

固相誘導体化によるメタボローム分析の前処理と その自動化に関する最新情報



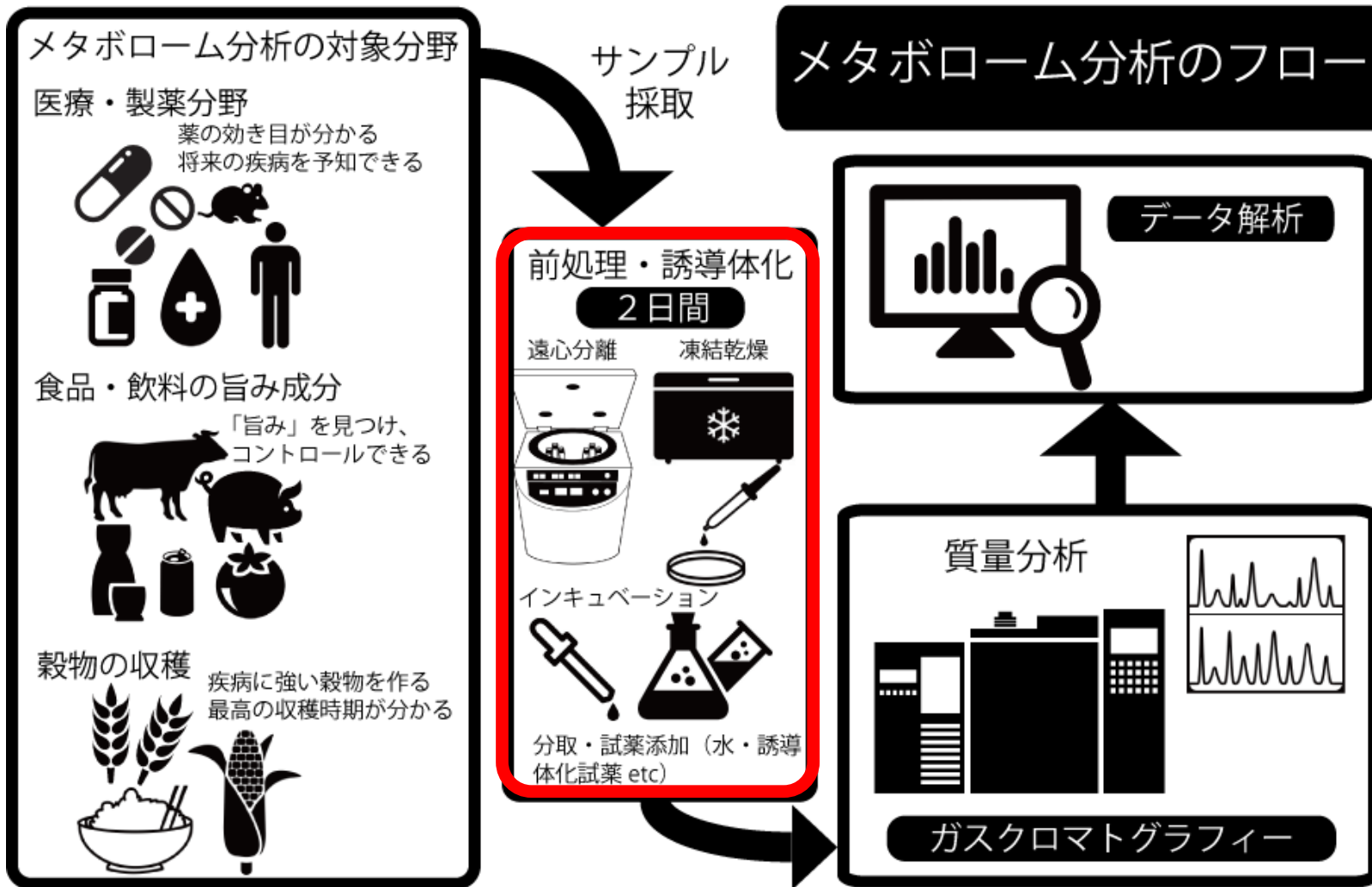
2023年6月23日

株式会社アイスティサイエンス

松尾俊介

Beyond your Imagination

メタボローム分析の例 (GC/MS)



GC/MSを用いたメタボローム分析の課題

従来のメタボローム分析の課題

■ 前処理操作について

遠心濃縮・凍結乾燥・誘導体化等
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

■ 多検体の測定について

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ふ。



固相誘導体化法による
迅速化・自動化



SPE-GCによる誘導体化から測定までの
オンライン化

課題を克服しGC/MSのメリットを最大限に生かせる！
高感度、高分離、一斉分析、データベース、装置高普及率

本研究の目的

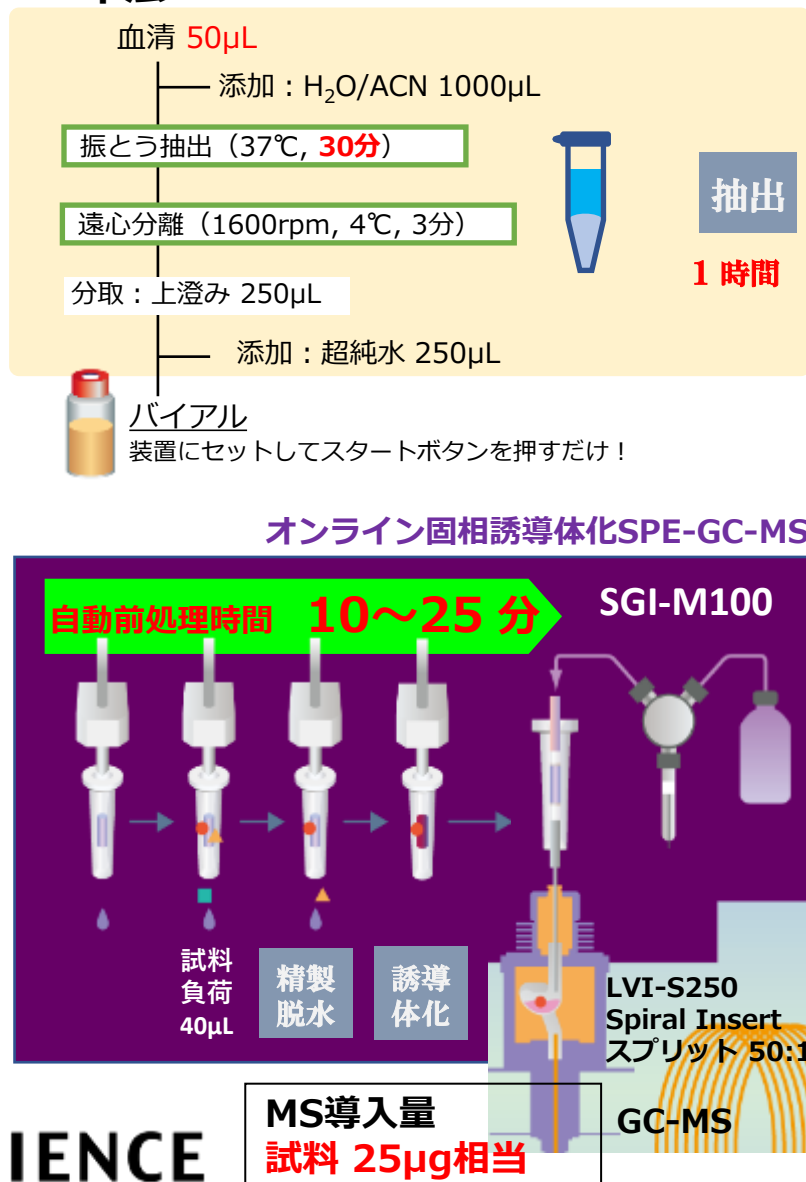
固相誘導体化法を用いたオンラインSPE-GC/MSシステムの開発

従来法と本法の前処理比較

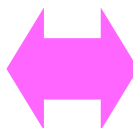
■ 従来法



■ 本法

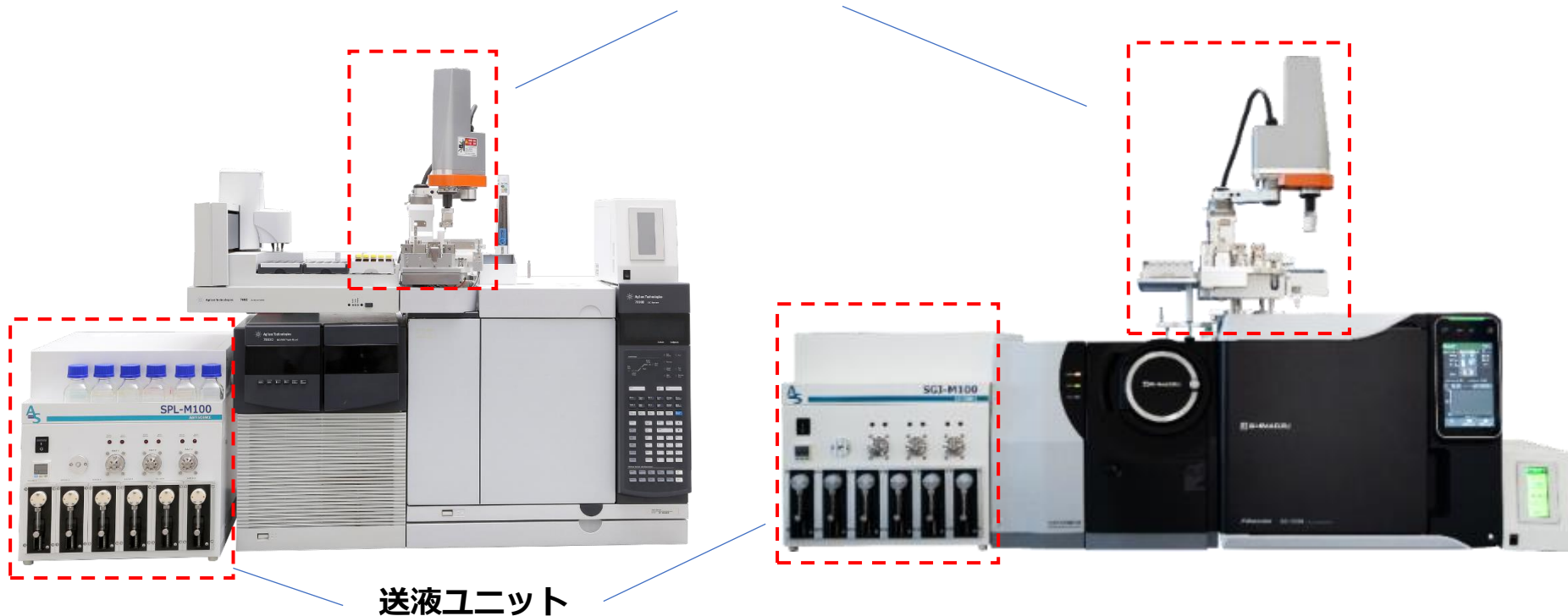


20 時間



オンラインSPE-GC-MSシステム

前処理ユニット

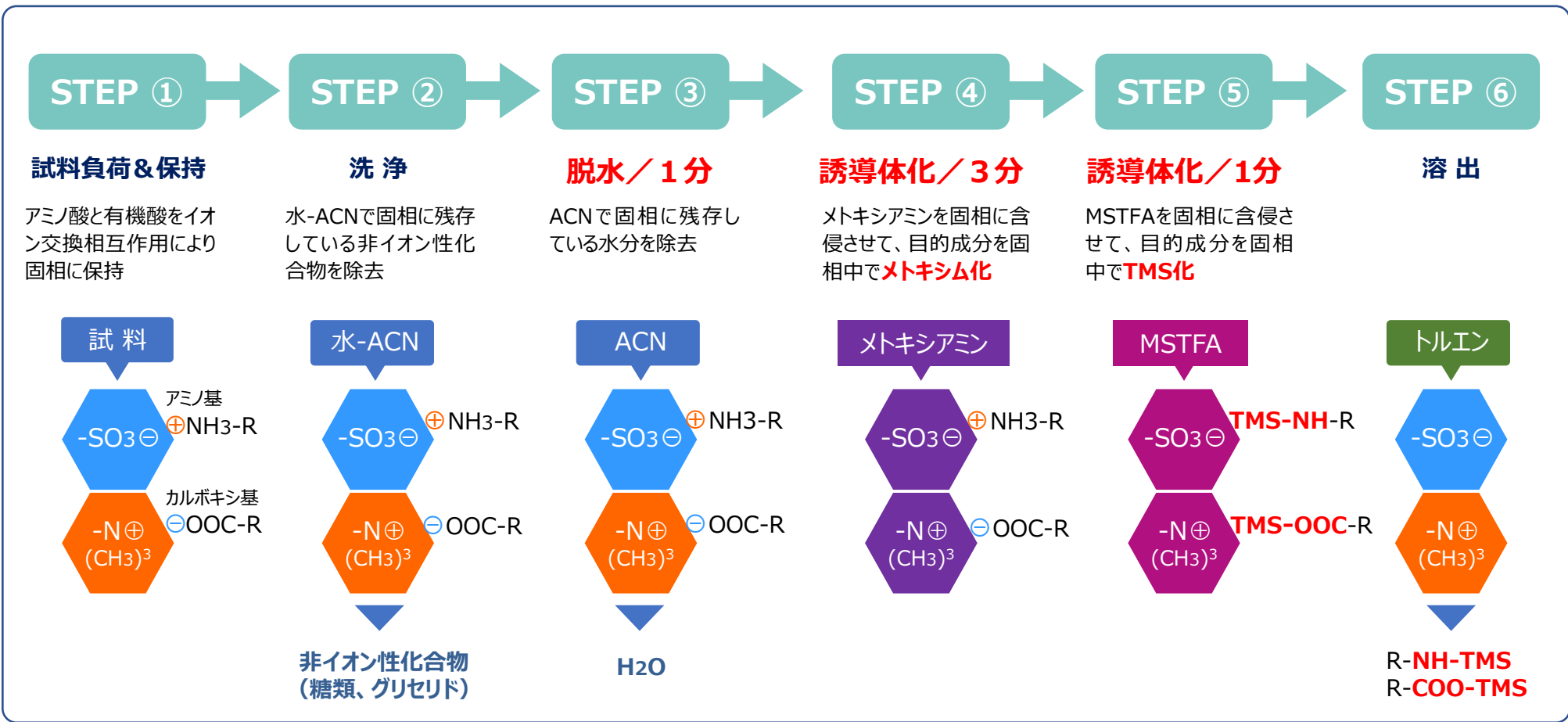


送液ユニット

SPL-M100とアジレント社製GCMS

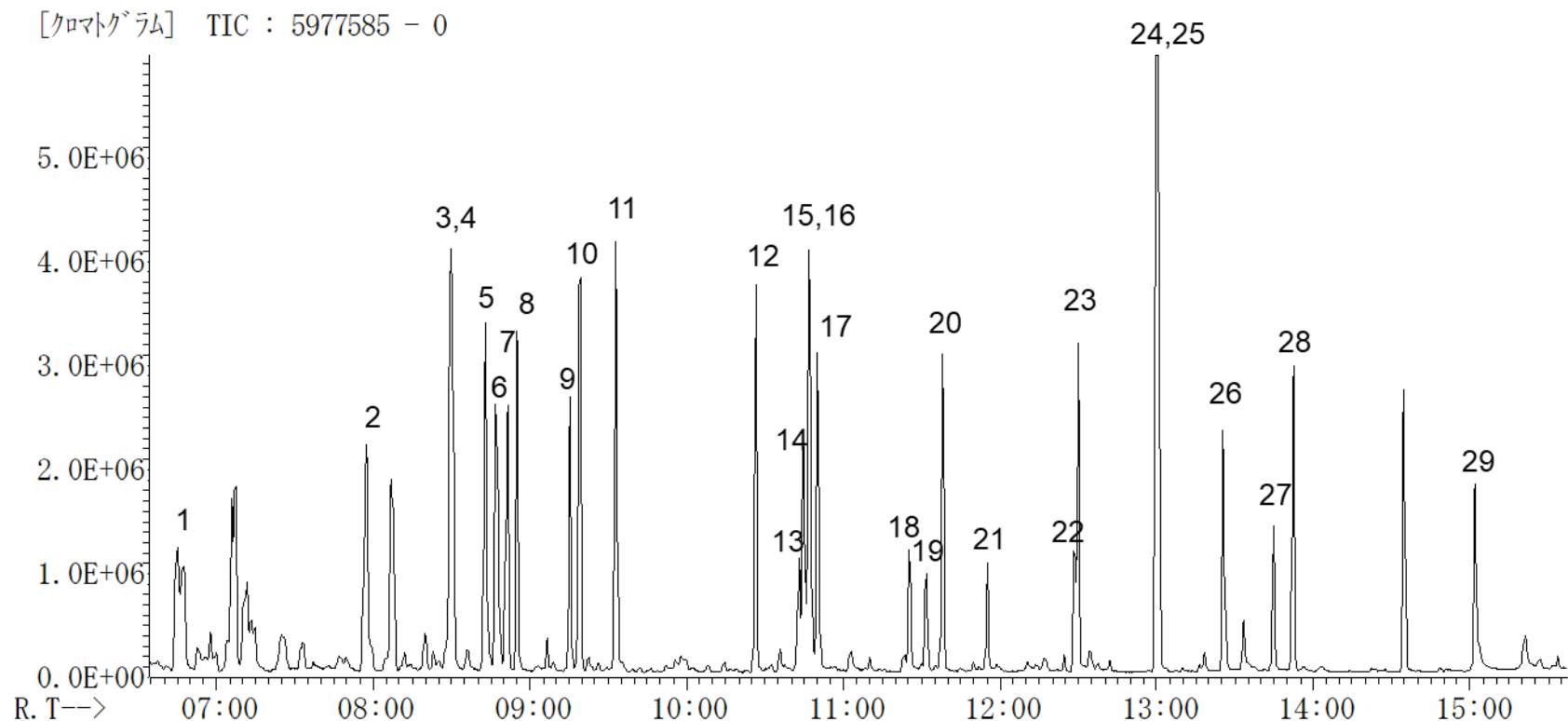
SPL-M100と島津社製GCMS

固相誘導体化法：アミノ酸/有機酸



特許登録：(株)アイスティサイエンス

本法によるアミノ酸・有機酸のSCAN-TIC



- | | | | | | |
|--------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|-------------------|
| 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

アミノ酸、有機酸メソッドでの再現性、耐久性試験 マウス血清 100回の連続測定×2回

	RT	マウス血清 Lot.1 100回		マウス血清 Lot.2 100回	
		average	%RSD	average	%RSD
Lactic acid 2TMS	2.74	1688847	5.0	1853041	6.2
Alanine 2TMS	3.06	587522	2.7	740790	2.2
Malonic acid 2TMS	3.79	31366	3.8	40091	3.8
Valine 2TMS	3.87	237318	2.5	298638	2.2
Benzoic Acid, TMS	4.13	7221	8.7	7318	8.5
Leucine 2TMS	4.27	469204	2.6	590823	2.0
Isoleucine 2TMS	4.42	102421	2.4	130129	2.2
Proline 2TMS	4.46	309139	3.9	407225	2.4
Maleic acid 2TMS	4.50	69701	4.1	88390	4.0
Glycine 3TMS	4.51	294420	4.2	370639	4.0
Succinic acid 2TMS	4.57	54141	2.0	66357	2.1
Serine 3TMS	4.87	185988	3.3	233449	3.8
Threonine 3TMS	5.04	86354	3.3	107792	3.9
Malic acid 2TMS	5.69	1857	7.2	2407	6.7
Methionine 2TMS	5.89	23333	11.8	32971	9.8
Aspartic acid 3TMS	5.89	101645	2.8	128257	6.2
Glutamic acid 3TMS	6.49	428765	5.8	552463	6.5
Phenylalanine 2TMS	6.53	102432	3.2	132811	2.7
Citric acid 4TMS	7.57	47365	4.0	59399	5.5
Lysine 4TMS	8.10	71583	4.4	95368	5.6
Tyrosine 3TMS	8.19	196160	3.5	248644	4.6
Palmitelaidic acid, TMS	8.60	26320	6.7	25599	6.5
Palmitic Acid, TMS	8.69	168891	4.2	169496	4.2
Cysteine 3TMS	9.62	5876	9.5	9146	8.4

マウス血清 Lot.1を100回連続測定し、その1週間後マウス血清 Lot.2を100回連続測定しました。

インサート、ガードチップ、カラム等の交換、イオン源の洗浄等のメンテナンスはしていません。

ピーク面積値（絶対値）
の結果です。

内標による補正はしていません。

【参考資料】
第15回メタボロームシンポジウム
アジレント・テクノロジー杉立氏
発表資料（共同研究）

揮発性成分分析用 オンラインSPE-GCシステム 【SPL-M100FE】

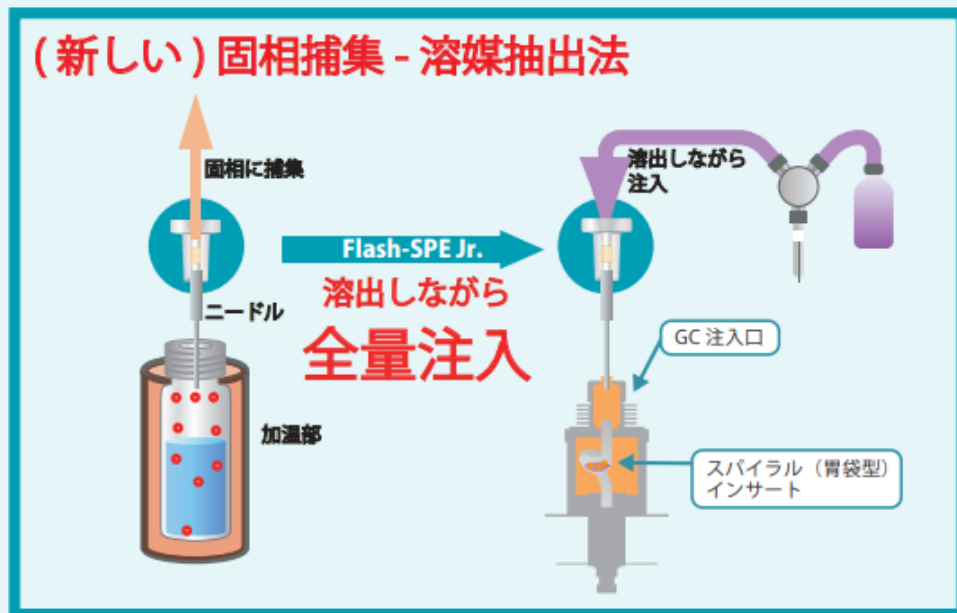


固相捕集 – 溶媒抽出法

固相捕集 - 溶媒抽出法

サンプルバイアル中の気相を固相カートリッジに吸引通気させ揮発成分を捕集。その後溶媒溶出時に、溶媒を全量 GC/MS に注入します。

- 固相カートリッジへ気相の通気により素早い吸着
- 固相カートリッジはサンプル毎に使い捨て
- 固相乾燥工程により気相中の水分の影響を抑制
- 溶媒溶出により固相から確実に目的物質を溶出
- 溶出液を全量 GC/MS へ注入による高感度分析

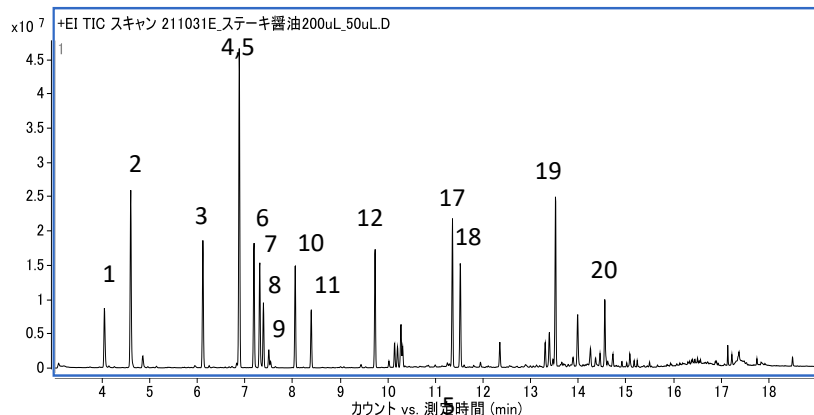


固相抽出液の一部注入による感度不足や、ファイバーを使用したキャリーオーバーや加熱による脱着不足という課題を解決します！

SPL-M100FE

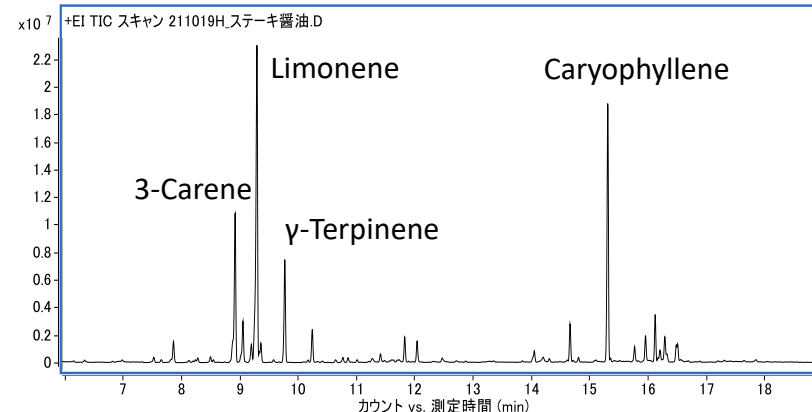
ステーキ醬油の成分分析とにおい成分分析

固相誘導体化法による ステーキ醬油の成分分析



- | | |
|-------------------------|----------------------------|
| 1. Lactic acid-2TMS | 11. Threonine-3TMS |
| 2. Alanine-2TMS | 12. Malic acid-3TMS |
| 3. Valine-2TMS | 13. Aspartic acid-3TMS |
| 4. Phosphoric acid-3TMS | 14. Methionine-2TMS |
| 5. Leucine-2TMS | 15. Pyroglutamic acid-2TMS |
| 6. Isoleucine-2TMS | 16. GABA-3TMS |
| 7. Proline-2TMS | 17. Glutamic acid-3TMS |
| 8. Glycine-3TMS | 18. Phenylalanine-2TMS |
| 9. Succinic acid-2TMS | 19. Citric acid-4TMS |
| 10. Serine-3TMS | 20. Lysine-4TMS |
| | 21. Tyrosine-3TMS |

固相捕集-溶媒溶出法による ステーキ醬油のにおい成分分析

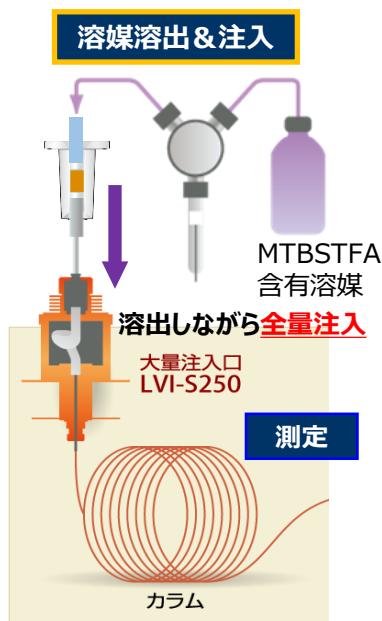


- | | |
|----------------------------------|-----------------|
| 1. Camphene | 9. 4-terpineol |
| 2. Terpinolene | 10. Terpineol |
| 3. Cymene | 11. Elemene |
| 4. Eucalyptol | 12. Copaene |
| 5. Terpinolene | 13. Humulene |
| 6. 1-Allyl-2-isopropyl disulfane | 14. Zingiberene |
| 7. Fenchol | 15. Bisabolene |
| 8. Trisulfide, methyl propyl | |

SPL-M100FE

納豆：におい-誘導体化分析

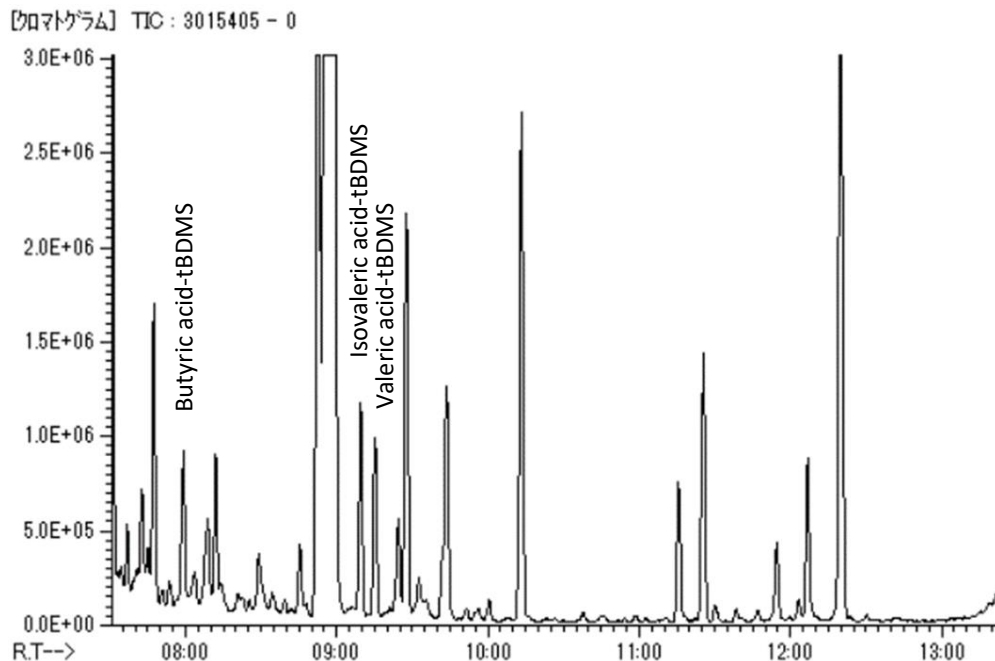
誘導体化



誘導体化

誘導体化試薬を含有した溶媒で溶出しながら胃袋型インサートを備えたGC注入口へその溶出液を導入し、インサート中で誘導体化。

誘導体化試薬 MTBSTFAを溶出溶媒に混液させて、t-BDMS化を行った。



におい成分を誘導体化することでこれまで見ていなかった成分が見えてくる。

糞便中短鎖脂肪酸分析への応用などいろいろな分析の可能性。

オンラインSPE-LC【SPL-W100】



- 水質分析（農薬，PFASなど）
- 飲料分析（機能性成分、有害成分など）
- その他、固相抽出→HPLC、LC/MS/MS分析全般

SPL-W100の自動工程

STEP 1 試料採取・負荷

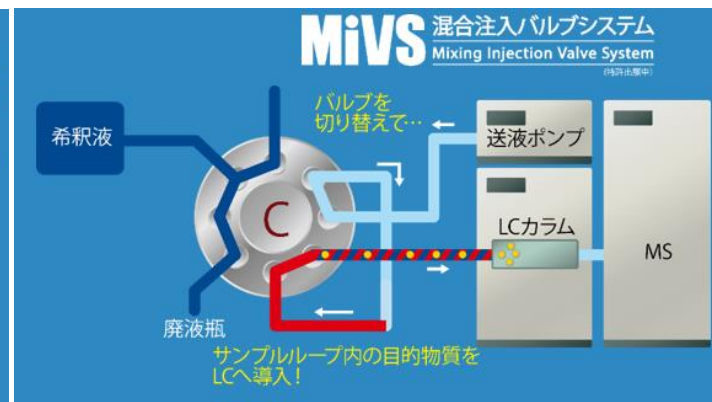
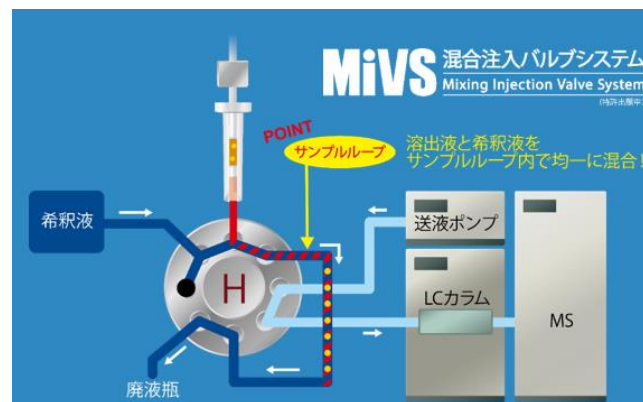
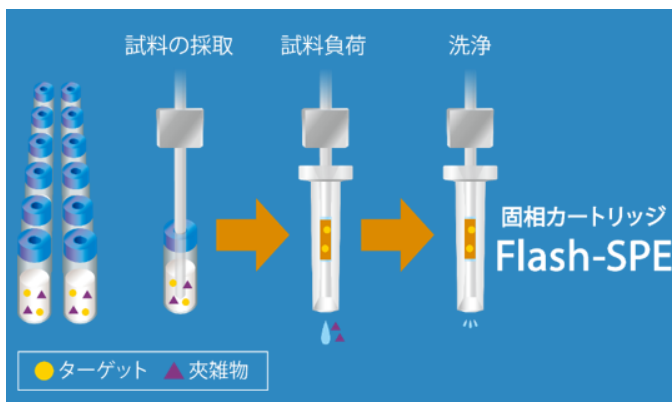
固相カートリッジによる精製
(無極性成分の除去)

STEP 2 溶出&希釈

固相溶出液をバルブ内で水希釈

STEP 3 LCへ導入

バルブを切り替え、LCカラムへ導入



※固相カートリッジは、インジェクションの都度使い捨て。

オンラインでの固相リサイクル分析の課題だった、キャリーオーバーやを回避し、都度の洗浄も不要。

オンラインSPE-LC-GC【SPL-X100】



- ・ 夾雑物の多い試料中の、単成分または数成分のターゲット分析

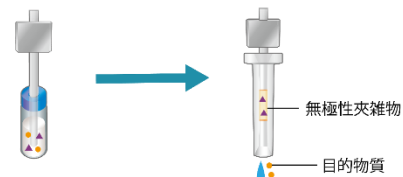
SPL-X100の自動工程



固相抽出のメリット

SPE (固相抽出装置)

試料の採取



固相によるクリーンアップ効果

LC カラムにダメージを与えるような夾雑物を予め固相で除去します。また、固相で濃縮することで高感度分析が可能になります。

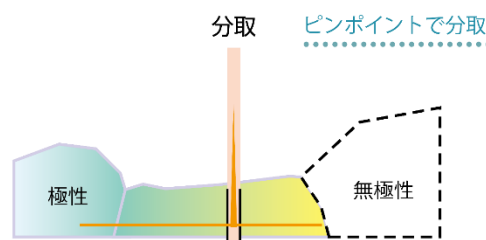
逆相HPLC-GCシステムのメリット

逆相 HPLC (分画装置)

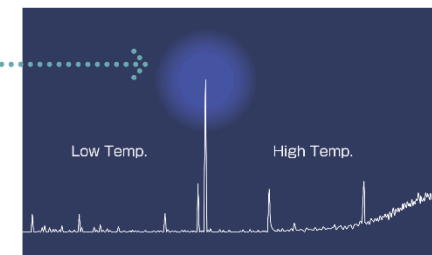
GC (測定装置)

+

+



溶解度、極性、Log Pow
逆相 HPLC によるクリーンアップ効果



温度、沸点
GC による高い分離機能

逆相 HPLC を前処理として使用することで、大きな試料許容量と幅広い範囲の分離機能により、選択性の高いクリーンアップを行い、GC でさらに効率的に分離します。

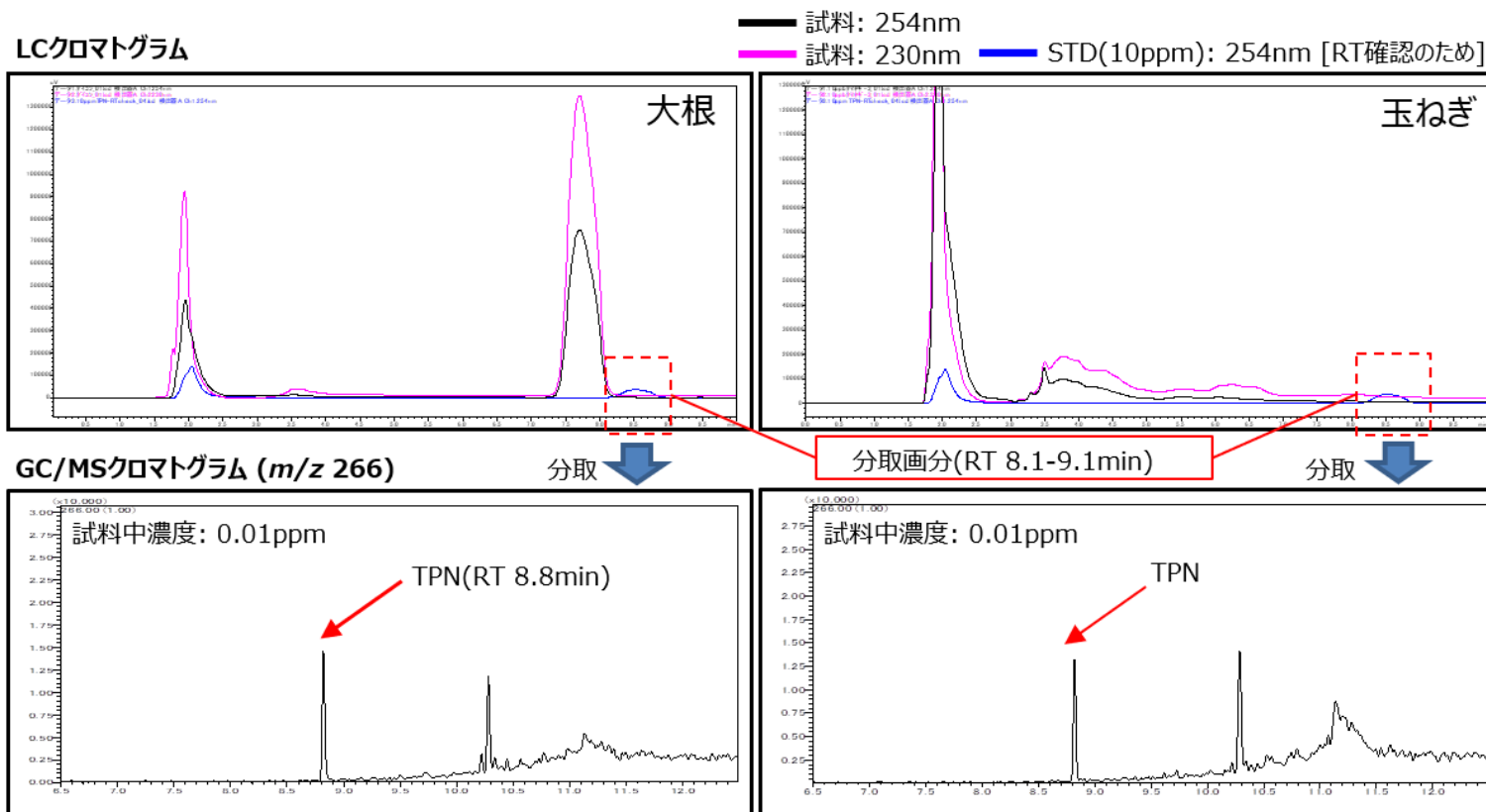
SPE精製 → LC分離・分取 → GC/MS測定

※SPE精製、LC分離、熱分離の組み合わせにより、
クロマトによる選択性が格段に向上

SPL-X100による野菜中の農薬個別分析

試料：大根、玉ねぎ

農薬：クロロタロニル (TPN)

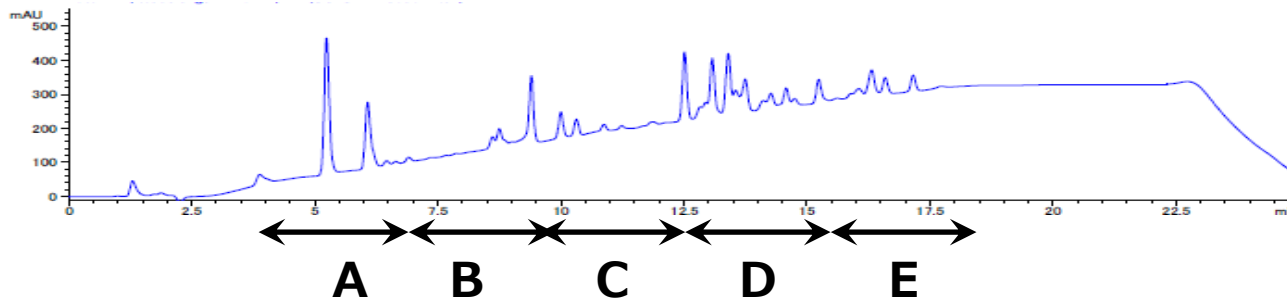


SPE-LC-GCにより純度の高いGC/MSピークが得られる

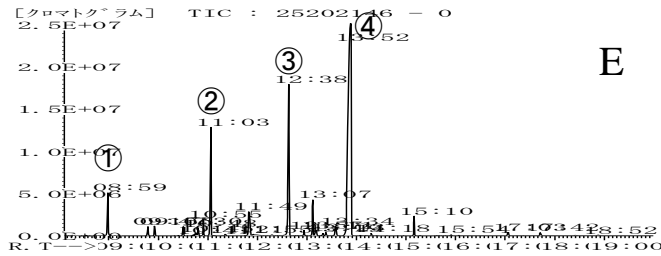
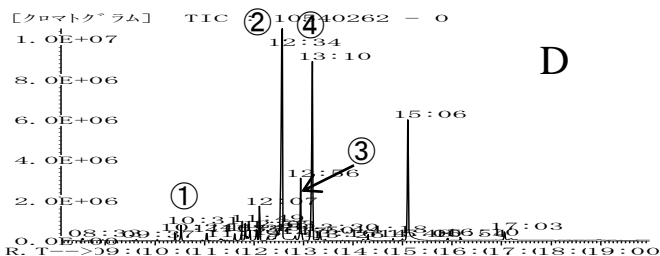
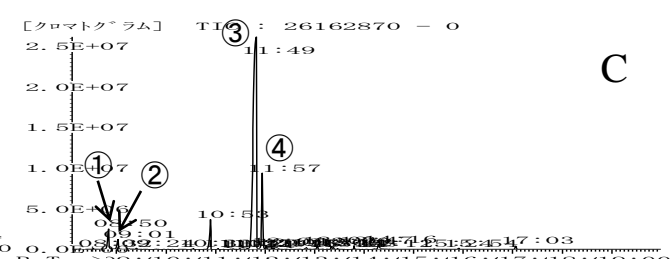
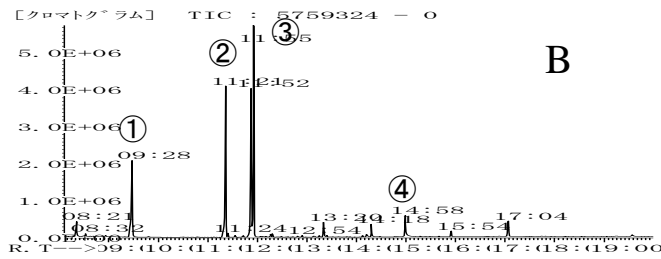
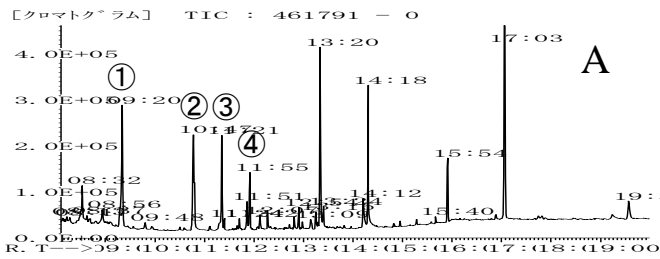
LC-GCシステムによる香水のフラクション分析

※旧機種LGI-S100を使用

HPLC-UVクロマトグラムとフラクション



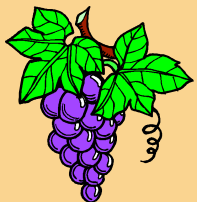
各フラクションをGC/MS測定した場合のTIC



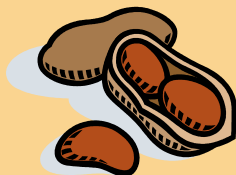
おまけ：ドライアイス凍結粉砕

さらさらパウダーで均一化、パウダーのまま保管

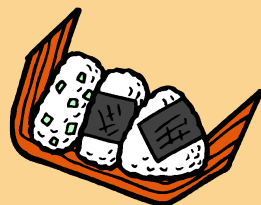
困った例



汁と皮が分離



粘性を帯びる



団子状に変化



筋が絡まる

ドライアイスと粉砕



パウダー状に



コツがあります
失敗や事故防止のために
まずはお問い合わせください

予冷式ドライアイス凍結粉砕

常温粉砕



凍結粉砕



凍結乾燥ではなく、
水分を含んだまま凍結して
粉砕する。



食品全体の成分を均一化する。

水分を含んだ成分濃度の分析。

大がかりな装置を必要としない。



当資料をご所望の際は
お気軽に展示ブースにてお声がけくださいませ！

装置動画やアプリケーションノートをWebサイトで多数掲載中！

アイスティサイエンス

検索

株式会社アイスティサイエンス

TEL : 073-475-0033 (本社)
048-424-8384 (東日本営業所)

FAX : 073-497-5011 (全国共通)

E-mail : as@aisti.co.jp

ホームページ : <http://www.aisti.co.jp/>