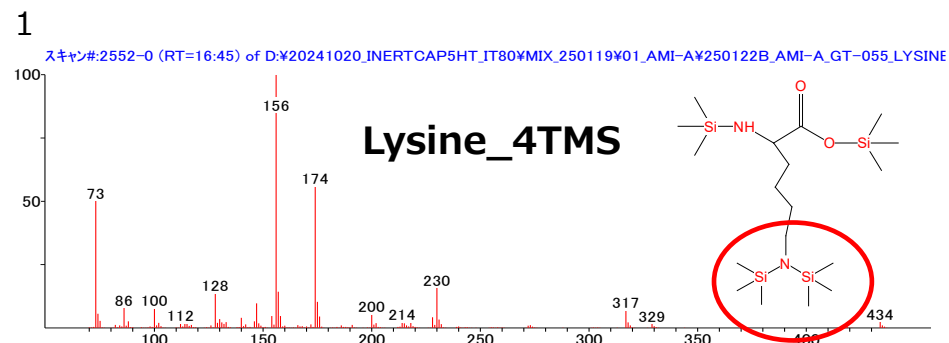
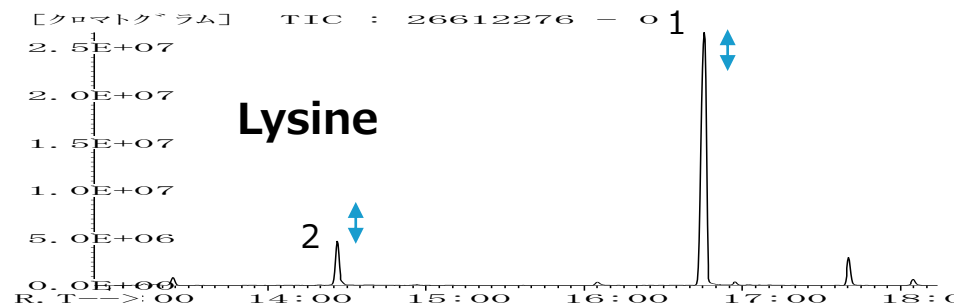


糖類は多くの異性体を持つため、そのままTMS化するとピークがいくつも出現してしまう。

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。

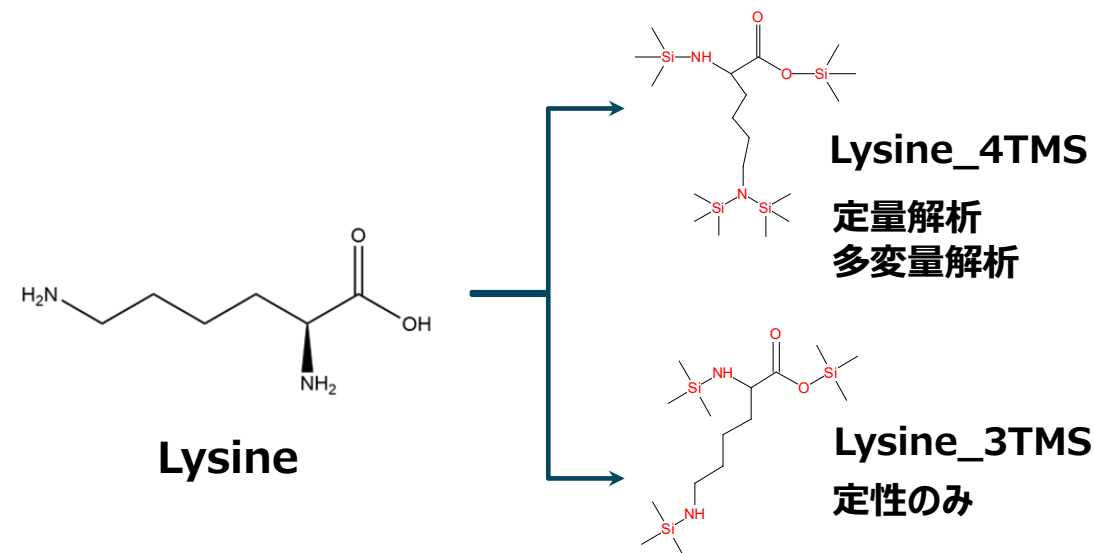
解析について

■ SCAN Total Ion Chromatograph



■ それぞれのピーク面積値と再現性について（仮）

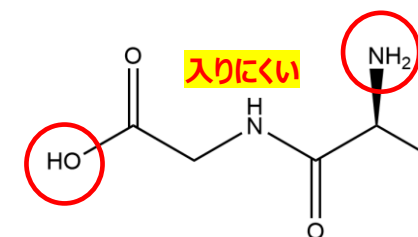
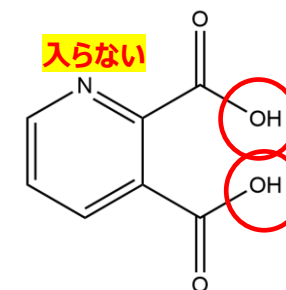
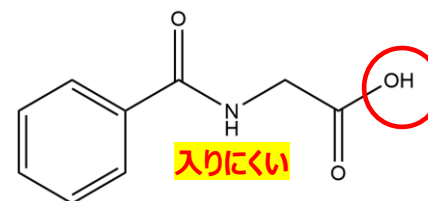
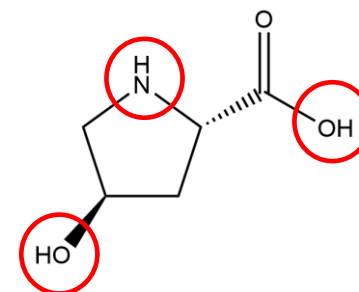
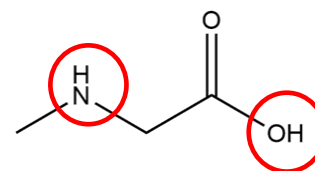
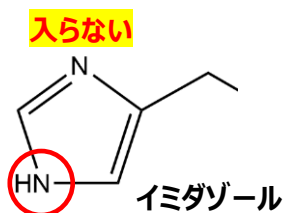
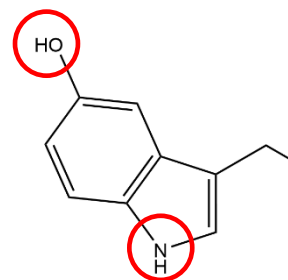
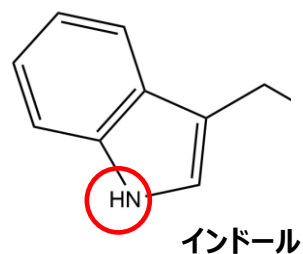
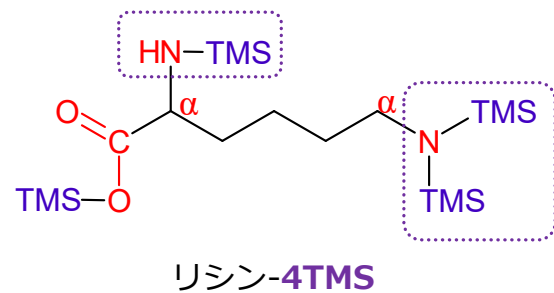
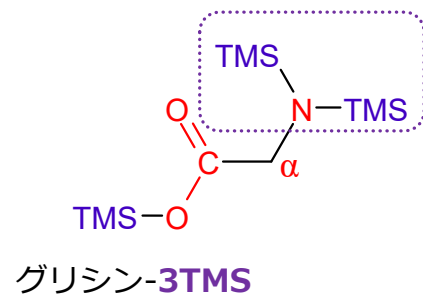
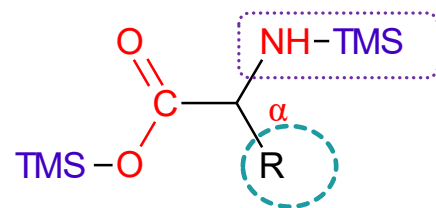
誘導体化物	1	2	3	4	5	Ave.	RSD
Lysine_4TMS	9,500	9,250	9,000	8,750	8,500	9,000	4.4
Lysine_3TMS	500	750	1,000	1,250	1,500	1,000	39.5



ピークが小さいLysine_3TMSは前処理で派生したもの。
試料中のLysineの挙動を知るには、ピークが大きいLysine_4TMSで十分である。
但し、網羅的定性分析を行う上で、出現したピークがLysine_3TMSであるということ
を認識して、解析から外すことが大事。

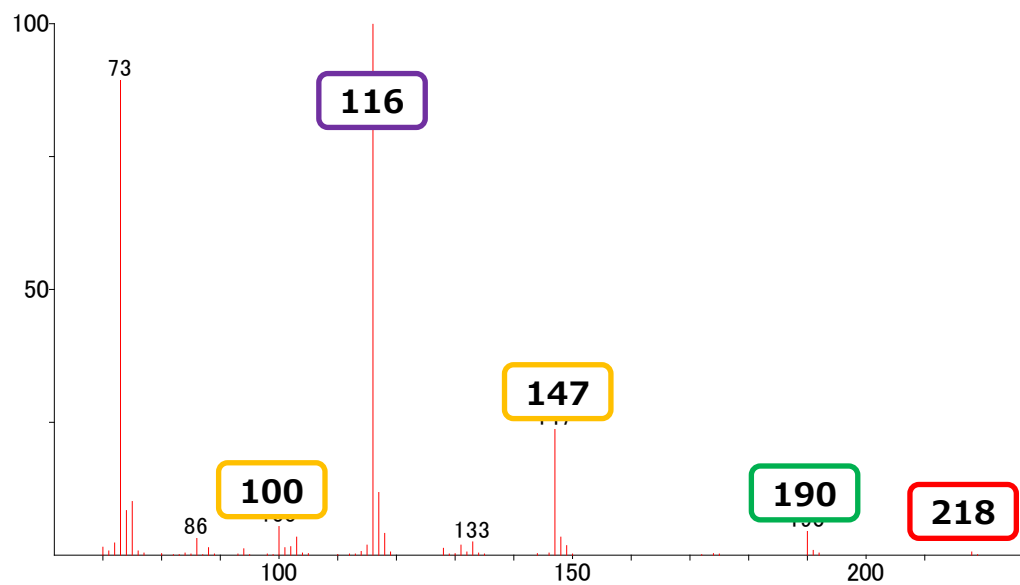
構造式とTMS化

2つのピークが検出される時がある



アミノ酸のフラグメントパターン

Alanine-2TMS

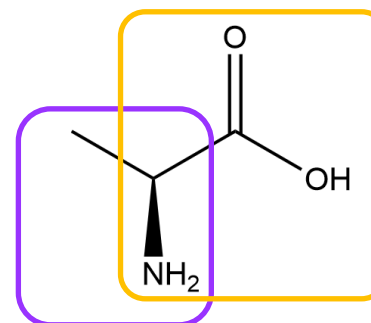


アミノ酸-MWフラグメントイオン

アミノ酸	MW	TMS	D-MW	CH3	?	TMS-COO-
	89	72	2	15	43	117
				218	190	116

アミノ酸-必須フラグメントイオン

100	-CH-NH ₂
147	
218	※NH(TMS)の場合

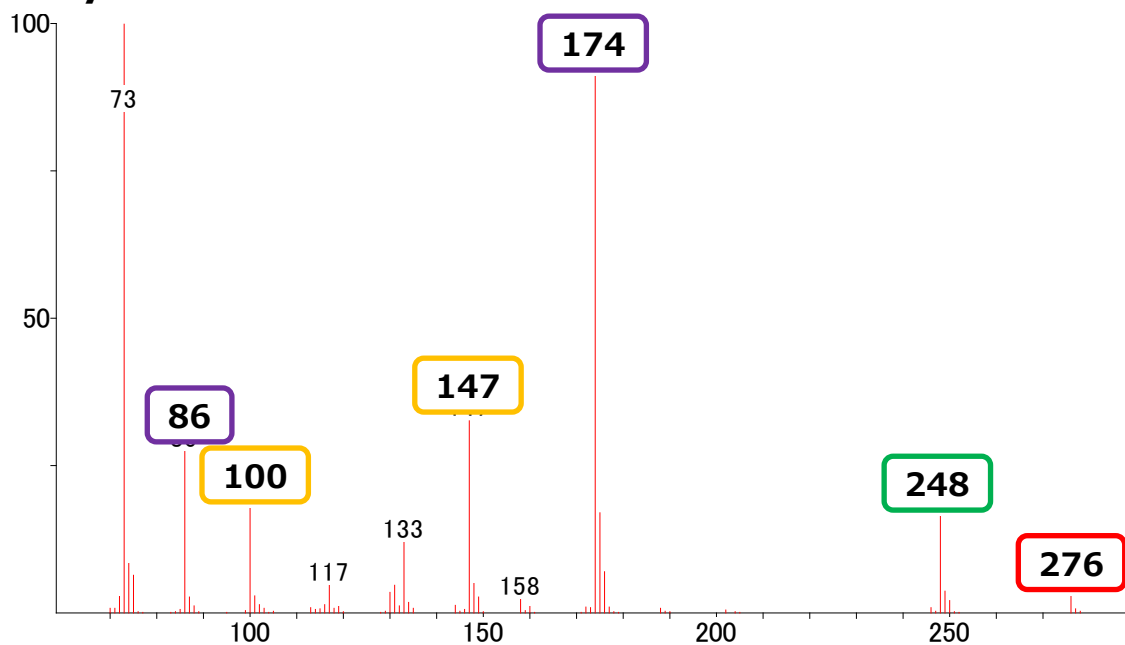


NH ₂ -CH ₂ -CO-O-TMS	
147	

TMS-NH-CH-CO-O-TMS	
218	

アミノ酸のフラグメントパターン

Glycine-3TMS



アミノ酸-MWフラグメントイオン

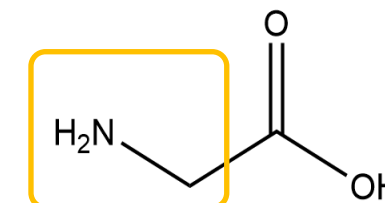
アミノ酸	MW	TMS	D-MW	CH3	?	TMS-COO
	75	72	3	15	43	117
				276	248	174

アミノ酸-必須フラグメントイオン

100	-CH-NH ₂
147	
218	※NH(TMS)の場合

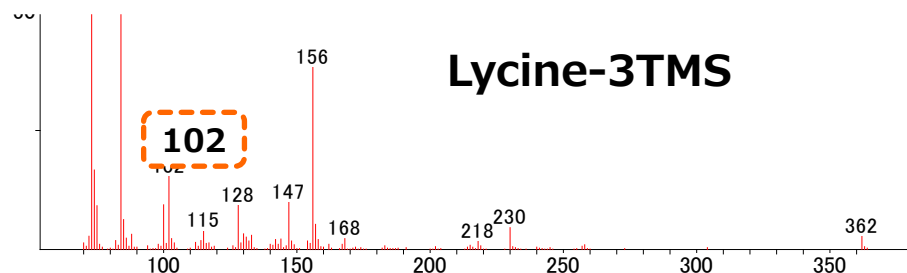
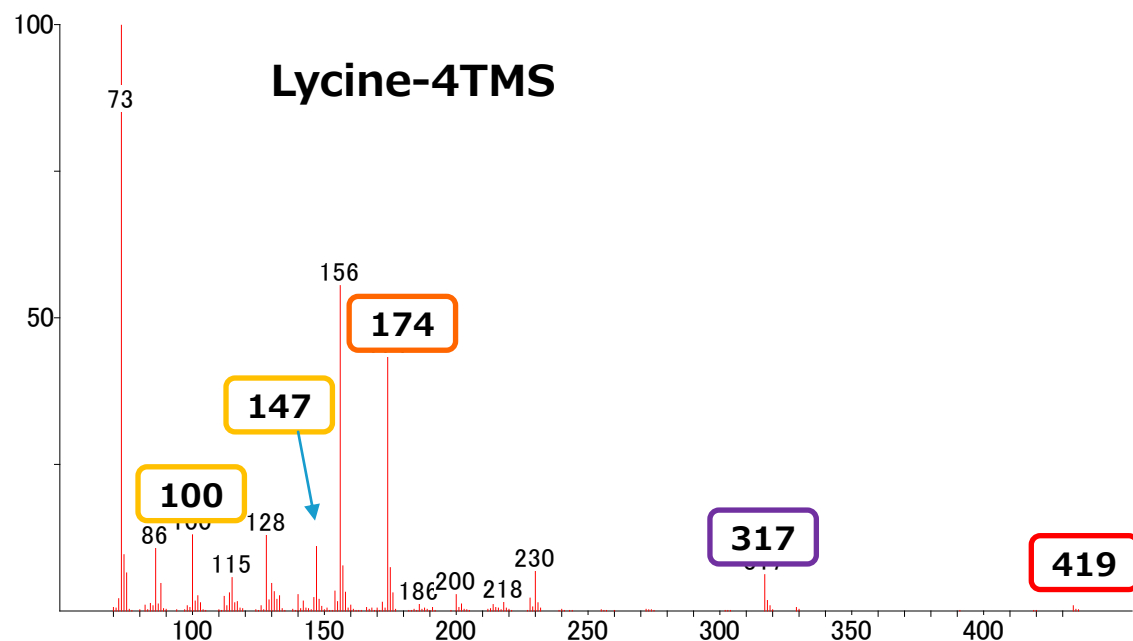
アミン-必須フラグメントイオン

174	
100	-CH ₂ -N(TMS) ₂
86	



アミノ酸のフラグメントパターン

化合物名: Lysine_4TMS_major



アミノ酸-MWフラグメントイオン

						CH3	?	TMS-COO-
アミノ酸	MW		TMS		D-MW	15	43	117
	146	+	72	x	4	=	434	419
							391	317

アミノ酸-必須フラグメントイオン

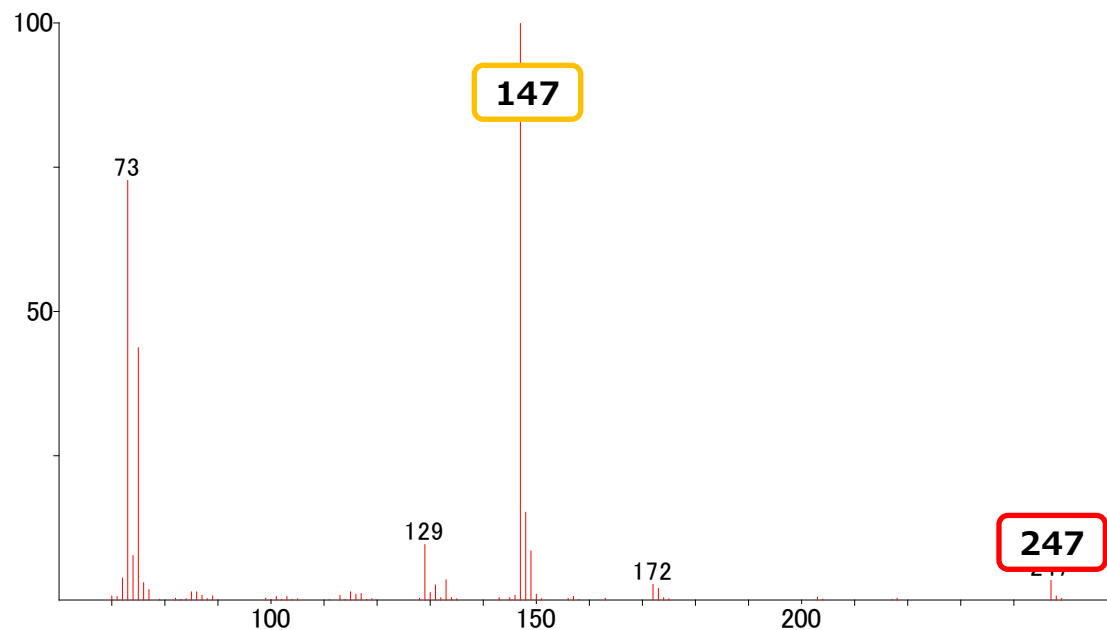
100	-CH-NH ₂
147	
218	※NH(TMS)の場合

アミン-必須フラグメントイオン

174	
100	-CH ₂ -N(TMS) ₂
86	

有機酸のフラグメントパターン

Succinic acid-2TMS



有機酸-MWフラグメントイオン

																	CH3
有機酸	MW			TMS				MO								D-MW	15
	118.00	+	72	x	2	+	29	x	0	=	262					247	

有機酸-必須フラグメントイオン

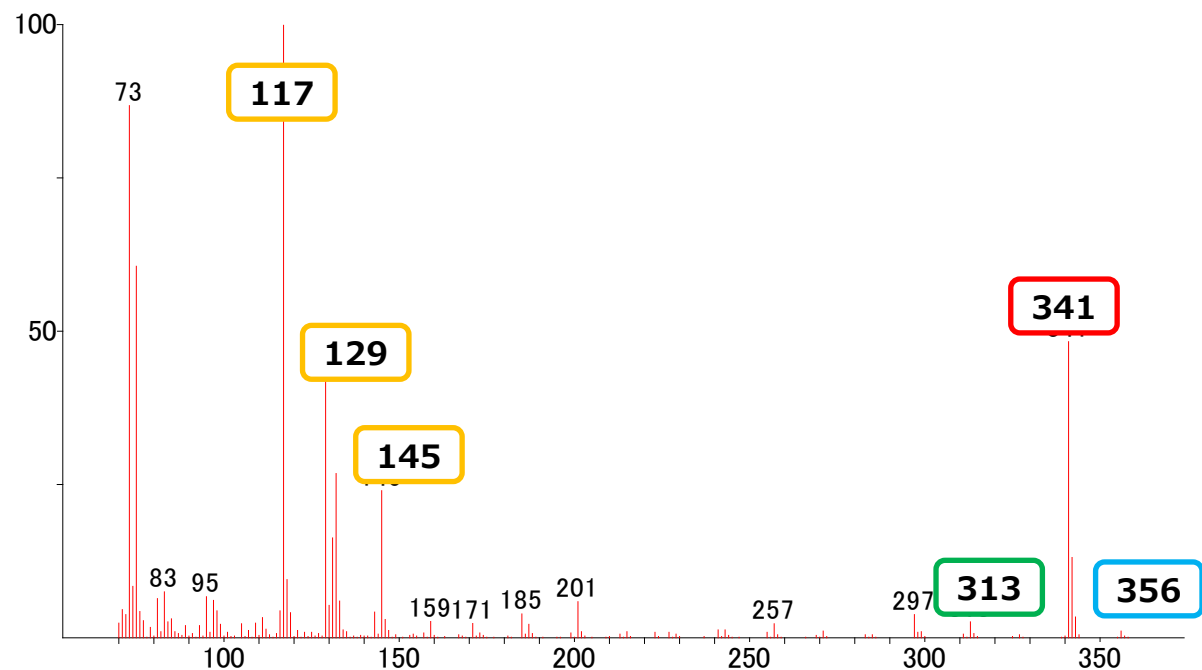
ジカルボン酸	147
-OHx2	147
-COOHx-OH	147

メトキシム化-必須フラグメントイオン

89

脂肪酸のフラグメントパターン

Stearic acid-TMS



脂肪酸-MWフラグメントイオン

								CH3	
脂肪酸	MW						D-MW	15	43
	284	+	72	x	1	=	356	341	313

脂肪酸-必須フラグメントイオン

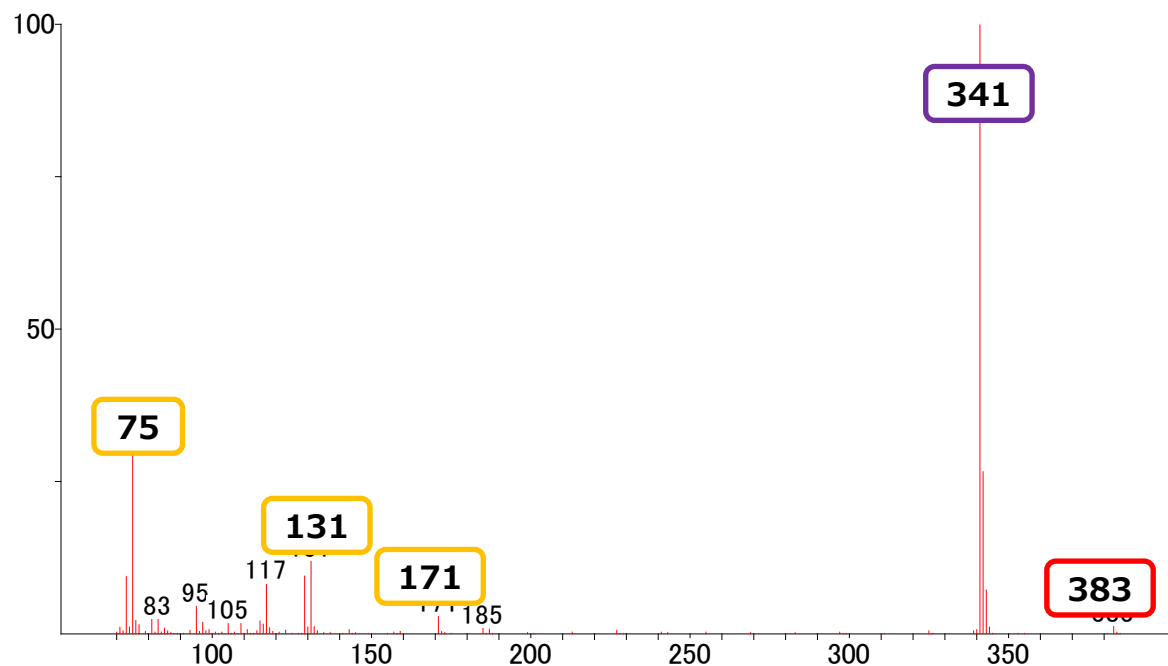
117
129
145

メトキシ化-必須フラグメントイオン

89

脂肪酸-TBDMS化のフラグメントパターン

Stearic acid-TBDMS



脂肪酸-MWフラグメントイオン

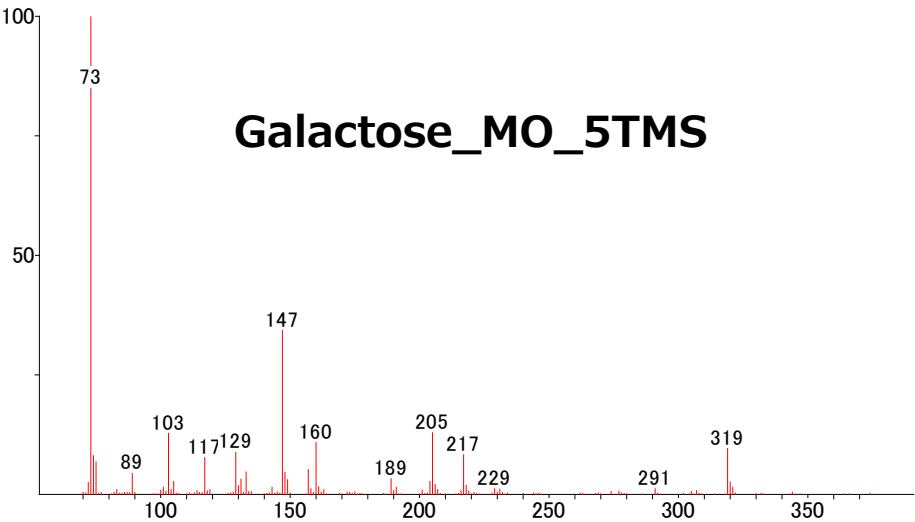
脂肪酸	MW									-C3H7	-CH3
	284	+	114	x	1	=	398			57	15
										341	383

脂肪酸TBDMS-必須フラグメントイオン

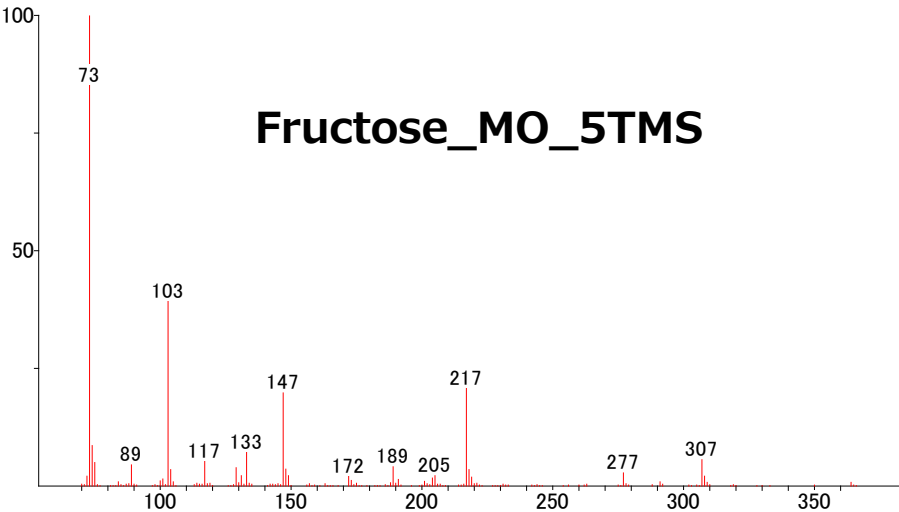
75
131
171

糖類のフラグメントパターン（検討中）

化合物名: Galactose_1MO_5TMS_major



化合物名: Fructose_1MO_5TMS_1



脂肪酸-MWフラグメントイオン

糖類-フラグメントイオン

89	89	89	89	
160	160		160	
103		103		103
	117			
147		147	147	147
			205	
217		217		217
	277			
307		307		
			319	319

環状
240

糖類メトキシム化-必須フラグメントイオン

89	
160	フルクトースを除く

15	45	=N-O-CH3
16		
14		
13	58	HO
13	71	
16	87	
73	160	