

カルボン酸を対象とした 高感度LC-MS分析用 誘導体化試薬

福岡大学薬学部 教授 吉田 秀幸
(薬品分析学研究室)

2024年5月28日

福岡大学薬学部 薬品分析学研究室

- 構成員（R6年度）：教授2名、助教2名、大学院生0名、学部生11～13名/4～6年生
- 研究の内容：
 - 生体に関連する物質の超高感度分析
 - 健康・医療に貢献する分析化学
- 研究の方法：「（多次元）HPLC」×「蛍光・MS・吸光度」、「分光学的手法」
- 研究の対象：「生体成分、医薬品、食品、環境成分等」中の「有機低分子化合物」

近年の研究テーマ

赤色文字：分析対象等 青色文字：分析方法等

- A Pyridinium Derivatization Reagent for Highly Sensitive Detection of Poly-(carboxylic acid)s Using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **33** (2022) 1492.
- Quantification of Casein in Baked Food Products by Selective Analysis of Phosphorylated Peptides Using Fluorous Derivatization with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method; *Chem. Pharm. Bull.*, **70** (2022) 19.
- 陽イオン選択性電極を用いたアセチルコリン関連化合物のセンシング; *分析化学*, **70** (2021) 261.
- Multi-dimensional HPLC Analysis of Metabolic Related Chiral Amino Acids - Method Development and Biological/Clinical Applications-; *Chromatography*, **40** (2019) 1.
- エキサプレックス蛍光現象を利用する多環芳香族炭化水素のHPLC分離分析; *分析化学*, **65** (2016) 729.
- Liquid Chromatographic Determination of Microcystins in Water Samples Following Pre-column Excimer Fluorescence Derivatization with 4-(1-Pyrene)butanoic Acid Hydrazide; *Anal. Chim. Acta*, **755** (2012) 93.

近年の研究テーマ

赤色文字：分析対象等 青色文字：分析方法等

- A Pyridinium Derivatization Reagent for Highly Sensitive Detection of Poly-(carboxylic acid)s Using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **33** (2022) 1492.

LC-ESI-MS/MSによるポリカルボン酸類の高感度
検出のためのピリジニウム型試薬の開発

本技術に関する知的財産権

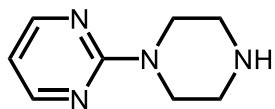
- 発明の名称： 質量分析用誘導体化試薬
- 出願番号： 特願 2022-079047
- 出願人： 学校法人 福岡大学
- 発明者： 坂口 洋平、川末 慎葉、古賀 鈴依子、
吉田 秀幸、能田 均

新技術の紹介

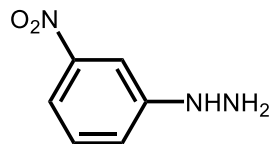
LC-MSにおける短鎖脂肪酸分析の問題点

■ 短鎖脂肪酸は極性が高く、LC-ESI-MSでの分析が困難

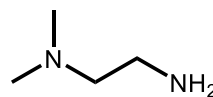
→ 問題点を克服するために多くの誘導体化試薬が開発



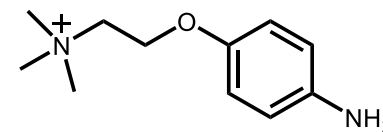
Anal. Biochem., **537** (2017) 26.



Anal. Chem., **93** (2021) 10075.



Anal. Chem., **90** (2018) 3512.



Anal. Chem., **80** (2008) 9042.

しかし、これらの誘導体化試薬は複数のカルボキシ基を持つ化合物への有効性が確認されていない

本技術の概要

■ 短鎖脂肪酸の高感度分析

→ カルボキシ基の数に影響を受けることなく、ポリカルボン酸の高感度分析が可能な誘導体化試薬の開発



他のカルボン酸類への適用

新技術の紹介

誘導体化試薬の設計 ～3つのコンセプト～

(1) カルボキシ基との反応部位

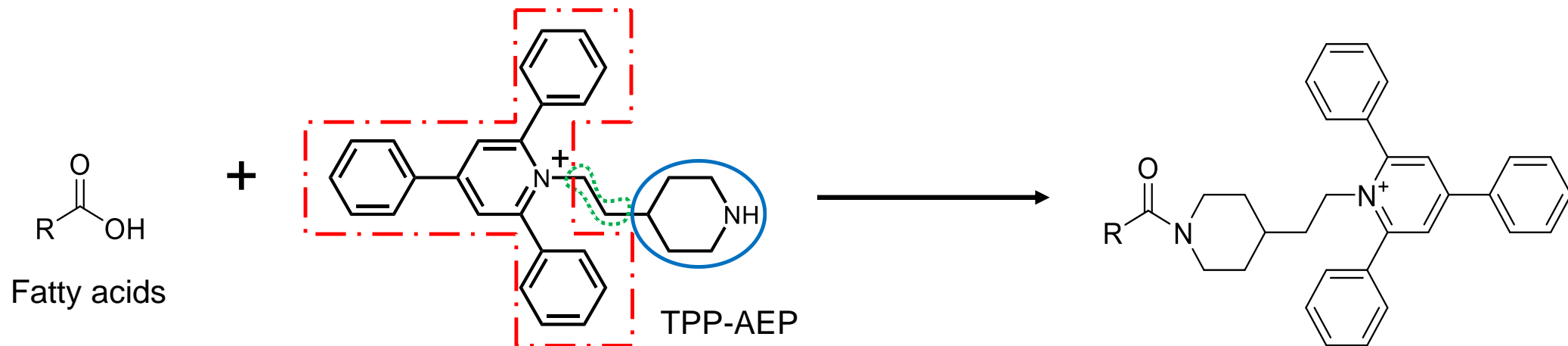
- アミノ基(カルボキシ基との反応部位)の構造

(2) LC-ESI-MSにおける高感度化部位

- 構造内永久電荷の有無
- 化合物の疎水性

(3) 高感度化部位と反応部位を結ぶリンカー

- リンカーの構造(芳香環, アルキル鎖)

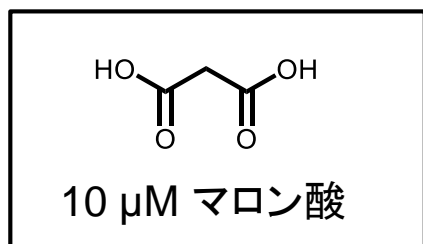


新技術の紹介

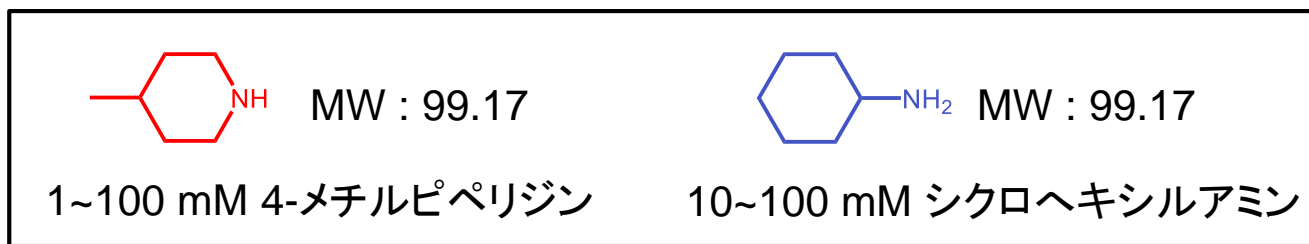
誘導体化試薬

(1) カルボキシ基との反応部位

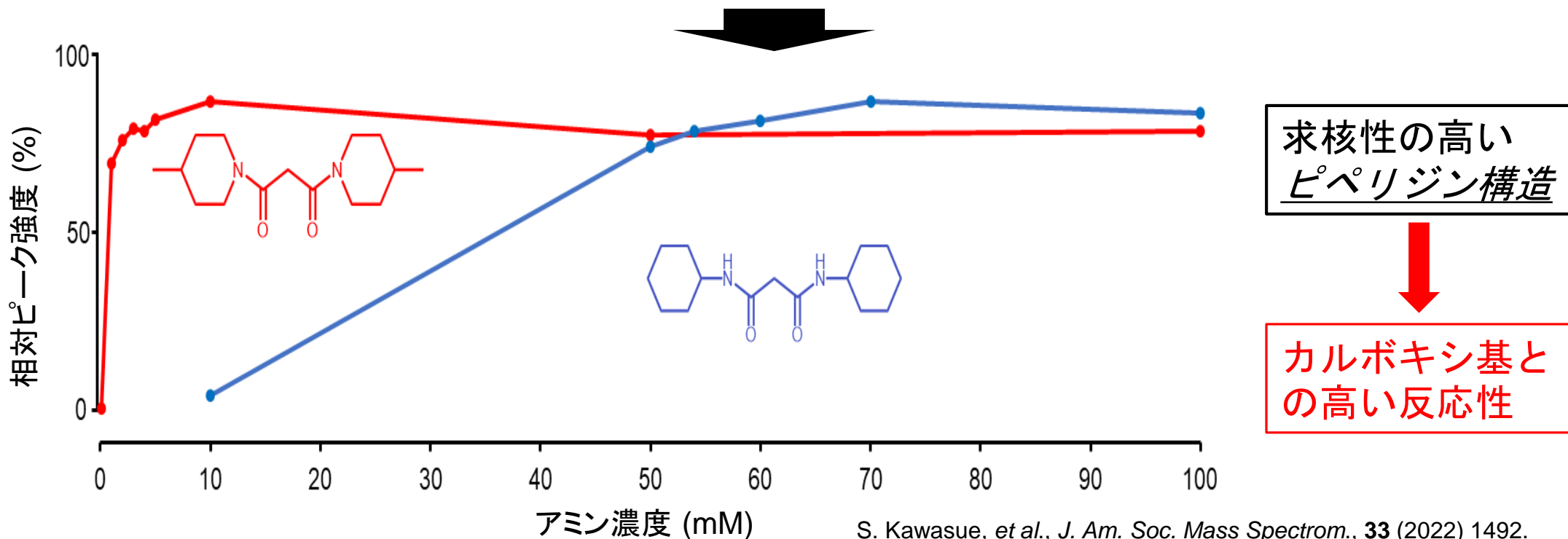
一級アミン、二級アミン(ピペリジン骨格)のカルボキシ基に対する反応性を比較



+



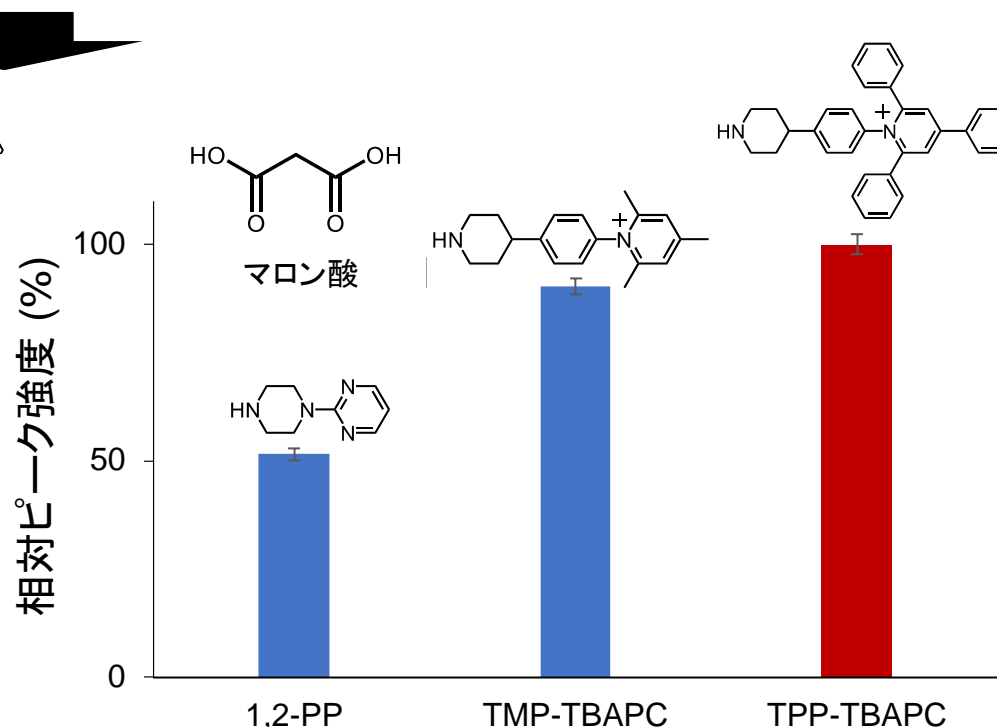
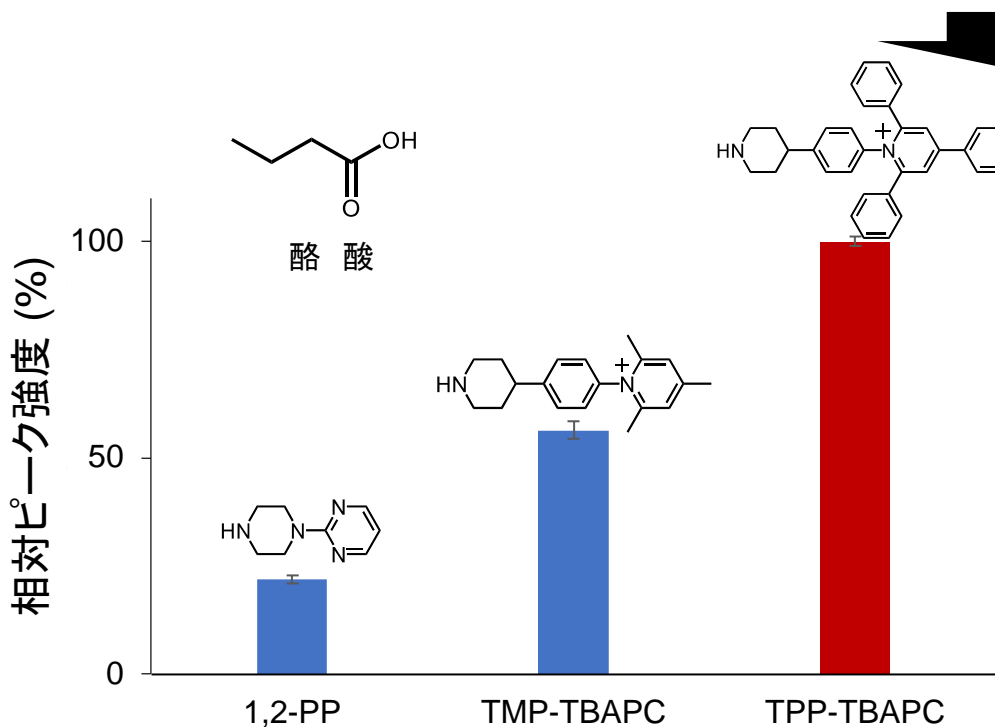
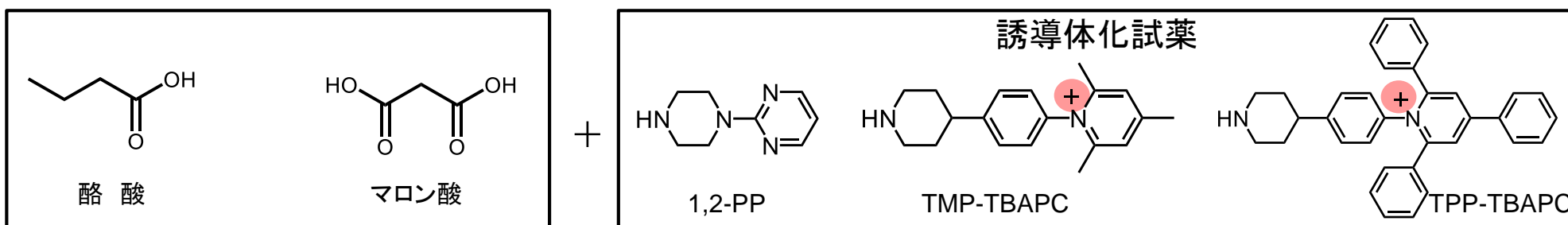
最大反応状態に達するアミン濃度の違いで、反応性の比較を行った



新技術の紹介

誘導体化試薬

(2) LC-ESI-MSにおける高感度化部位



永久電荷構造

+

高い疎水性

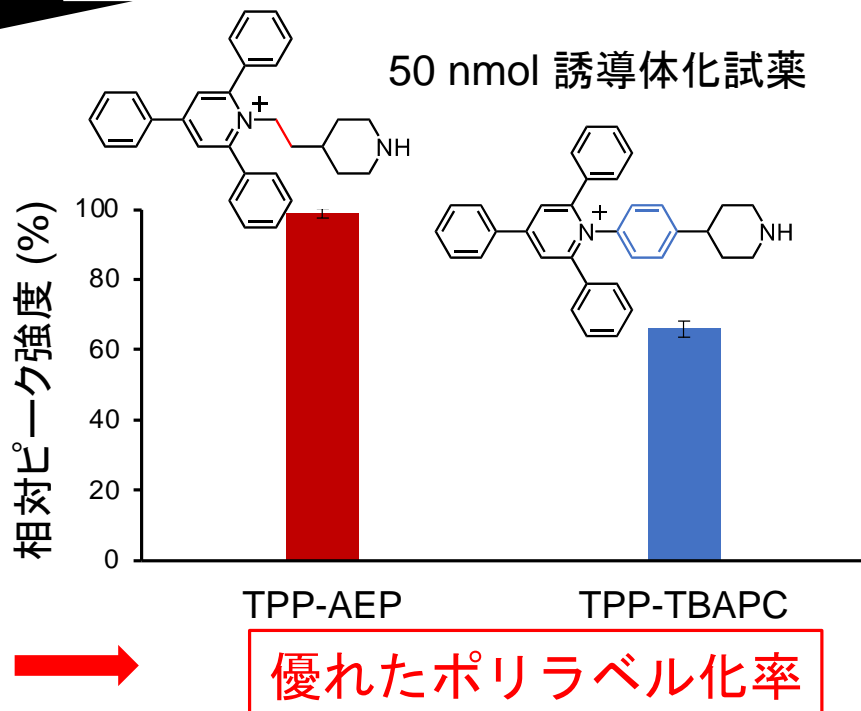
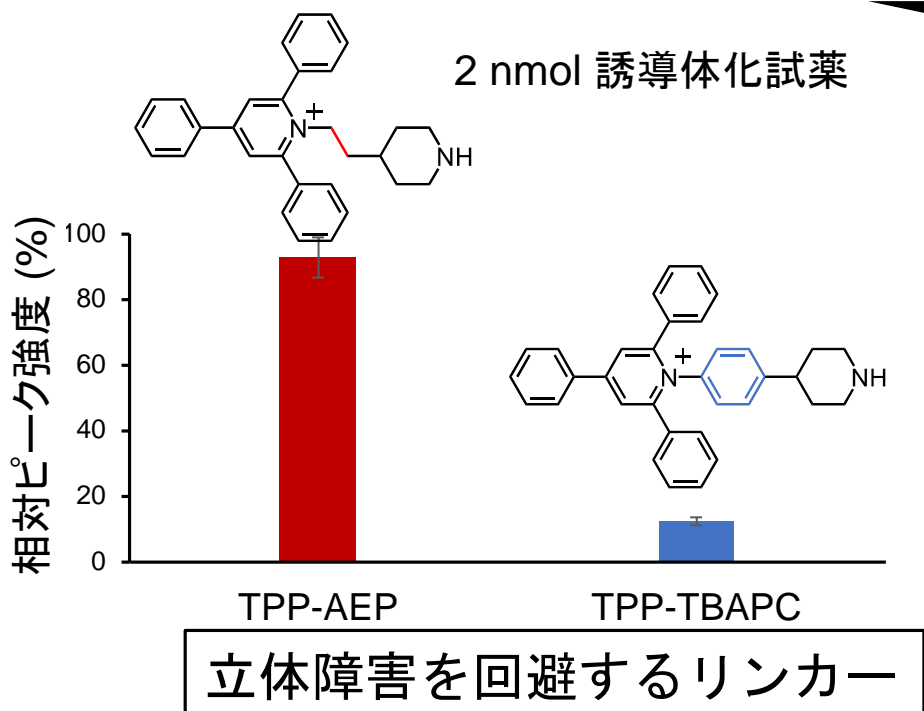
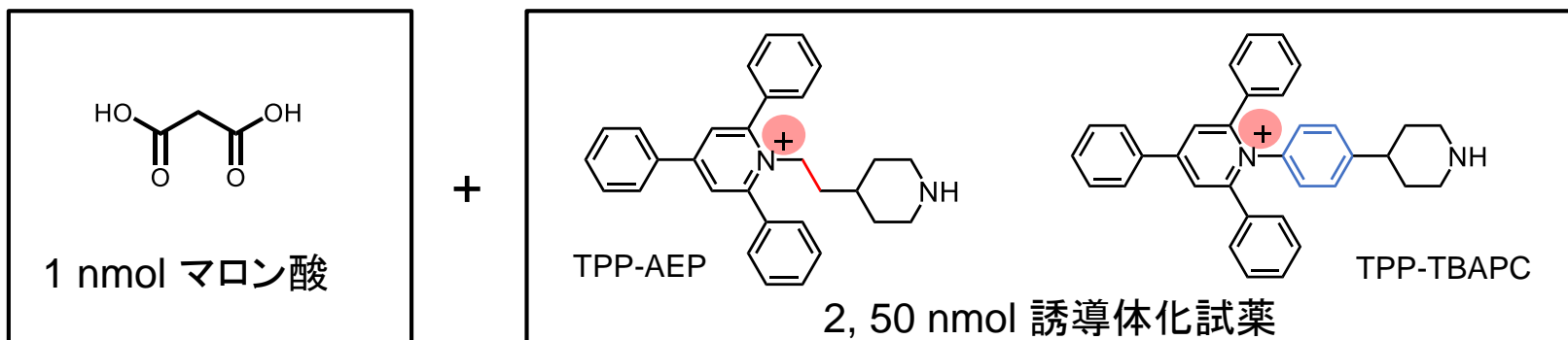


ESI-MSにおける検出感度の向上

新技術の紹介

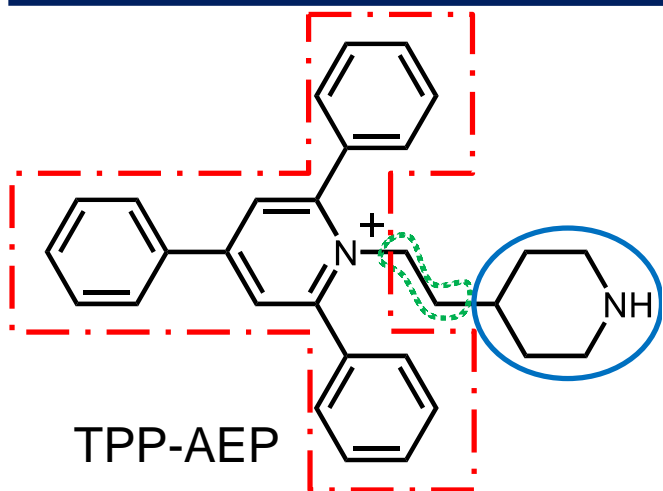
誘導体化試薬

(3) 高感度化部位と反応部位を結ぶリンカー



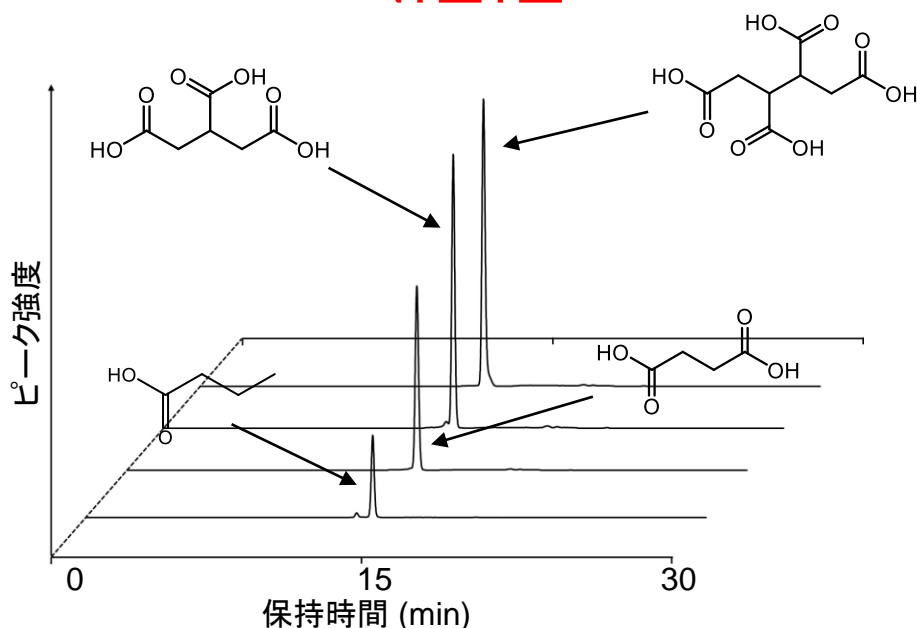
新技術の紹介

最適な誘導体化試薬



- カルボキシ基との反応性が高いピペリジン構造を持つ **優れた誘導体化効率**
- 永久電荷を持つにも関わらず、疎水性が高い **優れたESI効率**
- 永久電荷構造とピペリジン構造の間にリンカーを導入することで立体障害を回避

優れたポリラベル化率

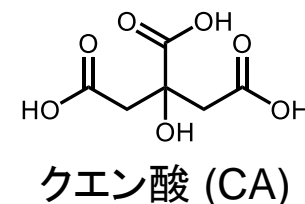
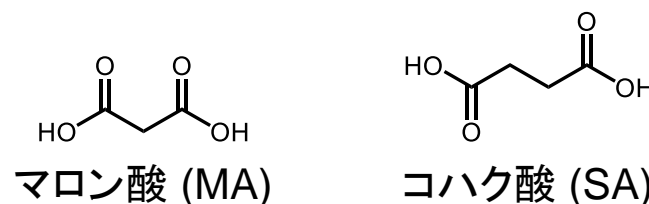
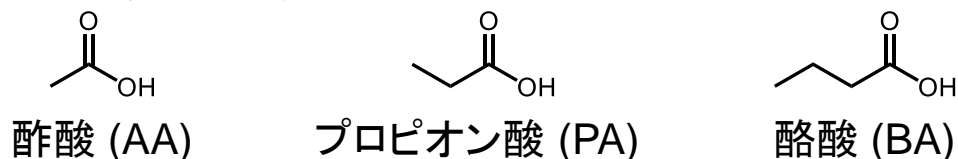


1~4個のカルボキシ基を持つ化合物を完全にラベル化できることを確認しており、カルボキシ基の数に関わらず高感度分析が可能である。

新技術の紹介

短鎖脂肪酸の分析

測定対象



誘導体化操作

1価カルボン酸

2価カルボン酸

3価カルボン酸

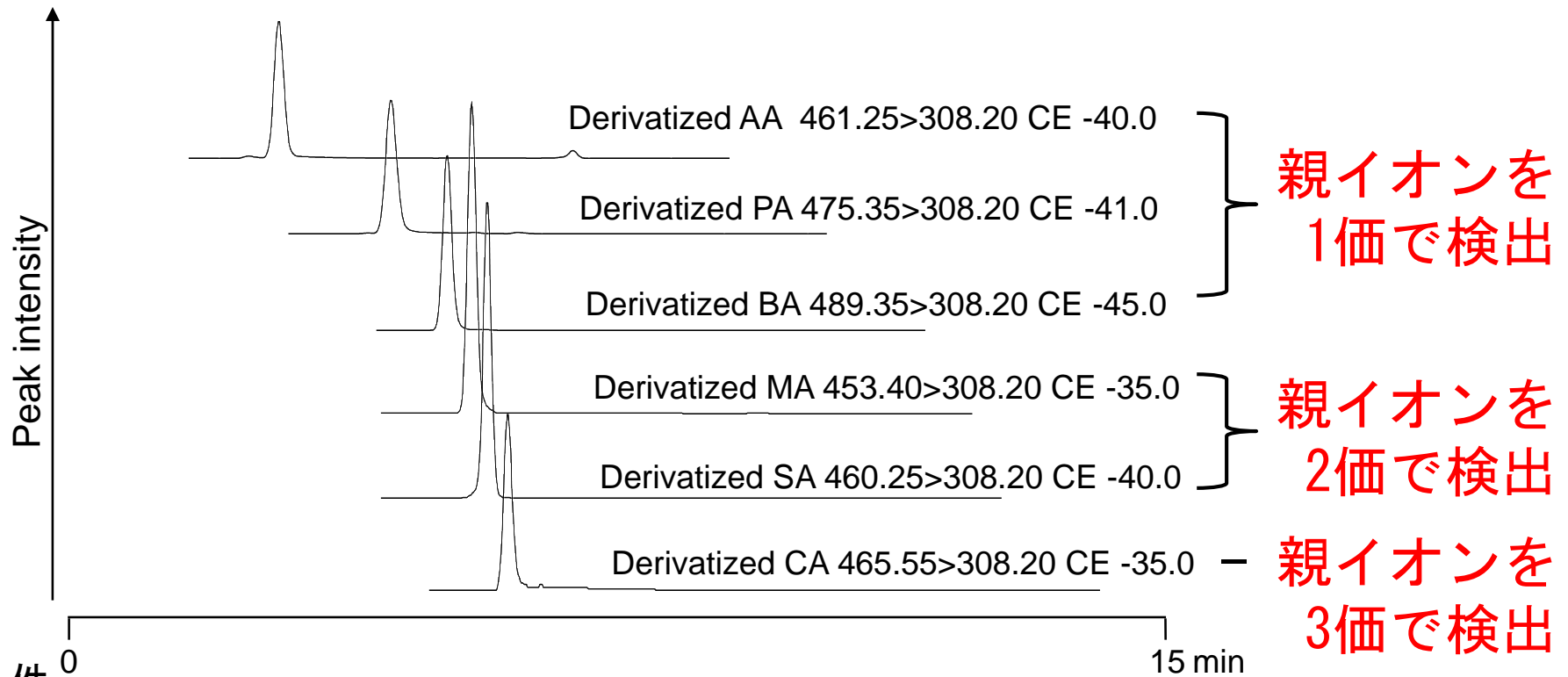
Sample	15 μ L
IS in 95% DMSO	5 μ L
4-Dimethylaminopyridine in DMSO	20 μ L
50 mM TPP-AEP in DMSO	50 μ L
100 mM DMT-MM ¹⁾ in 90% DMSO	50 μ L
Stand at 40 °C for 60 min	
5 mM Ammonium bicarbonate in 50% CH ₃ CN	200 μ L
Reaction mixture	
Inject into HPLC (5 μ L)	
Wash with 5 mM Ammonium bicarbonate in 50% CH ₃ CN	400 μ L
Elute with 200 mM Ammonium formate in 50% CH ₃ CN	150 μ L
Eluate	

必要に応じて、
過剰試薬の除去
を容易に行える

1) 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride

新技術の紹介

短鎖脂肪酸のSRMクロマトグラム



LC-MS条件

Column : XSelect™ CSH C18

(50 × 2.1 mm i.d., 2.5 μm, Waters)

Mobile phases : A 0.1% ギ酸(水溶液)

B 0.1% ギ酸(アセトニトリル溶液)

Flow rate : 0.2 mL/min

Gradient program : 1-5 min 20% B, 5-25 min 20%→80% B

25-30 min 20% B

Column temperature : 60°C

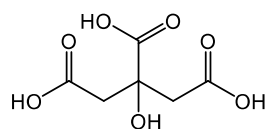
Mass spectrometer : LCMS-8050 triple quadrupole (Shimadzu)

Ionization : ESI (+)

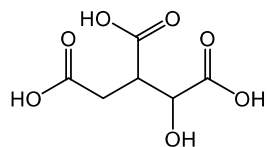
新技術の紹介

果実中ポリカルボン酸の分析

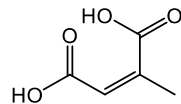
測定対象 (構造異性体or幾何異性体)



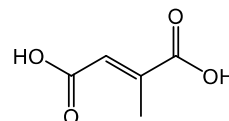
Citric acid



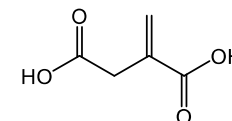
Isocitric acid



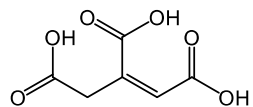
Citraconic acid



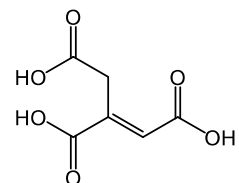
Mesaconic acid



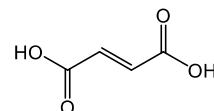
Itaconic acid



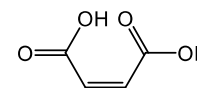
cis-Aconitic acid



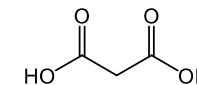
trans-Aconitic acid



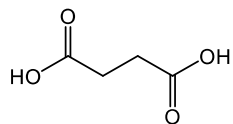
Maleic acid



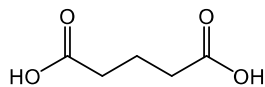
Fumaric acid



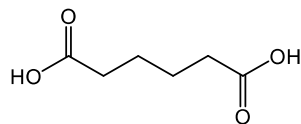
Malonic acid



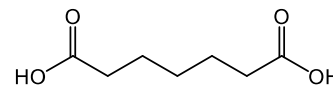
Succinic acid



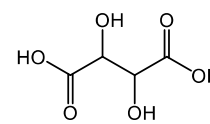
Glutaric acid



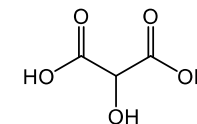
Adipic acid



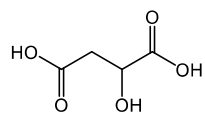
Pimelic acid



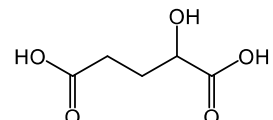
Tartaric acid



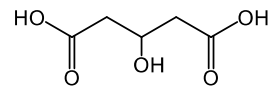
2-Hydroxymalonic acid



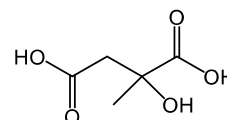
Malic acid



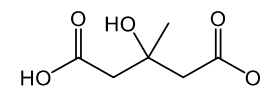
2-Hydroxyglutaric acid



3-Hydroxyglutaric acid



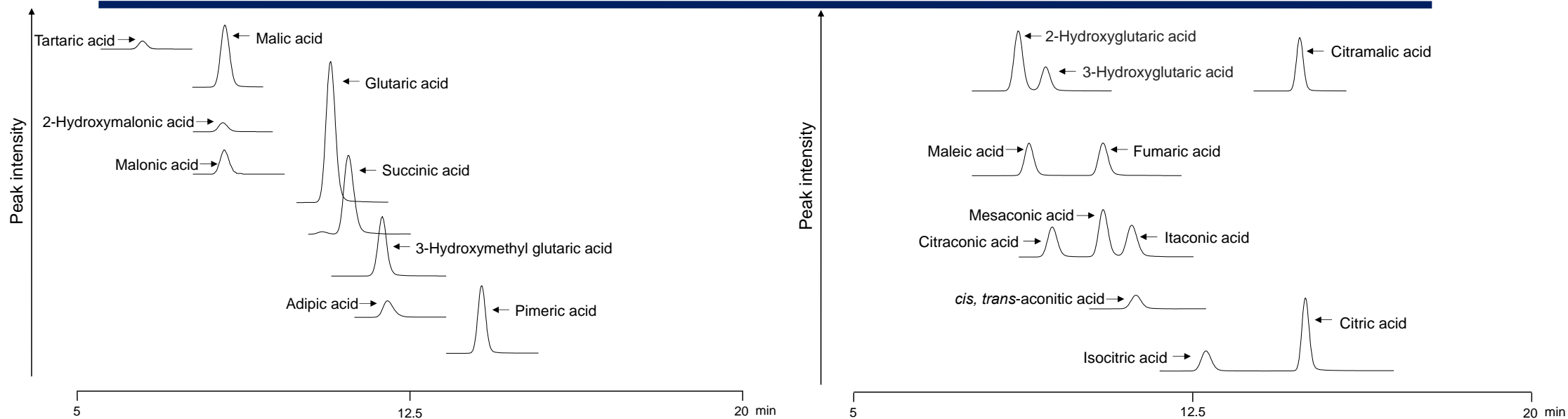
Citramalic acid



3-Hydroxy-3-methylglutaric acid

新技術の紹介

果実中ポリカルボン酸の分析



	Apple ^A	Apple ^B	Grape ^A	Grape ^B	Orange ^A	Orange ^B	Pine-apple ^A	Pine-apple ^B	Grape-fruit ^A	Grape-fruit ^B
Citric acid (mg/kg)	137	104	826	391	1990	2100	207	182	2260	2170
Isocitric acid (mg/kg)	20.4	15.7	133	60.3	287	352	419	496.3	837	552
Fumaric acid (mg/kg)	12.8	20.5	27.9	8.03	17.2	11.3	6.99	14.1	3.53	5.45
Maleic acid (mg/kg)	567	512	572	342	211	476	478	496	122	393
Aconitic acid (mg/kg)	31.5	27.1	140	63.7	557.3	543	548	537	551	570
Succinic acid (mg/kg)	3.70	38.7	16.6	177	73.7	46.3	26.2	23.2	12.3	128
Tartaric acid (mg/kg)	N.D.	N.D.	883	375	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.124	174
Malic acid (mg/kg)	853	798	712	577	465	771	764	789	389	563

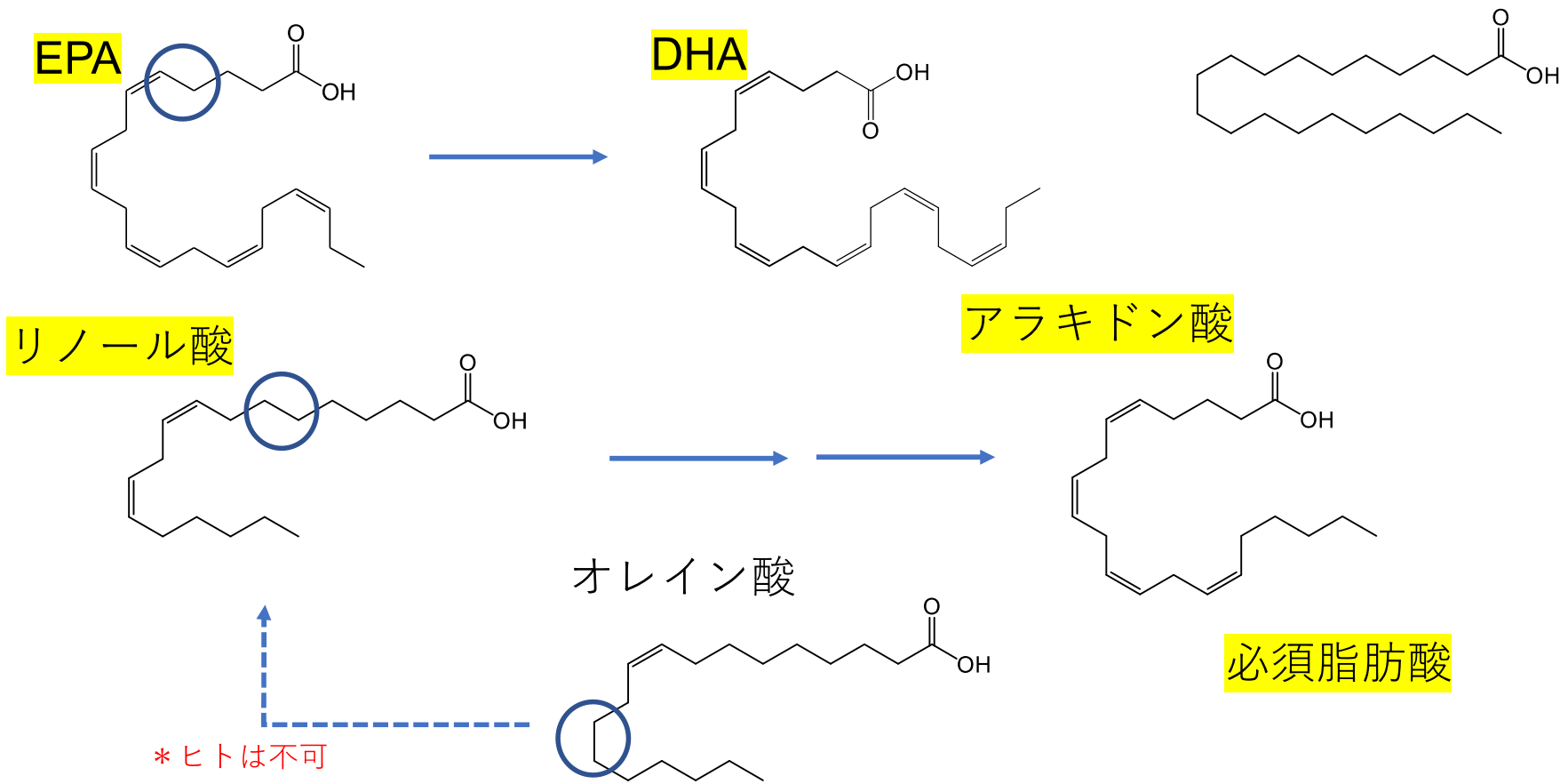
A : 搾りたて果汁
B : 市販濃縮還元飲料

川末ら, 第29回クロマトグラフィー
シンポジウム (2022年6月).

新技術の紹介

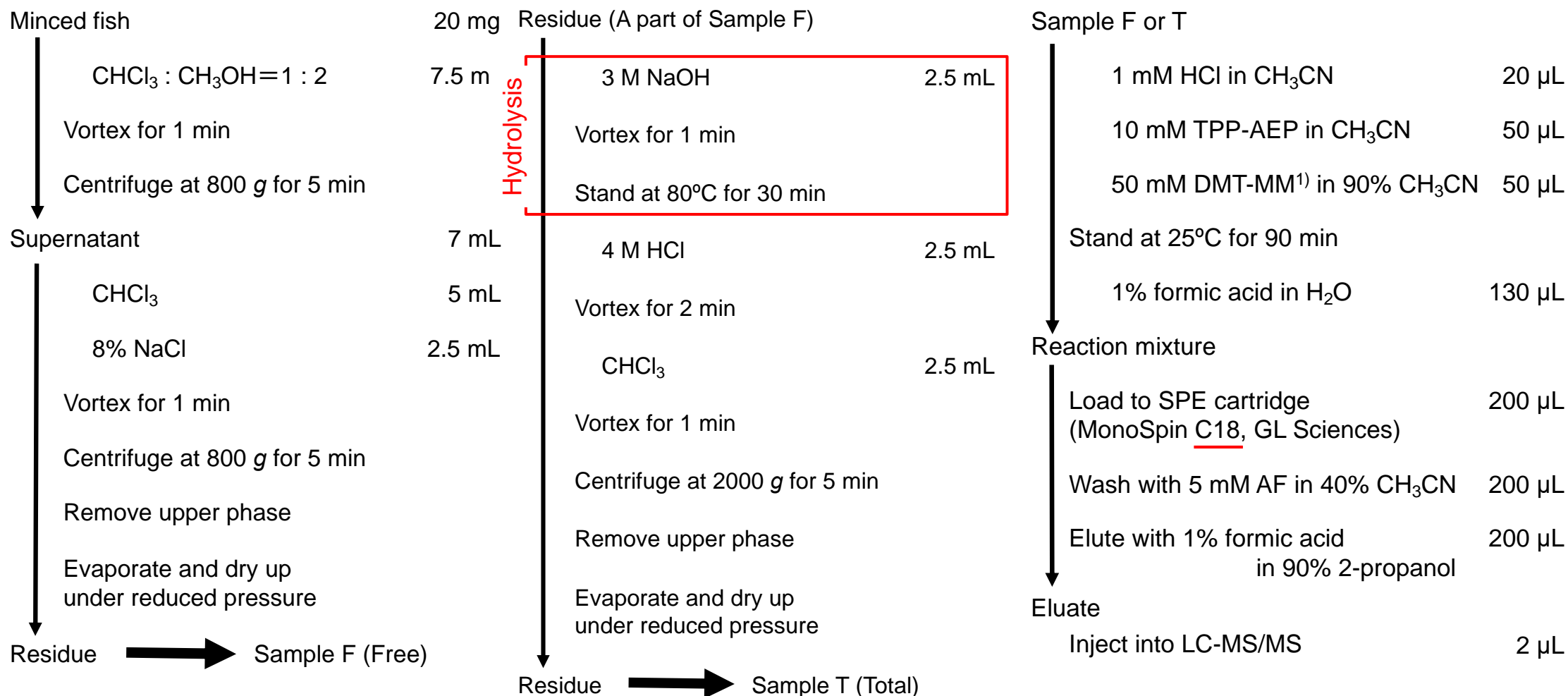
長鎖脂肪酸の分析

測定対象



新技術の紹介

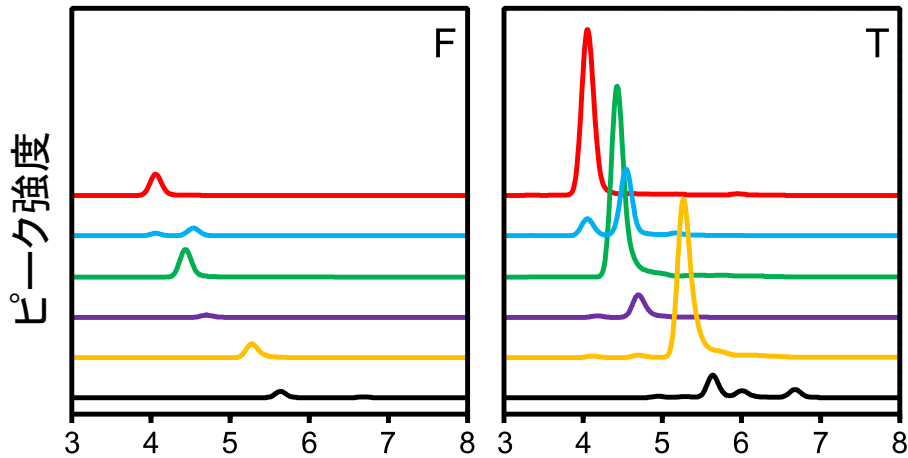
長鎖脂肪酸分析の前処理及び誘導体化



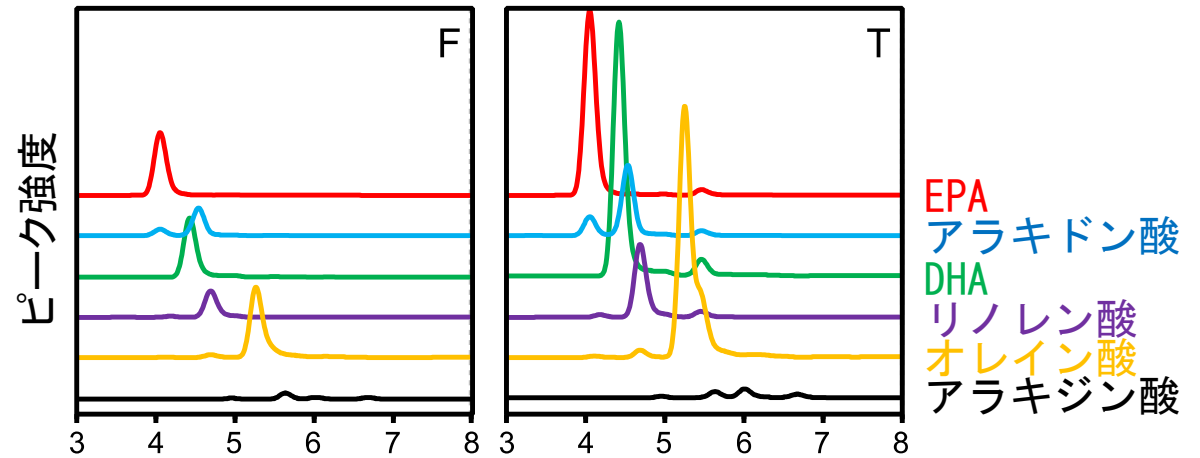
新技術の紹介

長鎖脂肪酸のSRMクロマトグラム

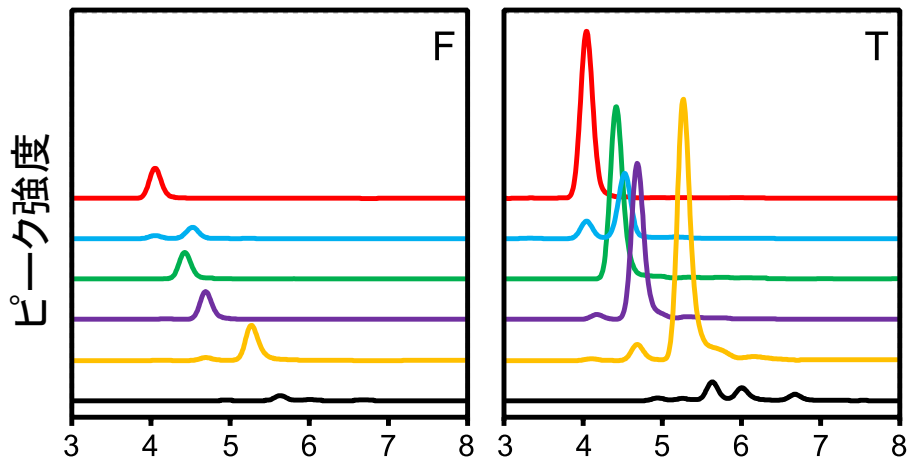
・ Horse mackerel (鰹)



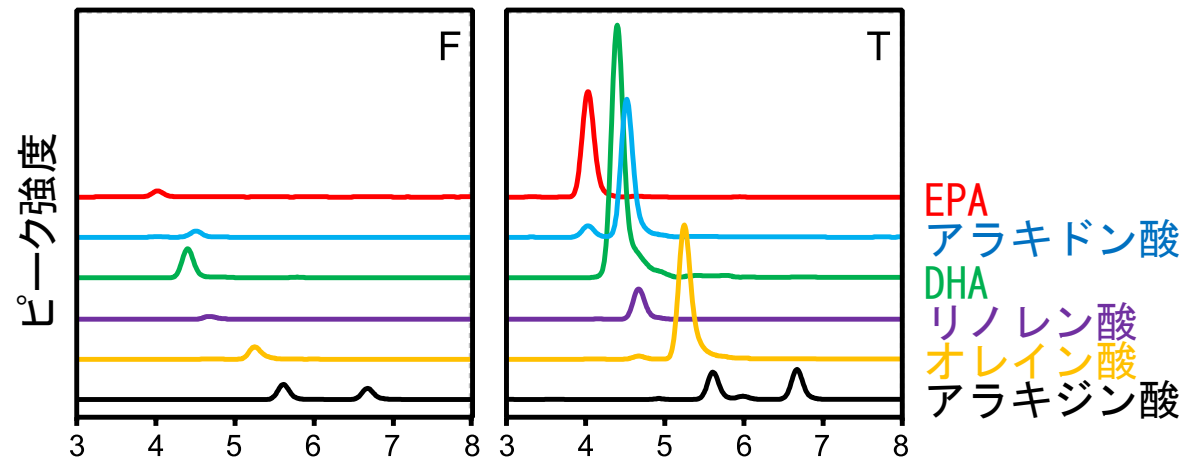
・ Amber jack (間八)



・ Red snapper (鯛)



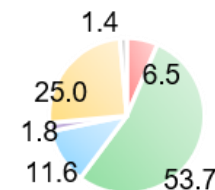
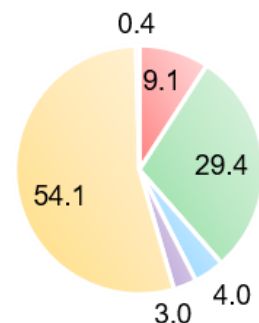
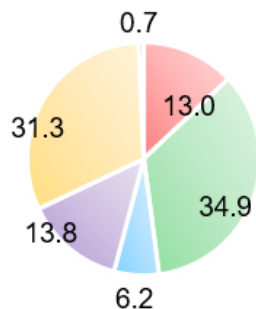
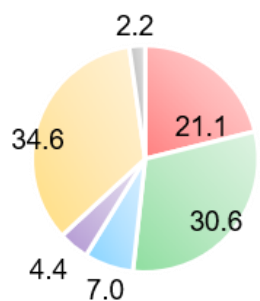
・ Tuna (鮪)



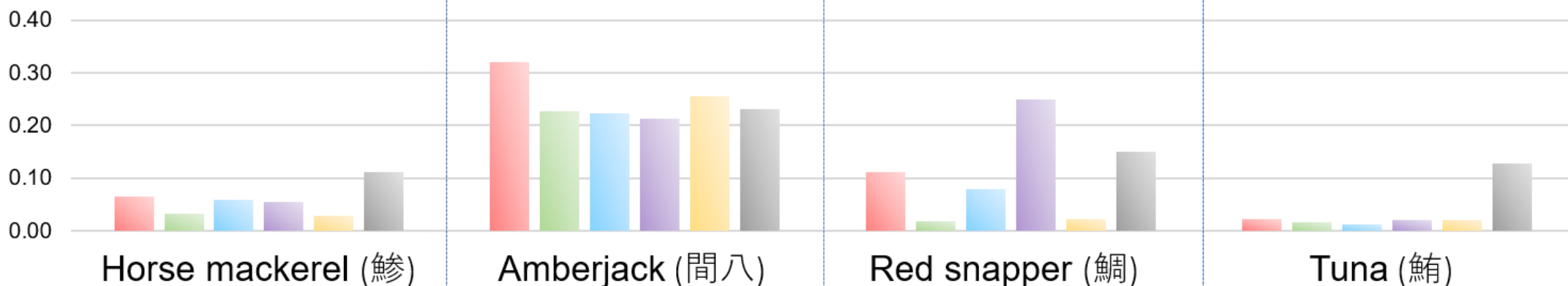
新技術の紹介

魚ミンチ中の脂肪酸

○脂肪酸構成比 総脂肪酸の定量結果をもとに算出



○F/T (遊離脂肪酸/総脂肪酸) 比



従来技術とその問題点(1)

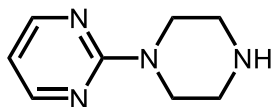
従来から普及しているカルボン酸類を対象としたLC-MS測定法の多くは、誘導体化を伴わないもので、

- ・ MSのネガティブイオン検出は感度不十分
- ・ 試料マトリクスに起因する精度の不備

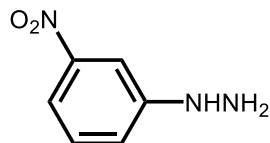
等の問題があり、内部標準物質を伴わない形でのLC-MSの定量結果に対して、絶対的な信頼性は得られていない。

従来技術とその問題点(2)

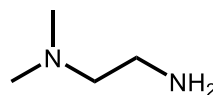
誘導体化LC-MS法によるカルボン酸類の分析も世界各地で試みられているが、「世界標準」となる試薬・方法はいまだ開発されていない。



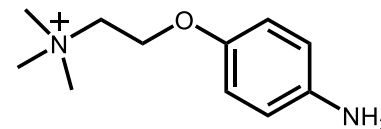
Anal. Biochem., **537** (2017) 26.
[日本]



Anal. Chem., **93** (2021) 10075.
[中国]



Anal. Chem., **90** (2018) 3512.
[中国]



Anal. Chem., **80** (2008) 9042.
[オランダ]

新技術の特徴・従来技術との比較

- 永久電荷構造誘導体化で**カルボン酸のポジティブイオン検出**が可能となり、**MS検出における感度向上**につながった。
- 誘導体化部位に**ピペリジン構造**を用いることで、**カルボン酸との反応性が改善**した。
- 誘導体化後の固相抽出で、**マトリクス効果の回避**に成功し、**分析精度が向上**した。
- 同概念に基づく**他の官能基を対象とした新規MS用誘導体化試薬**への展開が期待される。

想定される用途

- 食品中カルボン酸分析への適用
脂肪酸、有機酸 等 → 品質評価、食の安心安全
- 生体中カルボン酸分析への適用
TCA回路構成酸、アミノ酸 → 生体機能の解明
- カルボン酸系医薬品分析への適用
NSAIDs 等 → 血中濃度の把握・追跡
- 他の反応性官能基（アルコールやチオール等）
を対象とした永久電荷構造誘導体化試薬の開発

実用化に向けた課題

- 開発した試薬での**食品**（果実中の有機酸や魚類中の脂肪酸等）**及び生体成分**（代謝物等）の**分析例は検討済み**。医薬品分析へ展開中。
- 今後、対象をカルボキシ基に限定しない形での**複数のLC-MS用永久電荷構造誘導体化試薬**を新規に開発していく予定である。
- 多成分の網羅的計測への展開に向けて、複数の反応性官能基を対象とした**新規LC-MS用誘導体化試薬**を**合成・評価**する必要がある。

企業への期待

- まだ合成・調達できていない新規誘導体化試薬については、**企業との連携**で解決したい。
- **有機化合物の精密合成**や**高度な試薬精製の技術を持つ企業**との共同研究を希望している。
- **カルボン酸系化合物のLC-MS分析を実施中の企業**には、本技術の導入が有効と思われる。
- また、**LCを用いて各種成分を計測している企業**には、多方面での技術指導が可能と考える。

企業への貢献、PRポイント

- 本分析技術は有機酸や脂肪酸等の高感度・高精度計測を可能とするため、**食の安心安全に関係する企業**に貢献できると考えている。
- 新規試薬の合成を通して、実用的な**LC用誘導体化試薬の開発・評価、使用方法等**に関するノウハウを提供できる。
- 本格導入にあたっての技術指導や合成試薬の提供だけでなく、**LCが関連する広い分野での技術協力へ展開**できる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：質量分析用誘導体化試薬
- 出願番号：特願 2022-079047
- 出願人：学校法人 福岡大学
- 発明者：坂口 洋平、川末 慎葉、
古賀 鈴依子、吉田 秀幸、
能田 均

産学連携の経歴

- 2000年-2002年 製薬企業と共同研究*
- 2001年-2002年 (財)福岡県産業・科学振興財団
テーマ探索・シーズ発掘事業に採択
- 2004年-2004年 薬学研究奨励財団 研究助成金
- 2011年-2012年 JST A-STEP事業に採択
- 2012年-2013年 受託分析企業と共同研究*
- 2022年-2023年 福岡県立農業高校と共同研究*

* 共同研究は、研究室として実施

お問い合わせ先

福岡大学 研究推進部

産学官連携センター

〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

T E L 092-871-6631

e-mail sanchi@adm.fukuoka-u.ac.jp