

## Technical Report

# 高感度かつ高速スキャン可能なガスクロマトグラフィー/四重極型質量分析装置のメタボロミクス研究における有用性

津川裕司<sup>1,2</sup>、福崎英一郎<sup>1</sup>

### Abstract:

ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) は生体内低分子化合物の包括的解析を目的とするメタボロミクス研究の中核をなす分析技術として認識されており、品質評価やバイオマーカー探索のために幅広く用いられている。GC/MSメタボロミクス研究ではハイスループットかつ高感度な分析系が望まれているが、今回、高速スキャン可能な四重極型質量分析装置 (以下、Q/MS) が開発されたため、本装置の有用性の検証を行った。10種類のアミノ酸標準試料を用いた実験では、3.5–4.5乗の広い定量範囲が取得可能であった。また、急性炎症マウスの血漿サンプルを分析することで168化合物を同定及び定量することができ、頻用される炎症マーカーでは捉えることができなかった急性炎症の収束過程をメタボロームの観点から捉えることができた。本GC-Q/MSの登場により、今後のメタボロミクス研究のさらなる発展が期待される。

**Keywords:** メタボロミクス、ガスクロマトグラフィー、四重極型質量分析計、スキャン速度

## 1. はじめに

ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) は装置の安定性が高く、得られる定量データの再現性が高いことから、メタボロミクス研究の中核をなす分析技術として認識されている。GC/MSを用いたメタボロミクス研究では、主に親水性低分子化合物の包括的解析を行うことで、品質評価やバイオマーカー探索などが行われている。

従来、GC/MSメタボロミクス研究においては、ガスクロマトグラフに飛行時間型 (time of flight: TOF) の質量分析計を接続したGC-TOF/MSが頻用されてきた。この理由としては、飛行時間型の最大のメリットである高速データ取得能力により、①ハイスループットな分析すなわちFast GCが可能である、②1つのピークに対して30以上の豊富なデータポイント数が取得できるためピークトップの判別やデコンボリューション等のデータ処理が正確に実行可能であり、再現性の良い定性・定量データが取得できるためである。このような理由から、ピーク幅が1秒から3秒と狭いガスクロマトグラフィーに最も適合する装置としてGC-TOF/MSがメタボロミクス研究の必須装置とされてきた。しかしながら、飛行時間型は高価であり、定量範囲 (ダイナミックレンジ) が狭いことが問題点として指摘されており、より実用性の高い分析技術の開発が望まれていた。

そこで今回、高速スキャン測定が可能な四重極型質量分析を採用したGCMS-QP2010 Ultra (島津製作所) が新たにリリースされたので、本装置 (以下、GC-Q/MS) の有用性の検証を行った。本レポートでは、10種類のアミノ酸標準試料を用いた定量範囲の検証、及び急性炎症状態のマウス血漿のメタボローム解析を行った結果を報告する。

## 2. 実験

### 10アミノ酸標準品混合液の試料調製

用いたアミノ酸は、asparagine、glycine、leucine、lysine、methionine、phenylalanine、serine、threonine、tryptophan、valineの10種類であり、それぞれの化合物濃度を、10 nM、50 nM、100 nM、500 nM、1 μM、5 μM、10 μM、50 μM、100 μM、500 μM、1 mM、5 mM、10 mM、50 mMに調整した標準品混合液をそれぞれ150 μLずつ3つに分注し、凍結乾燥を行った。また、内部標準物質としてribitol (0.2 mg/mL) を全サンプルに10 μL加えた。凍結乾燥後の乾燥試料にMethoxyamine (20 mg/mL、pyridine) 溶液を100 μL加えて30°C、1,200 rpmで90分間インキュベーションを行った。さらに、MSTFAを50 μL加えて37°C、1,200 rpmで30分間インキュベーションを行った。

### 急性炎症マウス血漿の試料調製

マウスは日本クレア (CLEA Japan, Tokyo, Japan) から購入した。炎症を誘導するために20匹のマウスには*Escherichia coli* O111:B4 (L2630; Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, USA) 由来のLipopolysaccharide (LPS) を1 mg/kg BWで腹腔内投与した。20匹のうち10匹はLPS投与1時間後、全血採取を行い、残りの10匹はLPS投与24時間後、全血採取を行った。8匹のマウスはネガティブコントロールとしてphosphate buffered saline (PBS) 200 μLを腹腔内投与し、投与後1時間で全血採取を行った。採取した血液はすぐにヘパリン (sodium heparin、持田製薬、Japan、5,000 units/5 mL) で処理を行い、3,000×g、4°Cで10分間遠心した後、上清の血漿を1.5 mLエッペンドルフチューブに移し、液体窒素により凍結を行い、実験を行うまで−80°Cで保存した。

続いて、GC/MS 分析を行うため、1.5 mL エッペンドルフチューブに血漿 50  $\mu$ L を採り、250  $\mu$ L の混合溶液 (MeOH/H<sub>2</sub>O/CHCl<sub>3</sub>、2.5:1:1) を加えた。さらに内部標準物質として、0.5 mg/mL に調整した 2-isopropylmalic acid を 10  $\mu$ L 加えた。37°C、1,200 rpm で 30 分間インキュベーションを行い、16,000 rpm、4°C で 3 分間遠心分離した。上澄み 225  $\mu$ L を新たに用意した 1.5 mL エッペンドルフチューブに移した後、200  $\mu$ L の Milli-Q を加え、ボルテックスした。16,000 rpm、4°C で 3 分間遠心した後、上澄み 125  $\mu$ L ずつ新たに用意した 1.5 mL エッペンドルフチューブに移した。残存メタノールを除去するため、1 時間遠心濃縮を行った後、一晚凍結乾燥を行った。

誘導体化は、Methoxyamine (20 mg/mL、pyridine) 溶液を 80  $\mu$ L 加えよくボルテックスした後、ソニケーションを 20 分間行った。そして 30°C、1,200 rpm で 90 分間インキュベーションを行った。次に MSTFA を 40  $\mu$ L 加え、37°C、1,200 rpm で 30 分間インキュベーションした。その後、16,000 rpm、4°C で 3 分間遠心し、上澄み 80  $\mu$ L を分析用のバイアルに移し、GC/MS で分析を行った。

#### 分析条件

GC/MS 分析条件を Table 1 に示す。

Table 1 GC-MS 分析条件

<b>Instruments</b>	
GC-MS	: GCMS-QP2010 Ultra
Auto-injector	: AOC-20i + s
Column	: CP-SIL 8 CB low bleed MS (30 m $\times$ 0.25 mm I.D. df=0.25 $\mu$ m, Agilent)
<b>Analytical Conditions</b>	
<b>GC</b>	
Injection Temp.	: 230°C
Column Temp.	: 80°C (2 min) – (15°C/min) – 330°C (6 min)
Injection Mode	: Split
Carrier Gas	: He (Constant Linear Velocity)
Linear Velocity	: 39 cm/sec
Purge Flow	: 5 mL/min
Injection Volume	: 1 $\mu$ L
<b>MS</b>	
Ion Source Temp.	: 200°C
Interface Temp.	: 250°C
Acquisition Mode	: Scan
Scan Range	: <i>m/z</i> 85 – 500
Event Time	: 0.05 sec
Scan Speed	: 10000 u/sec (ASSP™)

### 3. 結果

保持時間、マススペクトルの標準品化合物データベースに基づき、得られた分析データから化合物の同定を行った。また、化合物の名前、保持時間、定量イオン、各試料で検出されたピーク高さ値 (内部標準物質のピーク高さ値で標準化したもの) を格納したデータ行列を作成した。アミノ酸混合液試料を GC-Q/MS 分析に供した結果、10 種類のアミノ酸すべてにおいて 3.5–4.5 乗の広い定量範囲が取得可能だった。(Fig. 1)

また、マウスの血漿分析データからは全 168 化合物が同定された。得られたデータ行列を主成分分析に供した結果を Fig. 2 に示す。また、同定された化合物のうち、有意差が検出された 35 の代謝物質を Table 2 に掲載した。主成分分析の結果は、PBS 処理群 (コントロール)、LPS 処理 1 時間後群、LPS 処理 24 時間後群がメタボローム情報から識別可能であることを示している。急性炎症反応の収束過程は、一旦炎症が生じた組織が正常な状態に回復する上で重要な工程と捉えられているが、その分子機構に関してはいまだ不明な点が多いのが現状である。特に、収束過程において肺など様々な組織で好中球の減少やマクロファージの流入の増大など多様な変動が認められている一方、血液中においては従来、臨床現場で頻用される炎症マーカーではその収束機構を捉えることができなかった。本結果は、頻用される炎症マーカーでは捉えることのできないマウスの急性炎症後期の収束過程を血漿で捉えることができるということを示唆するものである。また、Table 2 にも示すように、本装置を用いることで豊

富な代謝産物情報を取得することが可能であった。GC/MS による血漿メタボローム解析では特に、グルコースを除くすべての代謝物のピーク強度が低く、ピークの同定及び定量が困難である。そのため、高感度分析・解析システムが望まれており、この結果は、今回リリースされた GC-Q/MS を用いることで高解像度の代謝物表現型解析が実行可能であることを示唆するものであった。

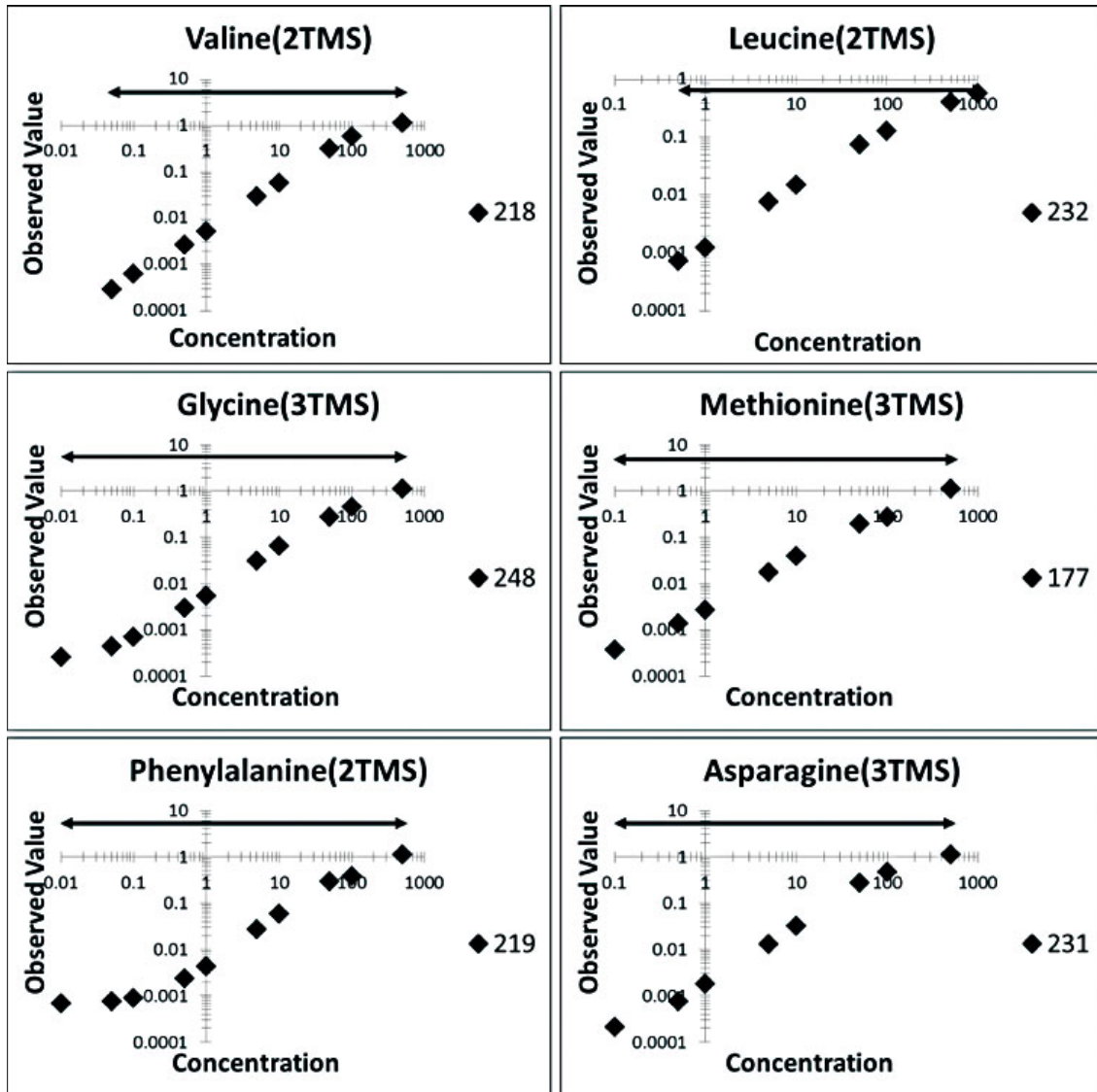


Fig. 1 アミノ酸混合液分析データの定量範囲例  
 アミノ酸混合液分析データの定量範囲例縦軸は、内部標準物質であるribitolのピーク強度との相対値を表しており、横軸は分析に供した濃度を表している。レジェンドに示しているのは、化合物を定量するために用いた  $m/z$  を表している。

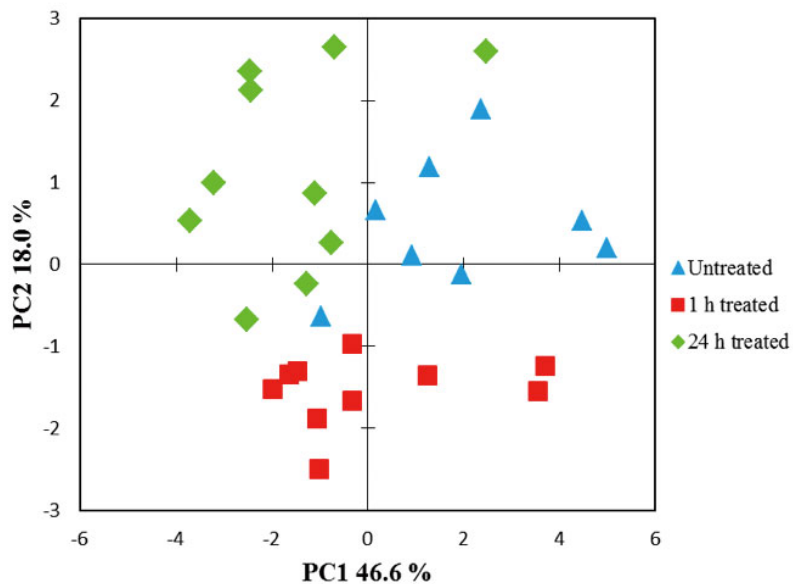


Fig. 2 急性炎症マウス血漿の主成分分析結果

Table 2 3群間で有意差が検出された化合物

Compound Name	Mean $\pm$ SD			P value		
	A (n = 8)	B (n = 10)	C (n = 10)	AB	BC	CA
2-Aminoadipic acid	6.8 $\pm$ 3.1 $\times$ E-03	1.0 $\pm$ 0.2 $\times$ E-02	2.3 $\pm$ 1.2 $\times$ E-02	0.0593 <sup>w</sup>	0.0181 <sup>w</sup>	0.0028 <sup>w</sup>
2-Hydroxybutyric acid	2.4 $\pm$ 0.5 $\times$ E-03	1.6 $\pm$ 0.3 $\times$ E-03	3.5 $\pm$ 0.8 $\times$ E-03	0.0027	0.0023	0.7742
3-Hydroxybutyric acid*	7.0 $\pm$ 2.3 $\times$ E-01	3.4 $\pm$ 0.8 $\times$ E-01	5.2 $\pm$ 1.0 $\times$ E-01	0.0156	0.0104 <sup>w</sup>	0.0027 <sup>w</sup>
Acetylsalicylic acid	2.9 $\pm$ 1.2 $\times$ E-03	2.3 $\pm$ 0.9 $\times$ E-03	4.0 $\pm$ 0.8 $\times$ E-03	0.5794	<0.0001	<0.0001
Aconitic acid	1.2 $\pm$ 0.1 $\times$ E-03	9.1 $\pm$ 1.9 $\times$ E-04	1.3 $\pm$ 0.3 $\times$ E-03	0.4878	<0.0001	<0.0001
Alanine (2TMS) *	1.8 $\pm$ 0.3 $\times$ E+00	1.2 $\pm$ 0.1 $\times$ E+00	2.1 $\pm$ 0.5 $\times$ E+00	0.0002	<0.0001 <sup>w</sup>	0.007
Arabinose	5.2 $\pm$ 1.2 $\times$ E-03	3.5 $\pm$ 0.4 $\times$ E-03	5.4 $\pm$ 1.3 $\times$ E-03	0.0729	0.0001	<0.0001 <sup>w</sup>
Arabitol	5.5 $\pm$ 2.1 $\times$ E-02	9.1 $\pm$ 2.3 $\times$ E-02	2.5 $\pm$ 0.9 $\times$ E-01	0.0026 <sup>w</sup>	0.0004	0.0711 <sup>w</sup>
Asparagne (3TMS)	2.6 $\pm$ 0.8 $\times$ E-02	1.4 $\pm$ 0.3 $\times$ E-02	2.2 $\pm$ 0.4 $\times$ E-02	0.0064	0.0052	0.6297
Behenic acid	6.6 $\pm$ 1.4 $\times$ E-04	4.9 $\pm$ 2.4 $\times$ E-04	1.1 $\pm$ 0.3 $\times$ E-03	0.0012	<0.0001	0.4514
Citrulline	4.1 $\pm$ 1.0 $\times$ E-03	3.4 $\pm$ 0.5 $\times$ E-03	4.8 $\pm$ 0.7 $\times$ E-03	0.0006	<0.0001	0.5445
Cystathionine	1.2 $\pm$ 0.2 $\times$ E-01	7.5 $\pm$ 1.7 $\times$ E-02	1.1 $\pm$ 0.1 $\times$ E-01	0.0018	0.0004	0.1968
DethioBiotin	1.1 $\pm$ 0.3 $\times$ E-03	1.7 $\pm$ 0.9 $\times$ E-03	3.6 $\pm$ 2.0 $\times$ E-03	0.0248	<0.0001	0.0083
Glycine (3TMS)	1.1 $\pm$ 0.2 $\times$ E+00	8.3 $\pm$ 1.1 $\times$ E-01	1.1 $\pm$ 0.1 $\times$ E+00	0.2472	0.0004	0.0392
Heptadecanoic acid*	1.3 $\pm$ 0.1 $\times$ E-02	1.3 $\pm$ 0.1 $\times$ E-02	1.9 $\pm$ 0.1 $\times$ E-02	0.0004	<0.0001	0.0003 <sup>w</sup>
Homoserine	1.3 $\pm$ 0.1 $\times$ E-03	1.2 $\pm$ 0.3 $\times$ E-03	2.0 $\pm$ 0.2 $\times$ E-03	0.0013	0.0184	<0.0001
Icosanoic acid	4.5 $\pm$ 1.0 $\times$ E-03	5.5 $\pm$ 1.2 $\times$ E-03	9.8 $\pm$ 2.5 $\times$ E-03	0.0129	<0.0001	0.0384
Inositol	3.8 $\pm$ 0.8 $\times$ E-01	2.9 $\pm$ 0.4 $\times$ E-01	3.7 $\pm$ 0.6 $\times$ E-01	0.0028	0.004	0.5411
Isoleucine (2TMS)	3.1 $\pm$ 0.7 $\times$ E-01	2.0 $\pm$ 0.5 $\times$ E-01	3.3 $\pm$ 0.3 $\times$ E-01	0.0003	0.0001 <sup>w</sup>	0.1287
Leucine (2TMS) *	9.3 $\pm$ 2.2 $\times$ E-02	5.6 $\pm$ 1.5 $\times$ E-02	9.8 $\pm$ 1.4 $\times$ E-02	0.005	0.0002 <sup>w</sup>	<0.0001 <sup>w</sup>
Methionine (3TMS)	1.9 $\pm$ 0.3 $\times$ E-02	1.0 $\pm$ 0.5 $\times$ E-02	2.3 $\pm$ 0.7 $\times$ E-02	0.0043	0.0043 <sup>w</sup>	0.0794 <sup>w</sup>
N-Acetyl-Valine	2.5 $\pm$ 0.5 $\times$ E-03	1.8 $\pm$ 0.5 $\times$ E-03	3.4 $\pm$ 0.6 $\times$ E-03	0.0177	<0.0001	0.0713
Phenylalanine (2TMS)	1.3 $\pm$ 0.1 $\times$ E-01	9.9 $\pm$ 1.8 $\times$ E-02	1.9 $\pm$ 0.3 $\times$ E-01	0.0046 <sup>w</sup>	0.001 <sup>w</sup>	0.7157
Prolinamide	1.8 $\pm$ 1.2 $\times$ E-03	5.6 $\pm$ 2.5 $\times$ E-03	8.5 $\pm$ 2.4 $\times$ E-03	0.0305 <sup>w</sup>	0.0006	0.1121
Proline (2TMS)	4.2 $\pm$ 1.2 $\times$ E-02	2.9 $\pm$ 0.7 $\times$ E-02	5.4 $\pm$ 1.2 $\times$ E-02	0.0597	<0.0001	0.0027
Rhamnose	3.4 $\pm$ 1.2 $\times$ E-03	5.5 $\pm$ 1.4 $\times$ E-03	1.4 $\pm$ 0.4 $\times$ E-02	0.1749 <sup>w</sup>	0.002	0.0006
Sarcosine*	3.2 $\pm$ 0.7 $\times$ E-03	2.1 $\pm$ 0.6 $\times$ E-03	4.6 $\pm$ 2.1 $\times$ E-03	0.003 <sup>w</sup>	<0.0001	<0.0001
Serine (3TMS) *	2.4 $\pm$ 0.7 $\times$ E-01	1.7 $\pm$ 0.5 $\times$ E-01	2.9 $\pm$ 0.4 $\times$ E-01	0.0036	0.0002 <sup>w</sup>	<0.0001 <sup>w</sup>
Threonic acid	1.4 $\pm$ 0.3 $\times$ E-02	1.1 $\pm$ 0.1 $\times$ E-02	1.6 $\pm$ 0.3 $\times$ E-02	<0.0001	<0.0001	0.5716
Threonine (3TMS)	1.4 $\pm$ 0.4 $\times$ E-01	1.1 $\pm$ 0.3 $\times$ E-01	2.1 $\pm$ 0.4 $\times$ E-01	0.0085 <sup>w</sup>	0.0003	0.3221
Thymine*	7.7 $\pm$ 3.0 $\times$ E-04	9.6 $\pm$ 2.5 $\times$ E-04	1.7 $\pm$ 0.5 $\times$ E-03	0.0011	<0.0001	0.0101
Tryptophan (3TMS)	6.8 $\pm$ 1.9 $\times$ E-02	9.6 $\pm$ 1.6 $\times$ E-02	2.2 $\pm$ 0.4 $\times$ E-01	0.1005	<0.0001	0.0005
Tyrosine (3TMS)	5.1 $\pm$ 0.8 $\times$ E-01	2.5 $\pm$ 0.5 $\times$ E-01	5.3 $\pm$ 1.0 $\times$ E-01	0.0846	0.0001	0.0854
Valine (2TMS)	6.5 $\pm$ 1.1 $\times$ E-01	4.4 $\pm$ 1.0 $\times$ E-01	7.9 $\pm$ 1.0 $\times$ E-01	0.0001	0.0002	0.2049
Xylitol	6.9 $\pm$ 1.8 $\times$ E-03	8.6 $\pm$ 2.0 $\times$ E-03	2.2 $\pm$ 0.7 $\times$ E-02	0.0855	0.0003 <sup>w</sup>	0.0001 <sup>w</sup>

3群間のうち少なくとも1組で有意差が検出された化合物を掲載した。3群間すべてで有意差が検出されたものについては、化合物名に上付きアスタリスク(\*)を付けた。Welch's t-testの結果はp-valueに上付きwを付けた。多重比較におけるp-valueの補正はBonferroni法 ( $p < 0.017$ )を用いた。

## 4. 結論

新たにリリースされた高速スキャン可能な四重極型質量分析装置であるGCMS-QP2010 Ultra (島津製作所)を用いることで、飛行時間型質量分析装置と同様のハイスループット分析及びデータポイント取得が可能となった。さらに、アミノ酸混合液、及びマウス血漿の実験結果は、本装置の感度・ダイナミックレンジが高いことを示すものであり、急性炎症状態の時間変化をメタボロームで捉えることが可能であることを示唆するものであった。今回、汎用性の高い四重極型質量分析装置でありながら、高感度かつハイスループットなメタボローム解析が実行可能であることが示されたことで、GC-Q/MSを用いたメタボロミクス研究が一層盛んになることが期待される。

### 参考文献:

- 1) Tsugawa H, Bamba T, Shinohara M, Nishiumi S, Yoshida M, Fukusaki E. Practical Non-targeted Gas Chromatography/Mass Spectrometry-based Metabolomics Platform for Metabolic Phenotype Analysis. *J Biosci Bioeng.* 2011 Sep;112 (3) :292-8.

## 島津GC/MSと生体分子の定量

アミノ酸、有機酸や脂肪酸などの生体分子は、極性基を有し揮発性があまりないため、直接ガスクロマトグラフィ/マススペクトロメトリ(GC/MS)で測定することが困難です。そのため、これらの極性基を誘導体化することにより揮発性をもった化合物に変換して測定する必要があります。これらの作業は手間がかかり敬遠されがちでした。

しかし、GC/MSは、液体クロマトグラフィなどの他のクロマトグラフィと比べ分機能などの優れた点が見直され、生体成分の測定に

適用されるようになってきました。特に、GC/MSはキャピラリーカラムを用いて容易に高分離を実現でき、また、きょう雑物と目的成分のピークが重なっても電子イオン化法(El法)により生成されるフラグメントイオンから適切なものを選ぶと、きょう雑物の影響を受けることなく目的成分を定量することができます。さらに、LC/MS/MSで問題となるイオンサプレッションが起こりにくいことから、きょう雑物を多く含む試料の定量に適しています。

弊社の GCMS-QP2010 シリーズは生体分析に最適な機能と性能を有します。

1. GCMS-QP2010 シリーズは生体分子が低濃度まで測定できる感度を有しています。
2. 生体試料はきょう雑物を多く含みます。そのような試料をGC/MSで測定すると、イオン源の汚染が問題となります。

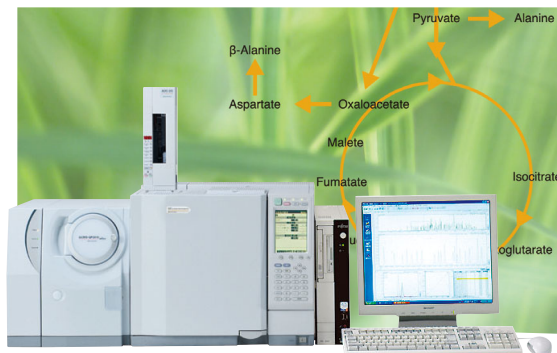
GCMS-QP2010 シリーズは汚れにくく、しかもイオン源が汚染されても容易に洗浄できます。

3. 生体試料を一斉に分析するには、その設定が煩雑です。GCMS-QP2010 シリーズ用 GC/MS 用代謝成分データベースには、最適な分析条件と定量のためのパラメータを含んだメソッドファイルが含まれています。

### ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-QP2010 Ultra

GCMS-QP2010 Ultra の特長

1. 高感度
2. 保守メンテナンスが容易
3. 保持指標を用いた化合物同定が可能



### GC/MS代謝成分データベース(アミノ酸・脂肪酸・有機酸)

「GC/MS代謝成分データベース」は、ガスクロマトグラフ質量分析計GCMS-QP2010シリーズワークステーションGCMSsolution向けライブラリです。保持指標付きマススペクトルライブラリを用いることによって、候補化合物を大幅に減らし、検索結果の信頼性を向上します。

本データベースには、分析条件、マススペクトル、保持指標などを登録した4種類のメソッドファイルと、CAS番号などを含む化合物情報、マススペクトル、保持指標を含む4種類のライブラリ、ハンドブック(ライブラリ情報の印刷物)から構成されています。

メソッド/ライブラリにはアミノ酸、脂肪酸、有機酸の代謝関連成分について、電子イオン化法スペクトル:261スペクトル、化学イオン化法スペクトル:50スペクトルが登録されています。

**株式会社 島津製作所**  
分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原作者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2012年11月  
© Shimadzu Corporation, 2012