

固相抽出の可能性とその自動化技術

—シリーズ3/5：固相誘導体化法：メタボロミクス—

佐々野 僚 一

1 はじめに

メタボロミクスでは、あらゆる物質の代謝を把握するために、網羅的に多くの物質を一度に測定することが望まれている。代謝物の主格でもあるアミノ酸や有機酸、糖類などは極性が高い不揮発性物質であるため、通常はLCの測定対象物質である。しかし、それらはそれぞれ異なる物性を持っているため、LCにおいて一斉に分析することは難しい。そこで、これらを誘導体化（メトキシ化、トリメチルシリル（TMS）化：図1）することで、揮発性物質に化学的に変化させ、GCによる一斉分析を可能としている。このように、アミノ酸・有機酸・糖類の「誘導体化」によるGC/MSの一斉分析は代謝物を網羅的に分析できるという点から極めて有効であり、さらに高分離能で、スペクトルライブラリを用いた検出成分の検索による定性が可能になる。

しかしながら、従来の「誘導体化」の前処理は、凍結乾燥（脱水）や誘導体化反応の工程に時間がかかり、抽出など手作業に頼る工程も多く、煩雑で長時間を要し、分析者の技量によってはデータがばらつくことがあるのが現状である。また、前処理に問題があった場合は、再度、最初から時間のかかる前処理をやり直して分析することになることになり、その労力や時間的損失が大きい。

本シリーズでは、メタボロミクスの分析の効率化を目

的として、固相抽出を用いた誘導体化を行い前処理の劇的な時短を実現した「固相誘導体化法」¹⁾²⁾と、それを組み込んだ抽出後の前処理から測定までを全自動化した「オンライン固相誘導体化 SPE-GC/MS システム」³⁾⁴⁾を紹介する。

2 固相誘導体化法の原理

固相誘導体化法（特許取得）の原理を図2に示す。固相はスルホン酸の陽イオン交換樹脂（CX）と4級アンモニウムの陰イオン交換樹脂（AX）の2層になっており、それぞれの樹脂が持つ官能基はマイナスとプラスに強く帯電している。

Step 1：アミノ酸と有機酸を含む試料を固相に負荷して、プラスに帯電しているアミノ基を持つアミノ酸はマイナスに帯電している固相 CX に、マイナスに帯電しているカルボキシル基を持つ有機酸はプラスに帯電している固相 AX に、イオン交換の相互作用により、固相に保持される。この時、試料に含まれる脂質（グリセリド）や糖類などの非イオン性物質は固相に保持されず、そのまま除去される。

Step 2：アセトニトリル-水で固相に残存している非イオン性物質を洗い流し、除去する。

Step 3：アセトニトリルで固相に残存している水を洗い流し、固相から水を除去する。

Step 4：誘導体化試薬（メトキシアミン/ピリジン溶

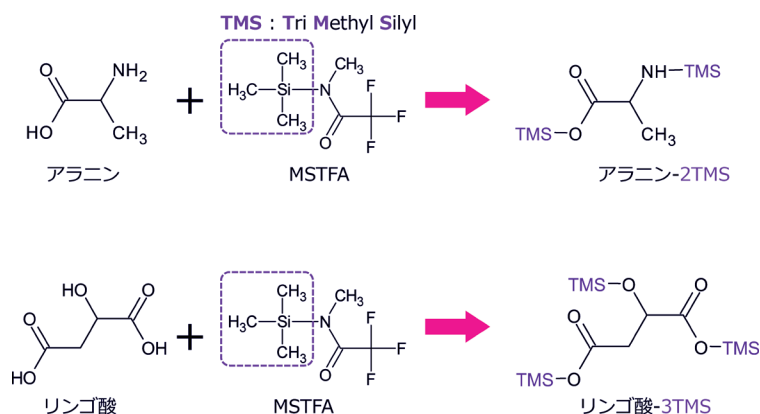


図1 アミノ酸と有機酸のTMS化

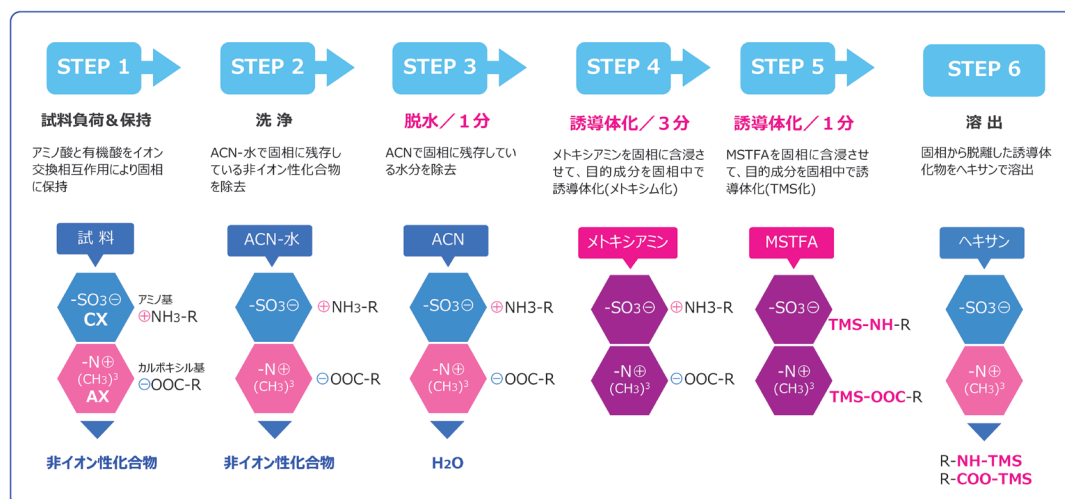


図 2 固相誘導体化法の原理

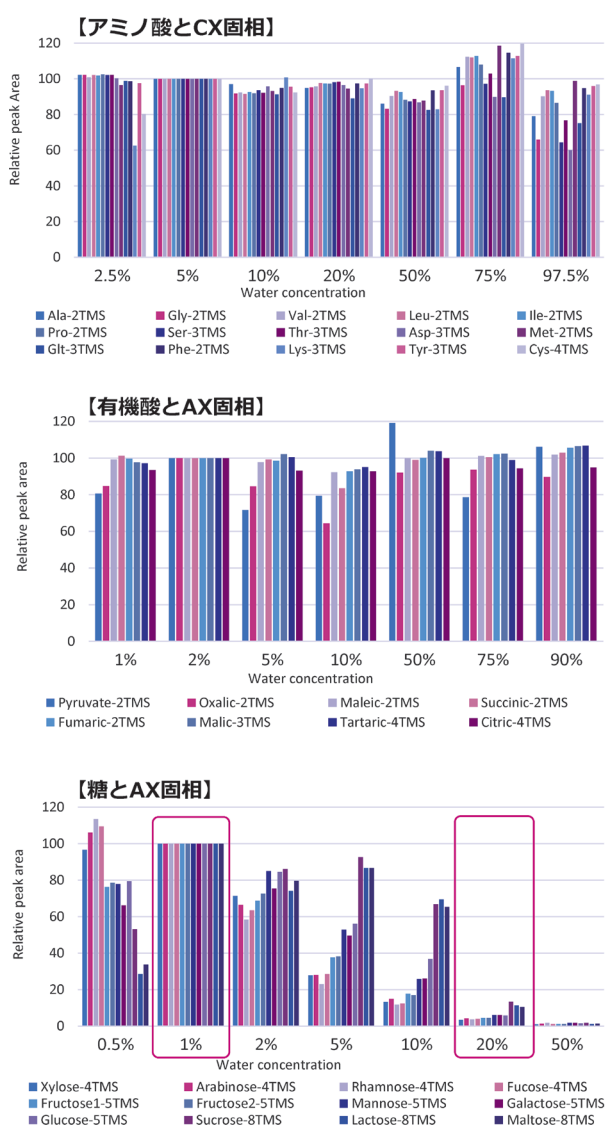


図 3 試料負荷時の水濃度と固相への保持について

液)を固相に3分間含浸させて、固相中で誘導体化反応を行い、ケトン基をメトキシム化する。

Step 5: 誘導体化試薬 (MSTFA) を固相に1分間含

浸させて、固相中で誘導体化反応を行う。アミノ基とカルボキシル基がMSTFAにより誘導体化(TMS化)され、イオン性を失ったアミノ酸と有機酸が固相から脱離する。

Step 6: TMS化したアミノ酸と有機酸をヘキサンで固相から溶出する。その溶出液をGC/MSで測定する。

特に注目すべきところはStep 3の脱水とStep 4と5の誘導体化である。従来法では凍結乾燥(水除去)に一晚(16時間)かかっている作業を本法では固相にアセトニトリルを通液するだけで水除去を成し遂げている。そのアセトニトリルの通液は1分未満で完了する。また、従来法ではメトキシム化に90分、TMS化に30分かけて誘導体化しているが、本法ではメトキシム化に3分、TMS化に1分と大幅に反応時間を短縮している。

次にアミノ酸・有機酸・糖類の固相への保持について述べる。試料負荷時のアセトニトリル-水の濃度比と固相への保持についてそれぞれの成分と固相について調べた結果を図3に示す。アミノ酸とCX、有機酸とAXについては水の濃度にかかわらず、保持することが分かった。一方、糖類とAXについては20%アセトニトリル-水では固相に保持されず、1%アセトニトリル-水で固相に保持されることが分かった。液相の水の濃度が低くなったために液相よりも固相の親水性相互作用(順相)により保持していると考えられる。この結果を基に糖類を除去したい時は20%以上の水濃度で洗浄し、逆に固相に保持したい時は1%の水濃度で負荷する。

3 オンライン固相誘導体化 SPE-GC/MS システム

前処理に固相抽出法(SPE)を用いることのメリットの一つに前処理操作を自動化しやすいことが挙げられる。さらにシリーズ第2弾⁵⁾で紹介した固相からの溶出液を全量注入できるオンラインSPE-GCシステムを用いることで、抽出/除タンパク後の精製・誘導体化から

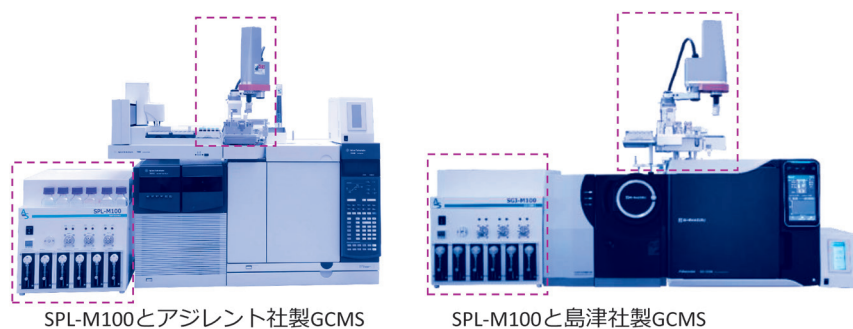


図 4 オンライン固相誘導体化 SPE-GC/MS システム

測定まで全自動で分析することが可能となった。本システムにより、従来の分析法で課題となっていた個人が持つ技量やラボ間で生じる差を最小限に留め、かつサンプルごとに誘導体化時間を一定に保てることにより、分析の精度および再現性が向上した。ここではそのオンライン固相誘導体化 SPE-GC/MS システム（図 4）を紹介する。

3・1 従来法と本法の比較

従来法⁶⁾と本法の比較を図 5 に示す。従来法は、試料をメタノール-水-クロロホルムで抽出/除タンパクし、次に水を追加しメタノール-水とクロロホルムを分離することによる液液分配で親水性物質（メタノール-水相）と疎水性物質（クロロホルム相）に分けて脱脂する。そして、その親水性物質を含むメタノール-水を試験管（遠沈チューブ）に分注し、減圧濃縮遠心分離後、一晚

かけて凍結乾燥して脱水乾固する。その試験管にメトキシアミン/ピリジン溶液を添加して 90 分間誘導体化反応（メトキシ化）させ、その後、MSTFA を添加して 30 分間誘導体化反応（TMS 化）させ、バイアルに移し替えて、GCMS にセットして GC/MS に 1 μ L 注入（スプリット 25：1）で測定している。

これに対して、オンライン固相誘導体化 SPE-GC/MS 法は、試料を水-アセトニトリルで抽出/除タンパクし、その上清をバイアルに移し替えて、本システムにセットする。その後は固相誘導体化を含む前処理から測定まで全自動で行う。自動前処理の動作は、固相をアセトニトリル水でコンディショニングし、試料を 40 μ L 吸引後、固相に負荷させて、そのままアセトニトリル-水で洗浄し、続けてアセトニトリルを通液させて固相内を脱水する。そして、メトキシアミン/ピリジン溶液（誘導体化試薬）を固相に含浸させて、測定対象物質がアミノ酸・

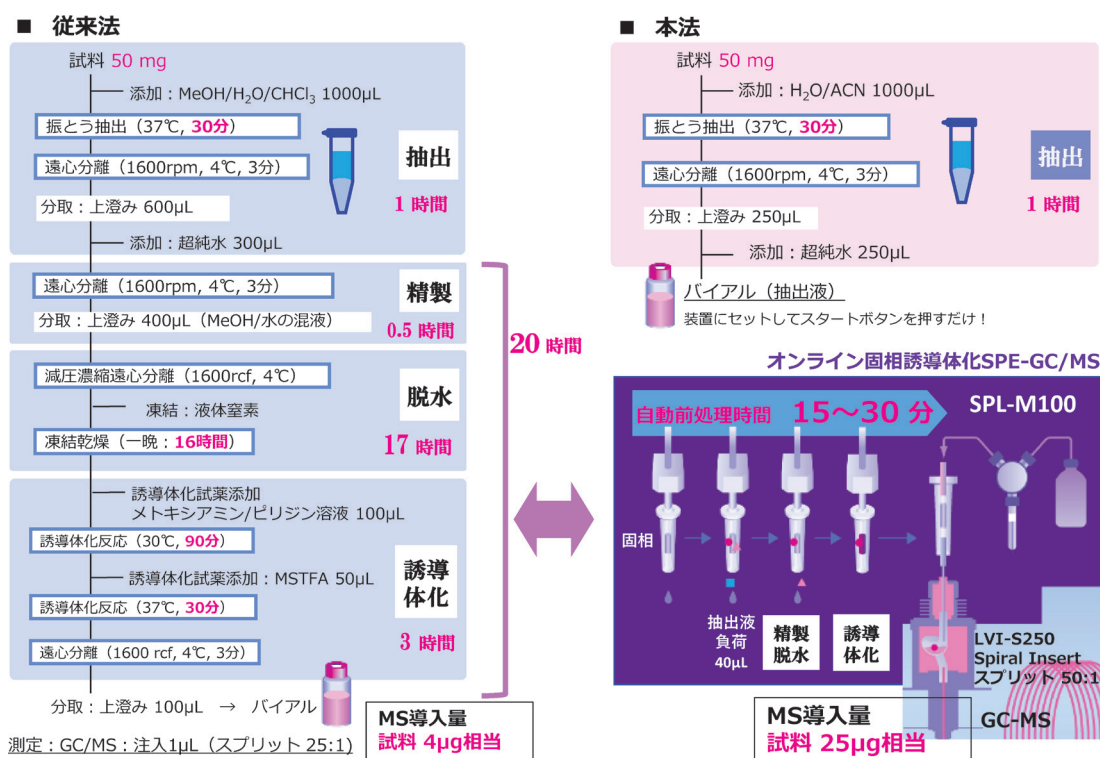


図 5 従来法と本法の比較

有機酸であれば3分間、糖類を含む場合は15分間、誘導体化を行いメトキシム化する。次にMSTFAを固相に1分間含浸させて、固相中で誘導体化を行い、目的物質をTMS化する。そして、その固相カートリッジにニードルを接続し、そのままニードルをGC注入口に挿入して、ヘキサンで誘導体化物質を溶出させながらGC/MSへその溶出液を全量注入し、スプリット1:50で測定する。

3・2 オンライン固相誘導体化システムのメリット

1) 前処理時間の大幅な短縮

従来法は抽出後の処理工程に20時間を要するのに対し、本法では固相誘導体化法により15~30分と大幅な短縮を実現した。

2) 抽出後の前処理から測定までを全自動化

従来法では遠心分離や凍結乾燥などの各工程を連結させて自動化するのは難しく、検体の取り間違えなどのリスクもある。前処理に固相誘導体化法を採用することにより、煩雑な作業を自動化することができた。これにより、人によるバラツキを低減し、分析精度を向上することができた。また、オペレータの操作も簡便で、事前に溶媒瓶や固相カートリッジをセットしておけば、試料バイアル（抽出液）を本システムにセットし測定シーケンスをスタートさせるだけなので、検体の取り間違えなどのリスクも低減しつつ、省力化の効果も得られる。

3) 手作業を必要とする抽出の簡易化

従来法はグリセリドなどの脂溶性物質を取り除くために抽出/除タンパク後にメタノール-水とクロロホルムで液液分配による精製（脱脂）を行っているが、本法は自動前処理による固相抽出の洗浄工程でグリセリドを除去している。そのため、手作業を必要とする抽出操作は抽出/除タンパクのみで抽出工程においても省力化となる。

4) 精製効果

本法はGC-MSの汚染物質であるグリセリドや糖などの非イオン性の物質は固相に保持せず除去できるため、従来法に比べ、装置の汚染を軽減し、メンテナンス頻度を抑えられる。また、精製効果により夾雑^{きょうざつ}ピークが減少し解析もしやすくなる。

5) 従来法と比較して高感度

本システムでは溶出する前に固相にニードルを装着し、溶出させながらGCに全量注入する。これにより、GCに注入される試料相対量を増やすことができ、従来法に比べ6倍程度の高感度分析が可能となる。なお、注入絶対量が多くなるが、固相抽出で精製しているため、GC-MSへの汚れの影響は少ない。

6) 誘導体化してからGC注入までの時間が一定

従来法は効率よく多検体を前処理するために一斉に誘導体化してから、GCにセットする。しかしながら、1本ずつ測定することになるので、誘導体化してからGC

で測定するまでの時間が検体の測定順ごとに長くなり、その間、バイアル中での誘導体化が進行したり、逆に誘導体化したものが分解したりと、測定対象物質の変動に問題があった。本システムでは誘導体化からGCに注入するまでの時間が検体ごとに一定であるため、誘導体化時間の差による偏りを抑えられる。

7) 分析所要時間の効率化

GCで測定している間に次の検体の前処理をオーバーラップして処理することで、GCの測定サイクル時間で、効率的に連続分析を行うことができる。

8) 抽出液を保管することで、再分析が容易

本法ではバイアル中の処理した抽出液の一部（20~50 μ L）しか使用しないため、残りの抽出液をそのままバイアルで保管することができる。そのため、容易に再分析ができる。

4 分析例

4・1 アミノ酸・有機酸

本システムを用いて、ホウレンソウ・トマト・ウメのアミノ酸・有機酸の一斉分析を行い、成分比較を行った。前処理フローを図6に示す。

抽出操作：それぞれの農作物の可食部100~200gにドライアイスを加えて凍結粉碎し試料とした。その試料10gを採取し、水10mLとアセトニトリル20mLを加え振とう抽出後、遠心分離し、除タンパクを行った。その上清を500 μ L分取し、アセトニトリル500 μ Lを加え、振とう遠心分離し、さらに除タンパクを行った。水酸化ナトリウム溶液でpH調製し、バイアルに移し、本システムにセットした。

本法で得られたホウレンソウの連続測定によるピーク面積値の再現性を表1に示す。アミノ酸・有機酸とも良好な結果を得られた。本法による各試料のSCANトータルイオンクロマトグラムを図7に示す。各試料から得られた成分のピーク形状および分離も良好であった。各試料から検出された成分のピーク面積比を図8に示す。ホウレンソウにはシュウ酸、トマトにはグルタミン酸、うめにはクエン酸が多く含むことが一般的に知られており、今回の結果からも各試料の成分の違いが明確に判定できた。

4・2 糖類

抽出液を固相上でアセトニトリルと混合して水濃度を下げた後固相に負荷して、糖類を固相に保持させた。

そして、アセトニトリルで脱水し、その後誘導体化試薬（メトキシアミン/ピリジン溶液）を固相に含浸して、固相中で誘導体化反応させてメトキシム化（図9）した。その後、誘導体化試薬MSTFAを固相に含浸して、固相中で誘導体化反応させてTMS化した。

糖類は環状構造や直鎖構造の構造異性体やそれらの立

【ドライアイス凍結粉碎】

農作物の可食部100~200 g にドライアイスを加えて凍結粉碎

【抽出】

試料採取 10 g 凍結粉碎した試料

— 添加 水 10 mL

手振とう

— 添加 ACN 20 mL

振とう抽出 10 min

遠心分離 3500 rpm, 3 min

分取 抽出上澄液 500 μ L

— 添加 ACN 500 μ L

振とう (37 $^{\circ}$ C, 1 min)

遠心分離 14000 rpm, 3 min

— 添加 0.1N NaOH

抽出上澄液

【オンライン固相誘導体化法】

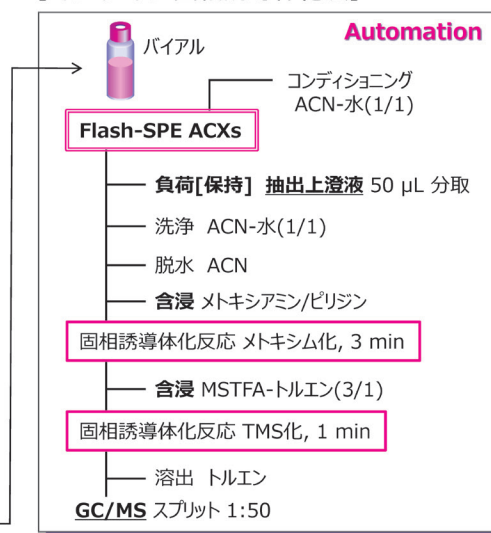


図 6 前処理フロー (アミノ酸/有機酸)

表 1 本法で得られたハウレンソウの連続測定によるピーク面積値の再現性

No.	成分名	U1	U2	U3	U4	U5	U6	Ave.	RSD., %
2	Alanine-2TMS	2,705,765	2,625,243	2,661,635	2,613,090	2,563,111	2,522,121	2,615,161	2.5
3	Oxalic acid-2TMS	21,958,314	21,851,090	21,894,348	22,511,436	21,642,163	21,152,779	21,835,022	2.0
5	Malonic acid-2TMS	548,802	512,489	526,249	519,043	526,234	560,334	532,192	3.5
6	Valine-2TMS	4,606,428	4,497,232	4,519,964	4,488,579	4,370,621	4,330,268	4,468,849	2.3
8	Leucine-2TMS	3,949,838	3,823,120	3,869,338	3,815,906	3,775,518	3,506,105	3,789,971	4.0
9	Isoleucine-2TMS	3,815,850	3,746,055	3,773,535	3,748,879	3,647,235	3,642,443	3,729,000	1.9
10	Proline-2TMS	722,955	701,361	703,837	693,309	677,892	656,913	692,711	3.3
11	Glycine-3TMS	311,795	300,133	304,260	291,269	293,179	271,290	295,321	4.7
13	Succinic acid-2TMS	686,713	683,285	686,428	692,873	682,757	675,948	684,667	0.8
14	Fumaric acid-2TMS	142,760	142,743	148,768	147,353	140,625	139,958	143,701	2.5
15	Serine-3TMS	3,965,989	3,691,721	3,774,761	3,724,560	3,590,127	3,663,876	3,735,172	3.4
16	Threonine-3TMS	602,931	560,277	568,682	558,021	542,283	550,970	563,861	3.7
17	Malic acid-3TMS	1,584,318	1,575,211	1,591,829	1,609,113	1,555,666	1,566,658	1,580,466	1.2
19	Aspartic acid-3TMS	4,528,602	4,434,587	4,423,349	4,546,915	4,327,986	4,393,956	4,442,566	1.9
20	Methionine-2TMS	53,844	57,581	57,174	46,740	55,391	50,128	53,476	8.0
22	GABA-3TMS	442,631	435,615	443,665	423,246	417,886	397,142	426,698	4.2
24	Threonic acid-4TMS	111,636	103,963	109,708	112,379	106,450	117,600	110,289	4.3
25	Ketoglutaric acid-MO-2TMS	4,372	4,620	5,300	5,080	4,489	4,590	4,742	7.7
26	Glutamic acid-3TMS	4,609,844	4,600,117	4,559,014	4,622,500	4,452,911	4,616,932	4,576,886	1.4
27	Phenylalanine-2TMS	1,525,816	1,487,573	1,505,821	1,508,921	1,441,017	1,419,540	1,481,448	2.8
29	Asparagine-3TMS	1,993,942	1,800,771	1,838,868	1,826,318	1,806,007	1,968,777	1,872,447	4.6
30	Putrescine-4TMS	100,127	90,218	92,879	94,574	87,116	79,290	90,701	7.8
31	Shikimic acid-4TMS	23,913	20,946	22,909	22,988	21,733	20,749	22,206	5.7
32	Citric acid-4TMS	480,734	471,479	470,472	476,376	461,721	453,838	469,103	2.1
34	Adenine-2TMS	32,888	28,552	26,642	27,283	25,239	24,364	27,495	11.0
35	Lysine-4TMS	1,086,746	1,036,401	1,065,106	1,021,094	1,015,699	926,104	1,025,192	5.4
36	Histidine-3TMS	309,715	305,531	314,436	317,818	296,923	287,021	305,241	3.8
37	Tyrosine-3TMS	3,660,407	3,522,793	3,549,047	3,567,762	3,463,739	3,332,989	3,516,123	3.1
40	Tryptophan-3TMS	138,662	133,594	136,100	134,166	131,844	134,228	134,766	1.7
43	Adenosine-4TMS	54,504	52,592	57,398	54,370	52,774	51,431	53,845	3.9

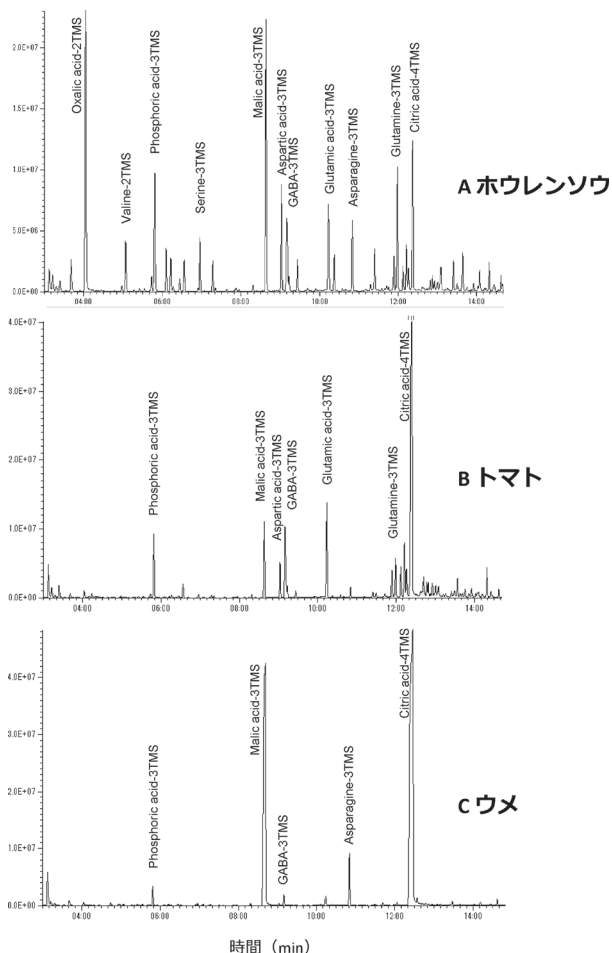


図7 本法による各農作物のSCAN トータルイオンクロマトグラム

体異性体で化学平衡しており、そのままGCで測定すると複数のピークが出現し、解析が困難である。そこで、GCで測定する時は直鎖構造の時にメトキシム化することで環状構造への変化を防ぎ、直鎖構造のメトキシム化へ反応させていくことにより、出現するピーク数を抑えられる。従来法ではこのメトキシム化の反応に90分を要するが、本システムでは15分で行った。

4.3 アミノ酸・有機酸・糖類（2段階試料負荷法）

食品試料では多成分が様々な濃度範囲で含有している。特に高濃度の糖類が存在する試料においては、その糖類のピークのリテンションタイムに近接する低濃度のアミノ酸や有機酸の測定が困難になるという問題がある。また、高濃度の糖類が大量にGCに導入されると、分離カラムの液相の保持可能な量を超え、目的成分も含めてリテンションタイムが大きくなることもあり、解析が困難になる。さらに、高濃度の糖類がMSに導入されることにより、MSの汚染や感度低下につながる。

そこで、低濃度のアミノ酸および有機酸と高濃度の糖類の一斉分析を目的とし、2段階試料負荷法⁷⁾を開発した。前処理フローを図10に示す。1回目の試料負荷では、溶媒アセトニトリル-水(4/1)の試料40 μ Lを固相に負荷して、糖類は固相に保持させずアミノ酸と有機酸を固相に保持する。2回目のサンプル負荷では、固相上で試料2 μ Lをアセトニトリルと混合して水濃度比率



図8 ホウレンソウ、トマト、ウメにおける各成分のピーク面積値の比較
HOU：ホウレンソウ、TOM：トマト、UME：ウメ

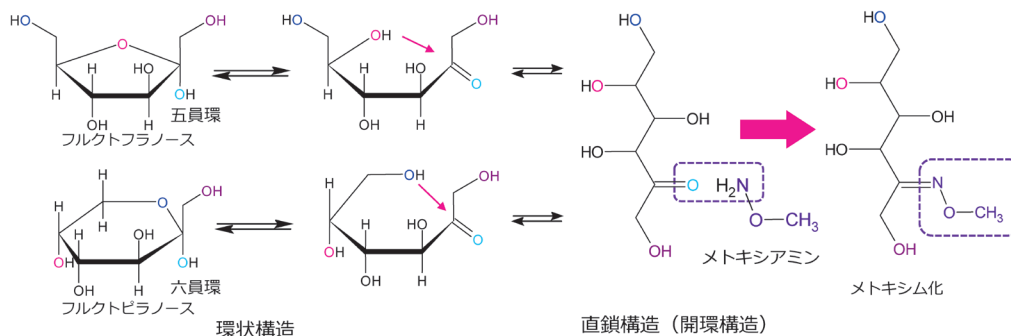


図 9 糖類の異性体とメトキシミ化

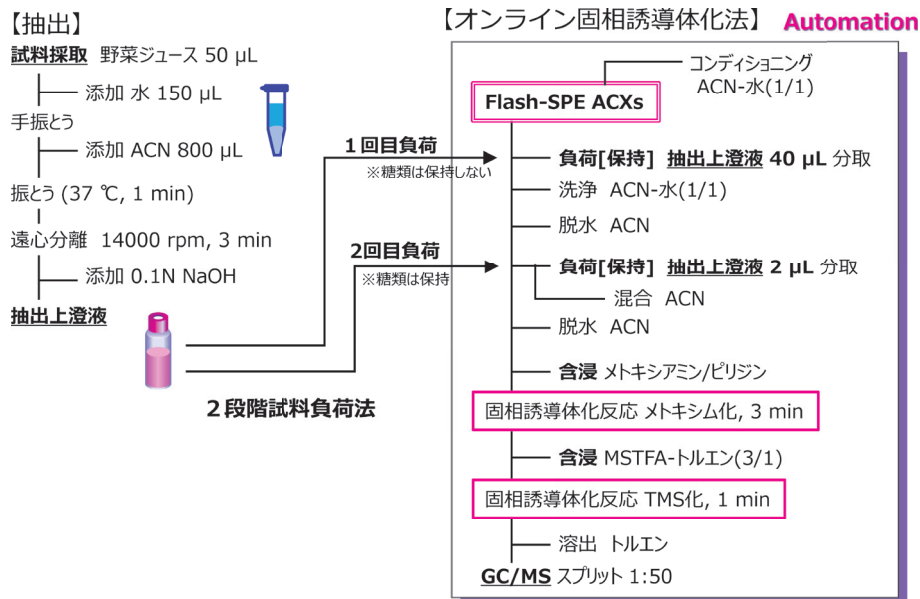


図 10 前処理フロー（アミノ酸/有機酸/糖類）

を下げた状態で同じ固相に負荷し糖類を保持する。よって、アミノ酸と有機酸は第 1 回目の試料負荷 40 µL と 2 回目の 2 µL を合わせて 42 µL が固相に保持していることになる。一方、糖類は 1 回目は保持されず、2 回目の 2 µL が固相に保持されていることになる。つまり、2 段階に分けて試料量および溶媒比率を変更して固相に負荷することで、低濃度のアミノ酸および有機酸を多く固相に保持させ、高濃度の糖類を同じ固相に少なく保持させることができる。

低濃度のアミノ酸・有機酸と高濃度の糖類が含まれている野菜ジュースを用いて本法により得られた SCAN トータルイオンクロマトグラムを図 11 に示す。その結果、得られたクロマトグラムは同じダイナミックレンジ内でそれぞれのピーク強度を得ることができた。これにより、GC-MS に負荷を与えることなく、低濃度のアミノ酸および有機酸と高濃度の糖類を含む試料の一斉分析が可能であることが示された。

4・4 短鎖脂肪酸

従来のメタボローム分析において、短鎖脂肪酸は、凍

結乾燥/遠心乾固の工程における気化損失が懸念されるため、前処理が難しく、塩酸酸性下でのジエチルエーテル抽出などの手法が取られることが多い。また、分子量の小さい短鎖脂肪酸であるギ酸、酢酸、プロピオン酸は MSTFA で TMS 化しても沸点が低く、残存誘導体化試薬由来のピークとリテンションタイムが重なり測定が難しい。一方、短鎖脂肪酸には誘導体化試薬に MTBSTFA を用いて TMS 化よりも質量が重くなる *t*-BDMS (*t*-butyl dimethyl silyl) 化をすることで残存誘導体化試薬由来の妨害ピークとの重なりを回避する手法が報告されている。そこで、凍結乾燥工程を必要としないオンライン固相誘導体化 SPE/GC/MS システムを用いて、MTBSTFA 誘導体化試薬による短鎖脂肪酸の一斉分析⁸⁾のメソッド開発を行い、有効であることが分かった。

ただし、ギ酸、酢酸、乳酸はブランクとして高濃度で検出される。特にプラスチック製品からの溶出が疑われ、遠沈チューブやピペットのチップ、固相カートリッジ、溶媒、誘導体化試薬などが疑われる。微量ながらそのほかの成分も多く検出されるので、ブランク操作の測定は必ず行うことをお勧めする。

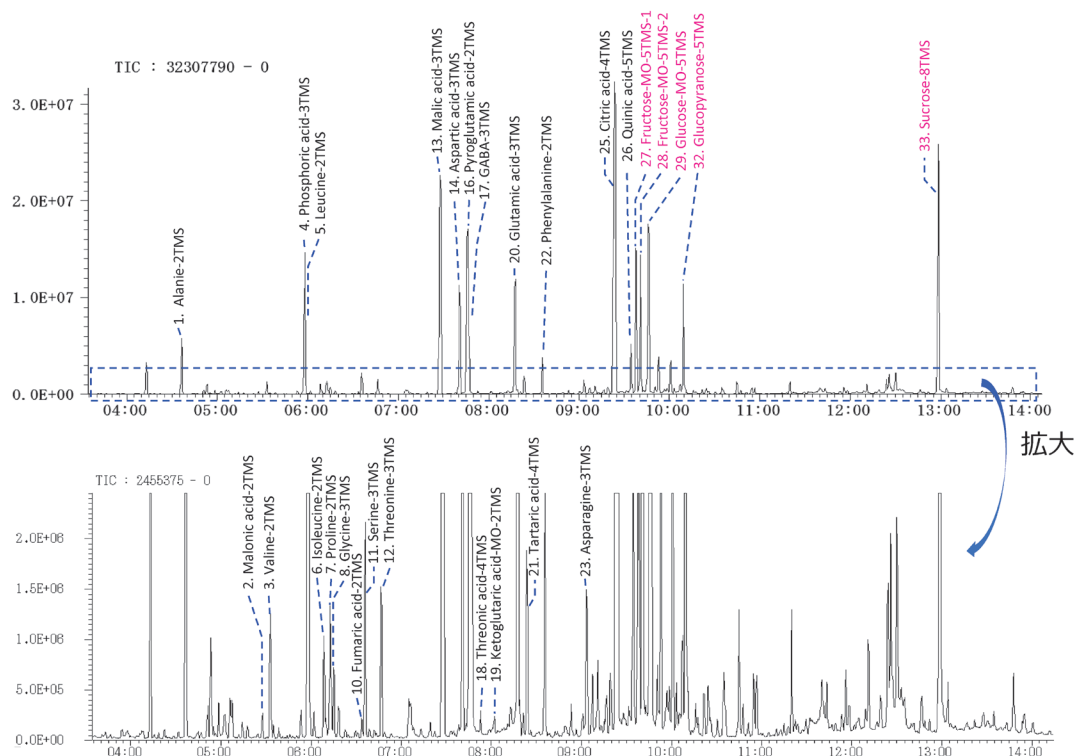


図 11 本法による野菜ジュースの SCAN トータルイオンクロマトグラム

5 まとめ

従来、アミノ酸や有機酸を GC/MS で測定するには凍結乾燥や誘導体化が必要であり、その工程に多くの労力と時間を費やしていた。しかし固相誘導体化法によりそれらを劇的に改善することができた。さらにその固相誘導体化法とオンライン SPE-GC/MS システムとの融合により前処理から測定までを完全に自動化することでメタボローム分析の更なる効率化と分析精度の向上を図ることができた。

医学や食品、バイオなどの様々な分野のメタボローム分析においてこのオンライン固相誘導体化 SPE-GC/MS システムを用いることで、正確な評価や多くの情報の獲得による研究開発のスピードアップが期待できる。

文 献

- 1) 佐々野僚一, 大崎秀介, 松本明弘, 馬場健史, 山下俊幸, 福崎英一郎: 第 9 回メタボロームシンポジウム要旨集, p.54 (2015).
- 2) E. Takeo, R. Sasano, S. Shimma, T. Bamba, E. Fukusaki: *J.*

Biosci. Bioeng., **124**, 700 (2017).

- 3) 佐々野僚一, 古野正浩, 大森一生, 山本祐一, 片上直人, 下村伊一郎, 福崎英一郎: 第 11 回メタボロームシンポジウム要旨集, p.100 (2017).
- 4) K. Yamamoto, M. Taniguchi, T. Nakahara, Y. Ito, R. Sasano, E. Fukusaki: *J. Biosci. Bioeng.*, **132**, 599 (2021).
- 5) 島三記絵, 松尾俊介, 佐々野僚一: ぶんせき (Bunseki), **2022**, 286.
- 6) O. Fiehn, J. Kopka, R. N. Trethewey, L. Willmitzer: *Anal. Chem.*, **72**, 3573 (2000).
- 7) 佐々野僚一, 大崎秀介, 古野正浩, 福崎英一郎: 第 65 回質量分析総合討論会講演要旨集, p.63 (2017).
- 8) 佐々野僚一, 杉立久仁代, 野原健太, 古野正浩, 福崎英一郎: 第 12 回メタボロームシンポジウム要旨集, p.115 (2018).



佐々野僚一 (Ryoichi SASANO)

株式会社アイスティサイエンス (〒640-8390 和歌山市有本 18-3). 《現在の研究テーマ》 理化学分析における前処理の自動化. 《趣味》 テニス.

E-mail: sasano@aisti.co.jp

会社ホームページ URL :

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

関連製品ページ URL :

<http://www.aisti.co.jp/product/sgi-m100/>