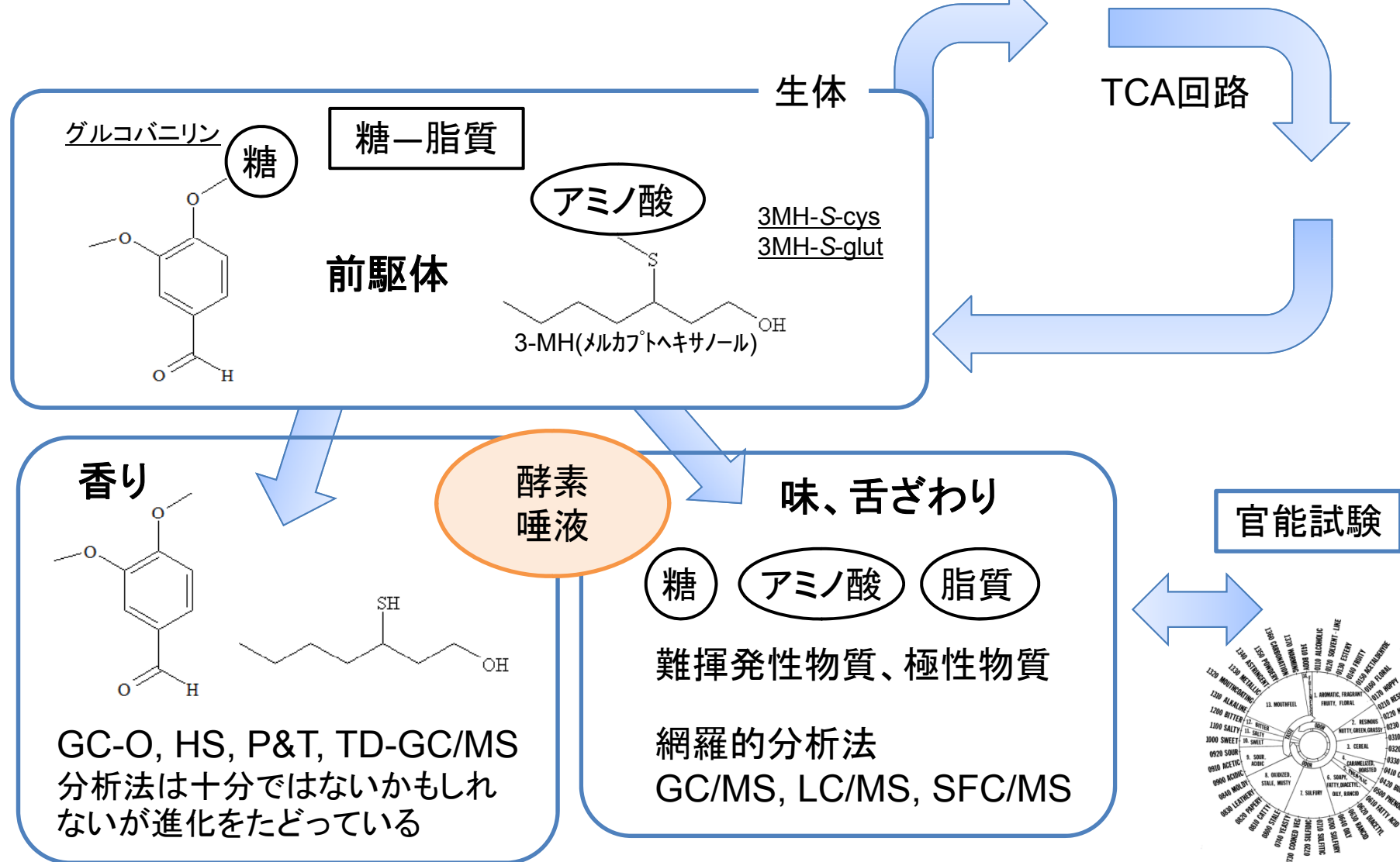


# スローフードとその網羅的分析法 (slow food)

ジューエルサイエンス(株)  
宮川 浩美

# スローフードを攻めの農業の一つに ～フレーバー(広義では香りと味)と機能～



# GCによる代謝物の網羅的分析法 ～進展～

## Objective

GC/MS is one of the most popular platforms for comprehensive analysis of metabolites in living organisms. The crucial process is to construct an organized two-dimensional data matrix containing compound names and their quantitative values. Because this process is the most complicated and knowledge intensive task in GC/MS-based metabolomics, it is essential to develop a tool for accurate, automatic data processing. We used the [MetAlign](#) (Lommen, 2009) data pre-processing tool. AIoutput can perform the peak identification, prediction, and data integration from the result exported from MetAlign and user defined retention time and spectra library. AIoutput is a non-targeted and targeted analysis tool for GC/MS based metabolomics written in visual basic for application (VBA, excel macro) available in Microsoft Excel Windows versions 2007 and later.

## Please cite

- Tsugawa et al (2011) GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA) *BMC Bioinformatics* 12: 131

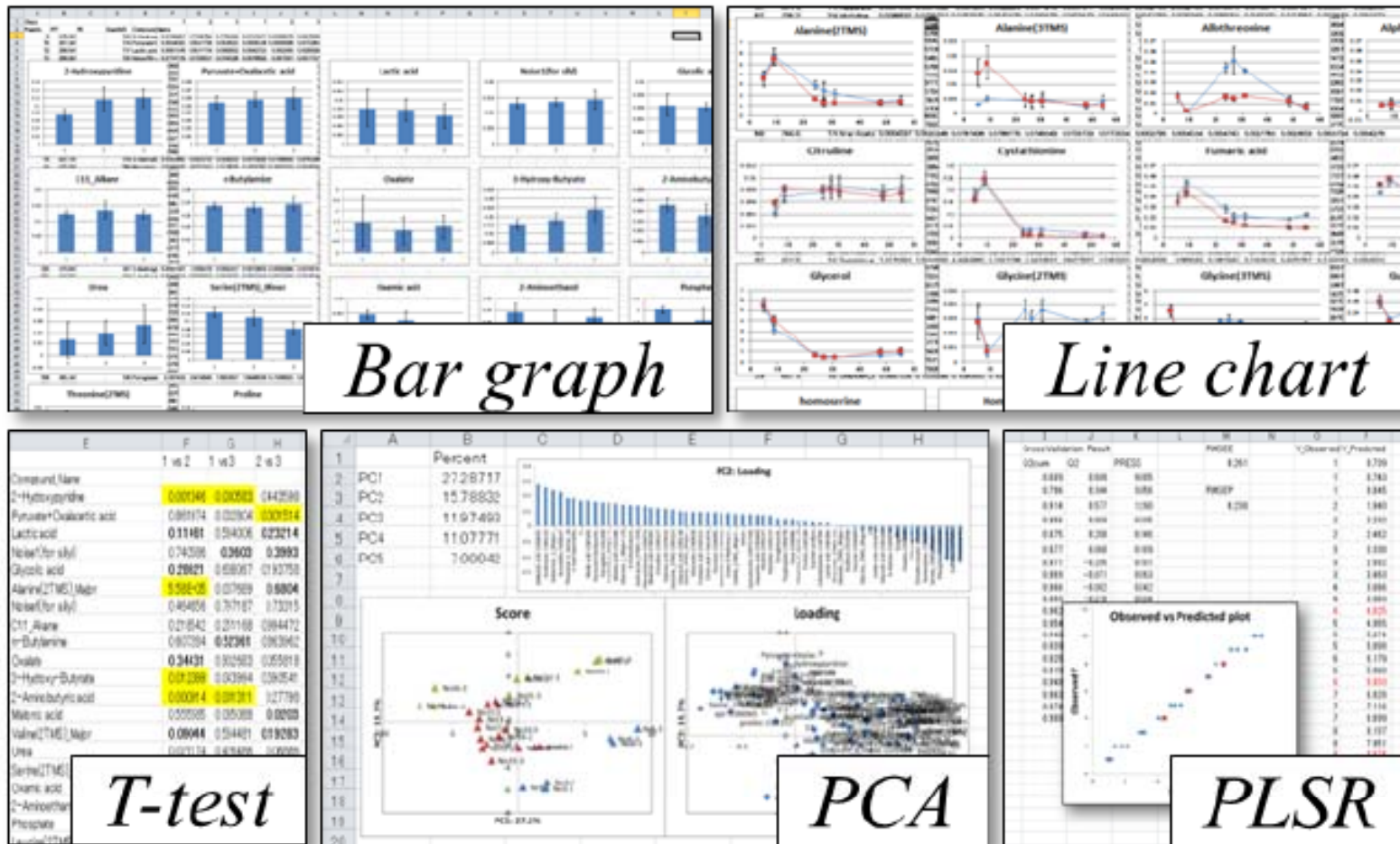
## Overview of AIoutput software

メキシ化とTMS化をうけた代謝物の保持指標とマススペクトルが収録されたライブラリーと、そのライブラリーを使用してピーク同定を自動で行うことができ多変量解析までをサポートしているソフトウェア**AIoutput**がフリーで公開された ([http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics\\_Software/AIoutput/index.](http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/AIoutput/index.))

**NISTの質量スペクトルデータベース**においてメキシ化とTMS化された成分の収録数が増加、研究者がマススペクトルを共有することを目的としたデータベース**MassBank** (<http://www.massbank.jp/>) に基礎代謝、二次代謝物質の登録数が増えている

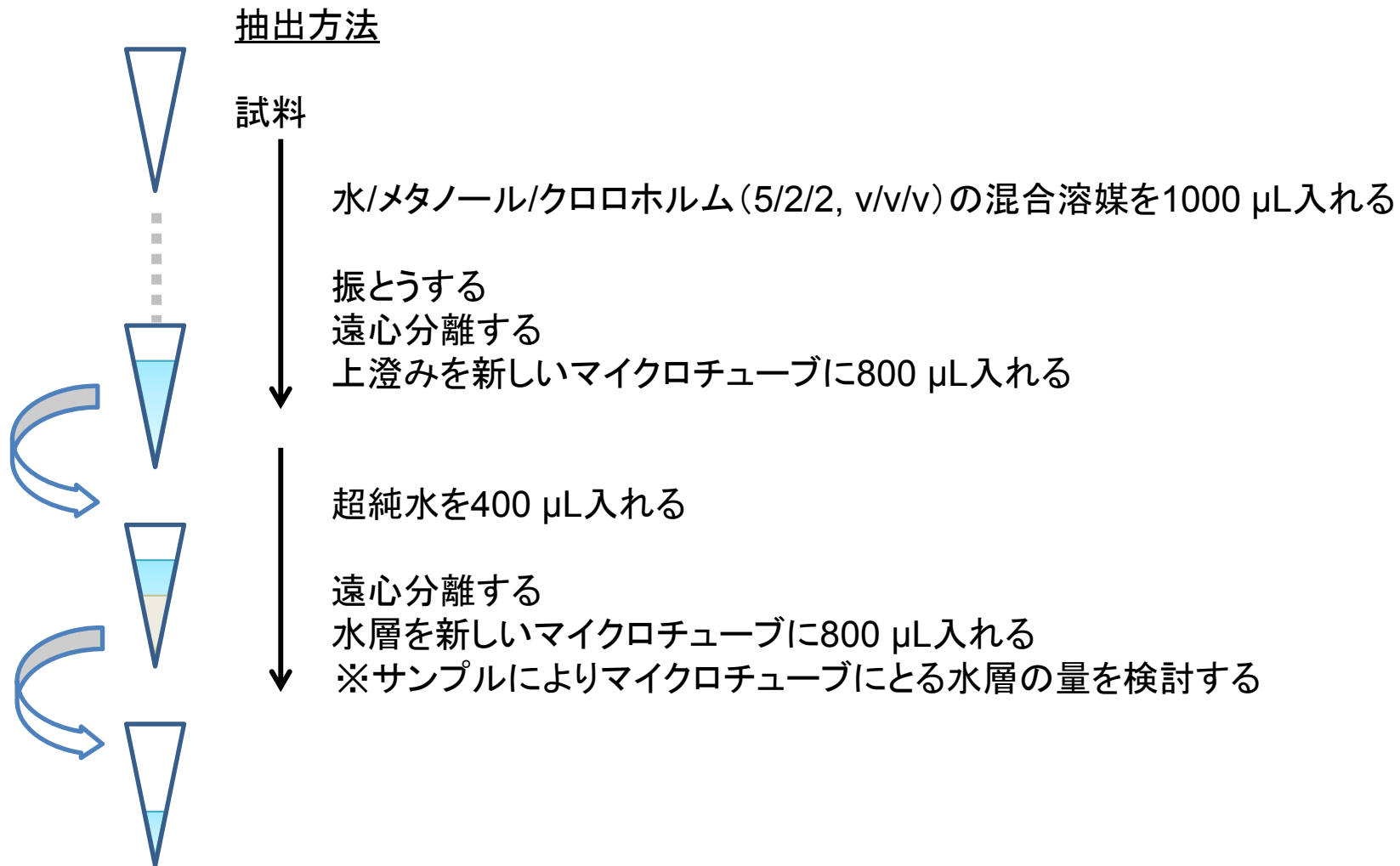
# GCによる代謝物の網羅的分析法 ～進展～

## Aloutputの機能



# GCによる代謝物の網羅的分析法 ～親水性化合物の抽出方法～

水/メタノール/クロロホルムの溶媒で抽出後、分層させ、水層をとる



# GCによる代謝物の網羅的分析法 ～親水性化合物の誘導体化法～

メタボローム分析での誘導体化法はメキシ化とTMS化の二段で誘導体化する



## 誘導体化方法

試料

濃縮遠心機で溶媒をとばす

凍結乾燥機で水をとばす

<メキシ化>

20 mg/mL メトキシアミン塩酸塩(ピリジン溶液)を100  $\mu$ L入れる  
振とうする(30  $^{\circ}$ C, 90 min)

<TMS化>

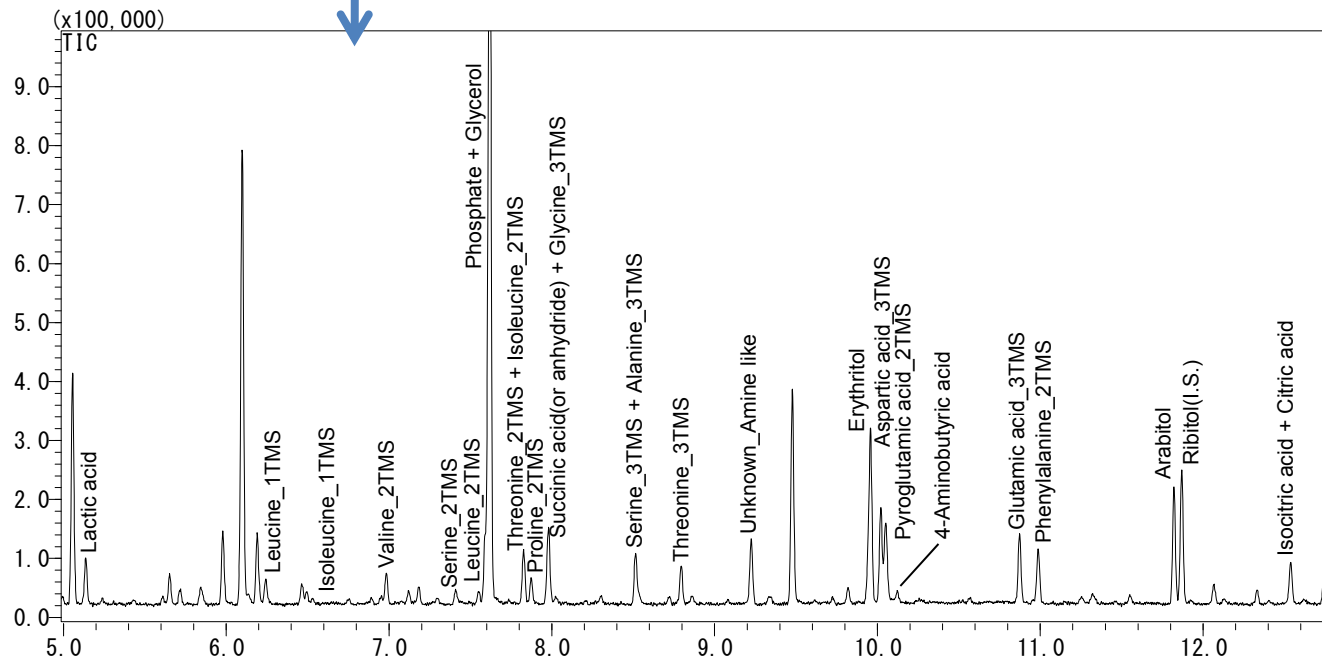
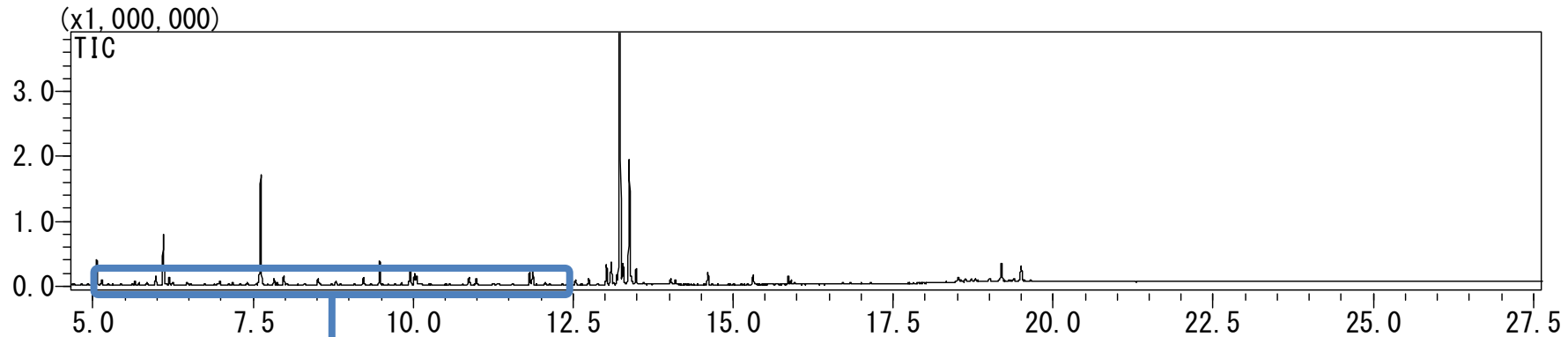
MSTFAを50  $\mu$ L入れる  
振とうする(37  $^{\circ}$ C, 30 min)

誘導体化物

System: GC-MS  
Column: InertCap 5MS/NP 0.25 mm I.D.  $\times$  30 m df = 0.25  $\mu$ m  
Inj. Temp.: 230 $^{\circ}$ C  
Column Temp.: 80 $^{\circ}$ C(2 min) - 15 $^{\circ}$ C/min - 330 $^{\circ}$ C(10 min)  
Inj.: **Split** 25:1  
Carrier Gas: He  
Column inlet Pressure: 75 kPa, Constant Pressure  
Septum Purge: 5.0 mL/min  
Inj. Vol.: 1  $\mu$ L  
Ion Source Temp.: 200 $^{\circ}$ C  
Interface Temp.: 250 $^{\circ}$ C  
Scan Range:  $m/z$  = 85 - 500  
Scan Speed: 5000  $u/s$



# GCによる代謝物の網羅的分析法 ～味噌の分析～



糖の含有量が多すぎる

味覚は選択的・対数

フェヒナーの法則から刺激の量  $R$  と感覚量 (人の情動反応)  $E$  は対数の関係にある



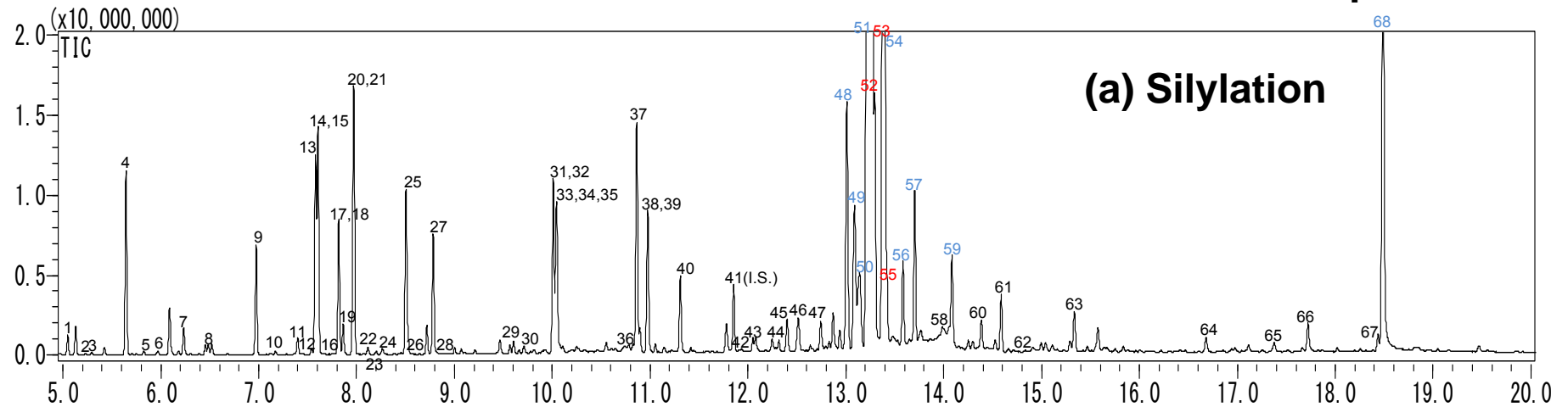
代謝物の存在比



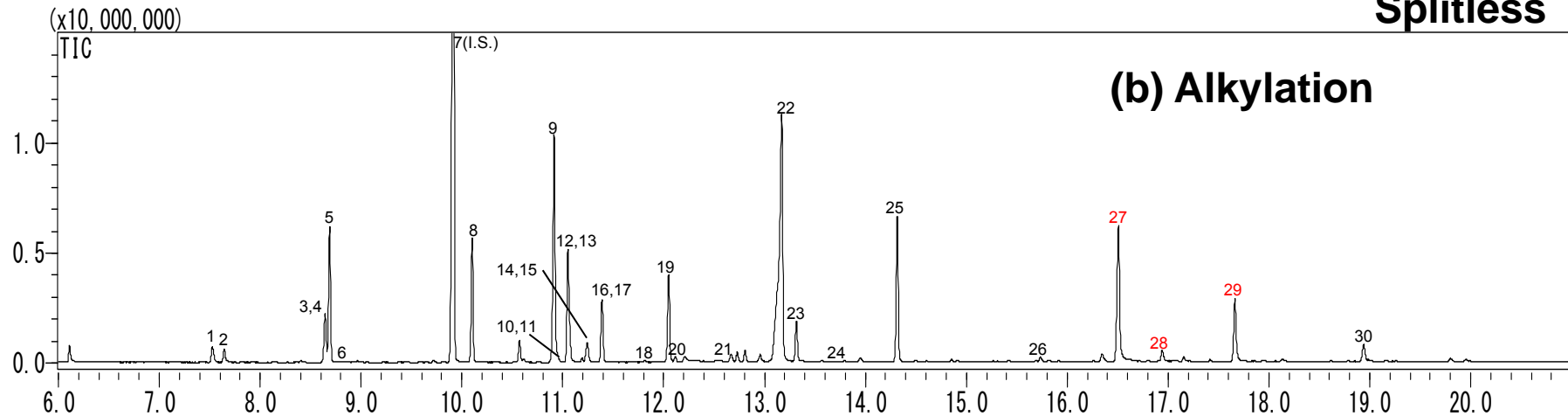
カラムと質量分析計のダイナミックレンジを超えている

# GCによる代謝物の網羅的分析法 ～糖の含有量が多いサンプルの問題～

Split 25:1



Splitless



Chromatogram of YPD medium extract  
(a) Silylation(YPDx10), (b) Alkylation



Peak No.	Compound Name	YPDx10	x100	x1000
1	Lactic acid	518824	54462	29115
2	Glycolic acid	51317	5931	2851
3	Valine_1TMS_minor	53334	3976	0
4	Alanine_2TMS	6706955	371662	37650
5	Glycine_2TMS	120963	2762	0
6	Oxalate	18101	0	0
7	Leucine_1TMS	1103892	96607	11176
8	Isoleucine_1TMS_minor	412653	47352	5909
9	Valine_2TMS_major	3405867	246126	26297
10	Urea	14051	8606	8359
11	Serine_2TMS_minor	285173	27062	3304
12	2-Aminoethanol	135719	10634	1807
13	Leucine_2TMS	6399242	378300	36815
14	Phosphate	3087965	15397	15747
15	Glycerol	1517174	128368	23204
16	Nicotinic acid	14259	0	0
17	Threonine_2TMS_minor	205723	13903	1934
18	Isoleucine_2TMS_major	3684799	181892	17780
19	Proline_2TMS	1178710	54594	4207
20	Succinic acid	1797248	140060	14477
21	Glycine_3TMS	5774669	371868	39044
22	Glyceric acid	34889	2124	0
23	Uracil	58287	3602	0
24	Fumaric acid	10052	0	0
25	Serine_3TMS_major	2678944	125722	11657
26	Alanine_3TMS	395854	38634	3288
27	Threonine_3TMS_major	966860	48052	4930
28	Thymine	5731	0	0
29	Nicotinamide	12505	0	0
30	Malic acid	84123	6360	0
31	Methionine_2TMS	768443	32607	0
32	Aspartic acid_3TMS	2639896	115247	11418
33	Hydroxyproline	602867	44436	0
34	Pyroglutamic acid_2TMS	4709554	245554	23010
35	4-Aminobutyric acid	118854	4956	0
36	Alanylalanine_1	32059	1073	0
37	Glutamic acid_3TMS	4225437	199341	17222
38	Pipecolic acid	10510	0	0
39	Phenylalanine_2TMS	2582509	130493	12432
40	Asparagine_3TMS	808317	32686	3175
41	Ribitol	593550	348153	37769
42	Putrescine	54049	3378	0
43	Unknown_Sugar phosphate like	104332	0	0
44	O-Phosphoethanolamine	7066	0	0
45	Hypoxanthine	57468	2411	0
46	Isocitric acid+Citric acid	188414	7584	786
47	Methionine sulfoxide_3	41274	2283	0
48	Unknown_Sugar like			
49	Unknown_Sugar like			
50	Unknown_Sugar like			
51	Glucose_1			
52	Histidine_3TMS	271015	0	0
53	Lysine_4TMS	2206257	317470	24500
54	Glucose_2		2E+06	111170
55	Tyrosine	2170044	172098	12757
56	Unknown_Sugar like			
57	Unknown_Sugar like			
58	Xanthine	29423	1641	0
59	Unknown_Sugar like			
60	Hydroxylysine	563066	0	0
61	Inositol	439693	23565	0
62	Guanine	46325	1831	0
63	Tryptophan_3TMS	1187001	34944	2183
64	Uridine_4TMS	67517	0	0
65	Inosine	45364	0	0
66	Adenosine	243559	5971	0
67	Guanosine	119053	2681	0
68	Trehalose	5797797	327344	28105

### (a) Silylation

No Hit
S/N <3
3 < S/N <10
S/N >10
Overloaded

### (b) Alkylation

Peak No.	Compound Name
1	Succinic acid
2	Lactic acid
3	Glycine
4	Malic acid_1
5	Alanine
6	Nicotinic acid
7	Adipic acid
8	Valine
9	Leucine
10	Serine_1
11	4-Aminobutyric acid
12	Isoleucine
13	Threonine
14	Pyroglutamic acid
15	Malic acid_2
16	Asparagine
17	Proline
18	Citric acid_1
19	Aspartic acid
20	Citric acid_2
21	Serine_2
22	Glutamic acid
23	Methionine
24	Citric acid_3
25	Phenylalanine
26	Ornithine
27	Lysine
28	Histidine
29	Tyrosine
30	Tryptophan

### 結果

微量のアミノ酸を測定しようとする、糖のピークはサチュレーションをおこしてしまう。

メキシ化とTMS化の結果とアルキル化の結果を組み合わせることが有効。

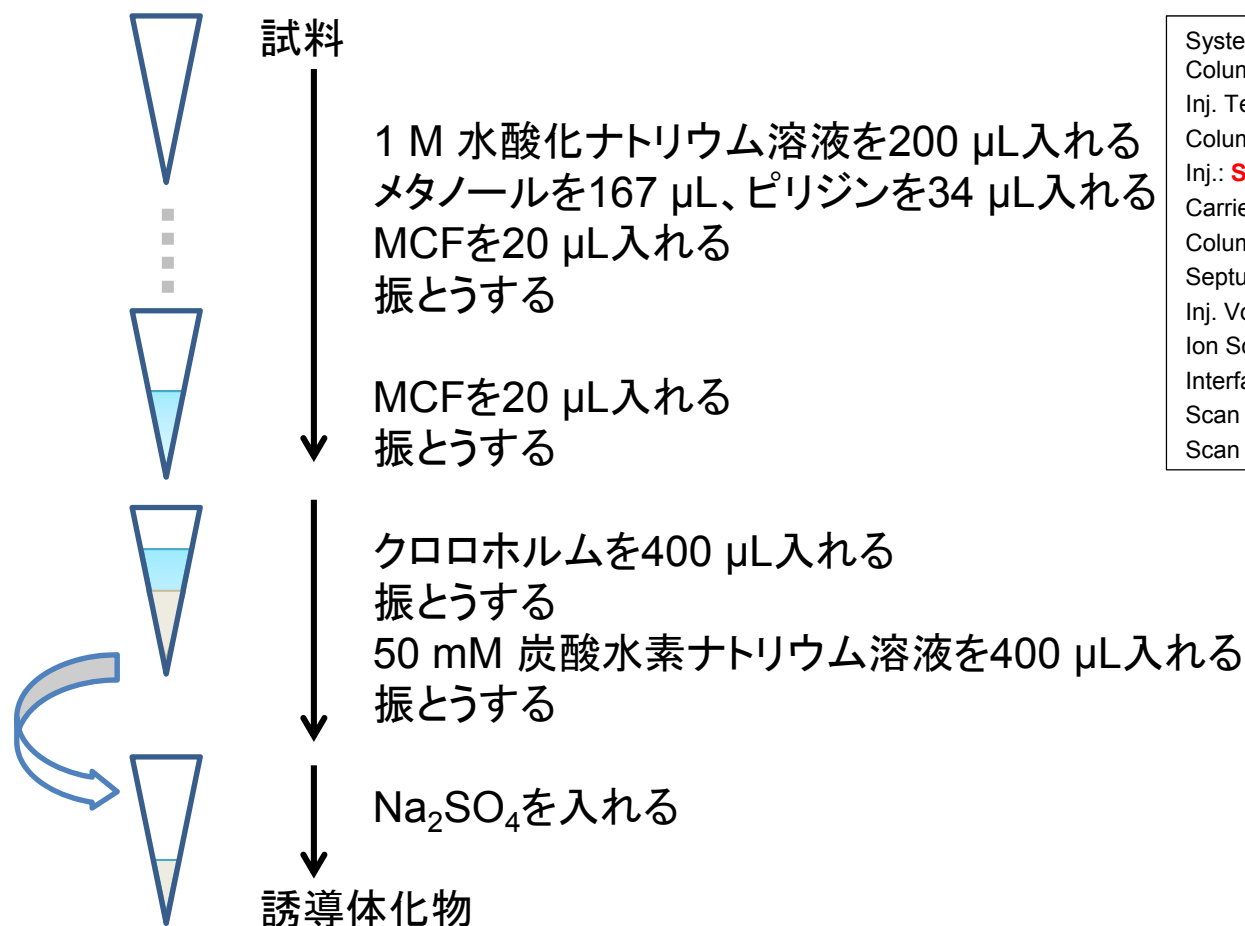
### 今後の課題

メキシ化とTMS化のライブラリーだけではなく、選択的に誘導体化するアルキル化や、エステル化とアシル化を組み合わせたライブラリーの充実が今後の課題となる。また、どのようにデータを解析するシステムをつくるか、前処理の煩雑さを軽減できるかも課題となる。

Identificated peaks from YPD medium extract  
(a) Silylation, (b) Alkylation

# GCによる代謝物の網羅的分析法 ～アルキル化～

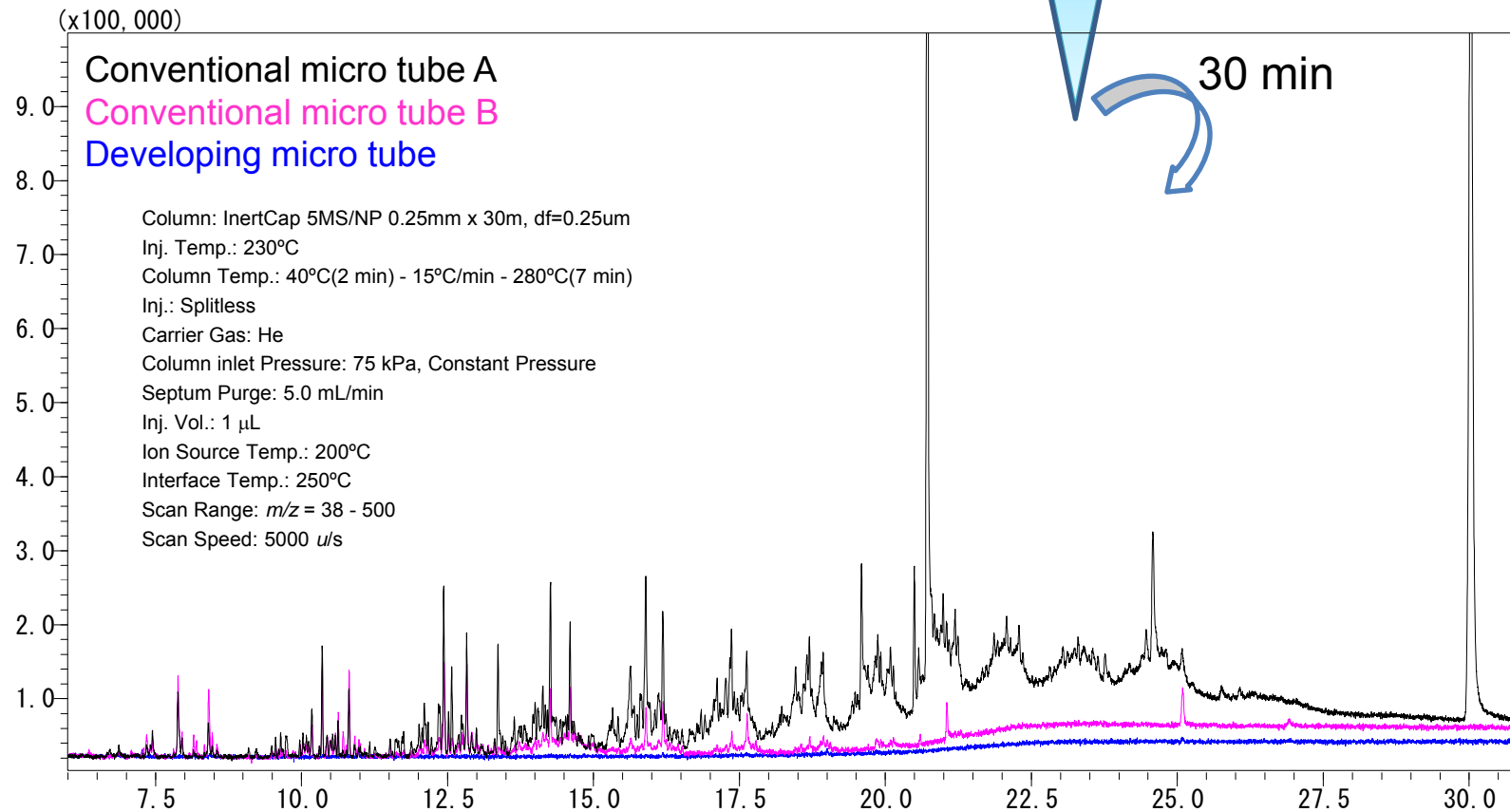
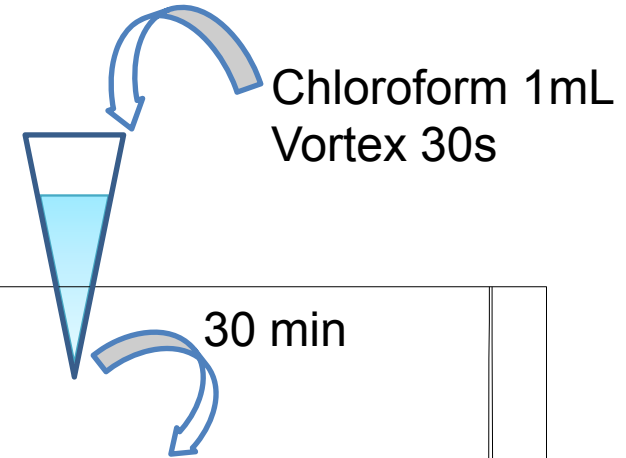
誘導体化後、有機層をとる



System: GC-MS  
Column: InertCap 5MS/NP 0.25 mm I.D.  $\times$  30 m  $df = 0.25 \mu\text{m}$   
Inj. Temp.: 230°C  
Column Temp.: 40°C(2 min) - 15°C/min - 280°C(7 min)  
Inj.: **Splitless**  
Carrier Gas: He  
Column inlet Pressure: 75 kPa, Constant Pressure  
Septum Purge: 5.0 mL/min  
Inj. Vol.: 1  $\mu\text{L}$   
Ion Source Temp.: 200°C  
Interface Temp.: 250°C  
Scan Range:  $m/z = 35 - 500$   
Scan Speed: 5000  $\mu\text{s}$

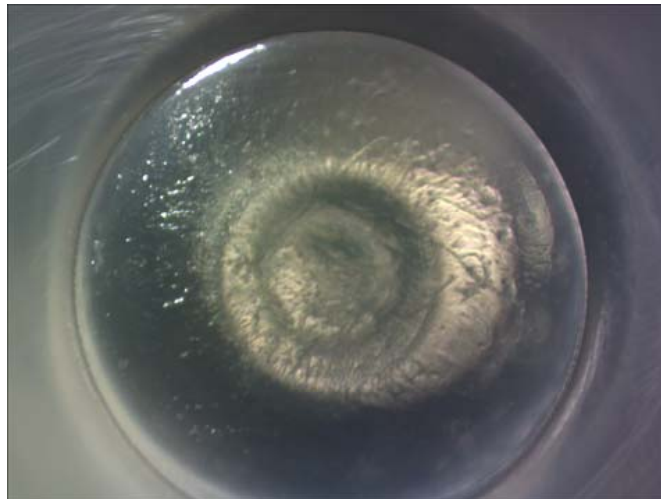
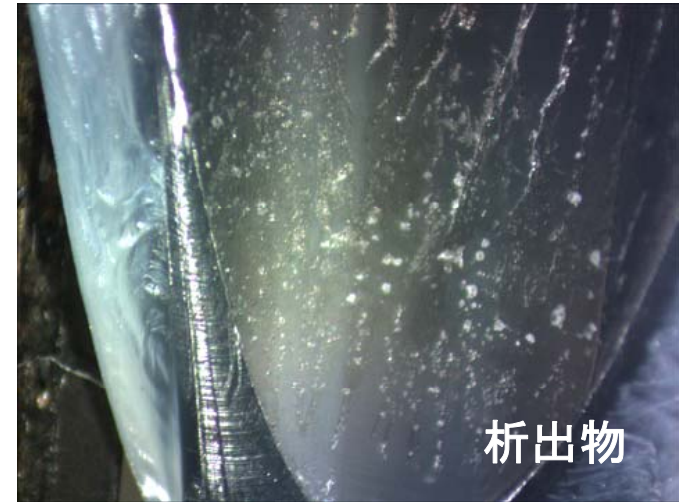
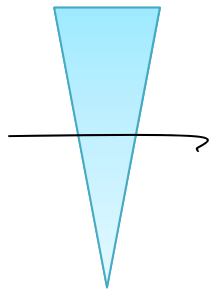
# 容器の課題～容器からの溶出物～

ほとんどのマイクロチューブの素材はポリプロピレンであり、塩素系溶媒に対する耐性がない

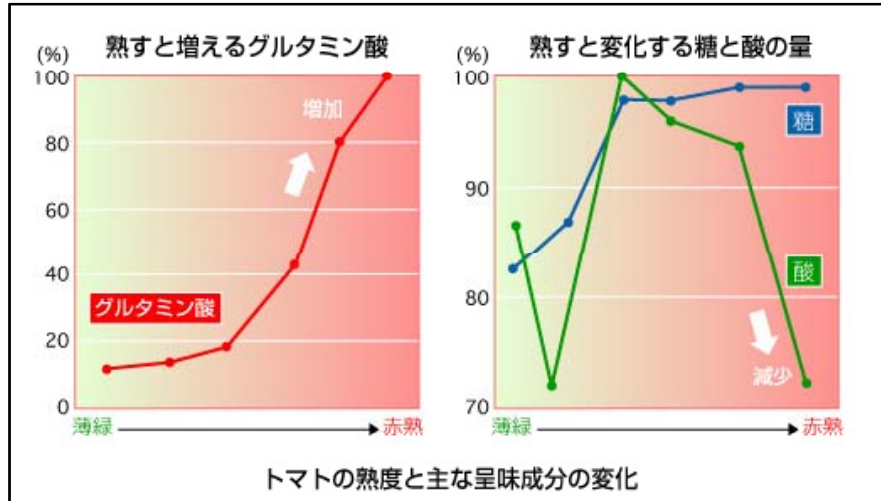


# 容器の課題～マイクロチューブの観察～

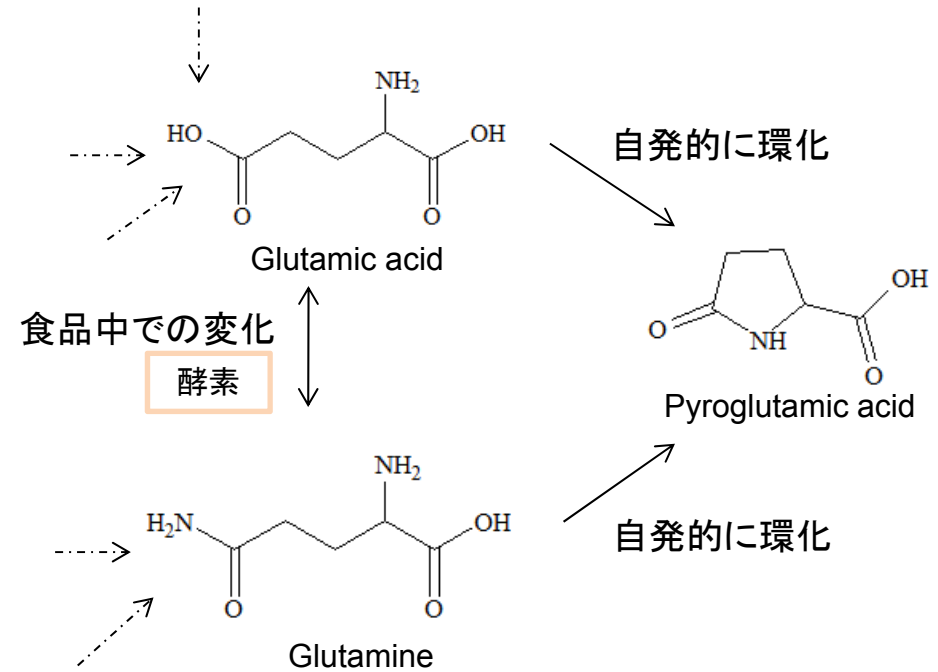
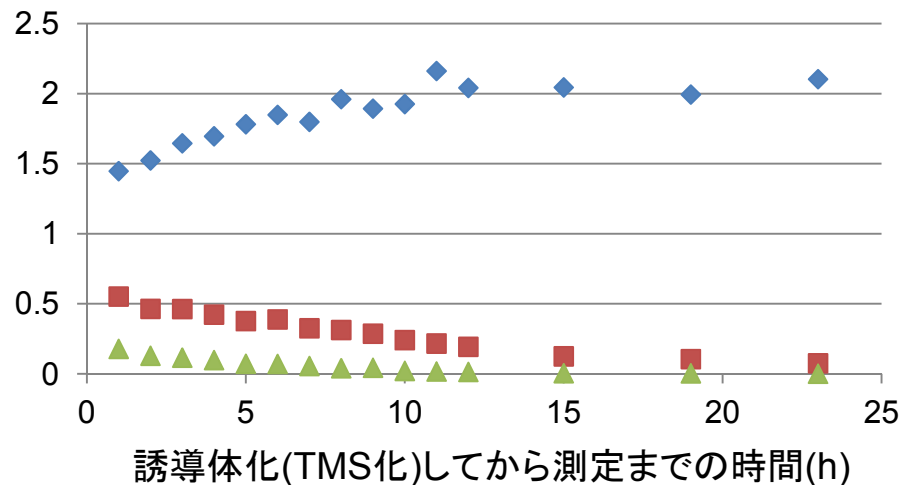
光学顕微鏡  
観察部位



# 食品の保存(熟成)と試薬の安定性 ～グルタミン酸、グルタミンを例に～



日本うま味調味料協会HPより



グルタミンは  
固体では安定  
水溶液中では不安定性

- ◆ Pyroglutamicacid\_2TMS
- Glutamic acid\_3TMS
- ▲ Glutamine\_3TMS

# GCによる代謝物の網羅的分析法 ～ライブラリーの充実～

Alouputで使用するInertCapのライブラリーにあげている化合物について、保持情報とマススペクトルの他に以下の補足情報を追加することを現在進めています。

- TMSの数  
ex. 2TMS, 3TMS



InertCap 5MS/NP 0.25 mm x 30 m, df=0.25 um

- 立体異性  
*E, Z*

- 分解・変性

ex. Oxaloacetic acidは常温では脱炭酸され、Pyruvic acidになる。

*N*-Formyl glycineは3本のピークとして検出され、

内1本はGlycineの3TMS 体として検出される。

グルタミン、グルタミン酸は一部がピログルタミン酸になって検出される。

- その他

ex. 核酸塩基はカラムが劣化するとテーリングしやすい。

5-OxoprolinoneとPyroglutamic acidは同じ化合物。

# GCによる代謝物の網羅的分析法 ～まとめ～

- GC代謝物分析の進展  
大阪大学大学院福崎先生、馬場先生等のグループが高価な装置を必要としないで誰もが使用できる系をたちあげた  
ライブラリーとAloutputがフリーで公開された、データベースが充実してきている
- 糖が多いサンプルの課題  
糖に埋まってしまうピーク  
味覚は選択的で対数であるのに対し、カラムと質量分析計のダイナミックレンジは狭い  
→アルキル化とTMS化
- 容器の問題  
→内面処理したものを近日リリース
- 標準試薬の安定性  
→試験中
- Aloutputで使用するInertCapのライブラリーにあげている化合物について補足情報の追加を進めています

# 謝辞



大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻

福崎 英一郎 先生、馬場 健史 先生

(独)理化学研究所 CSRS

津川 裕司 先生

ジールサイエンス(株) 技術開発部

古野 正浩 様、本川 正規 様

