

第 341 回ガスクロマトグラフィー研究懇談会特別講演会

「健康で豊かな生活を支える

ガスクロマトグラフィー」

2015 年 12 月 11 日（金）

於：北とぴあ 13F 飛鳥ホール

【主催】

（公社）日本分析化学会

ガスクロマトグラフィー研究懇談会（設立 1958 年）

第 341 回 ガスクロマトグラフィー研究懇談会特別講演会

主題：「健康で豊かな生活を支えるガスクロマトグラフィー」

主催：(公社)日本分析化学会、ガスクロマトグラフィー研究懇談会

日時：12月11日(金) 10:00~19:00

会場：北とぴあ 13F 飛鳥ホール (講演・展示)、17F 山海亭 (意見交換会)

(〒144-8503 東京都北区王子1丁目11-1 http://www.kitabunka.or.jp/kitaku_info/rlink/summary-map)

<講演会プログラム>

9:30- 受付開始

10:00-10:05 開会の挨拶 (国立研究開発法人 産総研) 前田 恒昭

10:05-10:50 [招待講演 1]

メタボロミクスによるがんバイオマーカー探索 (神戸大医) 吉田 優

10:50-11:20 [技術講演]

1. GC・GCMSによる代謝産物の一斉分析—定量に向けた情報共有— (GLサイエンス(株)) 宮川 浩美

2. 安定同位体と超高速 GC-MS/MSを使用したヒト血漿中の代謝物の分析 (株島津製作所) 坂井 健朗

11:25-12:05 [招待講演 2]

皮膚ガスから取得できる体の情報：香りと健康 ((有)ピコデバイス) 津田 孝雄

12:10-13:20 昼食

13:20-14:00 [招待講演 3]

コレステロールを減らすトクホ緑茶開発—カテキンによるコレステロール低下作用とその機構—
(株伊藤園) 小林 誠

14:05-14:45 [招待講演 4]

GC/MSによる呼気分析 (東北薬科大) 藤村 務

14:50-15:20 [技術講演]

3. 半導体センサーGCを用いた呼気中アセトアルデヒド測定による食道がん高危険群スクリーニング
(日本写真印刷(株)) 花田 真理子

4. 高分解能・精密質量測定 GCMS 装置のご紹介
(サーモフィッシャーサイエンティフィック) 榎本 好宏

15:20-15:50 休憩

15:50-16:20 [技術講演]

5. マトリックス成分から見た食品中残留物分析 (アジレント・テクノロジー(株)) 杉立 久仁代

6. エネルギー分野における質量分析計を用いたガス分析 (日本電子(株)) 奥田 晃史

16:25-17:05 [招待講演 5]

ツムラのガスクロマトグラフを用いた残留農薬に対する取り組みについて (株ツムラ) 三枝 弘和

17:10-17:15 閉会のご挨拶 (国立研究開発法人 産総研) 前田 恒昭

17:30-19:00 意見交換会 レストラン 山海亭

<目次>

〔招待講演 1〕

メタボロミクスによるがんバイオマーカー探索 (神戸大医) 吉田 優… 1

〔技術講演〕

1. GC・GC/MSによる代謝産物の一斉分析 一定量に向けた情報共有 (GLサイエンス株) 宮川 浩美… 3
2. 安定同位体と超高速 GC-MS/MSを使用したヒト血漿中の代謝物の分析 (株島津製作所) 坂井 健朗… 7

〔招待講演 2〕

皮膚ガスから取得できる体の情報：香りと健康 ((有)ピコデバイス) 津田 孝雄… 11

〔招待講演 3〕

LDL-コレステロールを減らすトクホ緑茶開発—カテキンによるコレステロール低下作用とその機構—
(株伊藤園) 小林 誠… 21

〔招待講演 4〕

GC/MSによる呼気分析 (東北薬科大) 藤村 務… 29

〔技術講演〕

3. 半導体センサーGCを用いた呼気中アセトアルデヒド測定による食道がん高危険群スクリーニング
(日本写真印刷株) 花田 真理子… 35
4. 高分解能・精密質量測定 GCMS 装置のご紹介
(サーモフィッシャーサイエンティフィック) 榎本 好宏… 41

〔技術講演〕

5. マトリックス成分から見た食品中残留物分析 (アジレント・テクノロジー株) 杉立 久仁代… 45
6. エネルギー分野における質量分析計を用いたガス分析 (日本電子株) 奥田 晃史… 51

〔招待講演 5〕

ツムラのガスクロマトグラフを用いた残留農薬に対する取り組みについて (株ツムラ) 三枝 弘和… 53

カタログ展示・広告掲載企業一覧

運営委員名簿

〔招待講演1〕

メタボロミクスによるがんバイオマーカー探索

神戸大学大学院医学研究科 吉田 優 (よしだ まさる)

メタボロームとは、生体試料(体液、組織、細胞等)に含まれる低分子代謝物(分子量1,000以下)群です。これらの代謝物を網羅的に定性・定量解析するメタボローム解析(メタボロミクス)は、ポストゲノム科学の一分野として生まれたオーム科学のひとつです。特に近年では、質量分析計を用いた解析技術が進展し、ライフサイエンス分野では欠かせない研究手法の一つとなりつつあります。医学研究をはじめとしたさまざまな分野においてもその重要性が認識され始め、特にバイオマーカーの候補の検索に有用とされています。その理由として、様々な病態において、病気に関連する細胞・組織内において酵素タンパク質による代謝の変動が起こり、その疾患特有の代謝物のパターン(メタボロームプロファイル)へと変化し、それが血液・尿中にも反映することが予想されるからです。これまで私達は、さまざまなメタボロミクスシステムを確立し、消化器がんを中心にバイオマーカー探索を行ってきました。疾患特異的に変動する代謝物を組み合わせることで、疾患予測式を作成し、早期疾患診断システムの開発に取り組んでいます。本講演では、メタボロミクスの医学研究への応用、特にがんバイオマーカー探索について、私たちの研究成果をご紹介します。

参考文献

1. Nishiumi S, et al. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for pancreatic cancer. *Metabolomics*. 2010 Nov;6(4):518-28.
2. Shiomi Y, et al. A GCMS-based metabolomic study in mice with colitis induced by dextran sulfate sodium. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Nov;17(11):2261-74.
3. Ikeda A, et al. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for gastrointestinal cancer. *Biomed Chromatogr*. 2012 May;26(5):548-58.
4. Yoshida M, et al. Diagnosis of gastroenterological diseases by metabolome analysis using gas chromatography-mass spectrometry. *J Gastroenterol*. 2012 Jan;47(1):9-20.
5. Nishiumi S, et al. A novel serum metabolomics-based diagnostic approach for colorectal cancer. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e40459.
6. Kobayashi T, et al. A novel serum metabolomics-based diagnostic approach to pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013 Apr;22(4):571-9.
7. Okada T, et al. Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nat Commun*. 2013 Apr 3;4:1654. doi:10.1038/ncomms2668.

吉田 優 (Masaru Yoshida) プロフィール

神戸大学医学部卒・医学博士 (京都大学)



連絡先：〒650-0017 神戸市中央区楠町7-5-1

神戸大学大学院医学研究科病因病態解析学、
消化器内科学

e-mail: myoshida@med.kobe-u.ac.jp

Tel/Fax: 078-382-6305

HP < <http://www.med.kobe-u.ac.jp/metabo/index.html> >

略歴：

- 1992 神戸大学医学部卒
- 1992 神戸大学病院ならびに関連病院にて、内科臨床研修 (消化器内科)
- 1996 京都大学大学院医学研究科博士課程入学
- 2000 同上、修了、医学博士
- 2001 ハーバード大学医学部、リサーチフェロー
- 2004 同上、インストラクター
- 2005 神戸大学大学院医学研究科・消化器内科学分野・助教
- 2008 神戸大学大学院医学研究科質量分析総合センター・特命准教授 (兼務)
- 2010 神戸大学大学院医学研究科・病因病態解析学分野長・准教授 (兼務)
～現在に至る

その他：

- * 兵庫医科大学・非常勤講師 (内科学講座下部消化管科)
- * 独立行政法人理化学横浜研究所免疫アレルギーセンター・客員研究員
- * 国立大学法人北海道大学大学院生命科学研究院 客員准教授

所属学会等：

日本医用マススペクトル学会 (評議員)、日本消化器病学会 (専門医、評議員)、
日本消化器内視鏡学会 (専門医、指導医)、日本消化管学会 (胃腸科認定医)、
日本内科学会 (認定医)、日本免疫学会、日本ヘリコバクター学会、日本癌学
会、日本消化管免疫学会、日本抗加齢医学会、日本プロテオーム学会、日本臨
床検査医学会、American Society for Mass Spectrometry, The American
Gastroenterological Association (AGA), Metabolomics Society

〔技術講演〕

GC・GC/MSによる代謝産物の一斉分析～定量に向けた情報共有～

ジーエルサイエンス株式会社・宮川 浩美（みやがわ ひろみ）

GC/MSはLC/MSに比べ、ピーク同定に保持指標とマススペクトルを使える利点がある。また、ピークキャパシティが大きく、一度に様々な化合物を測定できる。しかし、農薬の一斉分析と同じように、網羅的分析法の定量は正直難しい。本技術講演では、代謝産物の一斉分析において一般的に良く利用されているオキシム化(メトキシルアミン塩酸塩を用いたメトキシム化)後にトリメチルシリル(TMS)化を行いGC/MSで測定する方法^{1,2)}について、定量に向けポイントを整理し、落とし穴におちないための情報共有を行うことを目的としたい。

ここでは、テルペン、エステル、アルカン、アルコール、有機酸、アミノ酸、糖などの代謝産物のうち、有機酸、アミノ酸、糖などの親水性化合物に関して得られた知見を報告する。

・誘導体化の問題～その1～

代謝産物は、カルボキシル基、ヒドロキシル基、アミノ基、チオール基、ケト基、フォルミル基など様々な官能基をあわせ持つ。そのような代謝産物を一斉に分析するために、オキシム化とTMS化を行い、GC、GC/MSで測定する方法が多くとられている。

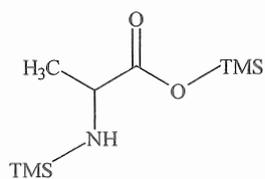
TMS化剤は幅広い官能基を修飾するが、一方で、官能基によるTMS化のされやすさは、アルコール>フェノール>カルボン酸>アミン>アミドの順であり、さらに立体障害の影響をうけるため、そのなかで一級>二級>三級の順番になる。また、TMS化後の化合物は加水分解をうけやすい性質がある。そのため、アミノ基においては完全にTMS化することが難しく、TMS基を1つ修飾した誘導体化合物と2つ修飾した誘導体化合物が出来てしまう場合が多い。例えば、アラニン誘導体化後測定する(誘導体化条件と測定条件は後方に記載した)と、2TMS体と3TMS体の2本のピークが観察される(Fig.1)。また、オキシム化をうける代謝産物においては、立体異性体が生じる(Fig.2)ため、2本のピークとして検出されるものが多い。このように、一化合物から複数のオキシム・TMS化合物が誘導されるものは多くあり、アミノ酸やケト酸、還元性の糖などがその例である。また、誘導体化から測定の間にも、変性や分解が起こる。

そこで、これらの情報を、保持指標とマススペクトルを含むライブラリ(測定に使用したキャピラリーカラムはInertCap 5MS/NP)に、オキシム基の数、TMS基の数、複数ピークが観察される化合物のナンバリング(_1, _2)、また、誘導体化から測定までにおこる変性・分解、ピーク形状などをまとめた。このライブラリはESI友の会からExcelファイルとしてダウンロードできるようになっている。

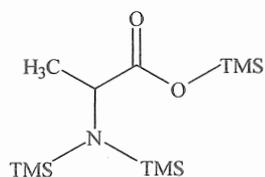
<https://sites.google.com/site/esitomonokai/daunrodopeji>

また、個々の化合物についても少しずつではあるが、情報共有を開始した。

<http://www.gls.co.jp/technique/metabolomics/gc/library2.html>

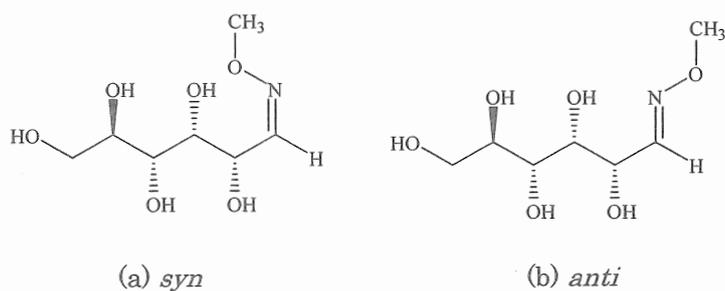


(a) Alanine-2TMS (R.I. 1106)



(b) Alanine-3TMS (R.I. 1372)

Fig.1. Structure of TMS-Alanine; (a) 2TMS, (b) 3TMS



(a) *syn*

(b) *anti*

Fig.2. Structure of Oxim-D-Glucose; (a) *syn*, (b) *anti*

・誘導体化の問題～その 2～

代謝産物の誘導体化後、測定するまでの時間を、サンプル間で一定にすることが出来ていない場合、繰り返し再現性を得られにくい。これは、誘導体化の問題～その 1～で述べたとおり、TMS 化は官能基の種類と立体障害により反応性が異なり、加水分解を受けやすいためである。

そのため、誘導体化後測定までの時間を一定にすることを目的とし、TMS 化の自動化を検討した。TMS 化後測定までの時間を一定にすることにより、繰り返し再現性が格段に良くなり、データの質をあげることに繋がった。また、自動化をすることにより、煩雑さを軽減することにつながった。

・イオン化室でのマトリックス効果

農薬の一斉分析においては、エンハウスのマトリックス効果が多数報告され、その原因追求や対策がされ始めた³⁾。農薬の一斉分析法と同じように、網羅的に測定する代謝産物の分析においても同様な現象が起こるかどうかの確認を行った。

酵母と血清を対象とし、GC/MS と GC/FID で比較することで、イオン化室におけるマトリックス効果を検討した。マトリックス効果はサプレッションとエンハウスの両方が観測され、現在のところ、一定の規則性を見出すのは難しいという結果に至っている⁴⁾。

・代謝産物の容器と保管の問題

代謝産物の抽出、精製に使用する少容量（～2 mL）の容器は、吸着をおこさず、濃縮遠心や凍結乾燥に適応できる形状が要求される。これらをふまえ、ポリプロピレン（PP）製のマイクロチューブが使用されることが多い。

しかし、樹脂製の容器は脂肪酸系の離型剤が使用されていることが多く、ブランクとして検出される場合がある（Fig. 4）。脂肪酸は重要な代謝産物でもあるため、用いる容器のブランクを確認しながら使用する必要がある。また、樹脂製の容器を試料の保管に使用する場合、代謝産物の溶媒と容器の分配係数（どちらの居心地が良いか）により、代謝産物は容器への溶け込んでしまうことがある。一方、ガラスの容器を用いる場合は、シラノールや不純物として存在する金属への吸着に注意する必要がある。

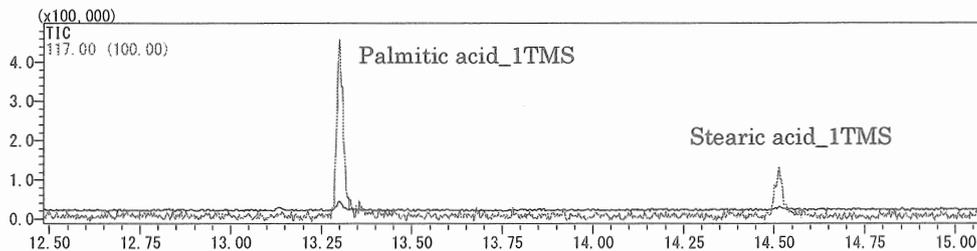


Fig. 4. ポリプロピレン（PP）製マイクロチューブのブランク

付記～代謝物質混合試料の紹介～

代謝物質混合試料を用意し、その保存性等を評価した。この混合試料には、誘導体化を行うことでGCで簡単にかつ確実に測定することができる解糖系の化合物（グルコースとピルビン酸）や、TCA回路の有機酸、アミノ酸、核酸塩基などが混合されている。TMS化の進行と分解の確認やカラムを含めた装置環境の確認、概算濃度の算出に使用することができる。

<http://www.gls.co.jp/technique/metabolomics/index.html>

誘導体化条件と測定条件

<オキシム化・TMS化の条件>

1. 誘導体化の準備

遠心濃縮機 (VC-36R, TAITEC) と凍結乾燥機 (Freeze Dryer VD-800R, TAITEC) を用い、サンプルを乾燥させた。容器はマイクロチューブを用いた。

※サンプル量により濃縮遠心と凍結乾燥の時間を決定する。メタノール-水混液 800 μ L の場合、濃縮遠心を約 2 時間、凍結乾燥を一晩が目安となる。

※3 で行う TMS 化は、加水分解をおこしやすく、結果に影響を与えるため、しっかり乾燥させる。

2. オキシム化

乾固したサンプルに Methoxylamine hydrochloride (20 mg/mL pyridine 溶液) (GL Sciences, Cat.No. 1022-15015) を 100 μ L 入れ、マイクロチューブのキャップをしめた。溶解させ、振とう機 (M・BR-022UP, TAITEC) で振とうした (30°C, 90 min)。

※ピリジンは水を吸収しやすい溶媒のため、脱水したものを使用する。

3. TMS 化

マイクロチューブのキャップを開け、*N*-Methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA, 1 g アンプル x 10, GL Sciences, Cat.No. 1022-11061) を 50 μ L 入れ、キャップをしめ混合した。同振とう機で振とうした (37°C, 30min)。

4. GC/MS 測定

サンプルをバイアルに移し、GC/MS で測定した。

※サンプル量が少ないため、ここで使用するバイアルはインサート一体型、もしくはインサートを使用するのが良い。

<GC/MS 測定条件>

カラム : InertCap 5MS/NP 0.25 mm x 30 m, df=0.25 μ m (GL Sciences, Cat.No. 1010-18642)

インジェクションモード : スプリット

スプリット比 : 25:1

※ピーク強度によってスプリット比を変更する。

インジェクション温度 : 230°C

オープン温度 : 80°C で 2 min 保持後 15°C/min で昇温, 330°C で 10min 保持

線速度 : 39 cm/s

※圧力制御の場合は 75 kPa, カラム流量制御の場合は 1.2 mL/min を目安に設定する。C9 から C40 までの炭化水素混合試料 (1 mL アンプル x 5, GL Sciences, Cat.No. 1021-58325) を測定し、全成分を溶出できるようにオープン温度 330°C で保持する時間を確認する。

ページ流量 : 5 mL/min

インターフェイス温度 : 250°C

イオン源温度 : 200°C

イオン化電圧 : 70 eV

分析モード : スキャン

スキャンレンジ : m/z 85~500

スキャンスピード : 5000 u/s (GCMS-QP2010Plus), 10000 u/s (GCMS-QP2010Ultra)

検出器電圧 : オートチューニング結果から

溶媒カット時間 : 3 min

データ採取時間 : 4~28 min

1) O. Fiehn *et al.*, Analytical chemistry 72, 3573-3580(2000)

2) E. Fukusaki *et al.*, J.biosciences 61, 267-272(2006)

3) K.Sugitate *et al.*, J.Pestic.Sci. 37(2), 156-163(2012)

4) H.Miyagawa *et al.*, 63rd Annual Conference on Mass Spectrometry 3P-39

〔技術講演〕

安定同位体と超高速 GC-MS/MS を使用したヒト血漿中の代謝物の分析

しまづせいさくしよ きかい たけるう
(株)島津製作所 坂井 健朗

ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) は、優れた分離能力と検出感度を持つ分析機器であり、今日までさまざまなフィールドで活用されてきました。昨今では、血液や尿をはじめとするさまざまな生体由来試料中の成分の測定に使用され、健康で豊かな社会生活を支えています。

本講演では、GC-MS を用いた代謝成分の分析例をご紹介します。弊社の GCMS-TQ8040 を使用して、ヒト標準血漿中の代謝成分を高速で測定する方法を新たに検討しました。各測定化合物の安定同位体を用いてピーク面積値を補正することで、従来よりも大幅に再現性を向上させることができました。また、二つの分離カラムを直列に接続した系を採用することにより、従来 23 分間だった昇温メソッドを、分離を犠牲にすることなく 5 分間にまで短縮することが可能になりました。当メソッドを採用することにより、多検体実験における代謝分析のスループットを飛躍的に向上させることができると考えます。

1. 安定同位体の添加について

図 1 に示す従来の生体試料の前処理において、従来内部標準物質を添加する工程で、さらに安定同位体 14 種の混合品を添加しました。

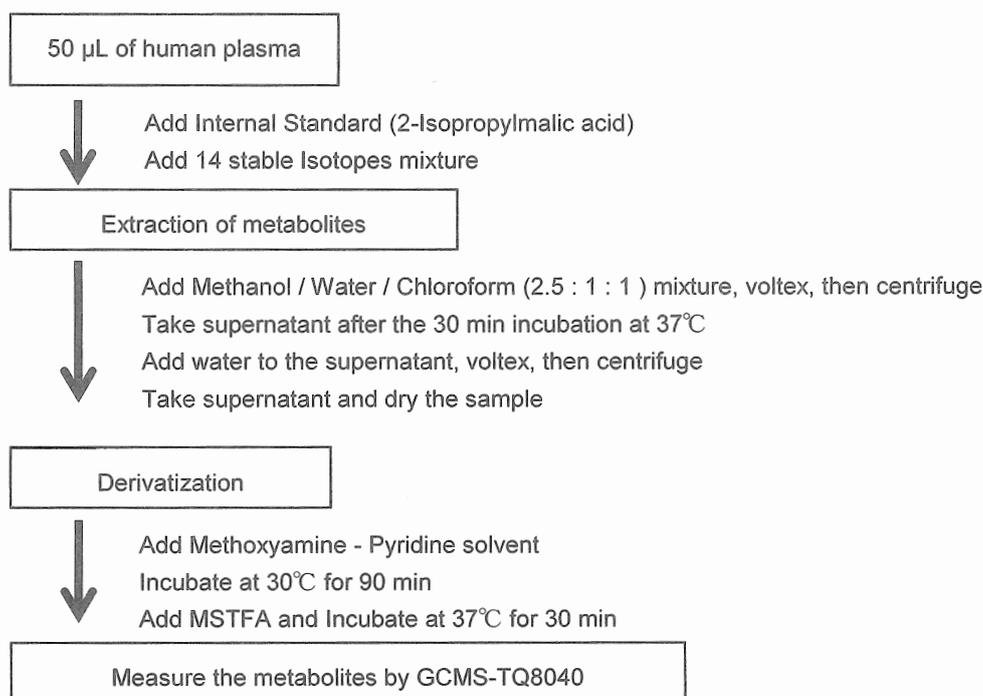


図 1 サンプル前処理の概要

2. 超高速 GC-MS/MS システムについて

今回検討した超高速 GC-MS/MS は、二種類のカラムを直列に接続した系が大きな特徴です。その概要は図 2 のとおりです。

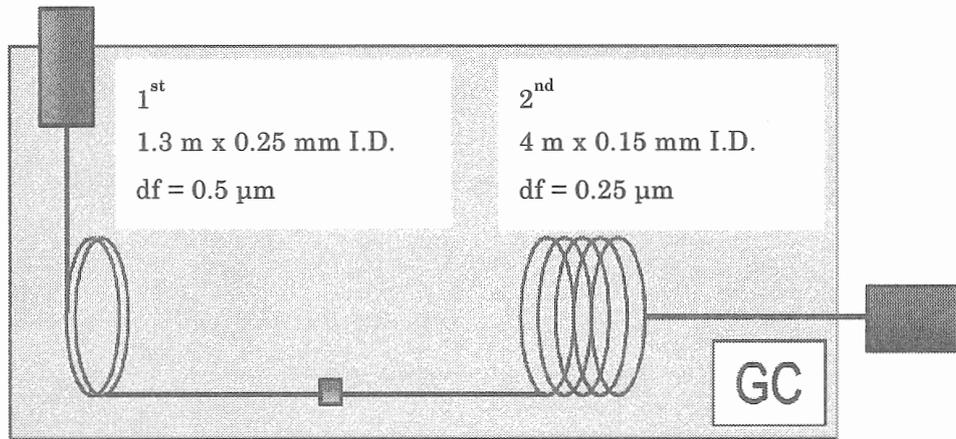


図 2. 超高速 GC-MS/MS システムの概要

この系を用いて n-アルカン混合標準品を測定した結果を図 3 に示します。

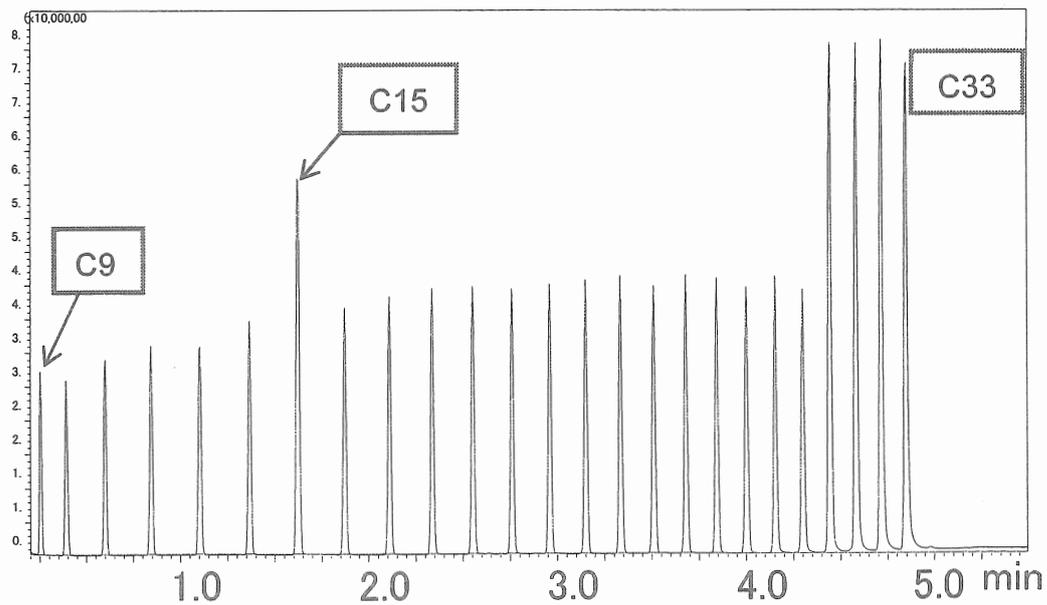


図 3. 超高速 GC-MS/MS システムによる n-アルカン混合標準品のクロマトグラム

3. GC-MS/MS について

検出器として用いる質量分析計には、弊社のトリプル四重極型 MS である GCMS-TQ8040 を用いました。図 4 にトリプル四重極型 MS を用いた MRM 分析の模式図を示します。MRM では、衝突誘起乖離と二段階の質量分離を用いることにより、従来のシングル四重極型 MS に比べてイオンの選択性が格段に向上します。このため、生体サンプルのような非常に夾雑の多いサンプル中でもクリアなピークを得ることができます。

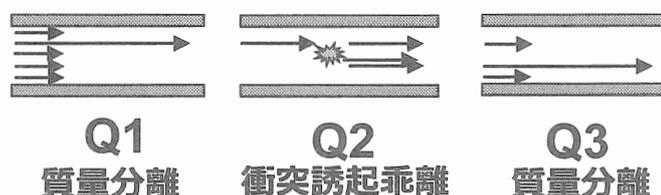


図 4. トリプル四重極型 MS の模式図

4. 安定同位体による補正の結果

それぞれの従来の内部標準物質の面積値による補正した場合と、各々の安定同位体物質で補正した場合で再現性を比較しました (表 1)。14 種すべての化合物で、安定同位体補正のほうで再現性がよくなり、中でも Valine-2TMS や Isoleucine-2TMS など、内部標準物質補正では %RSD が 10% を超えていたものが安定同位体補正により 3% 以下になるなど、再現性に劇的な改善が見られました。

表 1. 各化合物の再現性 (%RSD)

化合物名	内部標準物質による補正	安定同位体による補正
Lactic acid-2TMS	4.53	1.64
2-Hydroxybutyric acid-2TMS	4.21	2.03
Valine-2TMS	11.56	1.81
Isoleucine-2TMS	14.13	2.52
Fumaric acid-2TMS	4.32	4.34
Malic acid-3TMS	3.56	6.13
Aspartic acid-3TMS	10.50	3.30
Glutamic acid-3TMS	8.40	1.91
4-Hydroxybenzoic acid-2TMS	5.22	5.53
Ornithine-4TMS	6.86	2.41
Citric acid-4TMS	2.90	1.64
Dopa-4TMS	11.51	4.22
Kynurenine-3TMS	20.18	3.30
Tryptophan-3TMS	8.75	1.96

5. クロマトグラム

MRM 測定を行ったことにより、いくつかの成分でスキャン分析に比べ、クロマトグラムの形状が大きく改善しました (図 5)。

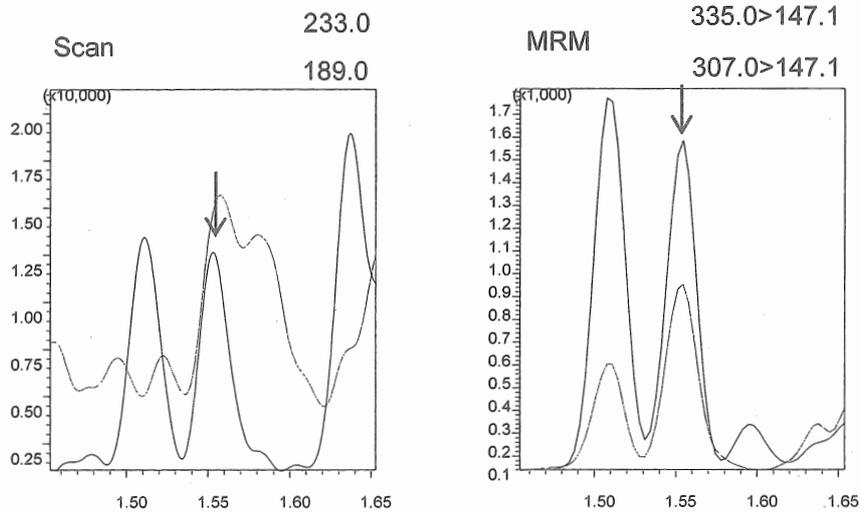


図 5. Malic acid-3TMS のスキャンおよび MRM クロマトグラム

6. 結論

安定同位体と超高速 GC-MS/MS を用いた系でヒト標準血漿を測定したとき、

- (1) すべての対象化合物で分析再現性が向上しました。
- (2) 分析時間を従来の 23 分間から 5 分間まで短縮することができました。

謝辞：

当成果の発表にあたっては、神戸大学大学院医学研究科 内科系講座病因病態解析学分野 吉田優先生、神戸大学大学院医学研究科 内科学講座消化器内科学分野 西海信先生のご協力をいただきました。この場をお借りしてお礼申し上げます。

〔招待講演 2〕

皮膚ガスから取得できる体の情報：香りと健康

(有)ピコデバイス 津田 孝雄

概要

身体の状態を外側から見てみるのに呼気と皮膚ガス及び汗がもっとも取り扱いやすい。身体からは涙、唾液、尿、糞便、放屁などがそれぞれ対象とできるが、サンプリングにそれぞれ工夫が必要であろう。呼気ガスは長らく対象とされてきたが、これを用いた実用化は胃のピロリ菌の検知、小児喘息での一酸化窒素、飲酒試験で実用化されている。日常的な職場や在宅での健康管理、高齢化時代に対応した方法などが社会的により強く要請されてきている。新たに登場した皮膚ガスは皮膚組織を経由して放出されるので、言わば皮膚のフィルターをどうし得られるのできれいで、体の変化を緩やかに全身的に反映する。皮膚ガスは皮膚組織近傍の特定領域の情報を得ることも可能である。また皮膚ガスは自律神経支配であるので、被験者の工夫により大きく変化することのできない特徴を持っている。24時間測定などの長期測定に向いている。皮膚ガスや呼気の測定には、分離能の高いクロマトグラフィーを通常用いるが、他方迅速測定を目的としてセンサーを用いるときは、特異的な選択性・感度・安定性が重要である。半導体センサー、超小型センサー、光デバイスの導入は、軽い・小型化の可能性から、さらに今後のウェアラブル機器への展開が起こっていくであろう。

皮膚ガス・呼気についての疾病との関連、採集器具、測定装置などについて現状を見て、健康と疾病について述べる。

ヒトの器官とガス

- ・呼気 口腔内、鼻、気道、肺
近傍にある器官 食道、胃
主として血液との相関を第一義にする。
肺からの呼気(終末呼気)をとる工夫
- ・皮膚ガス
皮膚機能(汗腺、脂腺、表皮)、皮膚表面での現象、末梢血管からの物質供給、
間質水からの物質供給、皮膚組織による
フィルター
- ・体内のガス 腸内、胃内、放屁、腹腔、他³

ヒト皮膚ガスについて

1. はじめに

昔は伝染病の媒体として蚊が恐れられていました。ヒトの皮膚へ蚊が降着するのを防ぐ

ことが必要で、皮膚上にある蚊の誘引物質を探す研究がなされていました。蚊へは、炭酸ガスが主要な役割を果たし、皮膚上の乳酸も重要な役割を果たす。

私たちは、お酒を飲むと、5分後に皮膚表面からアルコールが検出できることを見出した。このとき、アルコールの溶出する近辺にガスクロマトグラフのチャート上に他のピークがかなり認められることに気がつきました。これがヒト皮膚ガス(香りの成分やアセトン、メタン、水素ガスなど)の発見につながったのです。

ヒトの匂いについて、クラシエフーズとの共同研究から「オトコ香る」「フワリンカ」が生まれ、現在の香りブームのきっかけとなりました(図1-1)。

バラ香気成分の皮膚からの放出 時間変化 SIMチャート

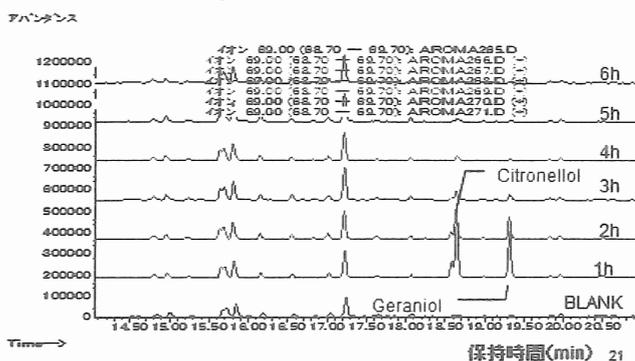


図1-1 ゲラニオールを含んだチューインガムからの香りの皮膚からの揮散測定

2. 現代の志向

ヒトの生きる動物でもあるので、匂いをはけられません、よりいい匂いの空間がそれなり求められます。匂いは体から発するものですから、身体の状態(健康、ダイエット、疾病など)のマーカーともなります。

現在の健康維持の要請が強い中で、健康的に生きることが大切になっています。これは個々の人にとっていいことでもあるのですが、同時にその道具が求められ、非侵襲的で容易であることが求められています。簡易的な分析装置の一般化ともいえるでしょう。

3. ヒト皮膚ガスはどこから

皮膚表面からは常に水が拍出されて、ヒトは水や水蒸気のベールに覆われています。しっとりとした肌も水分あつてのことで、水分がなければかさかさの乾燥肌になってしまいます。この水分は汗腺からと皮下から直接供給されていますが、その割合はほぼ等しいと見積もれます。

ヒト皮膚ガスは皮膚組織表面から直接揮散するケースと、もうひとつには汗の揮発成分由来のものが含まれます。発汗には生理的負荷に伴う発汗、常時拍出している不感性発汗があります。指の表面には、1平方センチメートルにつき約200個の汗腺が存在すると

いわれていますが、仔細に観察するとその10倍の着色点(ヨード-でんぷん反応で確認)が認められます。すなわち、汗腺以外の水分の拍出口が皮膚上に多数存在しています。皮膚上の水分は、間質水、上皮細胞からの水分などに由来すると考えられます。

汗は1日に1.8リットル程度はでます。体の表面積を2平方メートルとしますと手の表面からは一分間あたり0.03グラムの汗が出ていることとなります。この値は手に袋をかぶせて測定しました結果と合致します。運動や散歩のような生理的負荷が加われば、発汗はさらに進み、一日5~8リットルの発汗量となります。

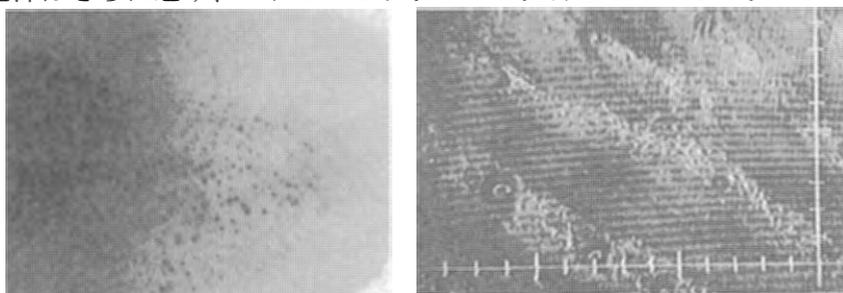
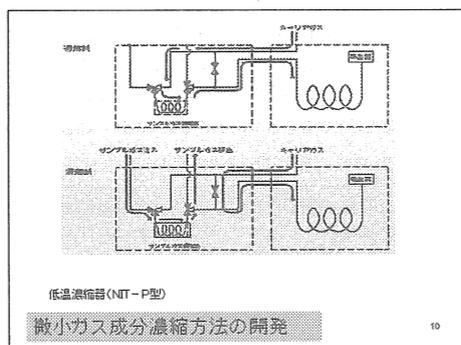


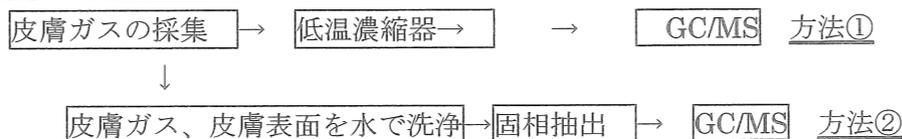
図5 指先の発汗の様子

3-2. 微量ガスの採集方法・測定方法について ヒトの匂いや部屋の空気、野菜や果物の香りの測定法には、ガスを採集具(手や、指、腕、腋などからの採集具 特許及び実用新案)による採取し、次いで25mlを低温濃縮装置(特許)に導入してオンラインで測定する方法がある(方法①)。

方法②として、皮膚ガス及び皮膚表面を水溶性溶媒で洗浄して集め、次いで固相抽出してGC/MSにかける方法(クラシエフーズ及びピコデバイス 特許第4827032)方法がある。またラットなどにもこの方法は適用できる(名工大及びピコデバイス 特許)。



NIT-P濃縮装置とGC/MS



皮膚ガスの採取 皮膚ガスの測定法を紹介します。この方法は、そのまま環境中の微量ガス成分やVOCへ測定にもそのまま用いることができます。

測定手順は、A. 皮膚ガスのサンプリング；B. 低温濃縮器の使用（濃縮倍率 250～1000倍）濃縮時間 15秒（～120秒）；C. オンラインでガスクロマトグラフ/質量分析計（GC/MS）による測定または選択検出器（モニター）の使用で行ないます。
一般的なサンプリングを図に示しました。

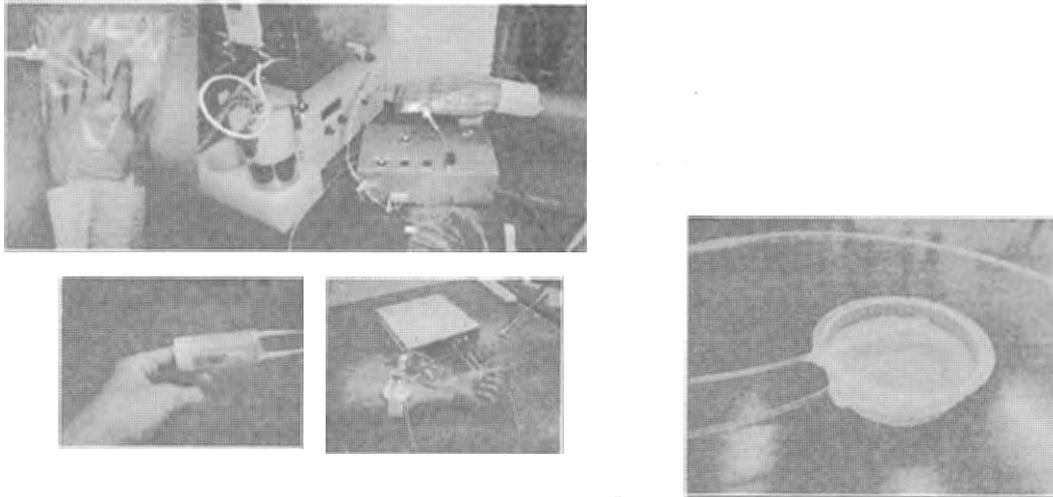


図 サンプリング容器類

4. ヒト皮膚ガス成分について

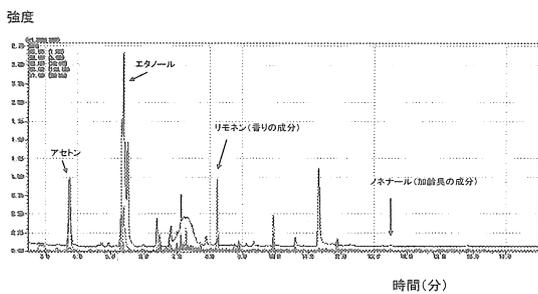


図7 手から皮膚ガスを5分間捕集し、そのうちの25mlを低温濃縮し、オンラインでガスクロマトグラフ/質量分析計により測定したクロマトグラム

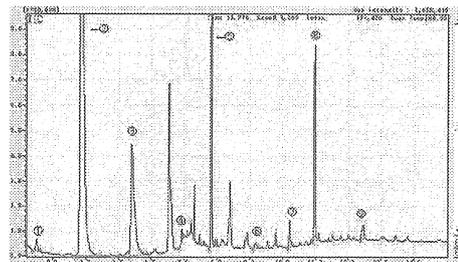


Fig. 手から採取した皮膚ガスのクロマトグラム アセトンの多い事例
(①アセトアルデヒド、②アセトン、③エタノール、④トルエン、⑤リモネン、⑥オクタナール、⑦ノナール、⑧2-エチル-1-ヘキサノール、⑨メントール)
被検者はダイエットを行い、前回測定より数十倍の高いアセトン濃度が検知された。

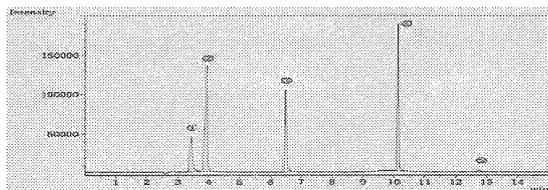
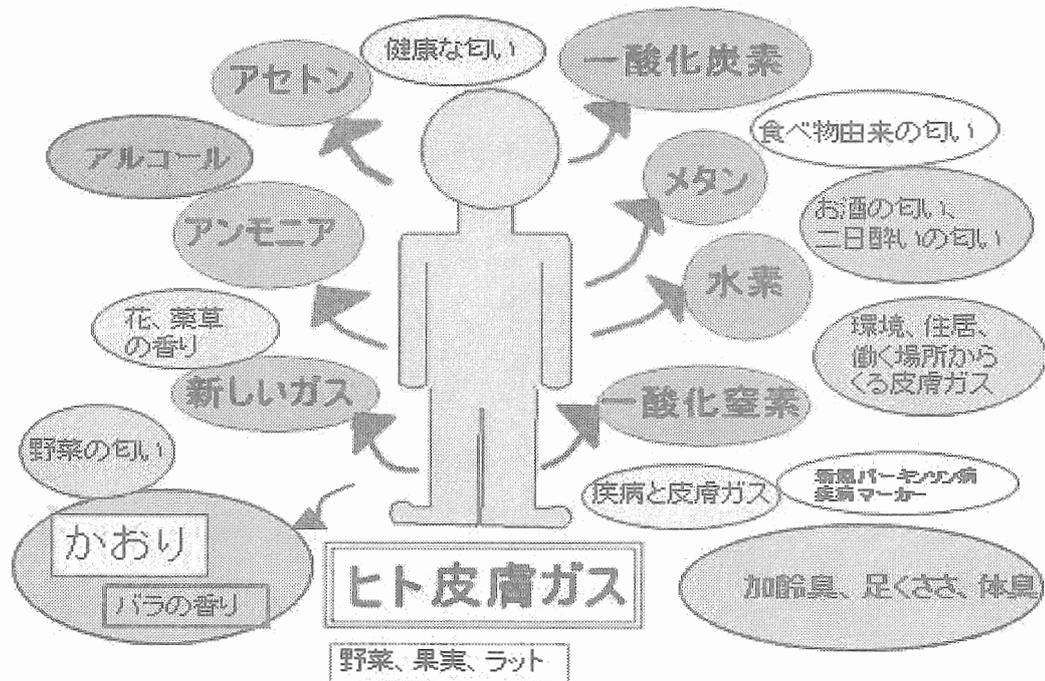
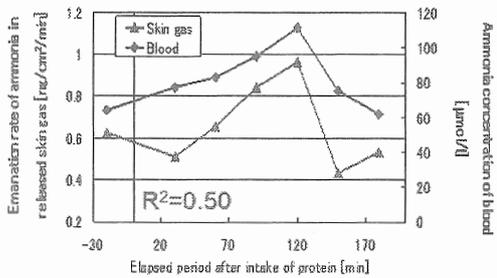


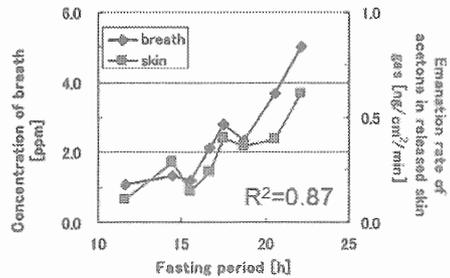
図8 皮膚から(手)のクロマトグラム
1. アセトアルデヒド (保持時間 3.4分) 2. 2,4,6-トリメチルベンゼンカルボニルニル (保持時間 3.5分) 3. メチルパルカプタン (保持時間 6.9分) 4. ニオ
化炭素 (保持時間 10.1分) 5. アリルアルコール (保持時間 12.5分)



5. 皮膚ガスの血液中との相関、呼気との相関



Relationship of Ammonia concentration to elapsed period after intake of protein 87



Relationship of Acetone concentration to fasting period 83

健康人と糖尿病患者の皮膚ガスアセトン放出量の比較

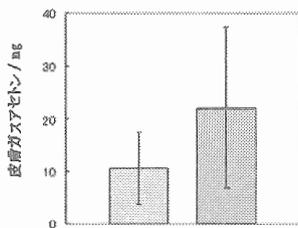
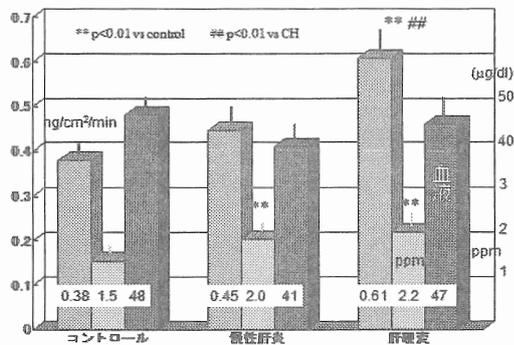


図3-1-1 健康人と糖尿病患者の皮膚ガスアセトン放出量の比較

肝疾患のアンモニア



6. 皮膚ガスのマーカーとしての有用性

皮膚ガスと疾病に関しては、これまでに糖尿病、肝硬変の疾患との関連が明らかにできた。ダイエット、疲労などにおけるアセトン、アンモニアの増加が認められた。日常的な疲労に伴う疲労臭の発生が生じる。

最近我々はパーキンソン病に関して検討した。パーキンソン病は疾病マーカーがなく疾病が進行してしまっからしか治療が実施できない難病とされている。我々は皮膚ガスを用いて検討したところ、皮膚ガスにおいて明らかな相違が認められた。新たなパーキンソン病の疾病マーカーが見出だすことが出来た。

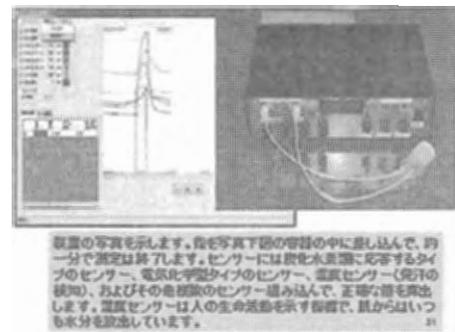
表1 呼気、皮膚ガス、放屁、汗などのに関して					
ガス成分及び香り	呼気	皮膚ガス	他	疾病および健康状態	情報
アセトン	○	○		糖尿病、ダイエット、栄養失調	C=O 吸収 赤外、近赤外吸収アリ、半導体センサー
アンモニア	○	○	口腔	肝疾患、口腔内衛生(細菌増殖)、オルニチンサイクルの機能測定	近赤外領域吸収アリ
一酸化炭素	○	△		内因性の CO は酸化ストレスで誘導される。喫煙により増加。喘息。皮膚ガス 喫煙者は2倍程度・呼気は3~6倍	(半導体センサー)
水素	○	△	放屁	植物繊維などの未消化炭化水素から大腸で産生。術後の経過。臨床的な有用性は不明	半導体センサー
メタン	○	△		日本人では呼気中に10%程度の現出率。臨床的な有用性は不明	半導体センサー
イソブレン	○		口腔	コレステロールの生合成から産生される。臨床的な有用性は不明	
硫化水素	○	○	口腔	嫌気性の細菌により産生。口腔内衛生管理、口臭 皮膚ガスでも強く認められる。	(半導体センサー)
メチルメルカプタン	○	○	口腔	同上	(半導体センサー)
二硫化炭素		○		由来不明(半導体生産)	
二酸化炭素	○	△		ピロリ菌の胃内感染(安定同位体 ^{13}C の使用、保険適用)	
一酸化窒素	○	○		気管支喘息、炎症により発生、血管拡張、小児や高齢者への適用に適している。	検出 化学発光

アルコール	○	○		アルコール疾患、酒酔い運転、二日酔い、労働安全の確保、	電気化学センサー
ゲラニール(バラの香り)		○		身体からのバラの匂い	
加齢臭		○		ノネナールそのほかの物質	
足臭さの匂い		○		イソ吉草酸など	
腋の匂い		○		カルボン酸化合物など	
汗臭さ			汗	乳酸などの腐敗の進行	

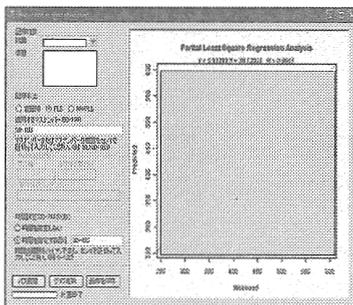
1. においと疾病—生体ガス測定から何が分かるか 植田秀雄、小橋恭一、特集「においと健康」におい・かおり環境協会 (2005) ; 2. 呼吸生化学 (1998) ; 3. Gas Biology Research in clinical Pracice(2011) ; 4. ヒト皮膚表面から起算される化学物質と香り、津田孝雄、AROMA RESEARCH, 9, 2008 ; 5. これまでの津田らの研究

皮膚ガスと身体情報

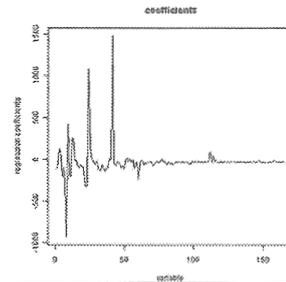
アセトン: 運動と体脂肪の燃焼; ダイエット;
 栄養不足; 糖尿病
 アンモニア: 運動による疲労; 疲労臭;
 慢性肝疾患
 エタノール: 二日酔い、アルコール疾患
 パーキンソン病: 新たな疾病マーカー
 (重度との関連)
 非侵襲血糖モニタリング (開発中、AMED)



GC/MS data was adopted for characterization of mass fragment contribution by the software of partial least square regression (PLS) (10)



This window for PLS was made by Pico-device.



The GC/MS data obtained from the skin gases collected from Parkinson disease patients were analyzed with partial least square methodology. Mass range used: 35-200, Number of patients was 17, variable, mass number, regression coefficients, calculated results.

PLS results concerning mass fragment contribution

MassNo	X-Coefficient	X-Offset	MassNo	X-Coefficient	X-Offset
64	0.076379	0.00225	77	-0.05222	0.00229
75	0.065279	0.00443	64	-0.07491	0.0014
98	0.076308	0.00403	65	-0.08071	0.00125
78	0.06221	0.0062	105	-0.09559	0.0017
46	0.07861	0.0175	81	-0.07276	0.00151
68	0.073	0.00484	45	-0.05248	0.00252
47	0.05705	0.00564	78	-0.07751	0.00417
146	0.074979	0.00372	82	-0.06309	0.00164
68	0.06125	0.00784	67	-0.06725	0.00197
41	0.02202	0.00904	65	-0.07214	0.00199
65	0.071812	0.00508	107	-0.08772	0.00251
67	0.06824	0.00156	84	-0.05849	0.00149
47	0.07371	0.00198	67	-0.09212	0.00229
74	0.06125	0.00559	70	-0.06274	0.00125
146	0.02154	0.00817	26	-0.04411	0.00774
111	0.06814	0.00126	42	-0.08944	0.00162
47	0.06819	0.00172	64	-0.08108	0.00252
49	0.0539	0.00187	81	-0.07245	0.00118
61	0.04562	0.00235			

Positive contribution Negative contribution

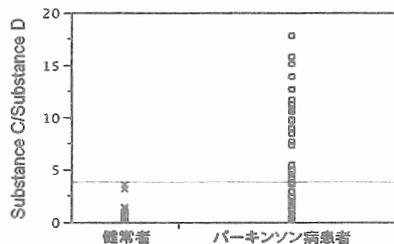
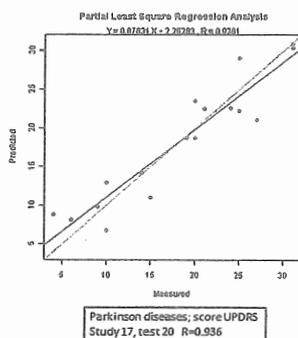
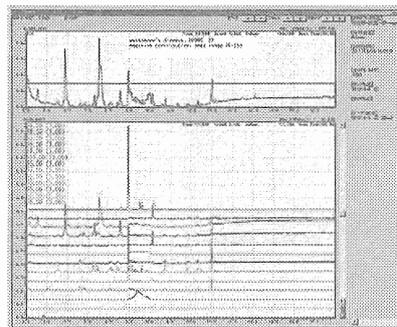


Fig. 皮膚ガス中の成分比による健常人と患者群

1. 関連が協会などの情報

1. 関連学会

日本呼吸病態生化学研究会 (1998~2008)

日本安定同位体・生体ガス医学応用学会 (2009~現在)、2015 第7回

出版物 1. 「呼吸生化学 —測定とその意義—」小橋恭一編著 メディカルレビュー社 (1998)

2. 「Gas Biology Research in Clinical Practice」edited by Y.Yoshikawa, Y.Naito, Karger, 2011.

国際: International Association of Breath Research (LABR) 2005~

Journal of Breath research を発行、国際会議 Breath Analysis Summit (2007~)

文献 (皮膚ガス)

1. "New measurement of hydrogen gas and acetone vapor in gases emanating from human skin", K. Naitou, T. Tsuda, K. Nose, T. Kondo, A. Takasu, and T. Hirabayashi, Instrumental Sci. Technol., 2002, 30(3), 267-280.
2. "Relationship between skin acetone and blood hydroxybutyrate concentration in diabetes", N. Yamane, T. Tsuda, K. Nose, A. Yamamoto, H. Ishiguro, and T. Kondo, Clin. Chim. Acta, 2006, 365, 325-329.
6. "Identification of ammonia in gas emanating from human skin and its correlation with that in blood", K. Nose, T. Mizuno, N. Yamane, T. Kondo, H. Ohtani, S. Araki and T. Tsuda, Anal. Sci., 2005, 21(12), 1471-1474.
3. "皮膚ガスを用いてのアルコールの検知" 津田孝雄、第23回¹³C医学応用研究会・第10回日本呼吸病態生化学研究会 合同学術大会、2007、10月、東京、講演要旨 p.24.
4. "皮膚ガス：一酸化窒素の確認と低酸素室での挙動"、大桑哲男、水野辰夫、野瀬和利伊藤 宏、津田孝雄、第67回分析化学討論会、2006、秋田、講演番号 E2002、講演要旨集、p.77

香りと匂い

5. “固相マイクロ抽出及び加熱脱着ガスクロマトグラフィー/質量分析計によるヒト皮膚から放出される香気成分の定量”、秋山朝子、今井かおり、石田幸子、伊藤健司、小林正志、中村秀男、野瀬和利、津田孝雄、分析化学, 2006, 55(10), 787-792.
6. “香料の傾向摂取による芳香成分の対表面からの放出挙動”、秋山朝子、伊藤健司、AROMA RESEARCH, 2006, 7(1), 63-65.
7. “. ” ヒト皮膚ガス及びバラの香りへのアプローチサンプリングと分析デバイス” 津田孝雄, 第56年会 日本分析化学会, 2006年9月、徳島、講演番号 D1008T、講演要旨 p. 77.
8. “ニンニク摂取に伴う皮膚ガス・呼吸中のイオウ化合物の確認と口中清涼剤の効果測定、(ピコデバイス、名工大、小林製菓) 津田孝雄、野瀬和利、高瀬琴女、宇野 明、中島賢治、第67回日本分析化学討論会、2006、秋田、講演番号 E2006、講演要旨、p. 74.
9. “ヒト皮膚から揮散される化学物質と香り “、津田孝雄、AROMA RESEARCH, 9, 63-72, 2008.
10. “食材野菜からの香りのオンライン濃縮分析及び成分値による野菜の評価、(デザイナーフーズ、ピコデバイス) 丹羽真清、松嶋俊紀、津田孝雄、久永真央、日本分析化学会第58年会、2009、北大、講演番号 H1007、講演要旨 p. 184.
11. “An exploratory comparative study of volatile compounds in exhaled breath and emitted by skin using selected ion flow tube mass spectrometry”, C. Turner et al., Rapid Commun. Mass Spectrom, 2008, 22, 526-532.
12. “Determination of acetaldehyde and acetone emanating from human skin using a passive flux sampler-HPLC system, Yoshika Sekine, Satomi Toyooka, S.F. Watta, J. Chromatogr. B, 859 (2007) 201-207.
13. “Dimethyl Trisulfide as a Characteristic Oder Associated with Fungating Cancer Wounds, M. Shirasu, S. Nagai, R. Hayashi, A. Ochiai, K. Touhara, Biosci. Biotechnol. Biochem., 73, 2117-2120, 2009.

測定法

14. “Novel instrumentation for determination of ethanol concentration in human perspiration by gas chromatography and a good interrelationship in ethanol concentration in sweat and blood”, T. Kamei, T. Tsuda, Y. Mibu, S. Kitagawa, H. Wada, K. Naitoh, K. Nakanishi, Anal. Chim. Acta, 1998, 365, 259-266.
15. Direct temperature-controlled trapping system and its use for the gas chromatographic determination of organic vapor released from human skin”, K. Naitoh, Y. Inai, T. Hirabayashi, and T. Tsuda, Anal. Chem. 2000, 72(13), 2797-2801.

特許(JST, ピコデバイス、津田)16 “皮膚透過ガス収集装置および皮膚透過ガス測定装置”、特許第 4024818 号、特許第 4024817 号、特許第 3850662 号、特許公開 2006-234843. US 7247137 B2, US 7266404 B2, US 7261692 B2, 韓国 第 562548 号、第 547462 号、第 592212 号、17 表面放出ガスサンプリング装置”、特許公開 2007-155385. 18 抗体による加熱時における同時温度制御、US 6661241 B2.

MEMO

A series of horizontal dashed lines for writing.

〔招待講演 3〕

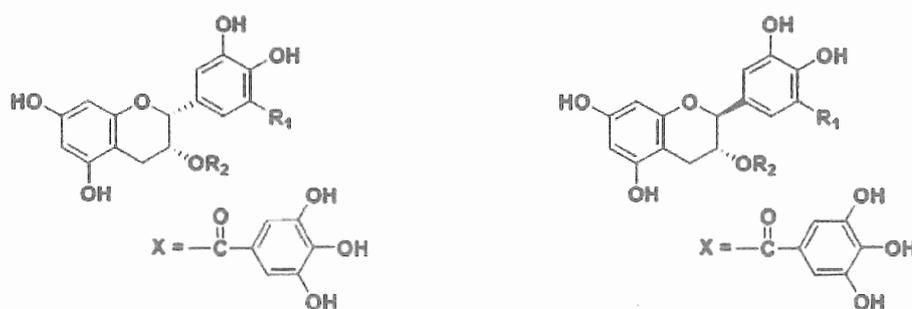
LDL-コレステロールを減らすトクホ緑茶開発 ～カテキンによるコレステロール低下作用とその機構～

株式会社 伊藤園 中央研究所 研究二課 小林誠

「はじめに」

緑茶の主要なポリフェノールはカテキン類であり主に、(-)-エピカテキン (EC)、(-)-エピカテキンガレート (ECG)、(-)-エピガロカテキン (EGC)、および(-)-エピガロカテキンガレート (EGCG) の4種が含有されている (図1 左)。カテキン類はガロイル基の有無により遊離型カテキン (EC および EGC)、ガレート型カテキン (ECG および EGCG) に大別される (図1 左)。緑茶抽出液中のカテキンのうち、ガレート型カテキンが約50-60%、遊離型カテキンが約30-40% 程度である。その中でEGCGの含量が最も高い。

緑茶カテキンは様々な健康機能性について研究されており、血清コレステロール低下作用についても疫学研究、ヒト介入試験、メタアナリシス、実験動物を用いた試験で多数報告されている。高コレステロール血症は冠動脈性心疾患の重要なリスクファクターのひとつである^{1,2)}。血漿コレステロール、特にLDL-コレステロールの上昇はアテローム性動脈硬化巣の発展を導く³⁾。動脈硬化症の進行は日本人の死因の約25%を占める心臓・脳血管疾患を引き起こすことから、予防が重要である。日本動脈硬化学会の動脈硬化性疾患予防ガイドライン2012年版⁴⁾では、主要危険因子である脂質異常症(高LDLコレステロール血症、低HDLコレステロール血症、高トリグリセリド血症)の診断から、冠動脈疾患既往歴の有無、他の主要危険因子や冠動脈疾患絶対リスク(一次予防)を考慮し、各リスク区分別脂質管理目標値を設定している。また、動脈硬化性疾患の予防には、脂質異常症を含む主要危険因子の管理を、早期から包括的に行うべきとの声明がなされている。



(-)-Epicatechin (EC): $R_1=R_2=H$

(-)-Epigallocatechin (EGC): $R_1=OH, R_2=H$

(-)-Epicatechin gallate (ECG): $R_1=H, R_2=X$

(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG): $R_1=OH, R_2=X$

(-)-Catechin (C): $R_1=R_2=H$

(-)-Gallocatechin (GC): $R_1=OH, R_2=H$

(-)-Catechin gallate (CG): $R_1=H, R_2=X$

(-)-Gallocatechin gallate (GCG): $R_1=OH, R_2=X$

図1 カテキン類の化学構造

左: カテキン、右: 熱異性化カテキン

太字: ガレート型カテキン、細字: 遊離型カテキン、X: ガロイル基

我々は、カテキンの血清コレステロール低下作用に着目し、ヒトにおいて効果を検証するとともに、特定保健用食品を開発・申請した。本講演では、その背景やヒト試験結果および血清コレステロール低下作用機構を中心に述べる。

「カテキンのコレステロール吸収抑制作用」

1986年、カテキンに血清コレステロール濃度低下作用があることが実験動物で報告された⁵⁻⁷⁾。糞便中のコレステロール排泄量が増加していたことから、カテキンは小腸でのコレステロールの吸収を阻害すると考えられた。

小腸でのコレステロール吸収過程は大きく分けて以下の5つに分類される。① 必須条件である胆汁酸ミセルへの溶解、② 胆汁酸ミセルからのコレステロールモノマーとしての放出、③ コレステロールモノマーの小腸上皮細胞表面微絨毛膜への取り込み、④ 上皮細胞内でのエステル化とカイロミクロンへの取り込み、そして⑤ リンパへの放出と続く。

そのため、コレステロール吸収が阻害されるかどうかを直接みるには、胸管リンパへのコレステロール吸収をみる必要がある。我々は胸管リンパカニュレーション手術を施したラットの胃内に放射性コレステロールとともにカテキンを投与すると、胸管リンパへの放射性コレステロールの吸収が抑制されることを示し、カテキンがコレステロールの吸収を阻害することを直接的に証明した⁸⁾。また、この吸収抑制作用はガレート型リッチな茶抽出物で遊離型リッチな茶抽出物よりも強いことを見出した(図2)。

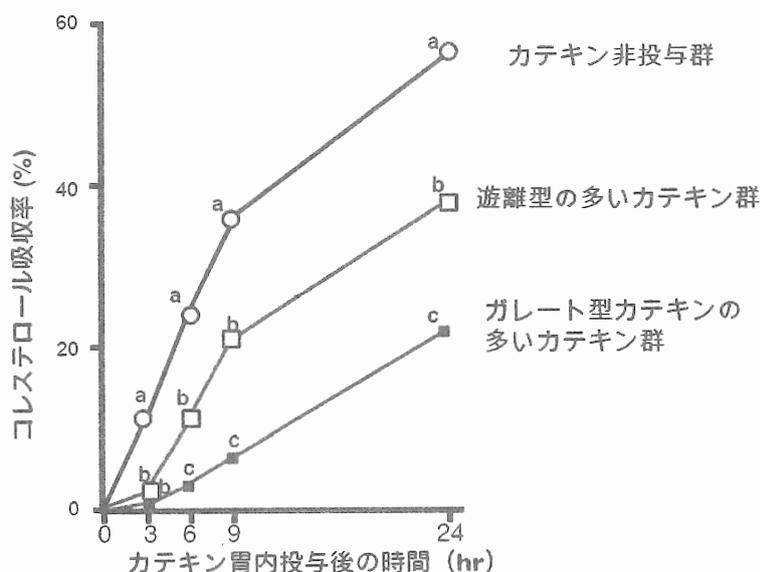


図2 胃内投与したカテキンが放射性コレステロールのリンパ吸収に及ぼす影響

¹⁴C-コレステロール 25 mg + 茶抽出物 100 mg を胃内投与. 平均 ± 標準誤差 (n=6) .

abc; 異なる文字間で有意差あり (p < 0.05) . 参考文献 8 より作成.

「カテキンのコレステロール吸収抑制の作用機構」

カテキンによって胸管リンパへのコレステロール吸収が抑制されたことから、コレステロール吸収の必須条件である胆汁酸ミセルへの溶解へのカテキンの影響を検討した。カテキンを人工胆汁酸ミセルに添加すると速やかに濁り、カテキンが人工胆汁酸ミセルに溶解したコレステロールを沈殿除去することを見出した。また、この作用はガレート型カテキンで、遊離型カテキンよりも顕著に強かった⁸⁾ (図3 左)。一方、胆汁酸濃度に影響は与えておらず、胆汁酸排泄を亢進して体内コレステロールプールサイズを減少させるとは考えられなかった (図3 左)。さらには、EGCG を人工胆汁酸ミセルに添加したときのコレステロールと EGCG 濃度を測定したところ、コレステロールおよび EGCG が添加量依存的に平行して沈殿することを示した (図3 右)。

これらのことから、我々は茶カテキン、特にガレート型カテキンが胆汁酸ミセル中のコレステロールと結合沈殿し、胆汁酸ミセルコレステロール濃度が減少することでコレステロール吸収が抑制されるという作用機構を提示した。遊離型カテキンの作用が弱いのは、コレステロールとの結合能力が弱いことによると考えられた。

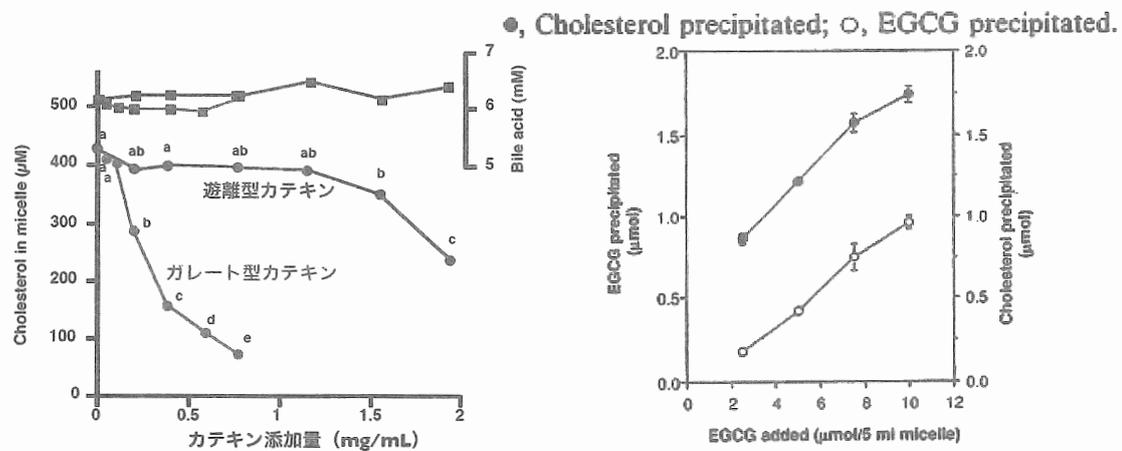


図3 胆汁酸ミセルへのカテキン添加に伴うミセル中コレステロールおよび胆汁酸濃度の変化 (左) と胆汁酸ミセルから沈殿したコレステロールおよび EGCG の変化 (右) 胆汁酸ミセルは 0.5 mM コレステロール, 0.6 mM ホスファチジルコリン, 6.6 mM タウロコール酸ナトリウムを含む。平均 ± 標準誤差 (n=3)。

abcde; 異なる文字間で有意差あり ($p < 0.05$)。参考文献 8 より作成。

「ヒトにおける効果 1」

我々が特定保健用食品の開発に着手した当時、緑茶摂取と血清コレステロール濃度の関連性について 3 つの疫学研究が報告されており⁹⁻¹¹⁾、これらの疫学研究の結果から、一日 10 杯以上の緑茶摂取 (480 mg 以上のカテキン類の摂取) が血清総コレステロール濃度を低下させるのに有効である可能性が示唆された。

そこで、1 回目の有効性検証試験として、1 本 (190 g) あたり 150 mg のガレート型カ

テキンを配合した飲料を用いて、被験飲料を食事の際に1本、1日2本または3本を8週間毎日摂取させるヒト介入試験により血清コレステロール低下作用について検討した。20歳以上の血清コレステロール値が200~280 mg/dlの境界域および軽度の高コレステロール値の男性被験者42名を、プラセボ飲料群、試験飲料2本群および3本群の3群に分け、8週間毎日摂取させた結果、試験飲料3本摂取群において、8週目に総およびLDL-コレステロール濃度が摂取前に比べて有意に低下し、プラセボ飲料群と比較しても有意に低下した¹²⁾。

このヒト試験結果と上述の血清コレステロール低下作用機構で特定保健用食品の申請をおこなったが、主に以下の3点について指摘を受け、許可には至らなかった。

- ・飲料中のカテキンはその加熱殺菌処理時にその約50%が熱異性化を受ける。これら熱異性化カテキン(図1右)での効果や作用機構については不明である。
- ・ヒト試験被験者が男性のみであり、女性でも効果があるかは不明である。
- ・審査基準の変更(摂取期間は3ヶ月以上、後観察期間の長期化、第三者機関での実施)

「熱異性化カテキンのコレステロール吸収抑制の作用機構」

そこで我々は、熱異性化カテキンのコレステロール吸収抑制の作用機構の検討をおこなった。その結果、ガレート型カテキンおよび熱処理ガレート型カテキン(熱異性化カテキンが50%程度生成)は胸管リンパへのコレステロール吸収を抑制し、その抑制作用は熱処理ガレート型カテキンのほうがガレート型カテキンよりも強いことを示した¹³⁾。また、熱処理によって生じるGCGおよびCGは、それぞれの由来であるEGCGおよびECGよりも強い胆汁酸ミセルからのコレステロール除去作用を示した¹³⁾。このことが、GCGおよびCG含量の増えた熱処理ガレート型カテキンが、通常のカレート型カテキンよりもコレステロールのリンパ吸収抑制作用が強い要因と考えられた。

さらに我々は、ガレート型カテキンと熱処理ガレート型カテキンの血清コレステロール濃度低下作用について、コレステロールを摂食させたラットを用いて比較した。その結果、ガレート型カテキンおよび熱処理ガレート型カテキンはラットの血清、肝臓コレステロール濃度を同程度低下させた¹⁴⁾。また、どちらのカレート型カテキンも糞便へのコレステロール由来中性ステロイド排泄量を増加させた(図4)。

これらの結果から、懸念されていた熱異性化によるコレステロール吸収抑制作用や血清コレステロール濃度低下作用の減弱化が起こらないことを示した。

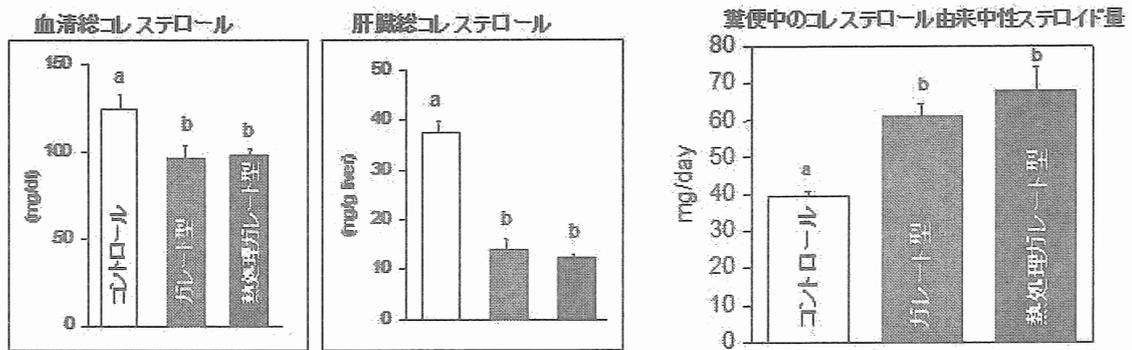


図 4 摂食試験でのラット血清および肝臓コレステロール濃度（左）および糞便中のコレステロール由来中性ステロイド量（右）

食餌は 0.5% コレステロール食、カテキン添加量は 1%, 3 週間ペアフィーディング。

平均 ± 標準誤差 (n=6) . ab; 異なる文字間で有意差あり (p<0.05) .

参考文献 14 より作成。

「ヒトにおける効果 2」

次に、二重盲検法によるガラクトース型カテキンの血清コレステロール低下作用について検証した¹⁵⁾。プラセボ飲料および 197.4 mg のガラクトース型カテキンを配合した試験飲料を、被験者に朝食および夕食の際にそれぞれ 1 本、1 日あたり 2 本を 12 週間毎日摂取させた。被験者は、平均年齢 48 ± 9 歳の男性 38 名、女性 22 名で、血清総コレステロール値が 180 ~ 259 mg/dl (平均値 222 ± 20 mg/dl) の境界域あるいは高めの方を選抜した。試験は、2 週間の前観察の後に 12 週間の試験飲料摂取試験を実施した。摂取開始 2 ヶ月および 3 ヶ月目に、試験飲料群で摂取開始前と比較して血清総コレステロール濃度が有意に低下した (図 5 左)。また、摂取開始 3 ヶ月目には、プラセボ群と比較して有意に低下した。LDL-コレステロール濃度が、摂取開始 2 ヶ月および 3 ヶ月目に、試験飲料群で摂取開始前と比較して有意に低下し、摂取開始 3 ヶ月目にはプラセボ群と比較して有意に低下したことから (図 5 右)、この総コレステロール濃度の低下は、主に LDL-コレステロール濃度の低下によるものと推察された。

しかしながら、男女で層別解析を行ったところ、男性ではカテキン摂取による総および LDL-コレステロール濃度の有意な低下が認められたものの、女性ではカテキン摂取による有意な低下は認められなかった (data not shown)。

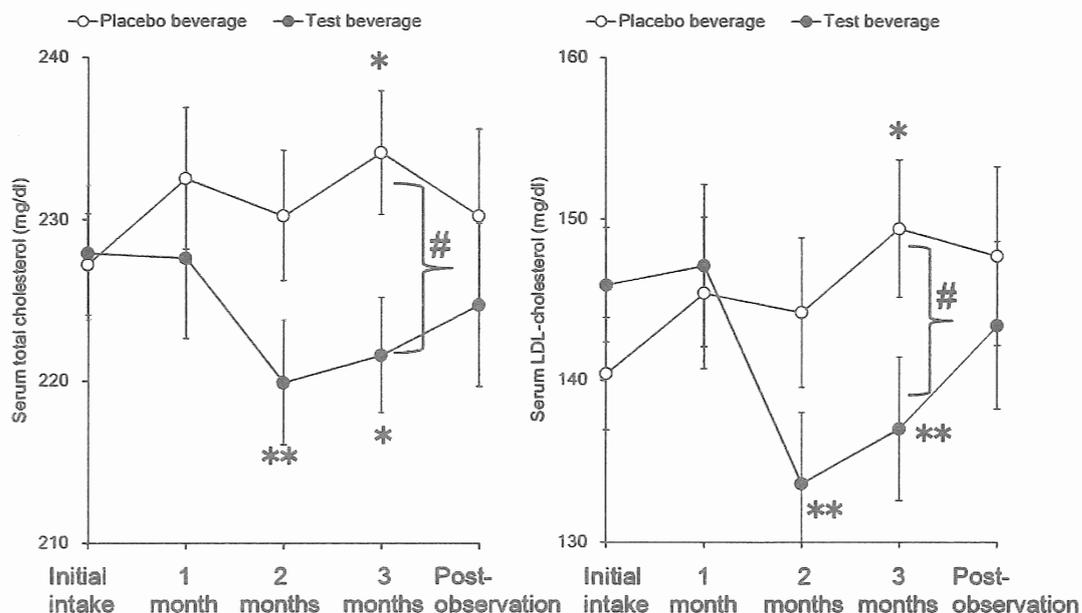


図 5 境界域あるいは軽度高コレステロール血症者の血清総コレステロール濃度（左）および LDL-コレステロール濃度（右）

197.4 mg のカテキン（約 50% が熱異性化体）を含む飲料（1 日 2 本）を 3 ヶ月摂取
 平均 ± 標準誤差（n = 30） 摂取開始時との有意差あり：* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ (paired t-test)
 プラセボとの有意差あり：# $p < 0.05$ (t-test)

参考文献 15 より作成.

熱異性化ガレート型カテキンの効果が通常のカレート型カテキンと少なくとも同等以上であることを示すことができると及びヒト試験 2 の結果から、再度特定保健用食品の申請をおこなった。しかしながら、女性のための追加試験を実施して女性での有効性を示されたいとの指摘を受けた。

「ヒトにおける効果 3」

そこで、女性を対象としたヒト介入試験を行った。空腹時血清総コレステロール値が 180 mg/dl 以上 260 mg/dl 未満の 25~85 歳の女性で、閉経前の女性では月経周期が 28 ± 4 日の方 148 名選抜した。被験者を 2 群に分け、ガレート型カテキン 196.2 mg 配合飲料および茶カテキンを配合していないプラセボ飲料を対照とした並行群間比較試験を行った。除外基準に該当するヒトを除き最終的に 132 名が評価対象になった。その結果、ガレート型カテキン群では摂取 4 週目から 12 週目にかけて総コレステロール値および LDL-コレステロール濃度が、プラセボ群に比べて有意に低下した¹⁶⁾。これらの結果より、女性においてもガレート型カテキン配合飲料の摂取により血清コレステロール濃度の改善作用が示された。

「コレステロールを低下させる特定保健用食品の表示許可とその後」

特定保健用食品の審査過程において結局3回のヒト試験が必要になり、約5年半の歳月を要して、2006年10月に、コレステロールを低下させる特定保健用食品「カテキン緑茶」の表示許可を取得した。その後、350 ml 容量の「引き締った味カテキン緑茶」の表示許可を取得し、2008年3月に発売を開始した。さらに、2007年に動脈硬化性疾患予防ガイドラインが改定されたことを受け、「LDL（悪玉）コレステロールを低下させる」の表示を追加した商品が許可され、2009年4月にリニューアル販売された。

さらに、カテキンの抗肥満作用に関する特定保健用食品の研究開発も進め、2011年3月に「LDL（悪玉）コレステロールを低下させる」および「体脂肪が気になる方に適している」の二つの機能性を併記した特定保健用食品の表示が許可され、2011年9月に「2つの働きカテキン緑茶」として2つのヘルスクレームの特定保健用食品が商品化された。

「我々が提示したガレート型カテキンのコレステロール吸収抑制機構は正しいのか？」

我々が提示したガレート型カテキンとコレステロールとの結合沈殿がコレステロール吸収抑制を引き起こすという作用機構は長らく信じられてきた。

しかしながら、最近になって EGCG が胆汁酸ミセルからコレステロールを除去するには、主要なリン脂質の一種、ホスファチジルコリンが必要であることが明らかになった¹⁷⁾。さらに NMR 法や分子間相互作用解析により、胆汁酸ミセル中で EGCG とホスファチジルコリンとの特異的相互作用は認められたものの、コレステロールとの相互作用は認められなかった¹⁷⁾。

現在、EGCG とホスファチジルコリンとの結合がどのようにコレステロールの吸収抑制を引き起こすのか検討中である。

「参考文献」

- 1) Martin, M. J.; Browner, W. S.; Hulley, S. B.; Kuller, L.H.; Wentworth, D. Serum cholesterol, blood pressure and mortality: implications from a cohort of 361,662 men. *Lancet*, **1986**, *2*: 933–936.
- 2) Okamura, T.; Tanaka, H.; Miyamatsu, N.; Hayakawa, T.; Kadowaki, T.; Kita, Y.; Nakamura, Y.; Okayama, A.; Ueshima, H. NIPPON DATA80 Research Group. The relationship between serum total cholesterol and all-cause or cause-specific mortality in a 17.3-year study of a Japanese cohort. *Atherosclerosis*, **2007**, *190*, 216–23.
- 3) Jain, K. S.; Kathiravan, M. K.; Somani, R. S.; Shishoo, C. J. The biology and chemistry of hyperlipidemia. *Bioorg Med Chem*, **2007**, *15*, 4674–4699.
- 4) 日本動脈硬化学会（編）：動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012 年版. 日本動脈硬化学会, 2012
- 5) Muramatsu, K., Fukuyo, M., and Hara, Y. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol

- level in cholesterol-fed rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **1986**, *32*, 613–62.
- 6) 福與真弓, 原征彦, 村松敬一郎. 茶葉カテキンの構成成分である(-) エピガロカテキンガレートの血中コレステロール低下作用. *日本栄養・食糧学会誌*. **1986**, *39*, 495–500.
 - 7) Matsuda, H.; Chisaka, T.; Kubomura, Y.; Yamahara, J.; Sawada, T.; Fujimura, H.; Kimura, H. Effects of crude drugs on experimental hypercholesterolemia. I. Tea and its active principles. *J Ethnopharmacol*, **1986**, *17*, 213–224.
 - 8) Ikeda, I.; Imasato, Y.; Sasaki, E.; Nakayama, M.; Nagao, H.; Takeo, T.; Yayabe, F.; Sugano, M. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim. Biophys. Acta*. **1992**, *1127*, 141–146.
 - 9) Imai, K.; Nakachi, K. Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *BMJ*. **1995**, *310*, 693–696.
 - 10) Kono, S.; Shinchi, K.; Ikeda, N.; Yanai, F.; Imanishi, K. Green tea consumption and serum lipid profiles: a cross-sectional study in northern kyushu, Japan. *Prev med*. **1992**, *21*, 526–531.
 - 11) Kono, S.; Shinchi, K.; Wakabayashi, K.; Honjo, S.; Todoroki, I.; Sakurai, Y.; Imanishi, K.; Nishikawa, H.; Ogawa, S.; Katsurada, M. Relation of green tea consumption to serum lipids and lipoproteins in Japanese men. *J Epidemiol*. **1996**, *6*, 128–133.
 - 12) 野澤歩, 杉本明夫, 永田幸三, 角田隆巳, 堀口倫博. 茶カテキン配合飲料の血清コレステロール値低下作用. *健康・栄養食品研究*. **2002**, *5*, 1–9.
 - 13) Ikeda, I.; Kobayashi, M.; Hamada, T.; Tsuda, T.; Goto, H.; Imaizumi, K.; Nozawa, A.; Sugimoto, A.; Kakuda, T. Heat-epimerized tea catechins rich in gallic catechin gallate and catechin gallate are more effective to inhibit cholesterol absorption than tea catechins rich in epigallocatechin gallate and epicatechin gallate. *J. Agric. Food Chem*. **2003**, *51*, 7303–7307.
 - 14) Kobayashi, M.; Unno, T.; Suzuki, Y.; Nozawa, A.; Sagesaka, Y.; Kakuda, T.; Ikeda, I. Heat-epimerized tea catechins have the same cholesterol-lowering activity as green tea catechins in cholesterol-fed rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2005**, *69*, 2455–2458.
 - 15) Kajimoto, O.; Kajimoto, Y.; Yabune, M.; Nozawa, A.; Nagata, K.; Kakuda, T. Tea catechins reduce serum cholesterol levels in mild and borderline hypercholesterolemia patients. *J. Clin. Biochem*. **2003**, *33*, 101–111.
 - 16) Kajimoto, O.; Kajimoto, Y.; Takeda, M.; Nozawa, A.; Suzuki, Y.; Kakuda, T. A beverage containing tea catechins with a galloyl moiety reduce serum cholesterol level in hypercholesterolemia women. *Health Sci*. **2006**, *22*, 60–71. in Japanese with English summary.
 - 17) Kobayashi, M.; Nishizawa, M.; Inoue, N.; Hosoya, T.; Yoshida, M.; Ukawa, Y.; Sagesaka, Y.; Doi, T.; Nakayama, T.; Kumazawa, S.; Ikeda, I. Epigallocatechin gallate decreases the micellar solubility of cholesterol via specific interaction with phosphatidylcholine. *J. Agric. Food Chem*. **2014**, *62*, 2881–2890.

GC/MSによる呼気分析

○藤村 秀¹、加賀 直子²、高 ひかり¹、飯森 聖²、岡山 美昭²
¹東北薬科大学、²丽天堂大学

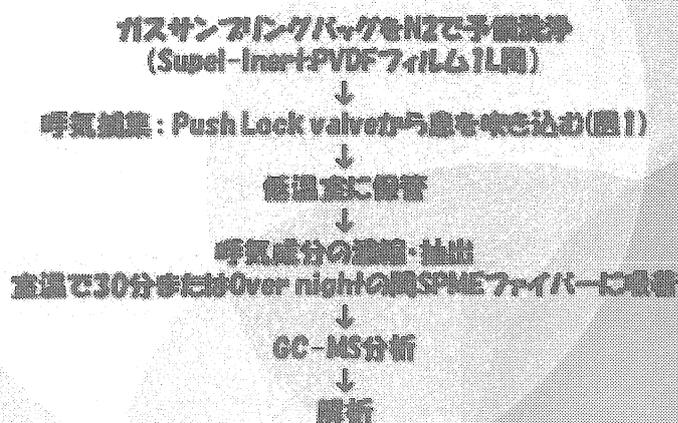
目的

- * 食道扁平上皮癌における呼気中の臭気測定を行い、臭気の原因となっている物質を特定することによって非侵襲的な食道扁平上皮癌の臨床マーカーの開発を目的とする。
- * 進行食道癌患者の呼気を収集しGC-MSを用いて検出を行い、食道癌に特異的な揮発性有機化合物を同定する、進行度別の比較を行い、より早期での食道癌検出を目指す。

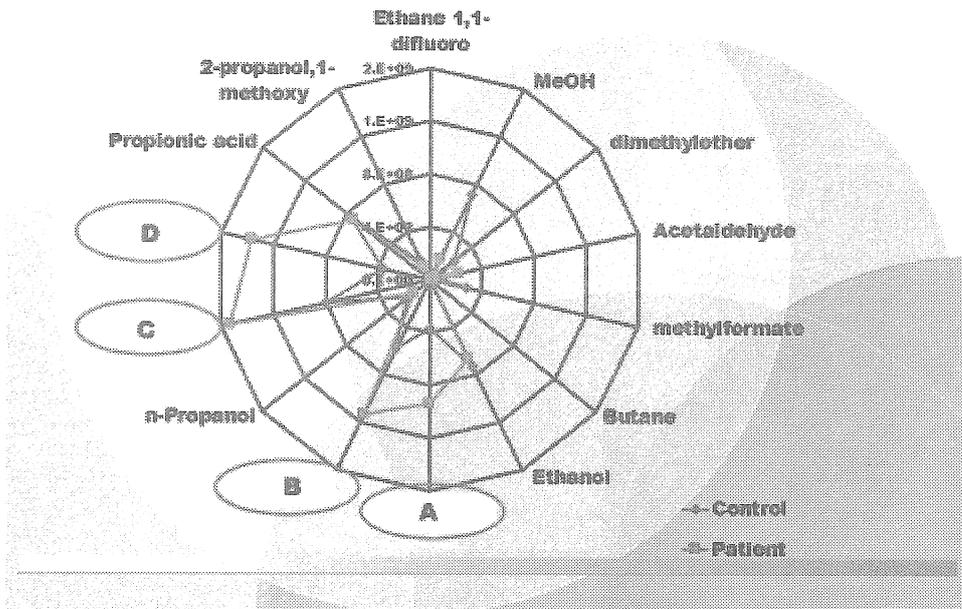
方法

2012年7月～2013年11月に食道癌と診断され治療中の食道扁平上皮癌患者45名と癌の既往のない健康者の呼気をTedlar Gas Sampling bags (Sigma-Aldrich Japan)を用いて収集した。患者群と健康者群にはそれぞれ問診を行い、加療中の疾患、内服の有無、喫煙の有無、家族歴等を確認した。代謝に変化を与える可能性のある放射線、化学療法を施行された患者は除外した。

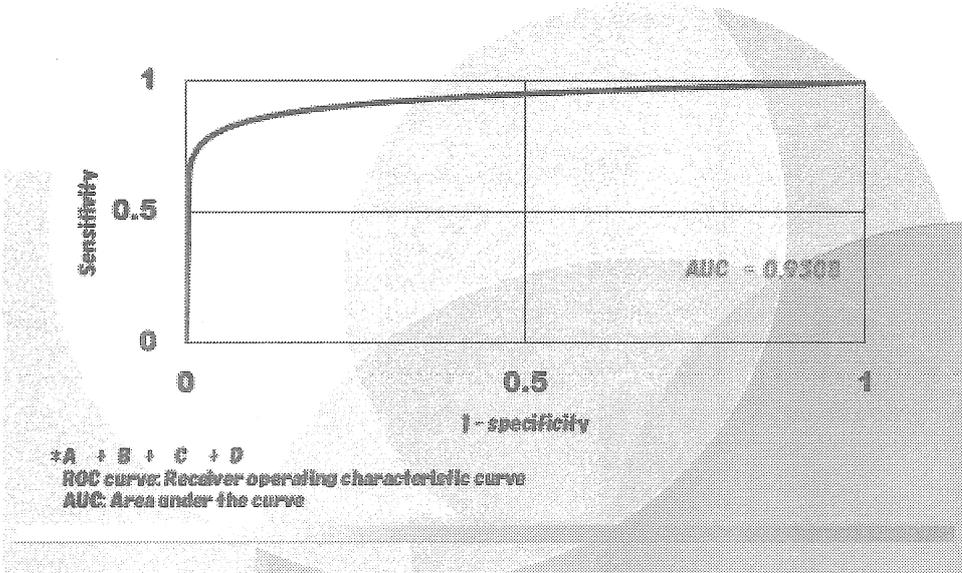
呼気サンプルの捕集 マイクロ固相抽出(SPME)-GC/MSを用いた呼気分析



[2] 吸着させた呼気成分の分布比較



[3] 同定した呼気成分のROC曲線



まとめ

*今回我々は食道扁平上皮癌患者の呼気分析を行い、患者群の臭気成分が健常者と明確に区別できることを確認した。特にA, B, C, Dの4成分は食道癌患者で有意に上昇していた。また、そのROC曲線におけるAUCは0.9308と高い判別結果であり、非侵襲的で食道扁平上皮癌に特異的な診断法となる可能性を示した。

*今後は検体数を増やすとともに食道癌の深達度や進行度の比較を行い、より早期の食道癌診断について検討する。

MEMO

A series of horizontal dashed lines for writing.

〔技術講演〕

半導体センサーGCを用いた呼気中アセトアルデヒド測定による 食道がん高危険群スクリーニング

日本写真印刷株式会社

○花田真理子、上坂亜紀、丸山 潤、田中克之
エフアイエス株式会社

翁長一夫、坂本洋志、片山 仁

1. はじめに

飲酒は古くから生活に浸透した習慣・文化であり、時に生活に潤いを与えてくれるものである一方、不適切な飲酒はさまざまな健康障害を引き起こす。その要因のひとつがアセトアルデヒドである。2009年に世界保健機構 WHO の下部組織である国際がん研究機関(International Agency for Research of Cancer : IARC)は、飲酒によって摂取したアルコールの代謝産物であるアセトアルデヒドが明らかな発がん物質であると認定した。

難治性がんである食道がん・頭頸部がんの重大な誘発因子は飲酒である。飲酒後、エタノールの代謝によって体内で産生したアセトアルデヒドはアルデヒド分解酵素 ALDH2 によって分解され無害化されるが、ALDH2 のアルデヒド分解能力にはその遺伝子型による差があり、活性型(野生型)と不活性型(ヘテロ欠損型及びホモ欠損型)に分かれる。不活性型の遺伝子型保持者の場合、体内にアセトアルデヒドが滞留する時間が長くなるため、食道がんの発症リスクが高くなる¹⁾。従って、ALDH2 遺伝子型を検査することは、食道がんの高危険群を抽出し、節酒・禁酒指導によって発症リスクを低減するなど、先制医療・予防医療の観点から有用である。ALDH2 遺伝子型を調べる方法として、血液検査の他、パッチテストやフラッシング問診法などがあるが、遺伝子検査は高価で時間がかかり、また倫理上の制約もあり、パッチテストやフラッシング問診法は精度が不十分であるという問題がある。

本開発の共同開発者である京都大学大学院医学研究科腫瘍薬物治療学講座の武藤らは、呼気中のアセトアルデヒド濃度が ALDH2 遺伝子型と関連すること、さらにその遺伝子多型が食道がん・頭頸部がんの発生母地となる field cancerization 現象(前がん病変が多発する現象)と関連することを明らかにし^{2) 3)}、これらの研究結果から、呼気中のアセトアルデヒド濃度による ALDH2 遺伝子型判定により、食道がん高危険群のスクリーニングが可能と考えた。

一方、我々は高感度半導体ガスセンサーを検出器とし、オリジナル小型カラムを用いたガスクロマトグラフ(エフアイエス(株)製センサガスクロマトグラフ、以下 SGC)の開発を行ってきた。そこで、SGC 技術の展開として、呼気中の微量アセトアルデヒド濃度を分析することにより ALDH2 の遺伝子型を高精度に判定し、非侵襲にかつその場で食道がん・頭頸部がんの高危険群であるかどうかを判定する手法、測定器、及び周辺装置を開発した。

2. 呼気中アセトアルデヒド/エタノール測定器 “エアロクロマ”

飲酒によって摂取したエタノールとその代謝産物であるアセトアルデヒドの呼気中濃度を測定

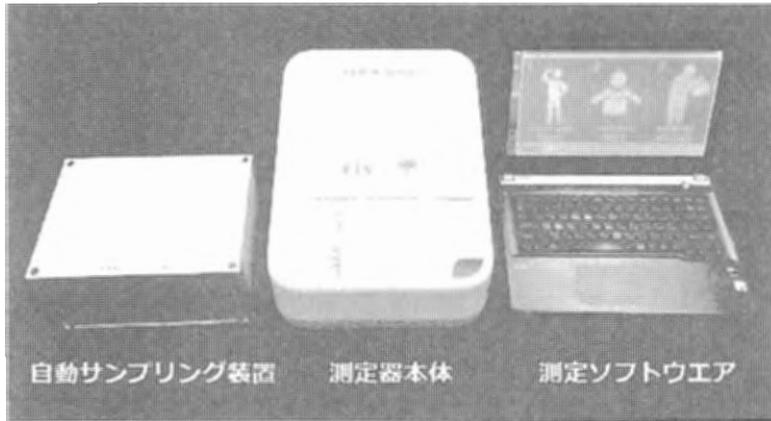


図1
測定器一式の外観写真

する小型ガスクロマトグラフ“エアロクロマ”の測定装置一式外観写真を図1に、測定器の構成を図2に示す。

検出器には長径約 0.5mm の楕円球形状の金属氧化物半導体ガスセンサーを使用した。素子の構造を図3に示す。このセンサーは小型でガス応答が速く、GC の検出器に適している。感ガス体にはアルデヒドに高感度な材料を用いている。カラムはオリジナル小型パックドカラムを採用した。従来のGCとは異なりカラムに直接ヒーターを取り付けることで省電力・省スペースを達成した。また、パックドカラムの選択による試料容量の確保と、充填材量を極力少なくし、試料ガスの充填材への吸着量を抑えることで高感度化にも寄与している。以上の構成により、ppb レベルのアセトアルデヒドを試料ガスの濃縮なしに、わずか4分という測定することが可能となった。

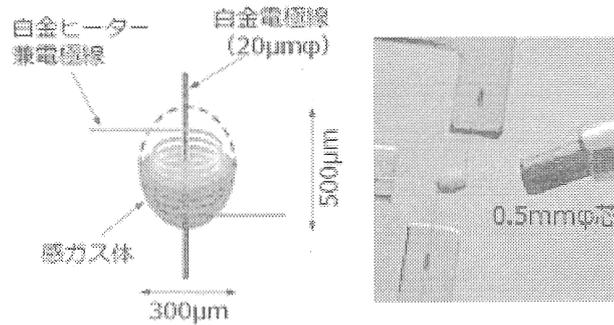
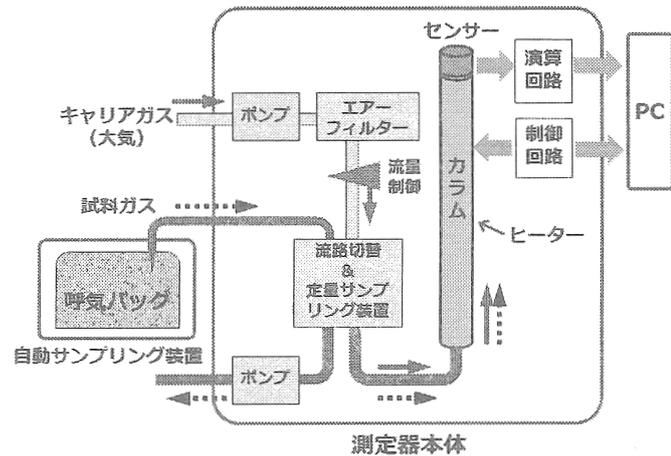


図3 ガスセンサーの構造

測定を簡便にするため、専用の自動サンプリング装置も開発した。呼吸を採取したガスバッグを自動サンプリング装置にセットすると、一定時間流路中の空気を試料ガスでパーージした後、自動的に測定器に定量 (5cc) の試料が導入され測定がスタートする。被験者への指示やクロマトグラムのリアルタイム表示、演算、測定結果表示は専用の PC ソフトウェアで行う。

また、キャリアガスに高圧ガスではなく小型ポンプで取り込んで浄化した自然大気を採用したこと、測定器本体の大きさは約 280(W)×170(H)×385(D)mm、本体重量は約 5kg と小型軽量であることにより、設置が簡単で可搬性が良く、測定現場に持ち込める測定器とすることができた。

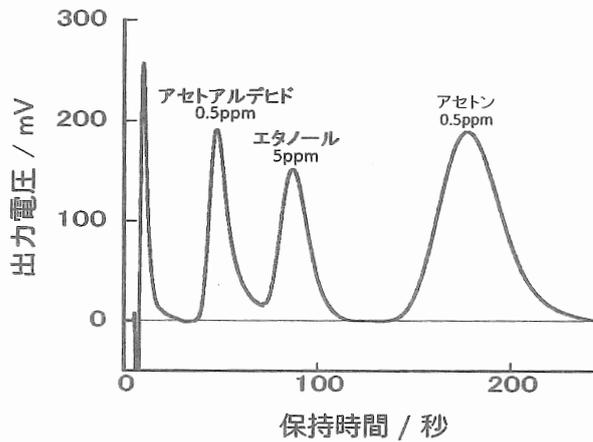


図4 標準ガスクロマトグラム

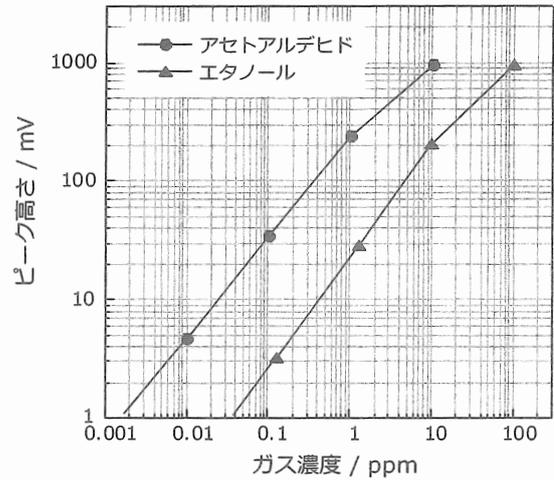


図5 ガス濃度とピーク高さの関係

開発した測定器の呼気成分測定クロマトグラムを図4に、ガス濃度とピーク高さの関係を図5に示す。S/Nを考慮したこの測定器の検出限界は約1 mVであり、アセトアルデヒドについては数 ppb、エタノールについては約十 ppb から測定可能であり、後述する測定プロトコルで採取した呼気中のアセトアルデヒド及びエタノールの濃度を測定するのに十分な感度を有している。

3. 終末呼気採取バッグ

呼気中のアセトアルデヒドは非常に微量であること、またアセトアルデヒドは吸着性の高いガスであることから、呼気中のアセトアルデヒドをロスなく回収することは困難であった。また、測定対象である終末呼気を採取するために、市販されている終末呼気採取システムや採取装置は構造や使用方法が複雑、あるいは高価であるという問題があった。

そこで我々は簡単に効率よく終末呼気を採取できる、容積約 300mL の呼気バッグを考案した。図6に開発した終末呼気採取バッグの概要図を示す。呼気バッグに取り付けた2本のストローの片方からバッグ内に肺活量相当の呼気を吹き込むとバッグ内の呼気は最低でも5~6回置換されるため、最初に排出される口腔や気管支など死腔の空気を含まない終末呼気だけを採取することができる。呼気採取後はストローを抜き取り、出口を軽く折り曲げると、呼気中の水分で出入口のシートは密着するため測定中の密封性は保つことができる。バッグの素材についても検討し、ガス吸着性が低く、素材から発生するガスが少ない、微量のアセトアルデヒドをロスなく回収可能でかつ測定に影響しない素材を採用した。

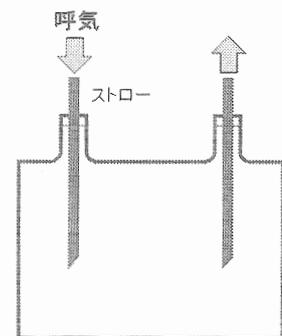
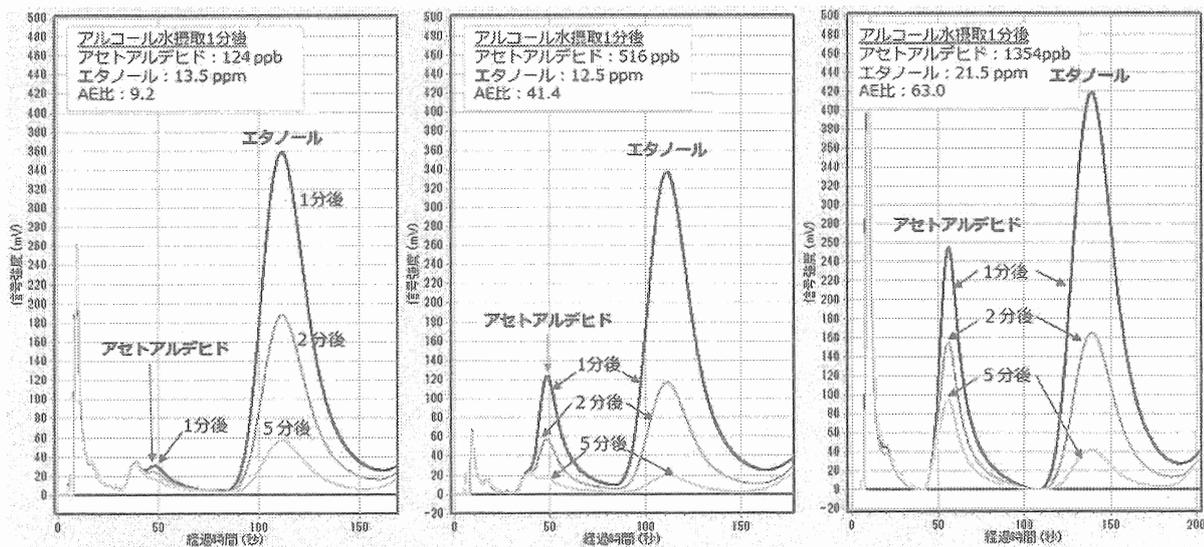


図6 終末呼気採取バッグ

4. ALDH2 遺伝子型及び食道がん発生危険度判定方法

開発した測定器を用いた ALDH2 遺伝子型及び食道がん発生危険度判定方法を検討した。アルコール負荷は未成年やお酒に弱い人でも検査でき、かつ判定精度に必要なアルコール量である0.5%のアルコール水 100 cc (エタノール 0.5 g) を経口摂取することとした。



a) 野生型 (野生型) b) 不活性型 (ヘテロ欠損型) c) 不活性型 (ホモ欠損型)

図7 エタノール 0.5g 摂取 1分後、2分後、5分後のクロマトグラム

図7に活性型(野生型)被験者と不活性型(ヘテロ欠損型及びホモ欠損型)被験者のアルコール水摂取 1分後、2分後、5分後の呼気測定クロマトグラム例を示す。活性が低いALDH2遺伝子型被験者ほど呼気中アルデヒド濃度が高く、濃度減衰に時間を要するという、明確な差が認められた。

次に、107名の健常ボランティアについて、開発した測定器でアルコール水摂取 1分後の呼気中のアセトアルデヒド及びエタノール濃度を測定し、ALDH2遺伝子型との関係を調べた。血液検査(SMAP法)によって検査した被験者のALDH2遺伝子型は、野生型50人、ヘテロ欠損型47人、ホモ欠損型10人であった。図8に呼気中アセトアルデヒド濃度とエタノール濃度の関係、図9にALDH2遺伝子型とアセトアルデヒド濃度の関係を示す。アルコール水摂取 1分後の呼気中アセトアルデヒド濃度の中央値は、活性型(野生型)89 ppb(分布 18 - 399 ppb)、不活性型のヘテロ欠損型 346 ppb(分布 78 - 1218 ppb)、ホモ欠損型 537 ppb(分布 213 - 1353 ppb)と、活性型被験者の方が不活性型被験者よりもアセトアルデヒド濃度が低い傾向が認められたが、濃度分布に重なりがあるためアセトアルデヒド濃度のみで活性型と不活性型とを明確に判別することはできなかった。この原因はアルコール吸収速度の個人差であると考え、次に判定指標として呼気中アセトアルデヒド濃度/アルコール濃度比(以下AE比)を検討した。図10に、ALDH2遺伝子型とAE比の関係を示す。AE比23付近を境に、活性型と不活性型の値が分離する結果が得られた。そこで、AE比23.3未満を活性型、23.3以上を不活性型としてALDH2遺伝子型判定を行った結果、感度100%、特異度92%、精度96.3%(95%CI:91.5-96.9%)となり、高い精度でALDH2遺伝子型を判定することができた。

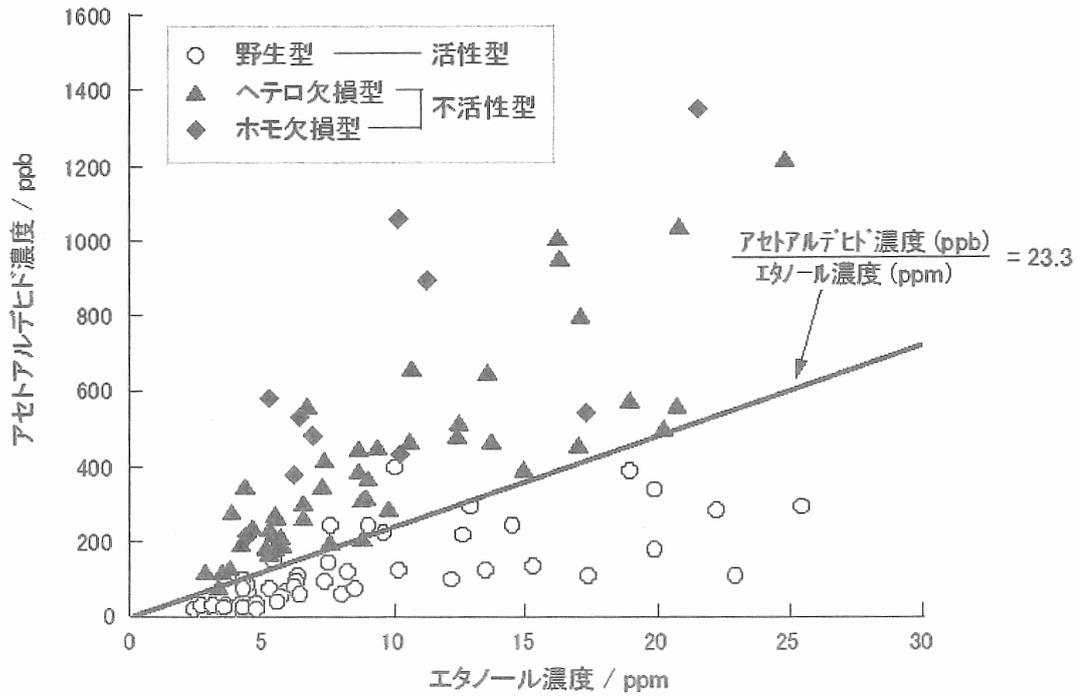


図8 エタノール0.5g 摂取1分後の呼気中アセトアルデヒド及びエタノールの濃度分布

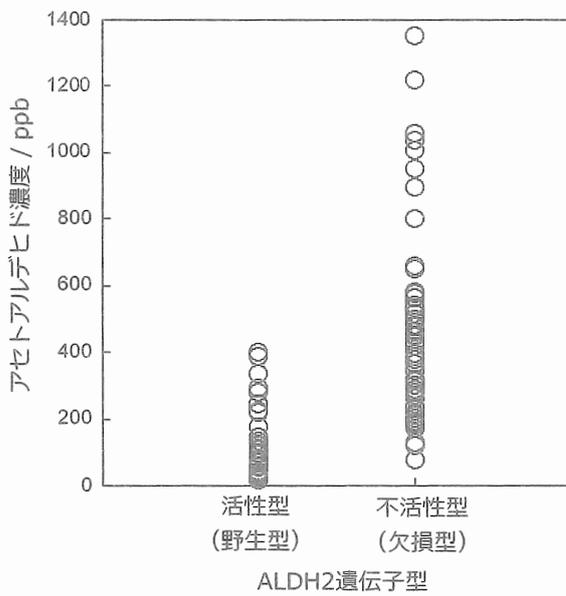


図9 ALDH2 遺伝子型とアセトアルデヒド濃度の関係

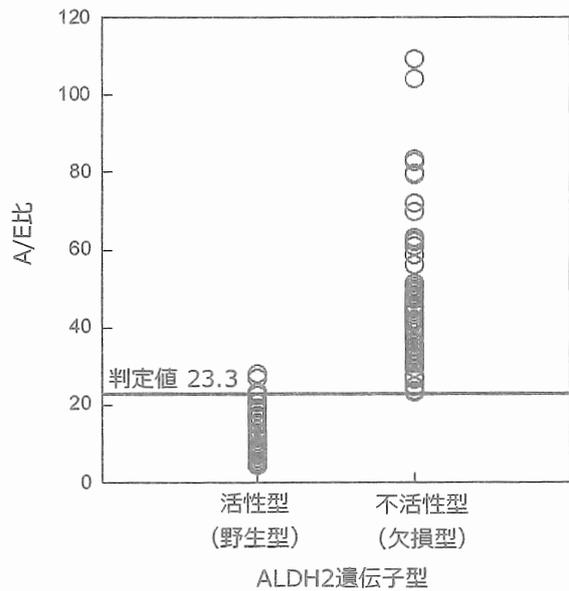


図10 ALDH2 遺伝子型とAE比の関係

5. まとめ

少量のアルコール負荷後の呼気中アセトアルデヒド及びエタノールの濃度測定することにより、アルデヒド分解酵素 ALDH2 遺伝子型を非侵襲に高精度に判定し、食道がん高危険群をスクリーニングする検査方法及び測定器を開発した。この測定器を一般検診や学校検診に導入することにより、食道がん高危険群であるかどうかを診断し、節酒・禁酒指導による発がん危険性の低下や、定期的な内視鏡検査受診による早期発見率の向上に役立てられると考えており、実用化に向けて更なる精度の検証を行っていくとともに、関係機関への働きかけを行っていく予定である。

更に、本検査は飲酒後に体内で産生される発がん性物質アセトアルデヒド濃度を定量的に直接測定していることから、ALDH2 遺伝子型によるアルデヒド分解活性に加えて被験者の肝機能の状況も反映した、より正確な発がんリスク判定方法である可能性がある。また、AE 比はアルコール代謝能を数値化した指標であることから、肝機能の簡便な評価方法として利用できる可能性もある。今後これらの観点についてもデータを蓄積し、更なる用途開発を行っていく予定である。

参考文献

- 1) A. Yokoyama, T. Omori, *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 33(3), 111 (2003)
- 2) M. Muto, et al., *Carcinogenesis*, 26(5), 1008 (2005)
- 3) M. Muto, et al., *Carcinogenesis*, 23(10), 1759 (2002)

〔技術講演〕

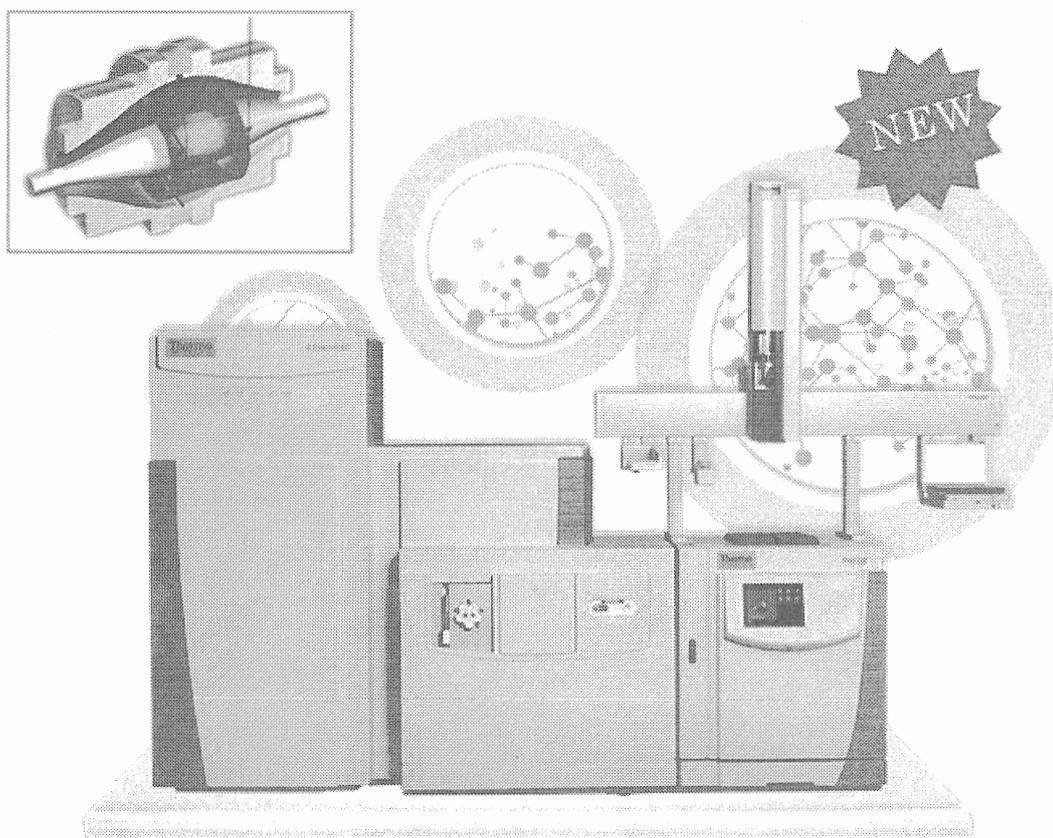
高分解能・精密質量測定 GCMS 装置のご紹介

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社
クロマトグラフィー & MS 事業部 マーケティング部
榎本 好宏（えのもと よしひろ）

〔発表内容〕

弊社が所有する Thermo Scientific™ Orbitrap™ テクノロジーは、高分解能・精密質量測定において優れたパフォーマンスを発揮しています。精密質量を高い確度と精度で測定することができ、定性から定量分析まで一台で測定可能です。このテクノロジーが製品化され、今年 10 周年を迎えています。分析が難しいとされているサンプルの詳細な解析を実現するために、GC-MS システムにおいても性能強化を実現しました。

本発表では、弊社の新製品である Q Exactive™ GC Orbitrap™ GC-MS/MS システムについてご紹介いたします。

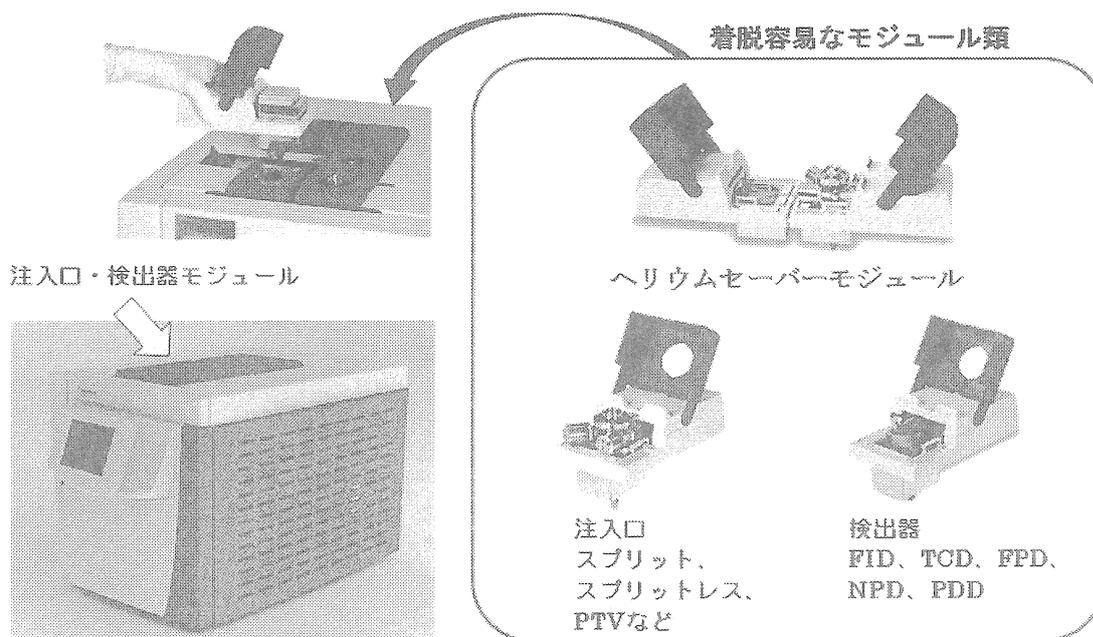


Q Exactive GC Orbitrap GC-MS/MS システム

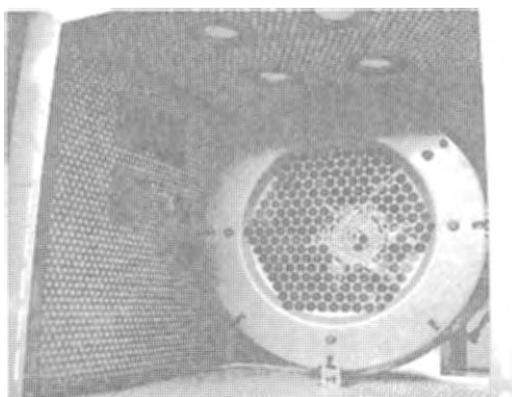
[付録資料]

GC 部装置のご紹介 (製品名: Thermo Scientific™ TRACE™ 1310 ガスクロマトグラフ)

TRACE 1310 ガスクロマトグラフを使用すると、生産性の向上、応答時間の短縮、総所有コストの低減を実現できます。多用途性と優れた GC/GC-MS 性能を備え、大規模な生産ラボや QA/QC ラボ、研究組織に適しています。このシステムには、装置コントロール、ステータスモニタリング、および装置上でのメソッド開発に使用できるフルタッチスクリーンが備えられています。Instant Connect インジェクターおよび検出器を使用すると、モジュールを数分で交換して別のワークフローに合わせて再構成したり、新しいメソッドを開発したり、メンテナンスに伴うダウンタイムを低減したりできます。

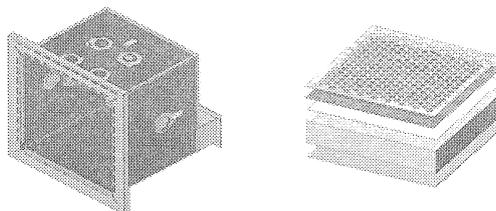


1000個の穴あきオープン



分析サイクルの短縮に役立ちます!

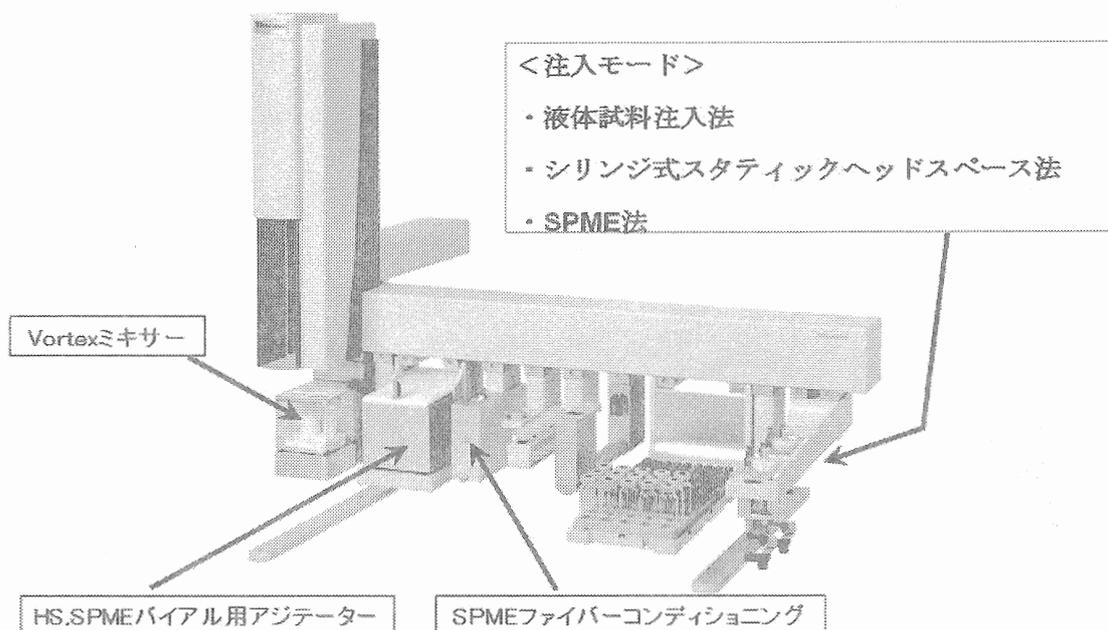
- 温度制御: 室温 +3 ~ 450°C
- 33段昇温
- 温度制御ステップ: 0.1°C
- 450°C から 50°C へ冷却時間、4分以下
- 最大昇温速度



オートサンプラーのご紹介（製品名:Thermo Scientific™ TriPlus RSH™ オートサンプラー）

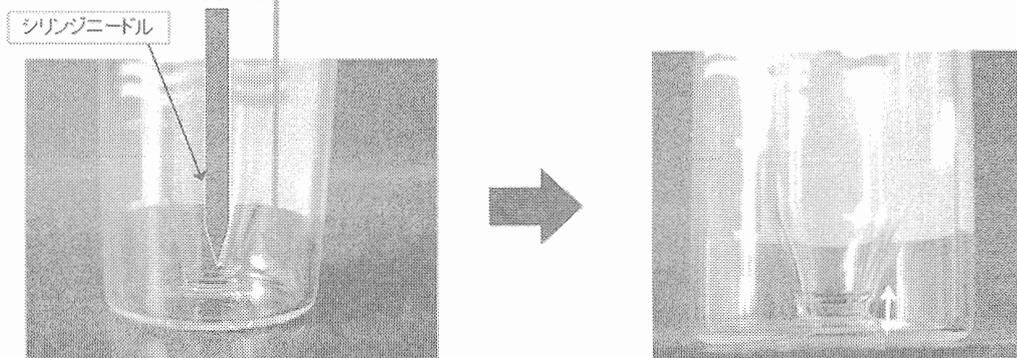
GC および GC-MS で最高品質の結果を得るためには、正確で再現性の高いサンプル調製およびサンプル導入が不可欠です。標準希釈から注入までワークフロー全体を自動化することで、データの精度と再現性およびラボの生産性を高めることができます。

TriPlus RSH オートサンプラーでは、自動化の機能が液体、ヘッドスペース、および SPME 注入まで拡張されています。高度なロボットを内蔵し、きわめて高い精度やサンプル処理の柔軟性と、週末の無人運転が可能な信頼性を実現します。



バイアル底面認識機能 (Vial Bottom Sensing)

- ・バイアル底面の位置を自動認識することにより、5 μ L のわずかな試料の吸入が可能に
(ダイオキシン、POPs 分析、生体試料分析、各種実験サンプルなど)
- ・バイアル内で濃縮した試料も採取

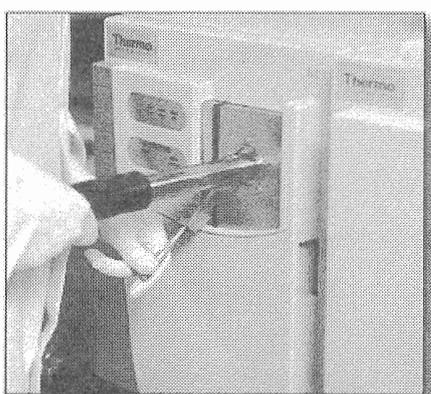
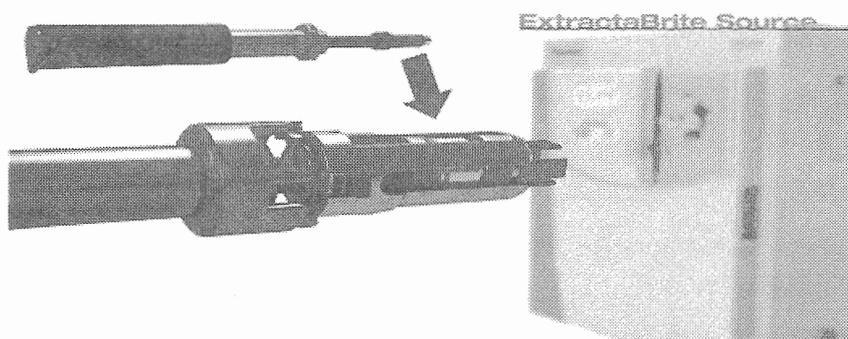


① シリンジをやさしく底面に押し当てて、位置を認識します。

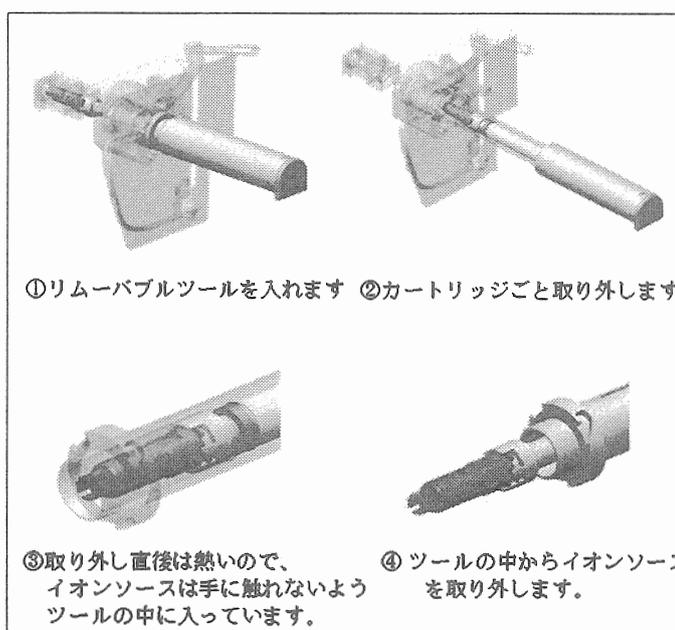
② わずかな液量でも吸入します。

質量分析部装置装置の機能 (真空ロックシステム)

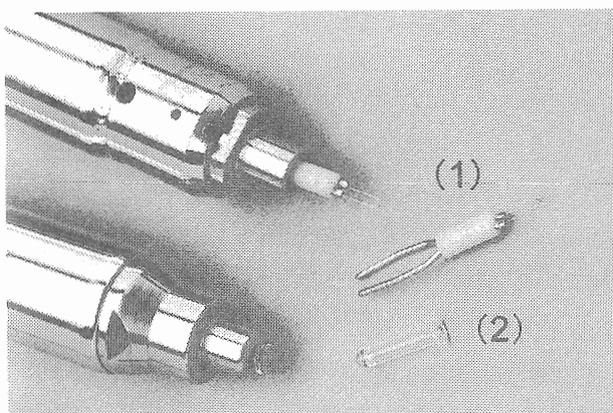
イオンソースの取り外しに、真空解除の必要なし！



真空解除せずにイオンソースの取出し可能



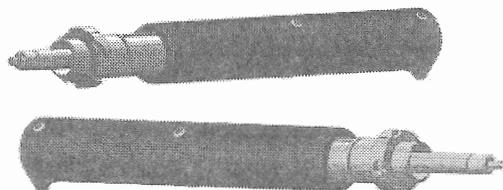
真空ロックシステムを利用して、直接試料導入法が可能



プローブとチップ (1)DEP (2)DIP

直接試料導入法とは試料を直接、質量分析する手法

- DEP、DIP の 2 種類のプローブ
- 真空ロック機能と組み合わせ、簡単かつ迅速に分析



〔技術講演〕

マトリックス成分から見た食品中残留物分析

アジレント・テクノロジー（株）杉立 久仁代（すぎたて くによ）

【はじめに】

日本の高度成長期には多くの化学物質が合成され、安定で豊かな私たちの生活を支えてきた。しかしながら一方で毎日口にする食品を汚染し、人工的な化学物質を含まない食品は存在しないのではないかと思うくらい、使用されている化学物質は多岐に渡っている。食品中に含まれる化学物質は食品添加物や人工甘味料、色素など意図的に添加しているものと、環境からの汚染（ダイオキシンやPCB、フタル酸エステル類など）や残留農薬がある。中でも、世界中で使われている農薬は約 800 種類とも言われており、食品の安全を守るための分析技術の発展は著しい。

食品中の残留農薬分析は、先人たちの知恵と経験により試料や対象農薬に照準を絞った前処理方法が多く存在する。最近ではあまり使われなくなってしまったが、フロリジルやシリカゲルカラムにしても充填量や含水比率、溶出溶媒の種類からその混合比率など細かな検討が行われていた。また、硫黄を含む玉ねぎやニンニクであれば硝酸銀アルミナカラムを使用したり、お茶中のタンニン除去のために酢酸鉛処理が使われるなどしてきた。しかし、特にポジティブリスト制度施行後は、対象物質の拡大に伴い、より多くの物性に対応できる“お決まり”の前処理となっており、あまり逸脱した前処理方法は近年では用いられていない。

一方で、分析に際して“汚い”検液といった言葉が使われているが、それは、検液の色が濃い、あるいは分析したクロマトグラムの対象化合物に夾雑成分が被って見えない、リテンションタイムが大きすぎた、などから判断している。しかしながら検液中にどのような夾雑成分が含まれているのかについて、これまで分析対象とはされてこなかった。食品は多岐に渡るため、その成分を調べることは難しい、とされてきたからである。しかし、食品中の夾雑成分を調べることができれば、前処理方法の開発や評価につなげられる有用な情報が得られる。

【代謝物分析のアプローチ】

生命現象を理解するには、ゲノム情報、タンパク質情報、代謝物情報などを網羅的に解析する手法がありオミックス解析と言われている。中でも代謝物は何十万と存在するタンパク質と比べ数も少なく（ヒトの場合：遺伝子 25,000 個、タンパク質 50 万個以上(200 万とも)、代謝物 42,000 個(HMDBに登録されている数))、比較的低分子のため、近年発達している質量分析計などの機器を使って分析しやすい。さらに、遺伝子上に潜在的に持っている情報でも、それらが生涯の間に発現するかしないかは未知であるが、代謝物は現在の生体内の状態を“丸ごと”表わすため、種々の有用な情報が得られる可能性があり、病気の診断、

バイオエネルギー、食品など様々な分野で使用されている。この代謝物分析は生体内の代謝物を網羅的に分析するため、残留農薬分析のような精製の工程はほとんどなく、いわば非常にクルードなサンプルを測定することとなる。興味深いことに、農作物や肉、魚などの微量有機汚染物質を測定する際に妨害となっているマトリックスと呼ばれている成分は、抽出の工程で巨大分子であるタンパク質や炭水化物は除去されるため、低分子の代謝物であると考えられる。そう考えると、これまで食品の残留農薬分析上で測定できないと思われていた成分を測定する手段がありうるということになる。

【GC-MS を用いた代謝物分析】

代謝物は生体内で代謝されるため、水酸基やカルボキシル基、あるいはアミノ基といった代謝されやすいような官能基がついていることが多い。このような官能基を持つ代謝物を網羅的に分析するためには一般によく知られているトリメチルシリル化(TMS 化)という誘導体化を行う。(厳密には TMS 化の前にオキシム化といった処理が入る)本来は、官能基に応じて最適な誘導体化が存在するが、アミノ酸・有機酸・糖・核酸・脂肪酸・ステロールといった種々の代謝物を網羅的に分析するため、最大公約数である TMS 化が使われている。

そこで、残留農薬分析におけるマトリックス成分を調べるため、代謝物分析の手法に従い誘導体化を行って測定した結果、種々の知見を得ることができたので報告する。

【マトリックス効果原因物質の探索】

残留農薬分析で最も問題になるのがマトリックス効果である。GC-MS の場合、標準溶液のレスポンスに対して検液中の農薬のレスポンスが上がる正のマトリクス効果が多い。そこで、種類の異なる作物について、通知法による前処理を行った検液について、さらに誘導体化を行って測定したところ、作物が異なっても共通の成分(モノアシルグリセロール、トコフェロール、ステロールなど)が残留することが分かった。水溶性の高いアミノ酸や糖は抽出の工程で除去され、脂肪酸は固相カラムで除去できているため、農薬と極性の近い成分や、あるいは少し極性の低い成分が残ったと考えられる。特にモノアシルグリセロールはこれまでは食品成分としては注目されてこなかったが、C14-18 を中心とした多くの種類のモノアシルグリセロールが検液中に高濃度で含まれ、これらがマトリックス効果を引き起こす主たる物質であることが分かった。さらに残留するモノアシルグリセロールの濃度によって、マトリックス効果の程度も大きく変動することが分かった。

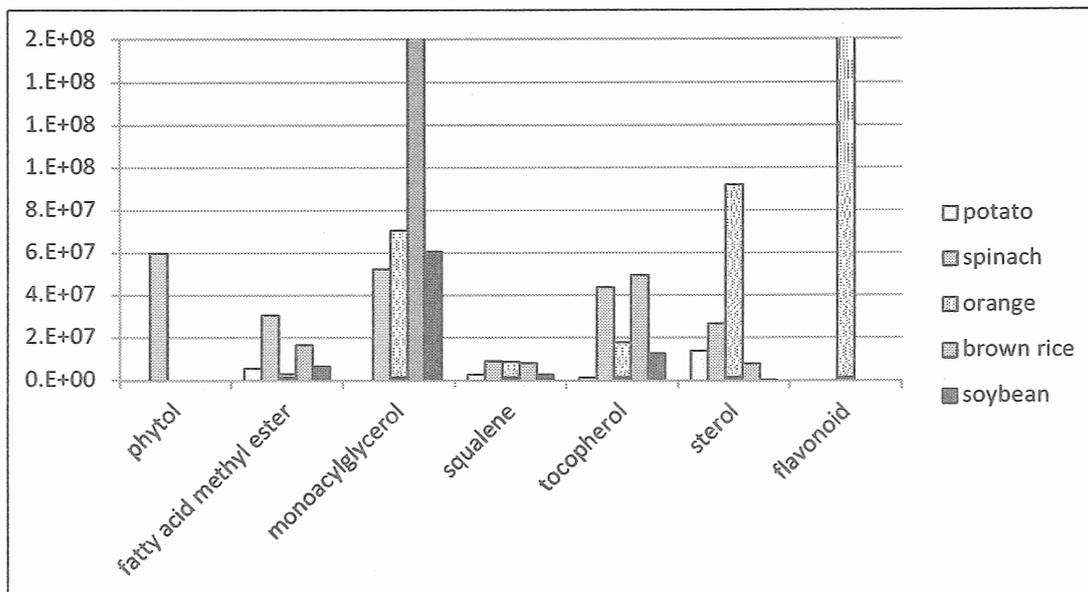


Fig. 1. Total Intensity of common matrix components

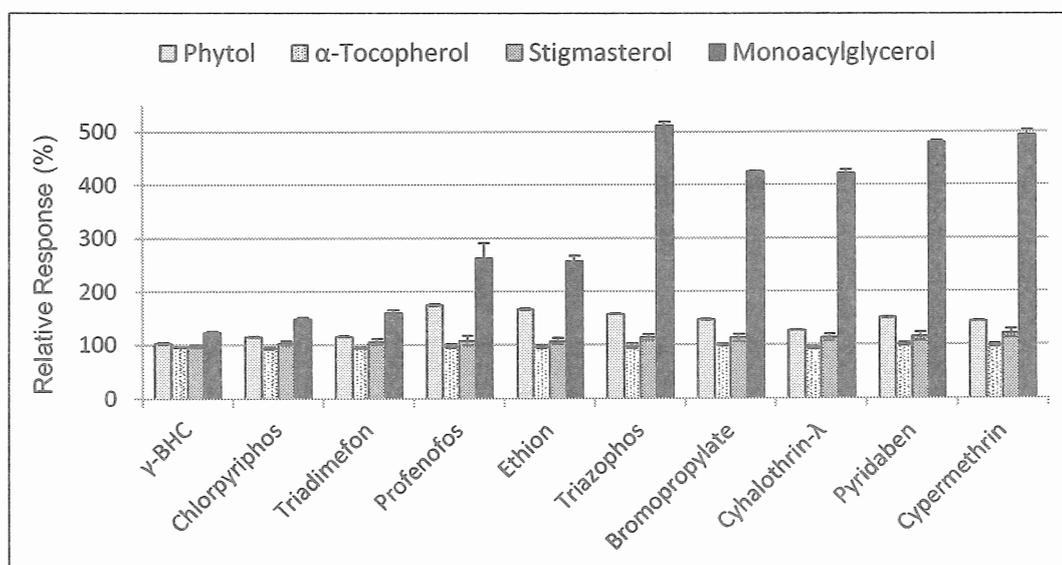
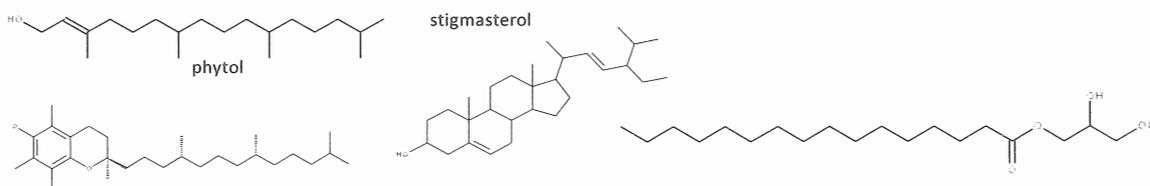


Fig. 2. Matrix Effect of Pesticides in Each Matrix Solution

(各マトリックス溶液 200ppm, 農薬 100ppb の場合)



【残留農薬分析法の各工程での比較】

誘導体化することで、今まで見えていなかった検液中の成分が測定できることが確認できたため、次に残留農薬分析の各工程で、どのような成分が抽出され、あるいは除去できているのかを新旧の前処理法で比較した。抽出の工程は、従来一般的に使用されていたアセトンと現在の一斉分析で主に使われているアセトニトリルとの比較、精製は従来使用されていたフロリジルカラムとシリカゲルカラム及び現在使われているグラファイトカーボン、NH₂, PSA での除去効果を比較した。

その結果、アセトニトリルは脂溶性の高い代謝物の抽出効果は低だけでなく、Log P_{ow} が 3.5 未満になると抽出効果が落ちることも分かった。しかしアセトニトリルを用いても農薬の回収率は良好であることから、実際にはアセトニトリルで抽出効果が低下しているわけではなく、アセトンの場合、マトリックス成分の水酸基との水素結合などが働き、より多くの成分を抽出している可能性が考えられた。また精製カラムでは、マトリックス効果の原因となるモノアシルグリセロールは一定の溶媒比率でフロリジルやシリカゲルカラムで除去できるが、現在の一斉分析法で使用されているカラムではいずれを用いても除去できていないことも明らかとなった。

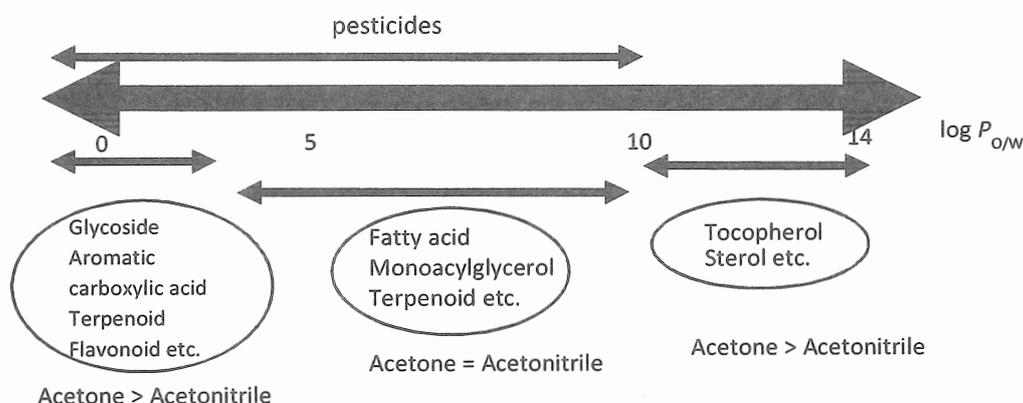


Fig. 3. Relationship between Each Components and log P_{ow}

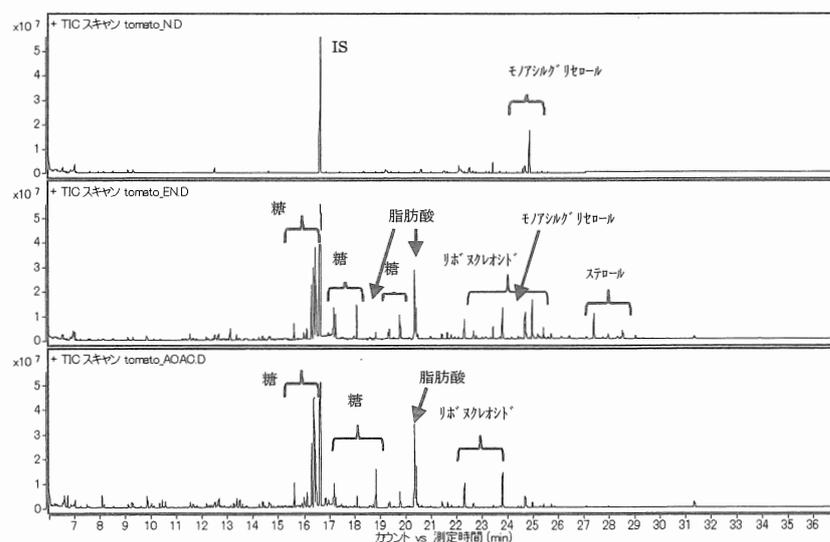
【通知法と QuEChERS 法の比較】

近年の残留農薬分析では一斉分析が大きな割合を占める。日本でもポジティブリスト制

度の施行に伴い、一斉分析法が示されている。海外では QuEChERS 法が AOAC 法に採用されて以来多くの注目を集め、欧米で広く使用される一斉分析の手法となった。QuEChERS 法は濃縮や乾固の工程を伴わず、簡単に前処理ができることから、最近日本でも注目されているが、通知法と比較して“汚い”と言われている。しかしながら、実際にどの程度精製度が異なるのかを調べた知見はない。そこで、これまでと同様の方法で誘導体化を行い比較を行った。比較的マトリックス成分が少ないとされるトマトジュース（無添加）から、難しいとされる生姜、唐辛子、ゴマなどをサンプルとした。

その結果いくつかの知見が得られた。まず、糖のように非常に水溶性の高い成分やフラボノイド化合物（カテキン類やイソフラボンなど）のように水酸基を多く持つ化合物は通知法では除去されているが、QuEChERS 法では十分には除去できていないことが明らかとなった。通知法の場合はサンプル抽出後に分取してから緩衝溶液を加えて塩析するが、QuEChERS 法では分取の工程もなく、サンプル中の水分のみを利用して（乾物の場合は膨潤のために水を添加）、塩を加えることで緩衝機能を持たせている。そのため QuEChERS 法の場合は塩析の際の水分量が大幅に不足していることが考えられる。また、QuEChERS 法では脂肪酸も多く残っていることが明らかとなった。脂肪酸は NH_2 や PSA イオン交換機能を利用した精製だと考えられるが、QuEChERS 法のように単純に分散固相を入れて振とうさせるだけではその機能を十分に発揮できないことが推察された。

一方、抹茶中のカフェインや唐辛子中のカプサイシン類、ゴマ中のセサミン類、生姜中のジンゲロール類などは、含有濃度も高くどちらの方法でも除去できないことが分かった。



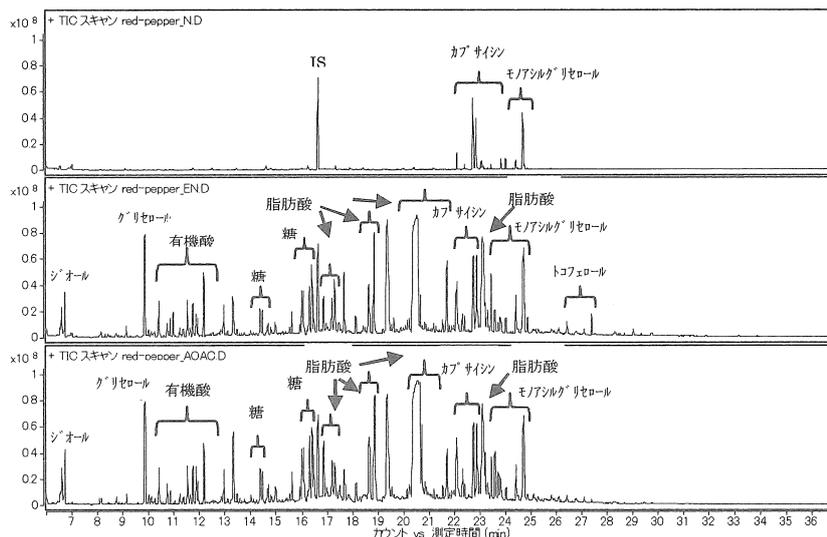


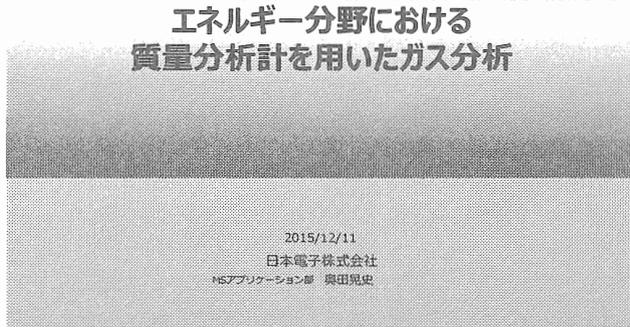
Fig. 3. 通知法と QuEChERS 法の比較例 (上：トマトジュース，下：唐辛子)
 上段より通知法, QuEChERS 法 EN 法, QuEChERS 法 AOAC 法

【まとめ】

サンプルを誘導體化することで、検液中に入っている成分を詳細に調べることができた。この手法を用いると、精製度の比較や、精製工程の見直しができるなど、有用な情報が得られることが明らかとなった。

【文献】

- 1) Sugitate *et. al.* Search of components causing matrix effects on GC/MS for pesticide analysis in food. *J. Pestic. Sci.* 2012, 37, 156-163
- 2) Sugitate *et. al.* Matrix behavior during sample preparation using metabolomics analysis in Agricultural Products. *J. Agric. Food. Chem.* 2013, 60, 10226-10234.
- 3) Sugitate *et. al.* Difference in the matrix components by cleanup methods between the notified multiresidue pesticide analysis method in Japan and the QuEChERS method. *J. Pestic. Sci.* 2015 (in press)



エネルギー分野におけるガス分析

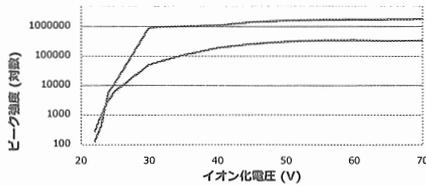
m/z 60 まで(C4相当)の低分子が目まぐるしく注目されています

- ・リチウムイオン電池(LIB)の劣化評価
充放電を繰り返した際に発生するガス成分を分析し、劣化度合い評価や劣化原因の解明
対象成分 : H_2 , CO , N_2 , O_2 , CO_2 , CH_4 , C_2H_4 , C_2H_6 , C_3H_6 , C_3H_8 , C_4H_{10} , フッ素化合物 など
- ・改質器の性能評価
メタノール・メタンガスなどの燃料から水素を生成する改質効率や耐久性を評価
対象成分 : H_2 , CH_4 , CO , N_2 , O_2 , CO_2 , CH_3OH など

ガス分析は低濃度かつターゲット成分が多い
↓
すべてのターゲット成分を高感度で検出できる
検出器を選択する必要があります

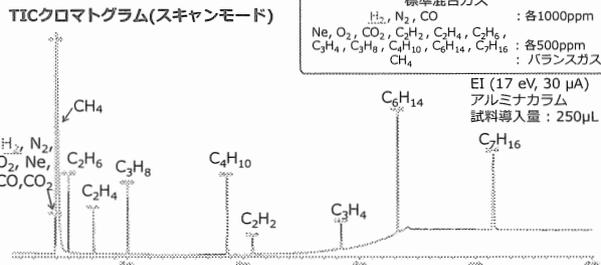
ガス分析時のイオン化電圧

- 一般的なガス分析では…
- ・電子イオン化 (EI) 法を使用
 - ✓ フィラメント電圧は低電圧に設定
(通常GC/MS測定で設定される70Vではない)
→ フラグメントイオンの生成を抑制するため
→ He(キャリアガス・バランスガス)のピーク強度を抑制するため



**JMS-Q1500GCを用いたガス分析
 H_2 の検出下限**

一般的な四重極質量分析計は m/z 10以下における測定安定性および感度が低いことが知られています。
JMS-Q1500GCは、電気回路などの改良により、水素などの低 m/z のイオン検出が安定して行えるようになりました。



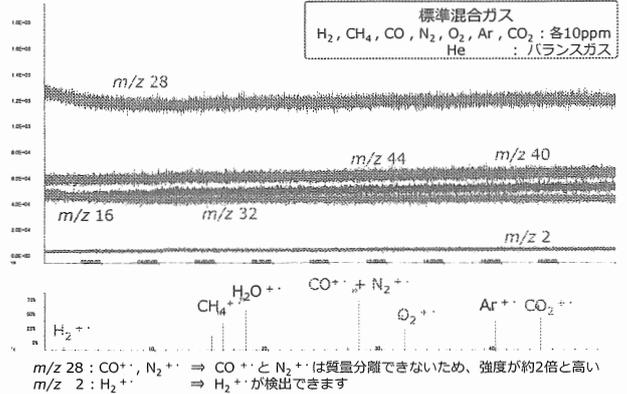
内容

1. エネルギー分野におけるガス分析
2. 測定例
 - ・ JMS-Q1500GCを用いたガス分析
 - ・ 標準ガスの長時間連続モニタリング
 - ・ H_2 の検出下限
 - ・ JMS-T200GCを用いたガス分析
 - ・ 標準ガスのマススペクトル
 - ・ JMS-MT3010HRGAのご紹介
 - ・ 多重周回飛行時間型質量分析計とは
 - ・ 装置性能のご紹介
3. まとめ

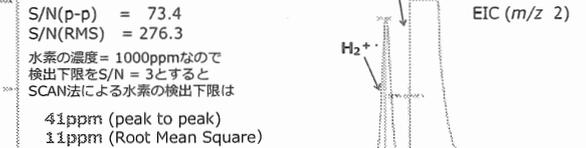
ガス分析用MSとしての性能比較

装置名	JMS-Q1500GC	JMS-T200GC	JMS-MT3010HRGA
低イオン化電圧安定性 (EI)	○	◎	◎
感度	○	○	△
H_2 定量	○	×	◎
質量分離 ($CO \cdot N_2$)	×	○	◎
キャリアーガス導入量	○	○	△
アプリケーション対応性	○	◎	△
可搬性	○	△	◎
特長	・ 高汎用性 ・ 高感度 ・ 広いダイナミックレンジ ・ H_2 分析可能	・ 高分解能 ・ 高感度 ・ 高精度 ・ 高速スペクトル記録	・ 超高分解能 ・ 高精度 ・ H_2 分析可能 ・ オンサイト分析可能

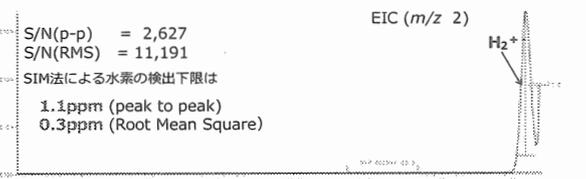
**JMS-Q1500GCを用いたガス分析
標準ガスの長時間連続モニタリング**



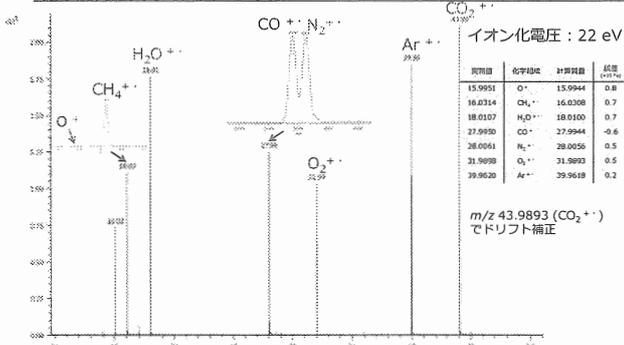
抽出イオンクロマトグラム(スキャンモード)



抽出イオンクロマトグラム(SIMモード)



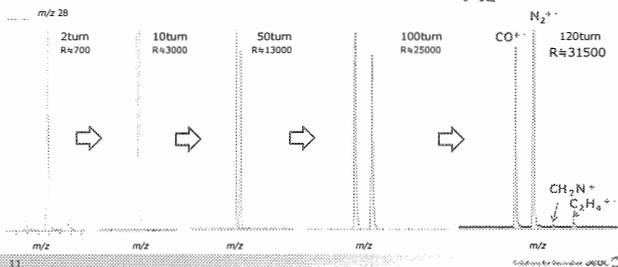
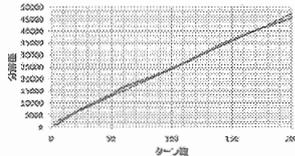
**JMS-T200GCを用いたガス分析
標準混合ガスのマススペクトル**



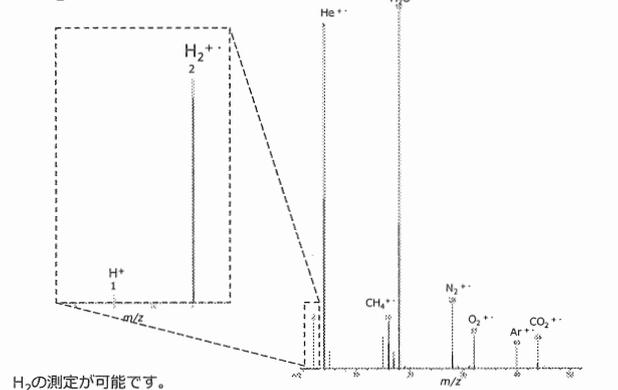
低分解能MSでは質量分離が難しいCO⁺とN₂⁺がJMS-T200GCでは質量分離できます。CO⁺とN₂⁺をそれぞれモニタリングすることが可能です。

**装置性能のご紹介(1)
高質量分解能**

マルチターン型TOFMSは周回数を設定できます
分析に必要な分解能に調整可能



**装置性能のご紹介(3)
H₂の測定**



H₂の測定が可能です。

**JMS-MT3010HRGAのご紹介
多重周回飛行時間型質量分析計**

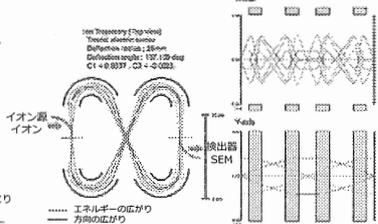
【装置の特徴】

多重周回飛行時間型質量分析計 (通称: マルチターン型 TOFMS) は、大阪大学で開発されたイオン多島周回技術^{1,2}を駆使したイオン光学系を採用しています。本装置のイオン軌道は平面に8の字を形成しており、イオンを多重周回させる事ができます。

小さい装置サイズでも大型機器に匹敵する分解能が得られます

【動作原理】

1. イオン群で生成されたイオン群は、エネルギー・方向・位置的な広がりをもちます。
2. 広がりを持ったイオン群が分析部での飛行を開始すると、周回する過程で異なる軌道を飛行します。
3. この光学系ではこれらイオン群を1周ごとに元の位置に戻す(完全収束)ことができるため、周回を重ねてもイオン群は広がらず、イオンの軌道を重ね、高分解能と高感度が得られます。

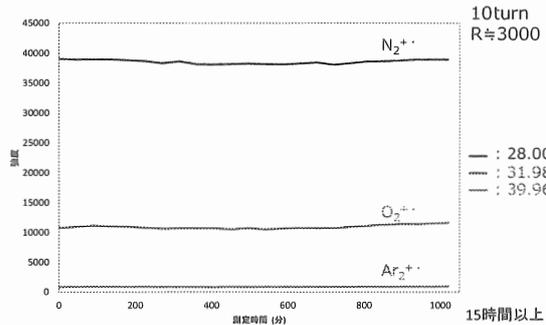


問題点

異なるm/zのイオンを同一軌道を周回させるため、周回を繰り返すとイオンの違いが物理的に起こります。この現象を回避するために周回軌道にイオンゲートを設置し、不要なイオンを排除することでイオンの違いを回避しています。

¹ Perfect Spatial and Isochronous Focusing Ion Optics for Multi-Turn Time of Flight Mass Spectrometer. M. Ishiguro, M. Toyoda and T. Hattori. Int. J. Mass Spectrom., 197, 179-183, 2000
² Multi-Turn Time of Flight Mass Spectrometers with Electrostatic Sectors. M. Toyoda, O. Otsumura, M. Ishiguro and I. Kitahara. J. Mass Spectrom., 35, 1125-1142, 2000

**装置性能のご紹介(2)
測定の安定性**



JMS-MT3010HRGAは測定の安定性が高く、長時間のリアルタイムモニタリングができます。また、超高分解能な状態でのリアルタイムモニタリングも可能です。

まとめ

- ◆ ガス分析は低温度かつターゲット成分が多い
→ 目的・用途にあった装置・方法の選択が必要です。
 - ◆ サンプリング方法
 - ◆ 発生ガスの採取方法
 - ◆ 質量分析計
- ◆ JMS-Q1500GCは、一般的な四重極質量分析計が苦手とするH₂の測定が可能です。
→ H₂検出下限 スキャンモード 11ppm (RMS)
SIMモード 0.3ppm (RMS)
電池関連の分析などにおいて、水素の測定に威力を発揮します。
- ◆ JMS-T200GCは、四重極質量分析計では分離できないCOとN₂の質量分離が可能です。また、いろいろなサンプリング方法との併用により材料から発生するガスの定性分析に有用です。
- ◆ JMS-MT3010HRGAは、オンサイトで高質量分解能リアルタイムモニタリングを行うのに最適です。また、H₂の測定も可能です。

〔招待講演 5〕

ツムラのガスクロマトグラフを用いた残留農薬に対する取り組みについて

株式会社 ツムラ 生産本部 分析センター 試験開発グループ
三枝 弘和（さえぐさ ひろかず）

I. 不純物に対する取り組み

漢方薬は、動植物あるいは鉱物の天然物由来である生薬を組み合わせて作られている。そのため、日本薬局方などの公定書においては水、土壌、大気など環境の影響も考慮して、残留農薬、重金属、ヒ素、微生物など安全性に関わる様々な基準が定められている。当社は、これら公定書の基準を遵守することは元より、さらに独自の基準を設定して検査を実施することで、原料となる生薬、エキス末および製剤の品質管理を徹底し、安全性を担保している。

当社では独自の GACP (Good Agricultural and Collection Practices) に則り、栽培から出荷までの履歴管理（生薬トレーサビリティ）を徹底しており、例えば栽培に必要な農薬は手順を定めた上で使用し、同時に使用履歴の管理も実施している。さらに日本薬局方他関連法規にて規制された農薬のみならず、使用している農薬についても分析対象と定めて中国及び日本国内の拠点において、生薬の全ロットを対象に分析管理を行っている。仮に、生薬に問題となる残留があった場合には、製品における残留を考慮した上で必要に応じて栽培現場へのフィードバックを行い、栽培現場の農薬管理の改善に活かしている。また、残留農薬以外についても原料となる生薬、エキス末および製剤に対して、重金属、ヒ素、アフラトキシン、微生物などの不純物を、法令に従い管理するだけでなく、患者のリスクとなる汚染に目を光らせながら、分析管理だけでなく GACP 管理により根本的な原因の排除を念頭に入れて活動している。

II. 残留農薬分析における問題点

当社は分析対象の農薬をトリプル四重極型質量分析計付きのガスクロマトグラフ (GC-MS/MS) および高速液体クロマトグラフ (LC-MS/MS) を用いて分析しており、生薬および製剤を対象として一斉試験を実施している。これらの一斉試験方法を開発する段階において、まず関連法規やガイドライン等にて設定されている試験方法のスペックを参考としたが、特に明記されていない場合は分析管理の目的を鑑みて自ら設定する必要があった。そこで、日本薬局方他関連法規に記載されている農薬、および頻りに基準値付近で検出される様な農薬については正確に定量することを目的としたスペックを目指して開発を開始した。しかし、農薬以外の妨害マトリクス含有量が多い生薬を用いた場合に、LC-MS/MS においてはイオン化障害、GC-MS/MS についてはマトリクス効果が発生し、真度が目標から外れる結果となった。

LC-MS/MS のイオン化障害については、定量したい濃度に対して質量分析計の感度が十分である場合に、試料溶液を希釈してその他の成分の絶対量を減らすことで軽減できた。試料前処理により妨害成分を除去することも対策として重要だが、操作が煩雑になるため希釈操作が最も有効であった。

GC-MS/MS におけるマトリクス効果は、試料が通過するシステム内のあらゆる箇所活性点に、農薬あ

るいはマトリクスが競合的に吸着することが一因で生じるとされている。このため、マトリクスを含まない標準溶液の分析では農薬が活性点に吸着され、検出器に到達する農薬が減少してピークが小さくなることもある。一方で、マトリクスを含む試料溶液では、マトリクスが活性点に多く吸着して農薬の吸着を阻害し、検出器に到達する農薬が増加してピークが大きくなることもある。添加回収試験を実施した場合、上記理由により真の回収率に比べてピーク面積値により算出した回収率が異常に高い値を示す現象が、GC-MS/MSにおいて散見されるマトリクス効果と言われている。回収率の異常を防ぐ根本的な対策は、マトリクスの除去である。しかし、取り扱う試料が多岐に渡る場合は精製法が煩雑となるため一斉分析のメリットを失いかねない。また、LC-MS/MSにおけるイオン化障害の対策と同様に試料溶液の希釈を試みたが、マトリクスの絶対量が減少しても農薬に対する相対量が減ることは無いため、必ずしも有効な手段ではなかった。

III. GC-MS/MSにおけるマトリクス効果対策

GC-MS/MSにおけるマトリクス効果対策には3つのアプローチがあると考えている。1つ目は、活性点がないシステムを構築して維持するアプローチであるが、メンテナンスと消耗品のコストがかかる上に、厳密に活性点が無いシステムを組み上げることに限界がある。2つ目は、マトリクス検量線を用いるアプローチである。標準溶液に試料溶液を添加することでマトリクス効果を標準溶液に対して起こすことができるため、マトリクス効果を有効に補正することができる。しかしデメリットとしては、試料の種類が多い場合は測定回数が多くメンテナンス頻度が高くなり、また残留があった場合には残留量に応じて検量線範囲をその都度考察する必要がある。3つ目は、マトリクス効果抑制剤を用いる方法である。試料中マトリクスに似た性質の物質を試料溶液中に添加して擬似的にマトリクス効果を引き起こすことで真度の改善を狙うため、ポリエチレングリコール(PEG)などが用いられる。マトリクス効果抑制剤を使用することで試料中の残留量を絶対検量線で評価することができる可能性があるが、分析対象農薬に対して予期せぬ悪影響がないことを確認する必要がある。

そこで本検討では、一部の生薬について、農薬混合標準溶液（ピーク数計 97）に対するマトリクス効果の抑制を目指し、各種文献⁽¹⁻³⁾で有用とされていた PEG200, D-sorbitol, olive oil, L-gulonic acid γ -lactone, 3-ethoxy-1,2-propanediol（各々0.1%）について検証した。

IV. マトリクス効果抑制剤による安定化作用の検討

各マトリクス効果抑制剤の基本的な性能として、農薬の分析に悪影響を及ぼさないこと、及び繰り返し分析における農薬のピーク面積値の安定性が重要である。これら进行评估するため、マトリクス効果抑制剤を添加した農薬混合標準溶液と試料溶液を交互に6回ずつ分析し、マトリクス効果抑制剤を添加した農薬混合標準溶液における各農薬のピーク面積値と併行精度をマトリクス効果抑制剤無添加の標準溶液と比較した。なお、試料の前処理方法は図1の通りである。以下、マトリクス効果抑制剤により特に異なる挙動を示した δ -BHC及びTPNについて紹介する。

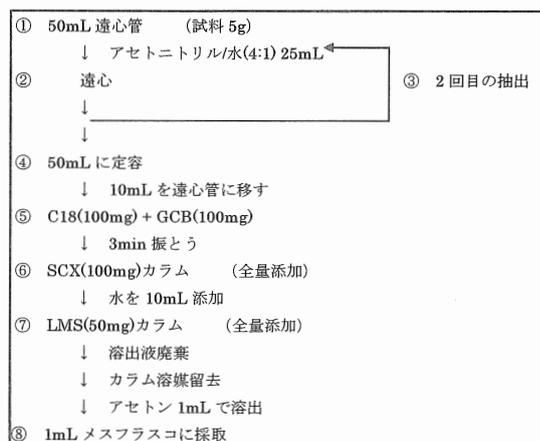


図 1. 試料の前処理フロー

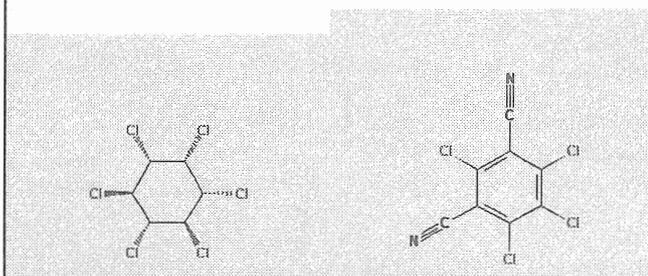


図 2. δ -BHC

図 3. TPN

δ -BHC

δ -BHC (図 2) は日本薬局方に基準がある農薬であるため良好な真度と併行精度が必要であるが、これまでマトリクス効果抑制剤を使用しない場合に結果が安定しないことが度々あった。

L-gulonic acid γ -lactone 0.1%, D-sorbitol を添加したところ δ -BHC のピーク面積値を減少させず、併行精度は良好であった。一方で、PEG200 添加では δ -BHC のピーク面積値がマトリクス効果抑制剤無添加と比較して 1/10 程度まで減少し、併行精度も悪くなった。

以上のように、 δ -BHC の分析において L-gulonic acid γ -lactone と D-sorbitol は有用であるにもかかわらず、PEG200 はマトリクス効果抑制剤無添加よりも悪いという、マトリクス効果抑制剤によって異なるという興味深い結果であった。

TPN(別名 : Chlorothalonil)

TPN (図 3) はアセトン中、低濃度において不安定であり、低濃度で正確な定量を実施するためには前処理にヘキサンを用いる必要があると考えており、一斉分析は困難だと考えていた。

L-gulonic acid γ -lactone および 3-ethoxy-1,2-propanediol, D-sorbitol 添加では、TPN のピーク面積値をマトリクス効果抑制剤無添加と比較して 4~6 倍に上昇させた。一方で、D-sorbitol を添加した結果、良好な併行精度を示したが、その他の抑制剤の併行精度は悪かった。

本検討により、D-Sorbitol を用いることで低濃度の TPN を一斉分析する手段が見えてきた。

V. マトリクス効果抑制剤の生薬に対する検証

農薬に悪影響を及ぼすことなく分析における安定化作用も十分であるとした L-gulonic acid γ -lactone と D-sorbitol に限定し、6つの生薬におけるマトリクス効果の抑制作用を評価した。本検討では、IV項と同様に、マトリクス効果抑制剤を添加した農薬混合標準溶液と、マトリクス効果抑制剤と生薬の試料を添加した農薬混合標準溶液を交互に分析した。また、比較対象としてマトリクス効果抑制剤無添加の場合も検討した。本検討では、各生薬に対するマトリクス効果抑制剤の効果を幅広く評価す

るため、抑制作用が強いほど高値となる独自の評価方法を設定して各生薬における全農薬に対するマトリクス効果抑制作用を総合的に評価した。評価は、農薬混合標準溶液に対する生薬の試料を添加した農薬混合溶液の農薬ピーク面積値の比率と、連続測定の間精度を勘案して実施した。評価結果は図4の通りとなった。

L-gulonic acid γ -lactone はマトリクス効果抑制剤を添加しない場合に比べて6生薬全てでマトリクス効果の抑制作用が高かった。一方 D-sorbitol は、トウニンにおいてほとんど抑制作用を示さなかったが、タイソウに対してL-gulonic acid γ -lactone より抑制効果が高かった。なお、マトリクス効果抑制剤の添加濃度については検討の余地があり、今回検討した濃度は暫定的な濃度である。また、農薬によっては最適なマトリクス効果抑制剤が異なる場合もあった。

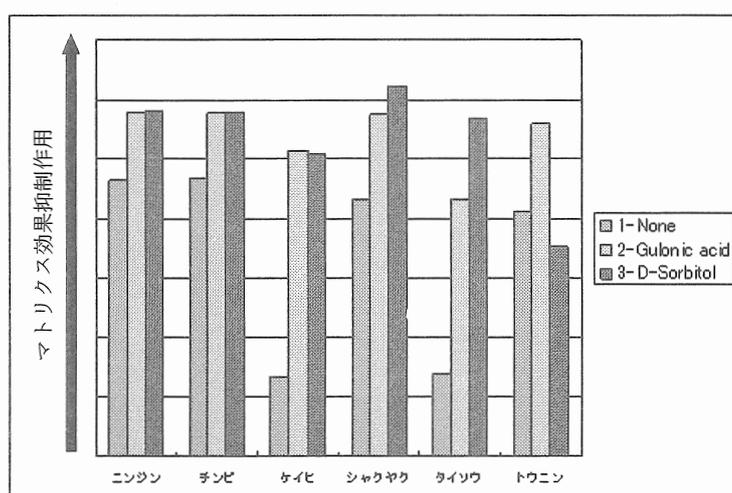


図4. L-gulonic acid γ -lactone および D-sorbitol の各生薬に対するマトリクス効果抑制作用

VI. まとめ

本検討は、GC-MS/MSにより農薬を正確に定量することを目的としており、予め試験方法をバリデートしてルーチン的に試験を実施する場合に有用である。しかし、定性あるいは定量であっても条件によってはマトリクス効果抑制剤を使用しない方法や、マトリクス検量線を用いる方が良い結果が得られるかもしれない。また、GC-MS/MSによる一斉分析でスクリーニングし、必要に応じて個別に精製処理して電子捕獲型検出器や蛍光光度検出器等で分析することで確実データが得られる場合もある。あらゆる分析システムには長所と短所があることを認識し、目的に応じて必要な性能を明らかにして分析方法を開発することが大切である。

参考文献

- (1) Anastassiades M, Mastovská K, Lehotay SJ., J Chromatogr A. 2003 Oct 10;1015(1-2):163-84
- (2) Mastovská K, Lehotay SJ, Anastassiades M., Anal Chem. 2005 Dec 15;77(24):8129-37.
- (3) Consuelo Sanchez-Brunete, Beatriz Albero, German Martin, and Jose L. Tadeo, Analytical Science. 2005 Nov ;Vol21:1291-6.

<カタログ展示企業一覧>

(五十音順)

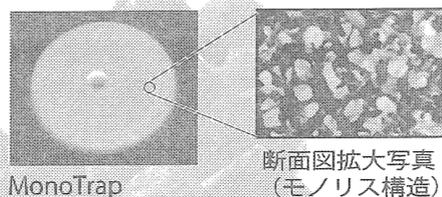
(株) アイスティサイエンス
アジレント・テクノロジー (株)
エーエムアール (株)
エフアイエス (株)
大塚製薬 (株)
関東化学 (株)
ゲステル (株)
サーモフィッシャーサイエンティフィック (株)
ジーエルサイエンス (株)
テクノインターナショナル (株)
東京化成工業 (株)
トレイジャンサイエンティフィックジャパン (株)
日本電子 (株)
日本分析工業 (株)
LECO ジャパン合同会社
レステック コーポレーション
ピークサイエンティフィックジャパン (株)

<広告掲載企業一覧>

(掲載順・順不同)

ジーエルサイエンス (株)
ピークサイエンティフィックジャパン (株)
大陽日酸 (株)
日本分析工業 (株)
エフアイエス (株)

シリカモノリス捕集剤 MonoTrap[®]

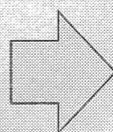


活性炭、ODS基、シリカの特性を併せ持つハイブリット吸着剤です。

取りたいときに、サンプリングしたい。

季節のうちに一度に多検体を
サンプリングしたい！

香気成分分析のお悩み、
MonoTrapで解決しませんか？

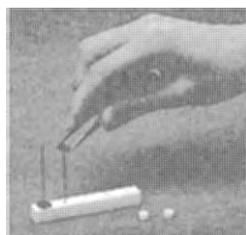


- 溶媒抽出で高感度分析
- 手軽で気軽なスクリーニング
- コンディショニングは要りません
- アイディア次第で様々なサンプリング

簡単操作で捕集、抽出が可能！

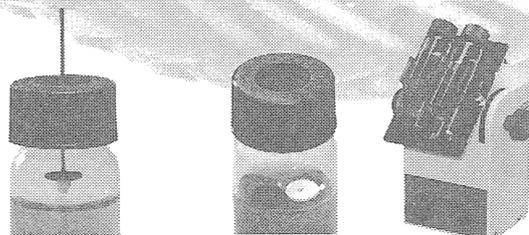
捕集例

◆ヘッドスペースガスサンプリング



専用ホルダーにセットし、バイアルピンに
詰めて使用します。

◆攪拌サンプリング



バイアルピンに試料を入れてMonoTrap
を浮かべます。ハンドレスシェーカー&専
用ホルダーを用いて攪拌します。

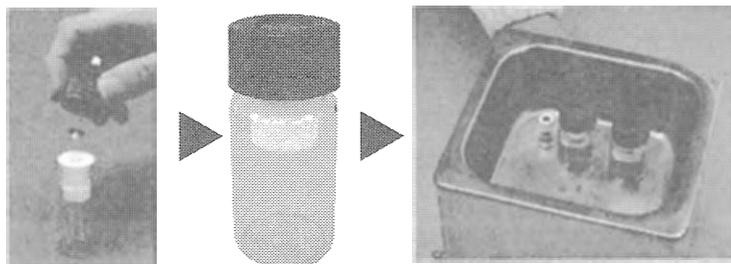
◆パッシブサンプリング



生花香気成分のサンプリング

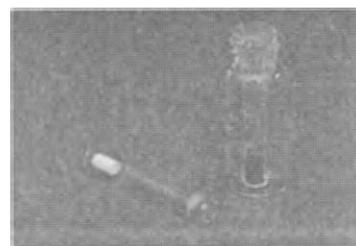
抽出例

◆Diskタイプ



バイアルピンにセットした後、超音波を照射し、抽出します。

◆Rodタイプ



抽出ピンを使用せず、オートサンプラー用
インサートに入れて抽出します。

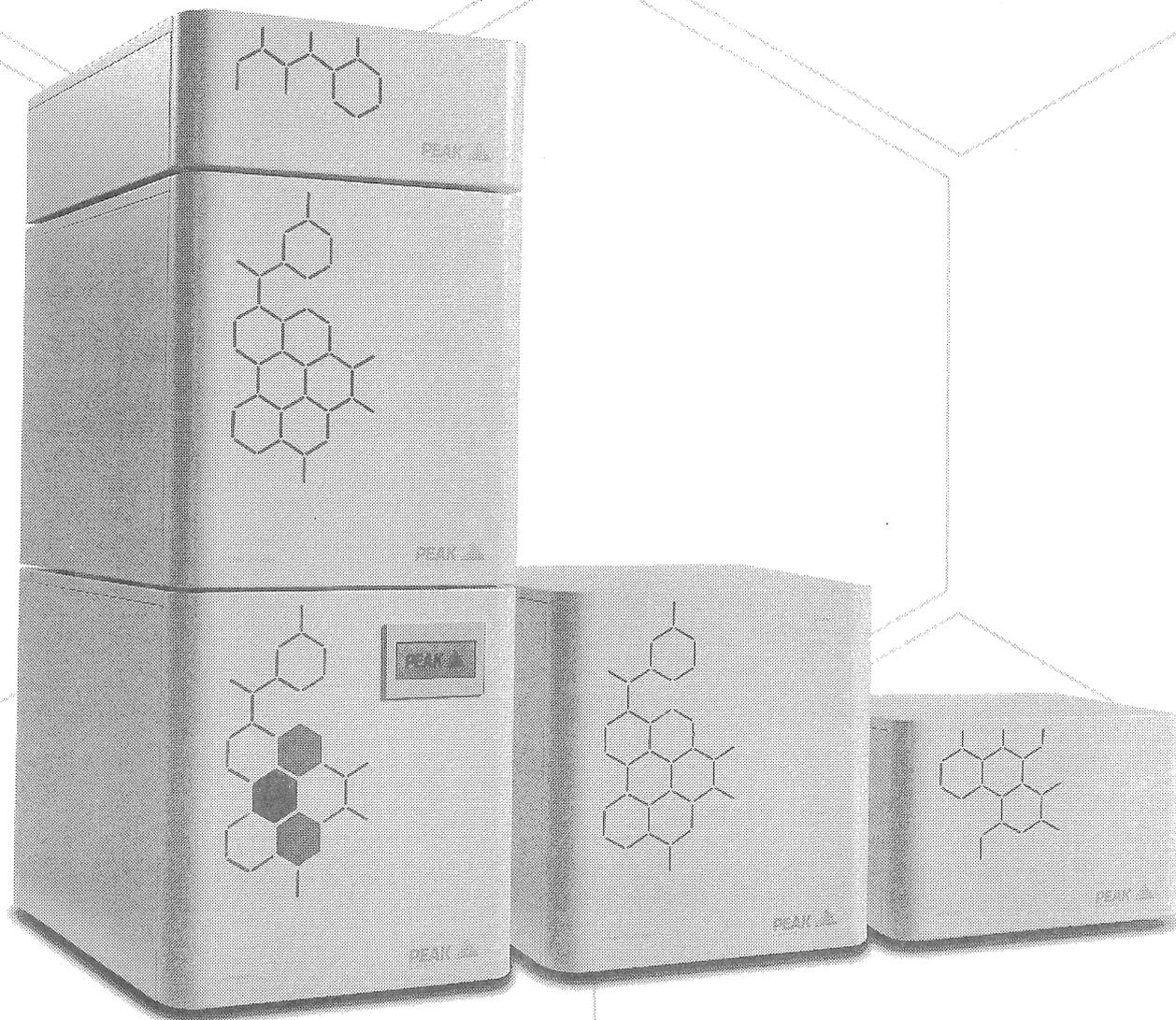
※詳しい資料をご希望の方は下記問い合わせ先まで請求してください。資料請求No. GC 0020

 **ジーエルサイエンス株式会社**

本社 営業企画部
〒163-1130 東京都新宿区西新宿6丁目22番1号 新宿スクエアタワー30F
電話03(5323)6611 FAX03(5323)6622
webページ: <http://www.gls.co.jp/> E-mail: info@glsc.co.jp



Your local gas generation partner

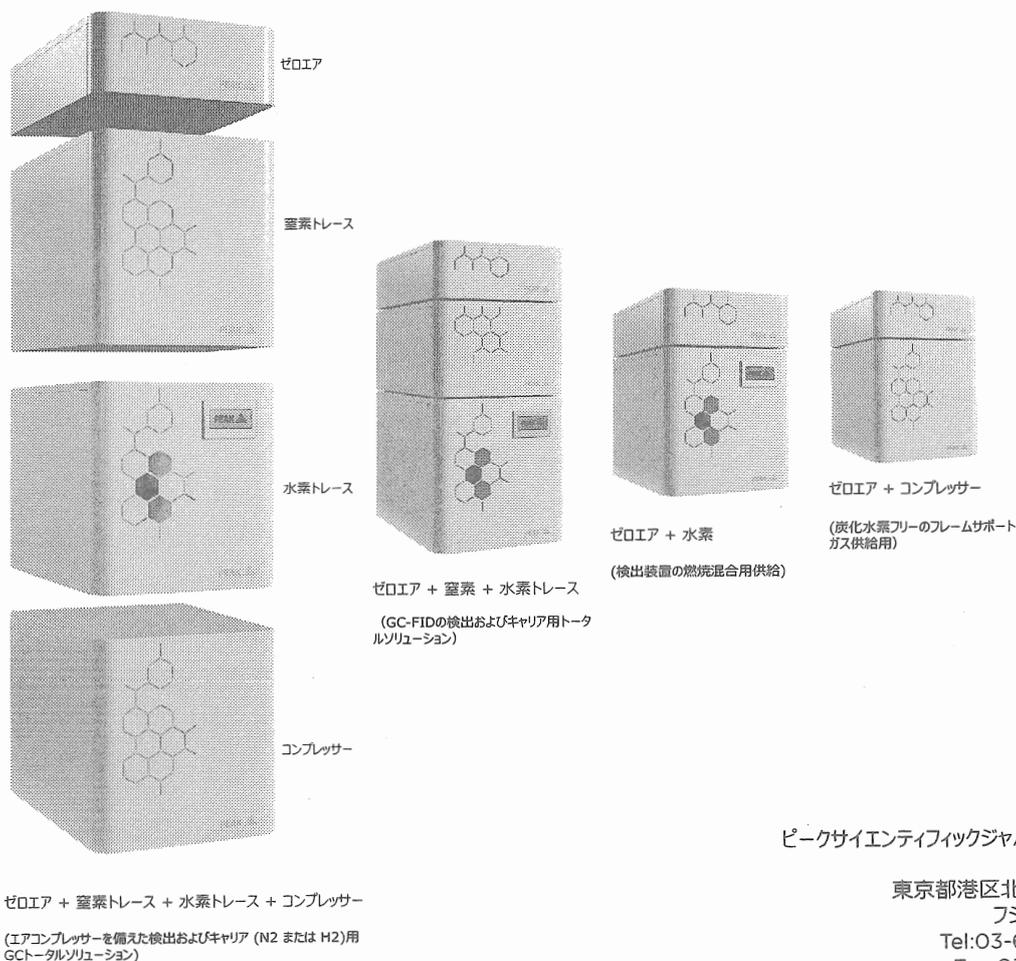


高精度(Precision)な性能

研究室等で使用されるGCへの使用を目的として設計・開発されたPrecisionシリーズは、Peak Scientificの最先端の革新技術を装備し、必要なガスを発生できるようデザインされたガス発生装置です。縦に積み上げることができるコンパクトなデザインで、利便性と信頼性を備えたPrecisionシリーズは、GCガスの要件を満たす安全で実用的な選択です。

Precision がGCガスの総合ソリューションである理由

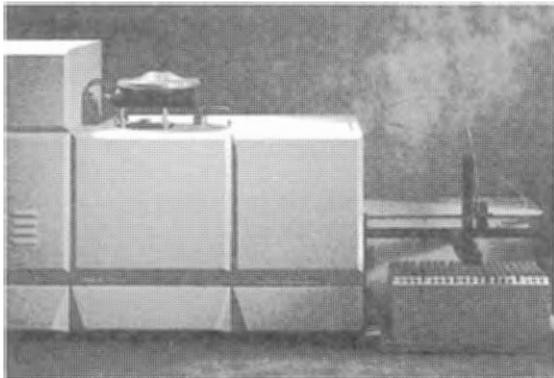
- 研究室レベルに必要なGC用ガスを連続かつ安定的に供給
- ポンプ、デューワー、大容量貯蔵に比べ、より安全で利便性が高い
- 小型で積み上げ可能なモジュール式システムのため、省スペースでラボの作業場所を最大限確保
- 窒素、水素、ゼロエアの各モデルを、多様な流量で利用可能
- キャリア、検出、基準、フレイム、サポート、サンプルの準備などのための総合的なガスソリューション
- 装置を縦に積み上げて設置し、特定のニーズに対応するために必要なさまざまな種類のガス、流量、純度を供給可能
- 長期間にわたって経済的な連続運転が可能で、ガスポンプの価格上昇のリスクを排除
- メンテナンスの必要性が非常に低い構造
- 水素発生装置は、内部リーク検出機能を装備し、頑丈で安全な機構
- 水素発生装置は、フロントパネルにLEDインジケータとタッチスクリーンパネルを装備
- 全シリーズに12か月保証、水素発生装置モデルではPEM（電解セル）の3年間保証を提供
- **[Peak Protected]** 発生装置保守契約プラン（オプション）をご利用いただくと、長期にわたり安定稼働で生産性を確保することが可能です



ピークサイエンティフィックジャパン株式会社
〒107-0061
東京都港区北青山2-7-26
フジビル28、2階
Tel:03-6864-0468
Fax:03-6862-9111
marketing@peakscientific.com

www.peakscientific.jp

全自動窒素炭素同位体比質量分析計 (ANCA-GSL)



ANCA-GSLは、生体試料中の ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{34}S の同位体比測定を目的に開発された高精度CONTINUOUS FLOW定磁場型質量分析計です。

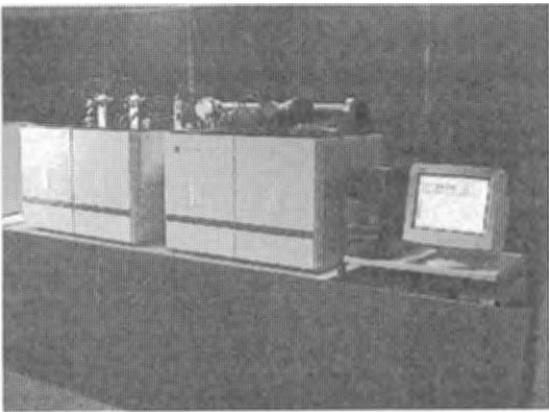
〈特長〉

- CONTINUOUS FLOW方式により高速分析を実現しました。
- トリプルコレクタ付 120° 広角磁場型および真空引き二系列化により高精度分析を可能としました。
- 同一サンプルから ^{13}C 、 ^{15}N の同時分析を高精度で分析可能としました。
- WINDOWS対応全自動分析ソフトを開発しました。

〈仕様〉

- 質量範囲：2~66amu
- 精度(再現性) 0.15‰ (^{13}C) 0.15‰ (^{15}N)

高精度同位体比質量分析計 (GEO20-20)



GEO20-20は、ガスサンプル中の ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{34}S などの安定同位体比を高精度、高感度で分析できるDual-Inlet定磁場型質量分析計です。

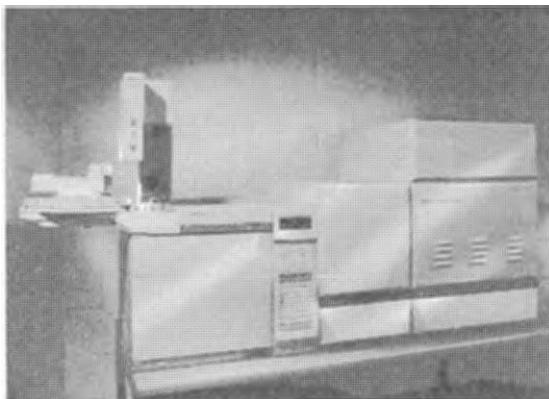
〈特長〉

- DUAL-INLET方式により微量の試料で高精度、高感度分析を可能にしました。
- 独自開発したPenta Blockにより、分析系内のdead volumeを最小限にしました。
- トリプルコレクタ付 120° 広角磁場型および真空引き二系列化により高精度分析を可能としました。
- WINDOWS対応全自動分析ソフトを開発しました。

〈仕様〉

- 質量範囲：2~66amu
- 精度(再現性) 0.15‰ (^2H) 0.01‰ (^{13}C) 0.01‰ (^{15}N)
0.015‰ (^{18}O) 0.015‰ (^{34}S)

ガスクロマトグラフ分離燃焼分析計 (ANCA-ORCHID)



ANCA-ORCHIDIは、GCで分離可能な生体サンプルの中の ^{13}C 、 ^{15}N を高精度で測定できる定磁場型質量分析計です。

〈特長〉

- サンプル中の目的構成成分の ^{13}C 、 ^{15}N の同位体比を測定できます。
- 少量サンプルの分析を可能としました。
- WINDOWS対応全自動分析ソフトを開発しました。

〈仕様〉

- 検出限界：0.5ngC 10ngN
- 精度(再現性) 0.2‰ (^{13}C) 0.5‰ (^{15}N)

製造元



総販売元



大陽日酸
The Gas Professionals

大陽日酸株式会社
メディカル事業本部
SI事業部

〒142-8558 東京都品川区小山1-3-26 東洋Bldg.
TEL. 03-5788-8550 FAX. 03-5788-8710

● 資料のご請求は、大陽日酸(株)までお気軽にご用命下さい。
メールアドレス Isotope.TNS@tn.sanso.co.jp
ホームページアドレス <http://stableisotope.tn-sanso.co.jp>

世界初。ハイブリッドパイロライザー JHI-07

キューリーポイント加熱と抵抗加熱炉のHYBRID

Curie Point Py(CP-Py)

世界初
Hybrid

Furnace Py (F-Py)

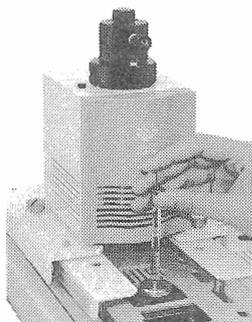
Hybrid Pyrolyzer for GC/MS

コンタミレス。

試料室となる試料管は、都度交換できます。

- 熱分解GC/MS
- 多段階熱分解GC/MS
- EGA分析
- 再分析捕集導入
- カラム入口冷却(濃縮導入)

【後方スライド可能なGCへの据付】



GCに据付けた熱分解プローブを撤去せず、

後方スライド

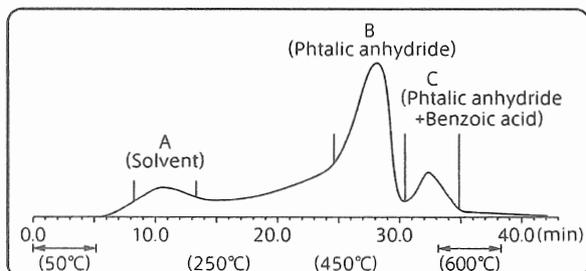
させて液打ち等、他の用途で使う事ができます。



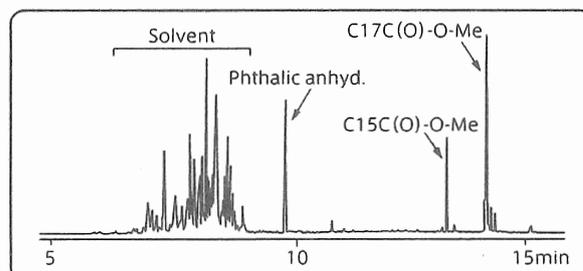
Hybrid Pyrolyzer JHI-07

【再分析捕集導入の分析例】

EGA分析時に出現したピークをスプリット捕集し、GCへの注入が可能です。



油性塗料(フタル酸樹脂系)のEGA分析です。A,B,C留分を容易にmini-PATに捕集することができます。



ピークAを捕集してJCI-55で同定しました。

JAI 日本分析工業株式会社

■ 本社・工場 〒190-1213
 ■ 大阪営業所 〒532-0002
 ■ 名古屋営業所 〒465-0025

東京都西多摩郡瑞穂町武蔵208
 大阪市淀川区東三国5-13-8-303
 名古屋市名東区上社3-609-3D

TEL 042-557-2331
 TEL 06-6393-8511
 TEL 052-709-5400

<http://www.jai.co.jp>

FAX 042-557-1892
 FAX 06-6393-8525
 FAX 052-709-5403

高感度・簡単・小型 Sensor Gas Chromatograph

センサガスクロマトグラフ

環境
悪臭

医療
バイオ

材料
食品



パソコンは製品に含まれません

微量ガスを高感度測定

センサガスクロマトグラフ (SGC) は、検出器に超高感度半導体ガスセンサー、カラムにオリジナル小型カラムを採用することにより、試料中目的ガス濃度の短時間・高感度測定を実現しました。

型式	ODSA-P2	ODNA-P2	SGHA-P2	SGEA-P2	SGVA-P2
測定対象ガス	硫化水素 メチルメルカプタン 硫化ジメチル	アンモニア トリメチルアミン	水素 一酸化炭素 メタン	アセトン エタノール アセトアルデヒド イソブレン	トルエン エチルベンゼン キシレン スチレン
測定濃度域 (※2)	硫化水素: 5~1000ppb (1ppm) メチルメルカプタン: 5~1000ppb (1ppm) 硫化ジメチル: 5~1000ppb (1ppm)	アンモニア: 50~100000ppb (100ppm) トリメチルアミン: 50~10000ppb (10ppm)	水素: 10~150000ppb (150ppm) 一酸化炭素: 10~150000ppb (150ppm) メタン: 1000~150000ppb (150ppm)	アセトアルデヒド: 5~100000ppb (100ppm) アセトン: 20~20000ppb (20ppm) エタノール: 200~100000ppb (100ppm) イソブレン: 10~20000ppb (20ppm)	トルエン: 5~1000ppb (1ppm) エチルベンゼン: 5~1000ppb (1ppm) キシレン: 5~1000ppb (1ppm) スチレン: 5~1000ppb (1ppm)

FIS
A Nissha Company

エフアイエス 株式会社
<http://www.fisinc.co.jp/>

〒664-0891 兵庫県伊丹市北園 3-36-3
TEL: 072-780-1800 / FAX: 072-785-0073

GC 研究懇談会 運営委員名簿

2015年11月1日現在

役員名	氏名	所属名
委員長	前田 恒昭	国立研究開発法人 産業技術総合研究所
副委員長	代島 茂樹	アジレント・テクノロジー (株)
副委員長	和田 豊仁	(株) 島津製作所
	秋山 賢一	東京工芸大学
書記	安藤 晶	ジーエルサイエンス (株)
	植田 郁生	山梨大学
HP	大川 真	(株) 日立ハイテクサイエンス
	大橋 眞	トレイジャンサイエンティフィックジャパン (株)
	大森 啓	トレイジャンサイエンティフィックジャパン (株)
	岡野谷 和則	(株) 伊藤園
会計	金子 広之	東京化成製造サービス (株)
	金丸 新	ケイサイエンス株式会社
庶務・展示	神田 広興	ゲステル (株)
	岸本 徹	アサヒビール (株)
	杉田 和俊	麻布大学
	瀬戸 康雄	警察庁科学警察研究所
	園部 淳	(株) エア・リキード・ラボラトリーズ
	武守 佑典	(株) 島津製作所
	谷村 健太郎	(株) 島津ジーエルシー
	中釜 達朗	日本大学
庶務・記念事業	中里 正光	ジーエルサイエンス (株)
	中村 貞夫	アジレント・テクノロジー (株)
	西島 功	日本電子 (株)
	野口 政明	テクノインターナショナル (株)
	羽田 三奈子	サーモフィッシャーサイエンティフィック (株)
	藤峰 慶徳	大塚製薬 (株)
	藤本 一馬	(一財) 化学物質評価研究機構
	古野 正浩	ジーエルサイエンス (株)
	本田 俊哉	(株) 日立製作所
HP	山上 仰	西川計測 (株)
	鰐川 彰	アサヒビール (株)
	渡邊 卓朗	国立研究開発法人 産業技術総合研究所
地方委員 (東北)	渡辺 忠一	フロンティア・ラボ (株)
地方委員 (中部)	津田 孝雄	(有) ピコデバイス
顧問・地方委員 (関西)	小村 啓	元 (公財) サントリー生命科学財団
地方委員 (関西)	佐々野 僚一	(株) アイスティサイエンス
地方委員 (関西)	藤村 耕治	信和化工 (株)
地方委員 (関西)	古川 雅直	(株) 島津製作所
地方委員 (関西)	森川 正己	エスアンドエー・ラボ (株)
地方委員 (九州)	門上 希和夫	北九州市立大学
地方委員 (九州)	佐藤 博	長崎国際大学
最高顧問・信頼性委員長	保母 敏行	東京都立大学大学院
	齋藤 壽	元 (株) 島津製作所
講習会・記念事業	竹内 正博	(有) GC技術研究所
顧問・記念事業・アーカイブ	渡辺 征夫	埼玉工業大学 (非常勤)

「健康で豊かな生活を支えるガスクロマトグラフィー」

(ガスクロマトグラフィー研究懇談会 第 341 回特別講演会 講演要旨集) 定価 2,000 円

2015 年 12 月 1 日 初版第 1 刷

編集兼発行人 公益社団法人 日本分析化学会

発行所 〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2

五反田サンハイツ 304 号

公益社団法人 日本分析化学会

電話：03-3490-3351 FAX：03-3490-3572

©2015, The Japan Society for Analytical Chemistry

本研究懇談会のホームページ(<http://www.jsac.or.jp/~gc/menu/solicitation.html>)では、研究会のご案内や入会などに関する情報がご覧いただけます。