

質量分析における前処理方法と 液体クロマトグラフィーの条件検討

高垣 さとこ¹・山田 晴代^{1,2}

¹名古屋市立大学 共用機器センター, ²名古屋市立大学大学院 理学研究科

TAKAGAKI Satoko, YAMADA Haruyo:

The Research Equipment Sharing Center at the Nagoya City University has launched a contract analysis service with support from the Core Facility Construction Support Program (the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology). We are mainly working on supporting clinical research using mass spectrometry. In this study, we compared three instruments to develop a stable and efficient pretreatment method (sample concentration method) for metabolome analysis. Additionally, we examined the conditions of liquid chromatography injection solutions.

1. 目的

本学はコアファシリティ構築支援プログラムの支援で受託解析事業を立ち上げ、質量分析による臨床研究支援に主に取り組んでいる。メタボローム解析における前処理（特にサンプル濃縮について）を安定的かつ効率的に行うため、共用機器センターにある3つの装置を利用して比較検討した。また液体クロマトグラフィーのインジェクションソリューション条件も合わせて検討した。

2. 方法

(1) 前処理における乾固装置の比較検討

①窒素乾固装置 (TEITEC DTU-1BN) ②遠心濃縮機 (LABCONCO CentriVap Concentrator) ③遠心濃縮機+凍結乾燥機 (YAMATO DC801) の3つの乾固装置の中でどの装置を利用することによって分析結果に影響が少なく、また効率的か検討した。予備実験としてサンプルの有機溶媒率を変化させ（メタノール：超純水 = 5 : 0 ~ 0 : 5 の6通り）乾固装置の長短所について確認した。また実際のサンプル（マウス血清）を一次代謝物メソッドパッケージ（島津製作所）のマニュアルに記載されているプロトコルに沿って前処理し、乾固した時間も合わせて検証した。本実験では試料溶液（41 μ M Methionine sulfone、41 μ M 2-Morpholinoethanesulfonic acid、17 μ M 標準品 Mix、メタノール 41%）240 μ L を各装置用と乾固前の状態確認用に各3本計12本準備した。①~③の条件で乾固した後、試料溶液と同じ溶媒比率（メタノール：超純

水 = 5 : 1）の溶液を 240 μ L で溶解し、高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS-8050（株式会社島津製作所）を用いて一次代謝物メソッドパッケージで分析した。

(2) インジェクションソリューション条件の検討

(1) の遠心濃縮機で乾固したもの5本を利用し、分析は(1)同様一次代謝物メソッドパッケージを利用し行った。利用した分析装置は(1)と同様である。

条件は I. 溶解した溶媒（メタノール：超純水 = 5 : 1）注入量 3 μ L、II. I と同一溶媒、注入量 1 μ L（以降すべて同量）、III. 溶解した溶媒（100%超純水）、IV. 溶解した溶媒（移動相 A（0.1%ギ酸水 100%））、V. 溶解した溶媒（移動相 A（0.1%ギ酸水 100%）：移動相 B（0.1%ギ酸アセトニトリル） = 1 : 1）の5条件で検討した。

3. 結果

(1) 前処理における乾固装置の比較検討

まず標準品の乾固に要した時間は①窒素乾固装置で1時間、②遠心濃縮機で2時間、③遠心濃縮機+凍結乾燥機で3時間となり①窒素乾固装置が最も短時間で乾固した。実際の臨床サンプルを前処理して乾固した時間は①1時間50分、②2時間50分、③2時間20分となり①窒素乾固装置が最も短時間で乾固したことは変わりなかったが、③遠心濃縮機+凍結乾燥機の乾固が次に短時間であった。

標準品検出数は全ての条件で45化合物であった。2つの内部標準品ではいずれにも大きな差異が見られず（図1-A）、分注作業による手技には問題がないことを

確認した。またほとんどの化合物で大きな差が見られなかったが(図1-B)、Cysteineを始め6化合物については差異が確認された(図1-C)。差異が確認された化合物のうち、OrnithineとValineについてはピークが複数となり形状の不良が要因とも考えられたため、インジェクションソリュージョン条件を検討しピーク形状の改善を試みた。なお2-Aminobutyric acid他7化合物は標準品 Mixに含まれている化合物のピーク強度よりも低い、明らかなピークが検出された。

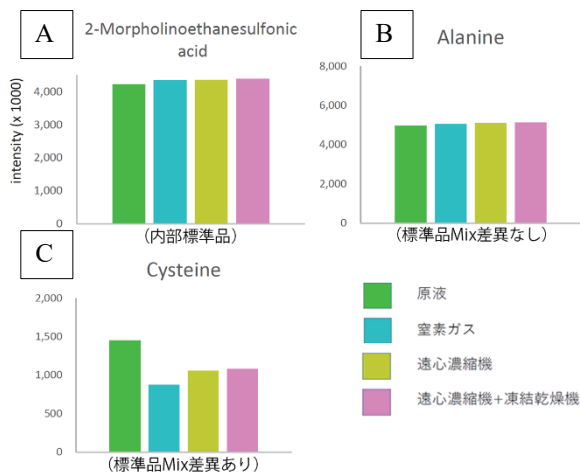


図1. 乾固前(原液)と乾固後の装置ごとの相対比較

(2) インジェクションソリュージョン条件の検討

ピークにあまり変化がなかった化合物は50化合物中10化合物だった。注入量を3 μL から1 μL に変更すると33化合物のピーク形状が改善された。希釈液を100%超純水に変更すると21化合物が改善またはより改善された(図2)。このメソッド・カラムではピークの完全分離が難しいLeucine・Isoleucineでは移動相A(0.1%ギ酸水)100%で最も改善が見られた。移動相Aを50%にすると1成分のみ改善が認められた。ただしCitric acidのみ条件(溶媒〈メタノール:超純水=5:1〉)1)注入量3 μL)を変更すると形状が悪くなった。

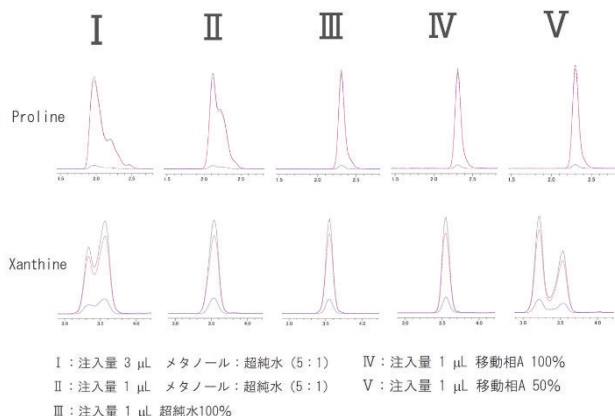


図2. 注入量や溶解する溶媒条件毎のピーク形状

4. 考察

(1) 前処理における乾固装置の比較検討

内部標準品での装置間差がなかったため、分注による影響はなかったことが確認できた。その上で残り43化合物を1つずつ検証したが、ほとんどの化合物に装置間差異がなかったため、有機溶媒比率が高くかつサンプル数が多い場合は②遠心濃縮機が効率的だと考えられる。ただし酸化しやすい成分や低温での温度管理が必要な成分の場合は遠心濃縮機での低温管理ができないため②遠心濃縮機、または③遠心濃縮機+凍結乾燥機では安定した乾固が困難であり、①窒素乾固装置が適当である。有機溶媒比率が低い(水の比率が高いもの)ものを乾固する場合は①窒素乾固装置や②遠心濃縮機では5時間を経過しても乾固させることができなかったため不適当であり、唯一③遠心濃縮機+凍結乾燥機でのみ乾固が行えると考えられた。

今回は内部標準品と標準品 Mixでの分析を行ったが、そこには含有されていない化合物が検出された原因については今後の検討課題とする。

(2) インジェクションソリュージョン条件の検討

注入量を3 μL から1 μL に変更すると多くの成分においてピーク形状に改善が見られた。また希釈液をメタノール:超純水=5:1から超純水100%に変更することでほとんどのピーク形状が改善された。一次代謝物メソッドパッケージを利用したスクリーニング目的の分析では、測定したい成分の親水性が高ければ超純水、非親水性が高ければ移動相Bの有機溶媒100%(今回の実験の場合0.1%ギ酸アセトニトリル)をサンプル希釈液に利用することが適していると思われる。ピーク形状を改善した状態で再度ValineとOrnithineの比較を行うなど、今後も継続して検討を行う。

謝辞

本研究はコアファシリティ構築支援プログラムの支援を受け、名古屋市立大学共用機器センターの機器を利用して行いました。

今回の発表において、名古屋市立大学大学院医学研究科法医学大瀧純様、細胞生化学橋本寛様、認知機能病態学野村洋様、横井雄斗様、東京大学医科学研究所浦木隆太様、株式会社島津製作所渡邊淳様他、たくさんの方々にご協力いただきました。感謝申し上げます。