

Pretreatment Procedure Handbook for Metabolites Analysis

メタボロミクス 前処理ハンドブック

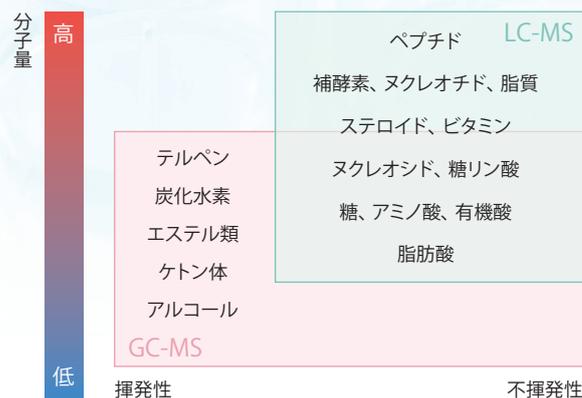
Metabolomics



メタボロミクスと質量分析計

定量メタボロミクス

サンプルに含まれる代謝物の総量の測定において、GC-MS、LC-MSが広く使われています。測定対象成分や目的に応じて、装置を使い分ける必要があります。



GC-MS



LC-MS

装置の特徴

GC-MS
1回の測定で数百成分を網羅的に測定可能
堅牢性に優れたスタンダードな測定法
導入コストが低い
網羅的測定のファーストチョイス

LC-MS
特定の代謝物 (~100成分) を簡便に測定可能
前処理を含め、短時間で測定可能
分子量が高く、不揮発性の代謝物も測定可能
特定成分を効率的にルーティン測定するのに最適

Contents

GC-MS分析における代謝物の抽出	
1. 必要備品一覧	P. 3
2. GC-MS分析用代謝物の抽出	P. 4
3. Smart Metabolites Databaseによる分析	P. 7

LC-MS分析における代謝物の抽出	
1. 必要備品一覧	P. 10
2. LC-MS分析用代謝物の抽出	P. 10
3. LC/MS/MS メソッドパッケージ 一次代謝物 Ver. 2 による分析	P. 13

GC-MS分析における代謝物の抽出

GC-MS分析における前処理では、最初にメタノール・水・クロロホルムの混合溶媒を試料に加え、除タンパクを行います。その後、水を添加して液層を2層に分け、水層を回収します。解糖系・TCA回路などの主要な代謝経路中で重要となる親水性の代謝物を多く抽出する方法です。

1. 必要備品一覧

■ 前処理用消耗品類

品目	製品例
1.5 mLチューブ	セイフロック 1.5 mL(カラーレス)
ピペット	ピペットマン P-100
ピペットチップ	200 µL目盛付PPラック(イエロー)
ピペット	ピペットマン P-1000
ピペットチップ	1000 µL目盛付システムラック(PP) ブルー
ピペット	ピペットマン P-20
コレクションプレート	UniRack S500-80AS
50 mLチューブ	遠心チューブ 50 mL
50 mLチューブスタンド	5410 4 way フリップパー 青
メスシリンダー(抽出溶媒調製用)	PYREX® メスシリンダー 1000 mL
メスシリンダー(抽出溶媒計量用)	PYREX® メスシリンダー 100 mL
抽出溶媒ストック用ビン	PYREX® メディウム遮光瓶 1000 mL

■ 試薬類

品目	備考
超純水	LC/MS測定用
メタノール	LC/MS測定用
クロロホルム	HPLC測定用
メトキシアミン塩酸塩	取り扱い: 東京化成工業、シグマアルドリッチジャパンなど
ピリジン	特級
N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド(MSTFA)	取り扱い: ジーエルサイエンスなど
ヘキササン	HPLC測定用
アセトン	HPLC測定用
内部標準物質*	2-イソプロピルリンゴ酸、リビトール、トロバ酸など

■ 機器類

機器	備考
ボルテックスミキサー	1.5 mLチューブを処理できるもの
加温振とう器	37°Cに温調可能で、1.5 mLチューブを処理できるもの
遠心機	1.5 mLチューブを処理でき、最大16000 Gの回転力を加えられるもの
遠心エバポレータ	1.5 mLチューブを処理できるもの
ディープフリーザー	-80°C以下に冷却可能なもの
凍結乾燥機	1.5 mLチューブを処理できるもの
デシケーター	真空機能は不要
ソニケーター	1.5 mLチューブを処理できるもの
電子天びん	最小目盛1 mg以下のもの

※ 内部標準物質は、以下のような条件を満たす化合物が推奨されます。

- ・サンプル中に存在していない
- ・再現性良く分析できる
- ・分子構造が対象化合物群に近い

食品や生体由来サンプルには2-イソプロピルリンゴ酸が含まれることは稀ですが、発酵品や細菌株などでは含まれる可能性があるため、リビトールやトロバ酸を使用します。リビトールの場合、近くに溶出する他の糖の影響を確認する必要があります。

■ 分析用消耗品類 島津ジーエルシーへご用命ください。

品目	推奨製品*
バイアル	1 Target スクリューバイアル(2 mL) (C4013-2) 2 クロマコール スクリューバイアル(2 mL) (2-SV(A))
キャップ セプタム	1 Target セプタム入りキャップ (C4013-63W) 2 ・バイアルキャップ (221-34273-92) ・バイアルセプタム (221-34271-92)
小容量ガラスインサート	1 Target 小容量ガラスインサート(150 µL) (GLC 4012-S530) 2 ・Inserts, 2 mL Tapered Insert – Clear 1000 pcs (02-MTV) ・Plastic 3 Prong Support Foot for Tapered Inserts 500 pcs (MTS-1)

※ バイアル、キャップ/セプタム、小容量ガラスインサートは、表中1または2のセットでご用意ください。

品目	推奨製品
洗浄液バイアル	バイアル 4 mL (221-34267-92)
洗浄液バイアルキャップ	バイアルキャップ 4 mL (221-34268-92)
洗浄液バイアルセプタム	バイアルセプタム 4 mL (221-34266-92)
n-アルカン混合標準品	Qualitative Retention Time Index Standard (Restek, 31080)
カラム	・BPX5 30 m × 0.25 mm I.D. df = 0.25 µm (SGE 054101) ・DB-5 30 m × 0.25 mm I.D. df = 1.00 µm (J&W 122-5033)

※ カラムはSmart Metabolites Databaseによる分析で使用されるものです。どちらか1点をご用意ください。

GCMS-TQシリーズを使用する場合 : BPX5推奨(分析時間23分)
GCMS-QP2020/2010シリーズを使用する場合 : DB-5推奨(分析時間37分または67分)
(BPX5では分析時間が短いため、GC-MSでは分離が不十分な場合があります。)

※ ガラスインサートは分析メソッドに応じて、スプリット用またはスプリットレス用をご使用ください。

2. GC-MS分析用代謝物の抽出(例:血清)



メタノール・水・クロロホルム混合溶媒を抽出溶媒とし、これを液体試料に加えて除タンパクを行い、水添加ののち水層を回収して主に親水性代謝物を抽出する方法です(*1)。

はじめに有機溶媒を含む溶液を血清に加えることで、タンパク質を変性させます。これを遠心・除去し、そこへ超純水を加え、溶け残ったタンパク質をさらに変性させて除去します。GC-MS分析ではタンパク質のような巨大分子は分析の妨げとなるため、タンパク除去操作は必ず行います。

遠心エバポレータでメタノールを気化させたのち、凍結乾燥により乾燥させます。遠心エバポレータを使うのは、メタノールが溶媒中に含まれると低温にしても溶媒が凍結せず、凍結乾燥機にかけられないためです。

凍結乾燥させた後、誘導体化を行います。GC-MS分析では気化した化合物のみ検出が可能のため、気化しにくい化合物に対しては必ず誘導体化が必要です。メトキシム化、TMS化の2段階の誘導体化を行います。

*1: Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for gastrointestinal cancer. (Ikeda A, Nishiumi S, Shinohara M, Yoshie T, Hatano N, Okuno T, Bamba T, Fukusaki E, Takenawa T, Azuma T, Yoshida M. *Biomed Chromatogr.* 2012 May; 26 (5):548-58. doi: 10.1002/bmc.1671. Epub 2011 Jul 20.)

1 除タンパク

1.5 mLチューブに血清を50 μ L取ります(図1)*。内部標準を用いる場合は内部標準をチューブ内に添加します。内部標準は安定して分析が可能で、サンプル内に存在しない物質を選択します。適当な濃度の水溶液を調製し(血清では、0.5 mg/mL程度の2-イソプロピルリンゴ酸)、10 μ L程度を添加します。

メタノール:水:クロロホルム=2.5:1:1の混合溶媒(抽出溶媒)をチューブ内に250 μ L加えます。タンパク質が変性し、チューブ内が白く濁ります(図2)。抽出溶媒はサンプル数に応じて事前に大量に調製しておき、常温で1 Lの試薬ビンなどにストックしておきます。なお、50 mLチューブなどに取った抽出溶媒と内部標準溶液をあらかじめ混合してから、抽出溶媒をチューブに導入することもできます。

これをボルテックスミキサーでよく混和し(図3)、加温振とう器で37°Cに保温し、30分間振とうします(回転数は1200 rpm程度)(図4)。

振とうが終了した後、4°C、16000 Gで3分間遠心します(図5)。溶液は2層に分離し、変性したタンパク質がその境界面に沈殿します(図6)。先端が、沈殿やクロロホルム層に触れないよう注意深くピペットチップをチューブ内に挿入し、上清のみを225 μ L取り、新しいチューブに回収します(図7)。

* サンプルに応じてサンプリング量を調整します。例えば、食品の中でも糖や脂肪酸が多いものでは、装置の汚染やピークの飽和が生じるため、サンプリング量を減らします。



図1



図2

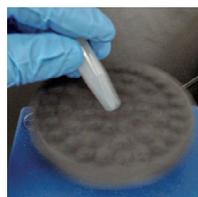


図3



図4



図5



図6



図7

2 親水性代謝物の抽出

上清を回収した新しいチューブに、超純水を200 μ L添加します。溶液中に残存しているタンパク質が変性し、溶液が白濁します(図8)。ボルテックスミキサーでよく混和し(図9)、4 $^{\circ}$ C、16000 Gで再び3分間遠心します。遠心後(図10)、上清を250 μ Lを取り、新しいチューブに回収します(図11)。



図8



図9



図10



図11

3 乾燥

穴の開いたチューブキャップを用意します。1.5 mLチューブのキャップに注射針などで小さな穴を2~3個開け、ハサミを使ってチューブから切り取ります(図12)。これを、上清を回収したチューブに取り付けます(図13)^{※1}。この状態で遠心エバポレータで25分間処理し、溶液中に含まれるメタノールを気化させます(図14)^{※2}。溶液中にメタノールが多く存在すると、低温にしても溶液が凍結しなくなるので、凍結乾燥機での処理ができなくなるためです。

25分間処理後、キャップはそのままにしてディープフリーザーに入れます。(低沸点成分が対象の場合は、液体窒素を使用します。)15分間ほど置き、溶液が完全に凍結していることを確認します。その後、凍結乾燥機で処理します(図15)。

なお、凍結乾燥後、すぐに続きの作業ができない場合は常温のデシケーター内で保存します。誘導体化の際に水を含むと、適切に誘導体化処理ができないためです。



図12



図13



図14



図15

※1 穴の開いたチューブキャップが用意できない場合は、穴無しのチューブキャップを使用してフタを開けた状態でエバポレータで気化させてください。

※2 最適な回転数や時間は使用されるエバポレータによって異なります。目視でメタノール分の溶液量が減少したことを確認します。

4 誘導体化

メトキシアミン塩酸塩を秤量します。秤量したメトキシアミン塩酸塩を、濃度が20 mg/mLになるようにピリジンに溶解します(図16)。メトキシアミンピリジン溶液は、1チューブにつき80 µL必要なので、試料数に合わせて必要量を調製します。

メトキシアミン塩酸塩は溶けにくいことがあるので、残滓が残っているように見える場合はソニケーター等で完全に溶解してください。

凍結乾燥後の試料のチューブ壁には白～黄白色の固体が付着しています(図17)。ここに20 mg/mLメトキシアミンピリジン溶液を80 µL加え(図18)、ソニケーターで残滓が分散するまで(20分程度)処理します(図19)。サンプルに水を含むと誘導体化効率が悪くなるので、水が混入しないよう十分に注意してください(キャップにパラフィルムを巻くなど)。

加温振とう器の温度を30℃に設定し、90分間処理します(回転数は1200 rpm程度)(図20)。

処理後、チューブにMSTFAを40 µL加え(図21)、加温振とう器の温度を37℃、に設定し、さらに30分間加温振とうします(回転数は1200 rpm程度)。

残滓が残っている場合は16000 Gで3分間遠心し(図22)、上清をGC-MSのバイアルに回収し、分析に供します(図23)。



図16



図17



図18



図19

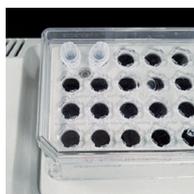


図20



図21



図22



図23

● 血清以外の代謝物の抽出

ここでは血清の前処理をご紹介しますが、メタボロミクスにおけるサンプルはもちろん血清だけではありません。血清・尿のような動物由来サンプル以外にも、植物、食品など、メタボロミクスのサンプルには幅広いバリエーションがあります。当プロトコルは、このようなさまざまなサンプルに応用が可能です。

一方、糖や脂肪酸を多く含むサンプルや酸化ステロール分析など、サンプルや分析目的に応じてより有効な前処理を探索することが必要な場合もあります。弊社では、さまざまな場合に応じて前処理を行ったアプリケーションをご用意しています。弊社HPをご参照いただくか担当営業までお問い合わせください。

培養細胞からの代謝物の抽出

アプリケーションデータシート No.102

「GC-MS/MSによるヒトES細胞解糖系代謝物の分析」
(LAAN-J-MS102A)

ビール中の代謝成分の測定

アプリケーションニュース No.M280

「ビール中代謝成分の網羅測定による品質評価法の検討」
(LAAN-A-LM5063A)

ラット尿のウレアーゼ処理直接乾燥法

アプリケーションデータシート No.60

「GC-MS/MSによるスキャン/MRMを用いたラット尿中の代謝物分析(1)」
(LAAN-J-MS060)

植物試料中の一次代謝物の測定

テクニカルレポート

「GC/MS/MSを用いた植物試料中の代謝物一斉分析」
(C146-0356)

3. Smart Metabolites Database™による分析

分析は、GCMS-TQシリーズおよびSmart Metabolites Databaseを用いて行いました。

Smart Metabolites Databaseには、GC条件や各化合物に対する最適なスキャンおよびMRMの測定パラメータがメソッドに予め登録されています。また、保持時間を予測計算するための保持指標も登録されており、代謝物の標準試料がなくても分析を開始できます。

また、データベースに登録されている化合物から測定したい化合物を選択するだけで、スキャン、SIM、MRMおよびそれらの複合モードの測定メソッドとデータ解析メソッドを自動で作成できます。

今回は上記の抽出を行った血清サンプルを、それぞれスキャン、MRMの両メソッドで分析しました。各分析における測定条件と測定結果の一部を示します。

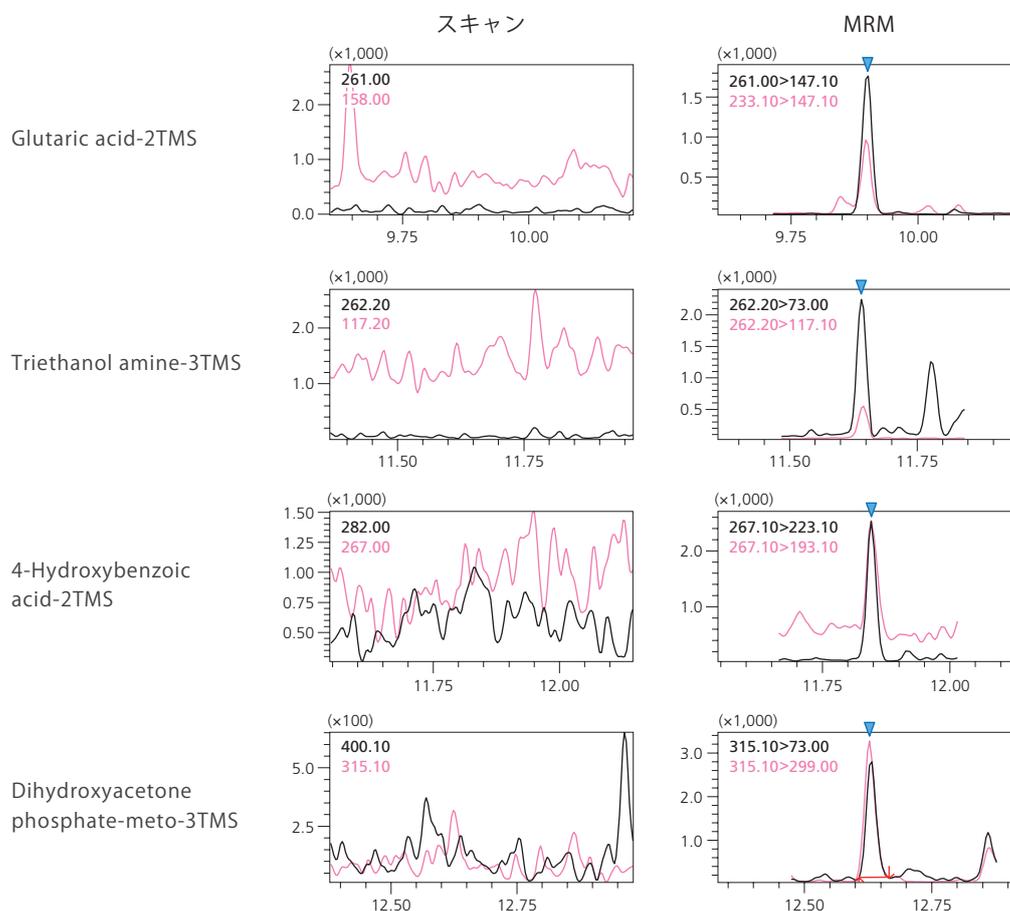
■測定条件

GC条件	
カラム	BPX5 (30 m × 0.25 mm I.D., df = 0.25 μm)
インサート	スプリットインサートウール入り
気化室温度	250°C
オープン温度	60°C (2 min) → (15°C/min) → 330°C (3 min)
注入モード	スプリット (30:1)
キャリアガス制御	線速度 (39.0 cm/sec)
注入量	1 μL

MS条件	
インターフェイス温度	280°C
イオン源温度	200°C
測定モード	スキャン、MRM
イベント時間	0.3 sec

■測定結果 — スキャンとMRMのクロマトグラム比較

メタボロミクスにおけるサンプルでは夾雑成分が多いため、MRMによる分析が有効です。抽出溶媒による前処理を施した血清サンプルを、それぞれスキャンモード、MRMモードで測定した時のクロマトグラムの比較を下記に示します。多くの化合物で、MRMモードにおけるピーク形状や感度が良くなる傾向が見られます。



メタボロミクス前処理FAQ

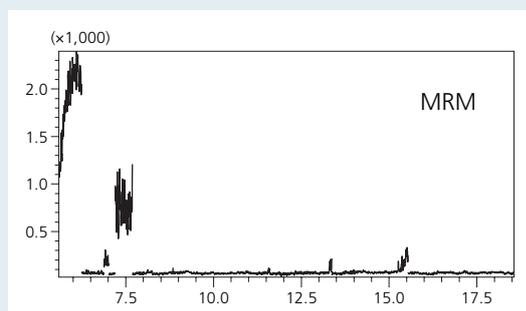
Q1 誘導体化が完了後の最終溶液は、どのように保管すればよいですか？

A1 TMS誘導体化は一般的にあまり安定ではないので、できれば長期保管はせず、**誘導体化後24時間をめどに分析して廃棄するのが理想的です。**

この間の保管に関しては、結露を避けるため常温での保管を推奨しています。

Q2 TMS 誘導体化をしたのですが、ピークがまったく出ません…どうして？

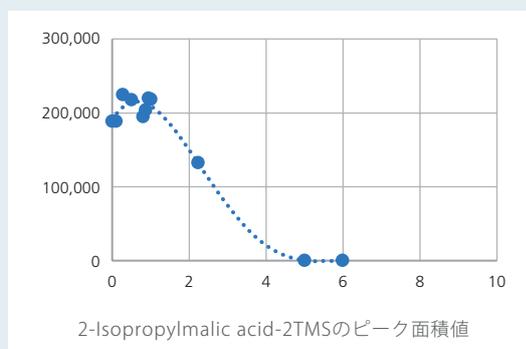
A2 「ピークがまったく出ない」という場合は、乾燥から誘導体化までの作業のどこかで、水が混入している可能性が高いです。乾燥が十分行われているか（凍結乾燥機、濃縮遠心機であればひと晩以上）、乾燥後にon iceなどサンプルを冷やす操作をしていないか（結露による水が混入する可能性がある）、などご確認ください。



Q3 TMS 誘導体化してピークはきちんと出ていますが、水分が混入してしまって全体的にピーク面積値が小さくなっている可能性はないですか？

A3 水分が混入してしまったサンプルは「ピーク面積値が低くなる」というよりは「ピークが出ない」となることが多いです。

弊社の実験では右のように、最終サンプル溶液中の水分含有量 0~1%までは面積値はほぼ変わらず、一方5%以上になると面積値がゼロになっています。つまり、「水分混入によりピーク面積値が低い」という現象が発生するのは水分含有量が1~5%の間のみ、混入量としては約1~6 μL の間で、それ以上でもそれ以下でも発生しません。現実的には、TMS誘導体化の成否は、「ピークが出ていれば成功」「ピークが出ていないのであれば失敗」の2パターンであると考えても問題ないことが多いです。



Q4 アミノ酸の再現性が他と比べて悪い。どうしたらよい？

A4 アミノ酸は、サンプルのマトリクスによっては他の化合物に比べて再現性が悪くなることがしばしばあります。MRM分析で、同一バイアルからの連続インジェクションでもCV値が10%を超えることもあります。

どうしても気になるということであれば、内部標準物質として個々のアミノ酸の安定同位体を使用されると劇的に改善します（~5%程度になります）。

トリプル四重極 ガスクロマトグラフ質量分析計

GCMS-TQ8040 NX

日常の分析を飛躍させるSmart性能

高感度での多成分一斉分析を可能にするSmart Performance、徹底した効率化による優れた生産性を実現するSmart Productivity、簡便なメソッド作成と解析をサポートするSmart Operation。3つのSmart技術の融合により、さまざまな分野でハイパフォーマンスを発揮する万能型トリプル四重極GC-MSです。



トリプル四重極 ガスクロマトグラフ質量分析計

GCMS-TQ8050 NX

新たな領域を切り拓く
超高感度トリプル四重極GC-MS

GCMS-TQ8050 NXは、新たな高効率検出器と3つのノイズ低減技術を搭載し、これまで到達できなかったフェムトグラムオーダーでの極微量の定量分析が可能になりました。

また、その圧倒的な超高感度を活かして、長期利用でのメンテナンス頻度・コストの削減や高質量分解能による更なるきょう雑物との高分離といった新たな領域の定量分析を提案します。



ガスクロマトグラフ質量分析計

GCMS-QP2020 NX

ラボの可能性を最大限に広げる
Smartソリューション

さまざまな分野で利用されるGC-MSは、今や分析の汎用機となっています。その中で、装置のさらなるコストパフォーマンスの向上と、利用するユーザーのワークライフバランスが期待されています。GCMS-QP2020 NXは、分析のあらゆる場面に対しての効率化を提案し、ラボの可能性を最大限に広げます。



LC-MS分析における代謝物の抽出

LC-MS分析における、メタノール・水・クロロホルムの抽出溶媒を用いた抽出をご紹介します。LC-MS分析では、ラインの詰まりが分析の妨げとなるのを避けるため、抽出後にさらにサイズ排除ろ過を行っています。

1. 必要備品一覧

■ 前処理用消耗品類

品目	製品例
1.5 mLチューブ	セイフロック 1.5 mL(カラーレス)
ピペット	ピペットマン P-100
ピペットチップ	200 µL目盛付PPラック(イエロー)
ピペット	ピペットマン P-1000
ピペットチップ	1000 µL目盛付システムラック(PP)ブルー
ピペット	ピペットマン P-20
コレクションプレート	UniRack S500-80AS
50 mLチューブ	遠心チューブ 50 mL
50 mLチューブスタンド	5410 4 way フリップパー 青
固相抽出カートリッジ	遠心式フィルター 0.5 mL - 3K
メスシリンダー(抽出溶媒調製用)	PYREX® メスシリンダー 1000 mL
メスシリンダー(抽出溶媒計量用)	PYREX® メスシリンダー 100 mL
抽出溶媒ストックビン/移動相ビン	PYREX® メディウム遮光瓶 1000 mL

■ 試薬類

品目	備考
超純水	LC/MS測定用
メタノール	LC/MS測定用
クロロホルム	HPLC測定用
ギ酸	LC/MS測定用
酢酸	LC/MS測定用
トリブチルアミン	LC/MS測定用
内部標準物質	L-メチオニンスルホン、 2-モノフルオロエタンスルホン酸(MES)など

■ 機器類

機器	備考
ボルテックスミキサー	1.5 mLチューブを処理できるもの
加温振とう器	37℃に温調可能で、1.5 mLチューブを処理できるもの
遠心機	1.5 mLチューブを処理でき、 最大16000 Gの回転力を加えられるもの
遠心エバポレータ	1.5 mLチューブを処理できるもの
ディープフリーザー	-80℃以下に冷却可能なもの
凍結乾燥機	1.5 mLチューブを処理できるもの
電子天びん	最小目盛1 mg以下のもの

■ 分析用消耗品類

島津ジーエルシーへご用命ください。

品目	製品例
バイアル	300 µL試料瓶(228-16850-91)
キャップ	キャップ 黒(228-15653-91)
セブタム	セブタム シリコンゴム(221-26718-93)
バイアルスぺーサ	スぺーサ 300 µL(228-16873-91)
カラム	Discovery™ HS F5 HPLCカラム 2.1 mm I.D. × 150 mm L, 3 µm (Sigma-Aldrich 567503-U)

※ 分析例では、LCMS-8040およびLC/MS/MSメソッドパッケージ 1次代謝物 Ver. 2のPFPPメソッドを使用しています。

2. LC-MS分析用代謝物の抽出(例:血清)

1 除タンパク	<ul style="list-style-type: none"> 血清をチューブに採取 抽出溶媒を添加して振とう 遠心/上清回収
2 代謝物の抽出	<ul style="list-style-type: none"> 超純水添加、混和 遠心/上清回収 サイズ排除フィルタリング
3 乾燥	<ul style="list-style-type: none"> 遠心エバポレータ(メタノールを揮発) 凍結乾燥
4 再溶解	<ul style="list-style-type: none"> 超純水に再溶解してバイアルに移す

除タンパク操作はGC-MS分析時と同様です。はじめに超純メタノール・水・クロロホルムの混合溶媒(抽出溶媒)を血清に加えることで、タンパク質を変性させて除去します^(※2)。

次に上清に超純水を加えて溶液を2層に分離させます。これを遠心して上層を回収することで、親水性の代謝物が抽出されます。

LC-MS分析では、分析中に試料が高濃度の有機溶媒環境にさらされます。これにより分析中に除去しきれなかったタンパク質が析出すると、ラインを閉塞させる原因となり分析がストップしてしまいます。これを避けるため、ここでは抽出後にサイズ排除フィルターを用いて再度タンパク質を除去する操作を行っています。

その後、凍結のため遠心エバポレータでメタノールを気化させ、凍結乾燥します。そのままディープフリーザーで保存も可能です。分析前に超純水に再溶解し、分析にかけます。

※2: Development of a practical metabolite identification technique for non-targeted metabolomics. Ogura T, Bamba T, Fukusaki E. *J Chromatogr A*. 2013 Aug 2;2301:73-9. doi: 10.1016/j.chroma.2013.05.054. Epub 2013 May 29

1 除タンパク

1.5 mLチューブに血清を50 μ L取ります(図24)*。内部標準を用いる場合は内部標準をサンプルチューブ内に添加します。内部標準は安定して分析が可能で、サンプル内に存在しない物質を選択します。適当な濃度の水溶液を調製し(血清では、0.5 mg/mL程度のL-メチオニンスルホンもしくは2-メルホリノエタンスルホン酸(MES))、10 μ L程度を添加します。



図24



図25

メタノール:水:クロロホルム=2.5:1:1の混合溶媒(抽出溶媒)をチューブ内に900 μ L加えます。タンパク質が変性し、チューブ内が白く濁ります(図25)。抽出溶媒はサンプル数に応じて事前に大量に調製しておき、常温で1 Lの試薬ビンなどにストックしておきます。なお、50 mLチューブに取った抽出溶媒と内部標準溶液をあらかじめ混合してから、抽出溶媒をチューブに導入することもできます。



図26



図27

これをボルテックスミキサーでよく混和し(図26)、加温振とう器で37℃に保温し、30分間振とうします(回転数は1200 rpm程度)(図27)。



図28



図29



図30

振とうが終了した後、4℃、16000 Gで3分間遠心します(図28)。チューブ底に変性したタンパク質が沈殿します(図29)。先端が沈殿やクロロホルム層に触れないよう注意深くピペットチップをチューブ内に挿入し、上清のみを630 μ L取り、新しいチューブに回収します(図30)。

* サンプルに応じてサンプリング量を調整します。例えば、食品の中でも糖や脂肪酸が多いものでは、装置の汚染やピークの飽和が生じるため、サンプリング量を減らします。

2 親水性代謝物の抽出

上清を回収した新しいチューブに、超純水を280 μ L添加します。残存しているタンパク質が変性し、溶液が白濁します(図31)。ボルテックスミキサーでよく混和し、4℃、16000 Gで再び3分間遠心します。溶液は上層の水/メタノール層と下層のクロロホルム/メタノール層に分離し、その境界面に变性物が沈殿します(図32)。



図31



図32

タンパク質除去用のサイズ排除フィルターを付属のチューブにセットします(図33)。フィルターの上に上清500 μ Lを添加し、キャップを閉めます。遠心機にセットし、4℃、16000 Gで60分間遠心します(図34)。遠心後、フィルターをチューブから取り外します。



図33



図34

● 組織片からの抽出

ここではヒト血清という液体試料を用いていますが、組織片試料からの代謝物抽出も可能です。組織片の場合、5~10 mgを2.0 mLチューブに取り、同様に抽出溶媒を添加します。その後、チューブ内にボールミル用のボールを入れ、サンプル破碎を行います。十分に破碎した後は加温振とうから始め、そのあとは液体試料と同様に操作します。



3 乾燥

穴の開いたチューブキャップを用意します。1.5 mLチューブのキャップに注射針などで小さな穴を2~3個開け、ハサミを使ってチューブから切り取ります(図35)。これを、上清を回収したチューブに取り付けます(図36)。この状態で遠心エバポレータで25分間処理し、溶液中に含まれるメタノールを気化させます(図37)。

GC-MS分析時と同様、凍結乾燥機にかける前に溶液を確実に凍結させるための操作です。

25分間処理後、キャップはそのままにしてディープフリーザーに入れます。15分間ほど置き、溶液が完全に凍結していることを確認した後、凍結乾燥機で処理します(図38)。

なお、すぐに続きの作業ができない場合は、乾燥後のサンプルをディープフリーザー内で保存します。



図35



図36



図37



図38

4 再溶解

凍結乾燥後のチューブに超純水100 μ Lを添加し(図39)、ボルテックスミキサーでよく攪拌します。バイアルに分注し(図40)、LC-MSで分析します。



図39



図40

● LC-MSのアプリケーション情報

弊社HPでは、LC-MSメタボロミクス関連のアプリケーションをご紹介します。
参考としてお役立てください。

マウス組織からの代謝物の抽出

アプリケーションデータシート No. 49
「PFPP: Penfluorophenylpropylカラムを用いた一次代謝物97成分の一斉分析」
(LAAN-J-LM018)

アプリケーションデータシート No. 42
「トリプル四重極型LC/MS/MSを用いた親水性代謝物の一斉分析」
(LAAN-J-LM011)

酵母からの代謝成分の抽出

テクニカルレポート
「イオンペアクロマトグラフィーを用いたLC/MS/MSによる親水性代謝物の定量分析」
(C146-2099)

大腸菌からの代謝成分の抽出

アプリケーションニュース No. C131
「微生物育種へのメタボロミクス応用」
(LAAN-A-LM103A)

細胞培養に用いた培地上清からの代謝成分の抽出

アプリケーションニュース No. C186
「四重極飛行時間型質量分析計LCMS-9030を用いた網羅的細胞培養プロファイリング」
(LAAN-A-LM158A)

糞便からの代謝成分の抽出

アプリケーションニュース No. C201
「LC/MS/MSによるニホンライチョウ糞便のメタボローム解析～絶滅危惧種の飼育技術確立への応用～」
(LAAN-A-LM173)

3. LC/MS/MSメソッドパッケージ 一次代謝物 Ver. 2による分析

分析は、LCMS-8040およびLC/MS/MSメソッドパッケージ 一次代謝物 Ver. 2を用いて行いました。

LC/MS/MSメソッドパッケージ 一次代謝物 Ver. 2を使用することで、分離条件の検討や各化合物に対するMSパラメータの最適化などの煩雑な作業を実施することなく分析をはじめることができるため、多成分一斉分析業務を効率よく進めることができます。

イオンペア試薬を用いたアミノ酸・ヌクレオチドの一斉分析メソッド(55成分)とアミノ酸・有機酸・塩基などを対象とした

PFPPメソッド(97成分)が含まれており、分析対象・装置環境に合わせて一次代謝物の多成分一斉分析ができます。測定可能な化合物の一覧は、弊社LC-MSアプリケーションデータシートNo. 42 (LAAN-J-LM011) およびNo. 49 (LAAN-J-LM018)をご参照ください。

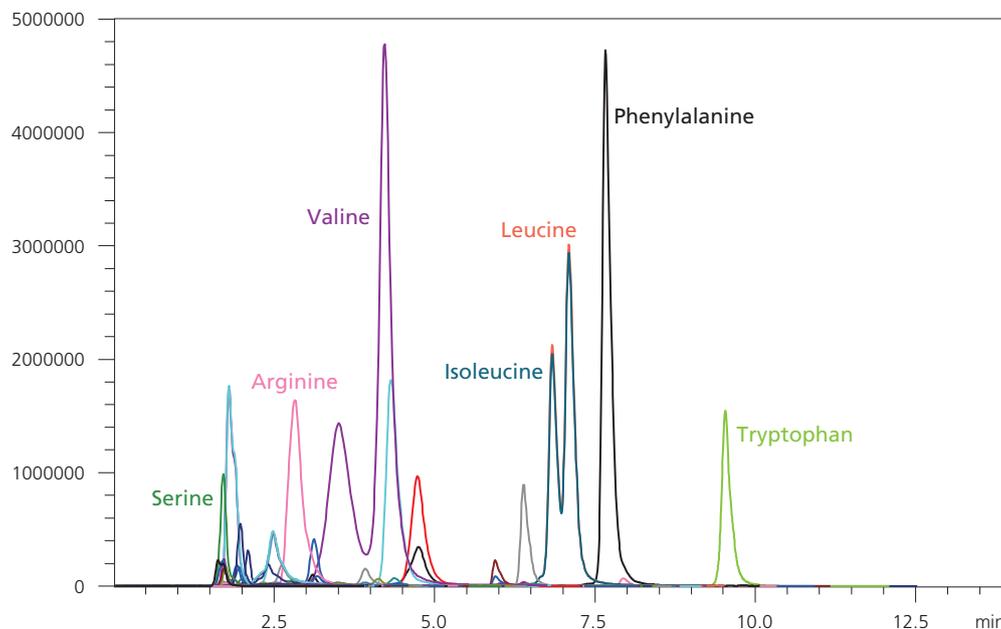
今回は上記のとおり処理したヒト血清を、PFPPカラムを使用したメソッドで分析を行いました。測定条件と、分析の結果得られたクロマトグラムの一部を示します。

■測定条件

HPLC条件	
カラム	Discovery™ HS F5-3 (2.0 mm I.D. × 150 mm L, 3 μm)
移動相A	0.1% ぎ酸/水
移動相B	0.1% ぎ酸/アセトニトリル
タイムプログラム	0%B (0–2.0 min) → 25%B (5.0 min) → 35%B (11.0 min) → 95%B (15.0–20.0 min) → 0%B (20.1–25.0 min)
流速	0.25 mL/min
注入量	5 μL
オープン温度	40°C

MS条件	
イオン化法	ESI (Positive / Negative)
ネブライザガス流量	2.0 L/min
ドライイングガス流量	15.0 L/min
DL温度	250°C
ヒートブロック温度	400°C

■測定結果 — MRMクロマトグラムの重ね描き



● イオンペア試薬メソッドについて

先述のとおり、LC/MS/MSメソッドパッケージ 一次代謝物Ver. 2には、PFPPカラムを用いるメソッドのほかに、イオンペア試薬を用いるメソッドが含まれています。こちらのメソッドでは糖リン酸やヌクレオチドといった親水性化合物が分析可能で、組織を破碎したサンプルの分析などに最適です。

HPLC条件	
カラム	Mastro™ C18 (2.0 mm I.D. × 150 mm L, 3 μm)
移動相A	15 mmol/L 酢酸 10 mmol/L TBA (トリブチルアミン)
移動相B	メタノール
タイムプログラム	0%B (0 – 0.5 min) → 25%B (8.0 min) → 98%B (12.0 – 15.0 min) → 0%B (15.1 – 20.0 min)
流速	0.3 mL/min
オープン温度	40°C

MS条件	
イオン化法	ESI (Positive / Negative)
ネブライザガス流量	2.0 L/min
ドライイングガス流量	15.0 L/min
DL温度	250°C
ヒートブロック温度	400°C

LabSolutions Insight™向け 波形処理オプションソフトウェア

Peakintelligence™ Ver. 2

従来のピーク検出アルゴリズムでは、多様なデータの品質や性質に応じて、検出パラメータをその都度最適化する必要がありました。それでも正しくピーク検出されない場合が多く、手作業による修正に大きな負担を要していました。

Peakintelligenceは、クロマトグラムのピーク検出をAIがアシストします。熟練作業者が行った波形処理をAIに学習させており、その熟練者と同レベルの解析を実現できます。従来のアルゴリズムとは異なり、事前のパラメータ調整は不要です。



Point 1

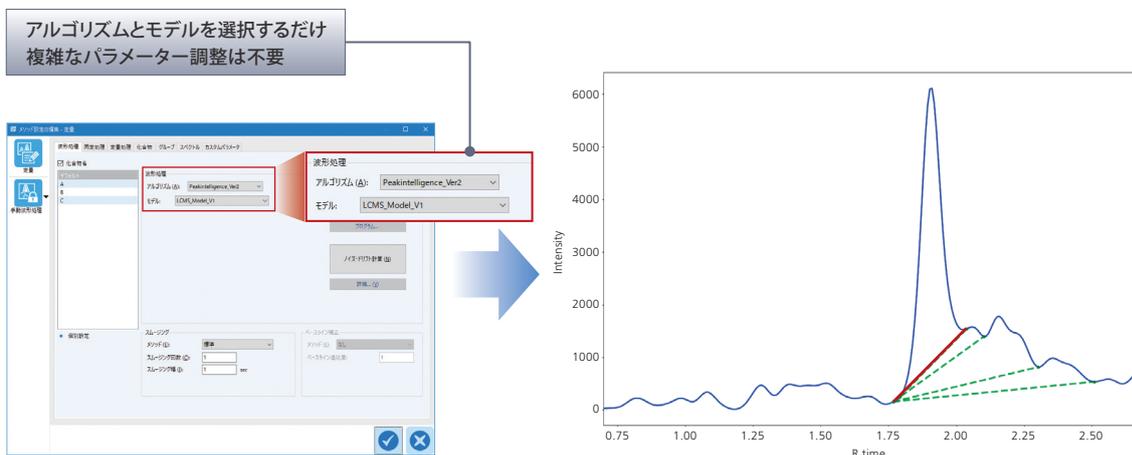
パラメータフリーで波形処理

Point 2

従来のアルゴリズムでは難しかった
クロマトグラムの解析が可能

Point 3

データ処理時間の短縮と
対象データの拡大



四重極飛行時間型 高速液体クロマトグラフ質量分析計

LCMS-9030

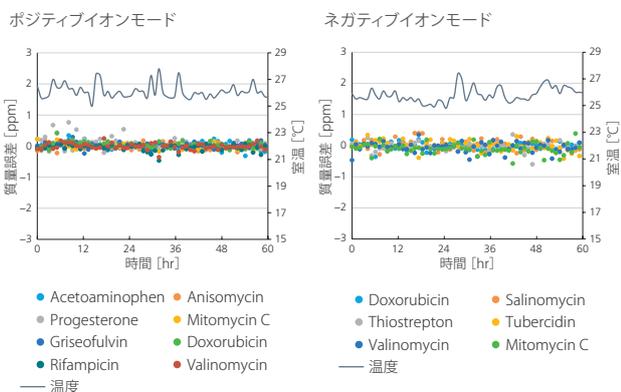
LCMS-8000シリーズで培われた技術と島津TOFの新技術が融合して誕生した「Q-TOF型質量分析計」です。

シンプルな操作だけで、精度、感度、分解能を兼ね備えた納得のデータが容易に得られます。



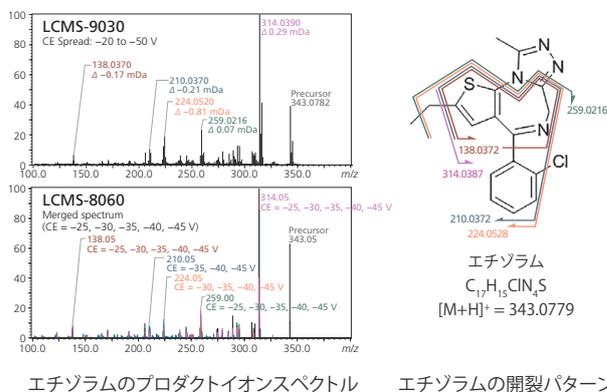
高精度温度コントロールシステムにより 質量精度が安定

HRAM: High Resolution Accurate Mass Spectrometer (高分解能精密質量分析装置)は、実験環境における室温変動が分析に与える影響を抑え、高い質量精度での分析を実現させます。



LCMS-8060のDNAを引き継いだスペクトルパターン

LCMS-9030はLCMS-8060と同様のHeated ESIを採用しているため、LCMS-8060で使用しているコリジョンエネルギーやイオン化部の温度などのパラメータと共通のものをLCMS-9030で使用することができます。



謝辞: 本分析は名古屋大学大学院医学系研究科 法医・生命倫理学 財津 桂 准教授のご協力のもと行いました。

●メタボロミクスにおけるターゲット法とノンターゲット法の融合

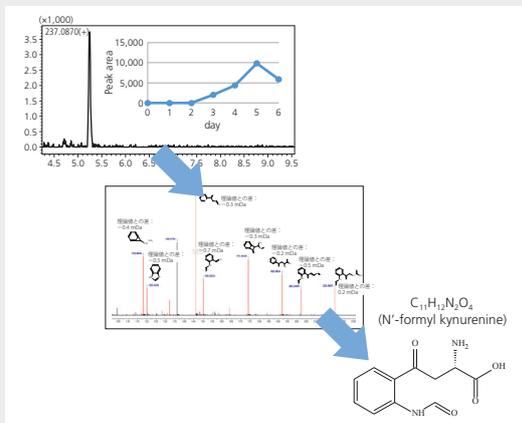
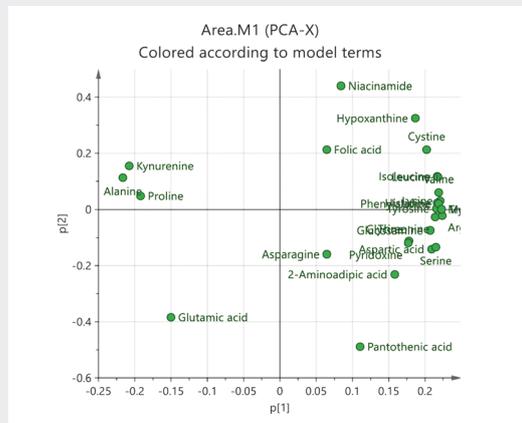
Q-TOFでは一般的なスキャン分析と同時に多数のSIMの設定が可能です。これにより、一度の分析で網羅的なノンターゲットフルスキャン分析とともに、ターゲットSIMを実施することができます。

SIMによるターゲット分析

所定のメソッドパッケージに登録されているSIMの化合物をターゲットとして測定し、専用ソフトウェアと組み合わせることにより網羅的な解析が可能です。

フルスキャンによるノンターゲット分析

フルスキャンした分析結果から化合物データベースや理論MSスペクトルとの比較により、SIMのターゲット化合物以外の化合物を探索できます。



謝辞: 本データは株式会社PSポータルのご協力のもと取得しました。

トリプル四重極 高速液体クロマトグラフ質量分析計

LCMS-8060NX

操作性、耐久性を向上させ、さらに世界最高感度と世界最高速を両立したトリプル四重極質量分析計の集大成モデルです。

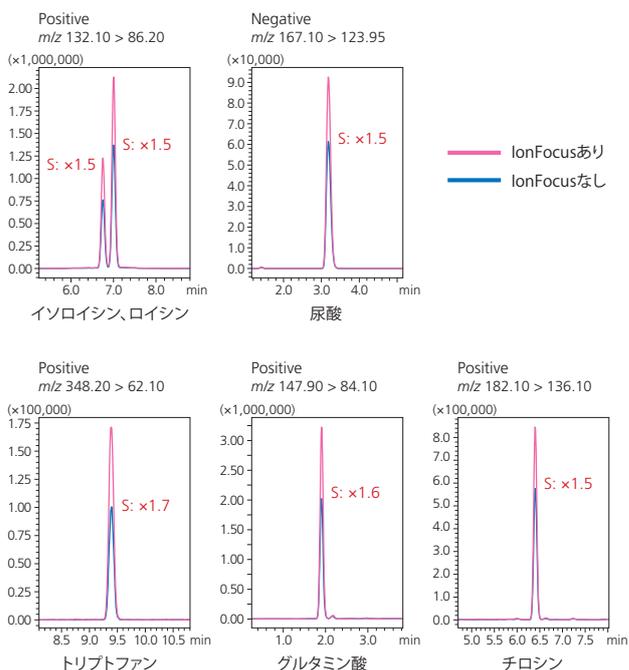
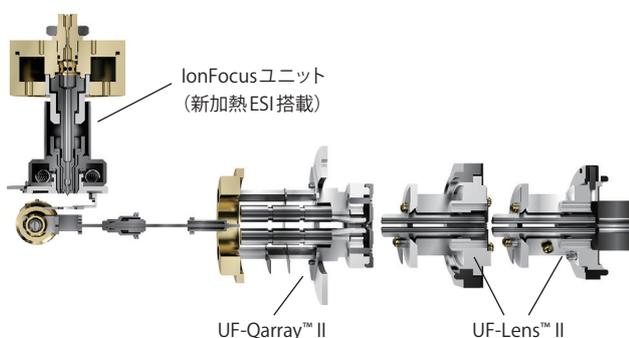
新開発のイオン源IonFocus™ユニットは、脱溶媒効率をさらに向上させ、イオン化が困難な化合物に対してもイオン化条件の最適化が可能です。

Nexera™シリーズと組み合わせることで「Analytical Intelligence」機能の活用により、分析準備から解析までワークフロー全体の効率化を図ることができます。

Enhanced performance
Sensitivity and Robustness

IonFocusによる感度の向上

LCMS-8060NXに搭載のIonFocusユニットは、ESIヒータの熱効率の改善とヒータリングガス流量の上限値の拡張を可能にしました。その結果、脱溶媒の効率が向上し、従来分析していた化合物だけでなく、ステロイドホルモンのようなイオン化しにくい化合物についても高感度分析を実現します。



Smart Metabolites Database, GCMS-TQ, GCMS-QP, UFMS, Smart MRM, LabSolutions Insight, PeakIntelligence, LCMS, IonFocus, Nexera, UF-QarrayおよびUF-Lensは、株式会社島津製作所の商標です。
PYREXは、コーニングインコーポレイティッドまたはその子会社の登録商標です。
Discoveryは、Sigma-Aldrich Co. LLCの商標です。
Mastrolは、株式会社島津ジーエルシーの商標です。

本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。
なお、本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。
本製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証を受けておりません。
治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。
トラブル解消のため補修用部品・消耗品は純正部品をご採用ください。
外観および仕様は、改良のため予告なく変更することがありますのでご了承ください。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部 604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

東京支社 101-8448 東京都千代田区神田錦町1丁目3
(03) 3219-(官公庁担当) 5631・(大学担当) 5616・(会社担当) 5622

関西支社 530-0012 大阪市北区芝田1丁目1-4 阪急ターミナルビル14階
(06) 6373-(官公庁・大学担当) 6541・(会社担当) 6556

札幌支店 060-0807 札幌市北区北七条西2丁目8-1 札幌北ビル9階 (011) 700-6605

東北支店 980-0021 仙台市青葉区中央2丁目9-27 プライムスクエア広瀬通12階 (022) 221-6231

郡山営業所 963-8877 郡山市堂前町6-7 郡山フコク生命ビル2階 (024) 939-3790

つくば支店 305-0031 つくば市吾妻3丁目17-1
(029) 851-(官公庁・大学担当) 8511・(会社担当) 8515

北関東支店 330-0843 さいたま市大宮区吉敷町1-41 明治安田生命大宮吉敷ビル8階
(048) 646-(官公庁・大学担当) 0095・(会社担当) 0081

横浜支店 220-0004 横浜市西区北幸2丁目8-29 東武横浜第3ビル7階
(045) 311-(官公庁・大学担当) 4106・(会社担当) 4615

静岡支店 422-8062 静岡市駿河区稲川1丁目1-1 伊伝静岡駅前ビル2階 (054) 285-0124

名古屋支店 450-0001 名古屋市中村区那古野1丁目47-1 名古屋国際センタービル19階
(052) 565-(官公庁・大学担当) 7521・(会社担当) 7531

京都支店 604-8445 京都市中京区西ノ京徳大寺町1
(075) 823-(官公庁・大学担当) 1604・(会社担当) 1603

神戸支店 650-0033 神戸市中央区江戸町9-3 栄光ビル9階 (078) 331-9665

岡山営業所 700-0826 岡山市北区磨屋町3-10 岡山ニューシティビル6階 (086) 221-2511

四国支店 760-0017 高松市番町1丁目6-1 高松NKビル9階 (087) 823-6623

広島支店 732-0057 広島市東区二葉の里3丁目5-7 GRANODE広島5階 (082) 236-9652

九州支店 812-0039 福岡市博多区冷泉町4-20 島津博多ビル4階
(092) 283-(官公庁・大学担当) 3332・(会社担当) 3334

島津コールセンター(操作・分析に関する電話相談窓口) 0120-131691
IP電話等: (075) 813-1691

<https://www.an.shimadzu.co.jp/>