

LC-MS メタボロミクスにおける抽出溶媒選択が アミノ酸プロファイルに与える影響 —予備的検討—

○小川 直也

東海国立大学機構 名古屋大学全学技術センター

1.はじめに

LC-MS を用いたメタボロミクスは、生体内の代謝物を網羅的に解析する手法として、生命科学・医学・食品科学など幅広い分野で利用されている。メタボローム解析では、試料前処理が測定結果に大きく影響し、特に抽出溶媒の選択は代謝物の抽出効率や回収率、夾雑成分の除去性能、さらには検出される代謝物プロファイルを左右する重要な要因である。

血漿試料を対象に、複数の有機溶媒によるタンパク質沈殿処理を比較した検討はこれまでも報告されており^[1,2]、溶媒の極性やタンパク質沈殿能の違いが代謝物プロファイルに影響することが知られている。本検討では、これらの知見を踏まえ、ウシ胎仔血清（FBS）を対象に、自身が管理・運用する質量分析装置を用いて、安定同位体標識（¹³C 標識）内部標準による測定を行い、溶媒間で観察される差異の要因（真の抽出・回収率かマトリックス効果か）を分離して検討することを試みた。

本発表では、その第一段階として、4 種の有機溶媒を用いて同一の FBS 試料を除タンパク処理し、20 種類のアミノ酸の LC-MS 応答を比較した。なお、本検討は単一ロット試料による予備的な技術評価であり、観察された差異の要因分離および結果の一般化可能性の検証は今後の課題として位置づける。

2.測定試料および装置

測定試料：ウシ胎仔血清（FBS：Fetal Bovine Serum, 単一ロット）

抽出溶媒：アセトニトリル（MeCN）、メタノール（MeOH）、エタノール（EtOH）、2-プロパノール（IPA）

前処理：FBS 100 μ L に対し各溶媒 400 μ L を添加し vortex（30 秒）、4°C で 20 分静置後、4°C・15,000 rpm で 15 分遠心分離。上清を 0.2 μ m PTFE フィルターでろ過後、1 μ L を LC-MS に注入した。

内部標準：安定同位体標識（¹³C¹⁵N 標識）アミノ酸を、除タンパク後の上清に測定直前に添加した（post-extraction spike）。

LC：Vanquish Horizon UHPLC System（Thermo Fisher Scientific, Inc.）、カラム：Intrada Amino Acid（Imtakt Corporation）、メーカー推奨プロトコルに準拠、MS：Orbitrap Exploris 240（Thermo Fisher Scientific, Inc.）、n = 3（技術的反復、同一ロット由来）

3.測定結果

各アミノ酸について Analyte/IS 比を算出し、4 溶媒中で最も高い応答を示した溶媒（MeOH）の平均値を基準（100%）とした相対応答値として比較した（図 1）。その結果、MeCN 処理群は他の 3 溶媒と比較して、特に荷電性側鎖を有するアミノ酸（Glu, Asp, His, Lys, Arg）で相対応答が顕著に低い傾向が認められた。一方、非荷電性アミノ酸ではこの傾向は比較的小さかった。

4.考察

本検討では、除タンパク後の上清に測定直前添加した ¹³C¹⁵N 標識内部標準を用いて Analyte/IS 比を算出しており、これによりイオン化効率の変動（マトリックス効果）および注入溶媒組成の違いに由来

するクロマトグラフィー的挙動の変動は、一定程度補正されていると考えられる。13C15N 標識は H/D 標識と異なり同位体効果による保持時間シフトが実質的に無視できるため、分析対象アミノ酸との共溶出性は高いと考えられる。

これらの測定側の要因がある程度補正された上でなお観察された溶媒間差は、除タンパク処理過程における真の抽出・回収率の違いに起因する可能性が示唆される。特に荷電性側鎖を有

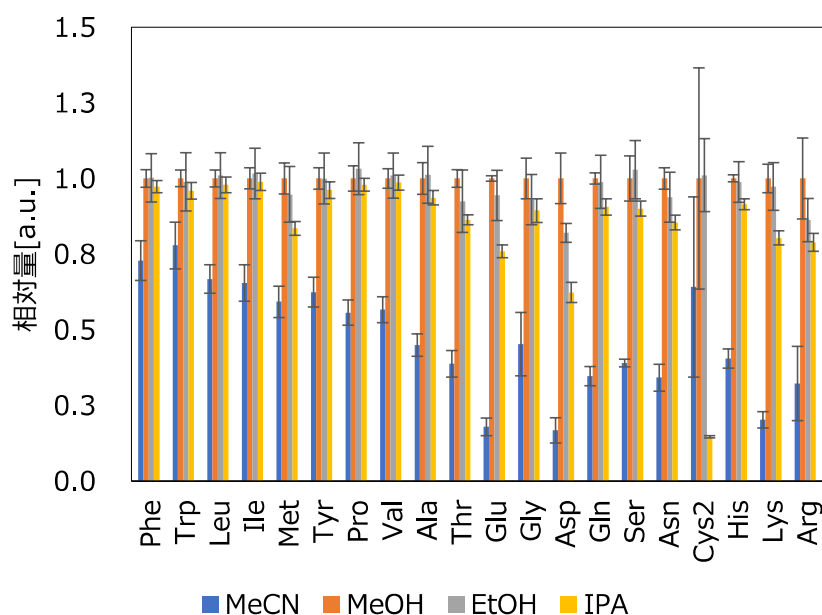


図 1 MeOH を 1 として規格化したアミノ酸の相対量

するアミノ酸で差が顕著であった点は、除タンパク能の強い溶媒ほどタンパク質沈殿への共沈殿の影響を受けやすいという、これまで検討されてきた結果と整合的である^[2]。

ただし、本検討における内部標準は抽出前ではなく抽出後に添加したものであり、除タンパク・遠心分離の過程で生じる分析物そのものの損失を直接的に補正するものではない。したがって、上記の解釈はあくまで推論であり、真の回収率差であるとの断定はできない。また、本検討は単一ロットの FBS を用いた技術的反復 (n=3) による予備的検討であり、ロット間差が結果に与える影響は評価していない。

今後、抽出前添加型の内部標準を用いた回収率評価、および溶媒別マトリックス検量線を用いたマトリックス効果・定量下限の評価により、本知見をさらに検証する必要があると考えている。

5. 結論

LC-MS メタボロミクスにおける抽出溶媒の選択は、荷電性側鎖を有するアミノ酸の相対応答に大きな影響を与えることが示唆された。この差異の要因を分離するための検証は今後の課題であるが、本検討はその第一段階として、溶媒選択の重要性を予備的に示すものである。

6. 参考文献

- [1] Bruce, S. J., Tavazzi, I., Parisod, V., Rezzi, S., Kochhar, S., & Guy, P. A. (2009). Investigation of human blood plasma sample preparation for performing metabolomics using ultrahigh performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 81(9), 3285–3296. <https://doi.org/10.1021/ac8024569>
- [2] 高垣さとこ, & 前田康博. (2025). PG-6. 前処理溶媒と分析までの経過時間が LC - MS / MS による一次代謝物の定量におよぼす影響. *JSBMS Letters* 50 (suppl) 65-65, Retrieved March 6, 2026, from <https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=er3jsbms&ye=2025&vo=50&issue=suppl>