

# Agilent Bravo Platform による 血漿代謝物の抽出の自動化

#### 著者

Weston R. Spivia<sup>1</sup>, Koen Raedschelders<sup>1</sup>, Manuel Gomez<sup>2</sup>, and Jennifer E Van Eyk<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Advanced Clinical Biosystems Research Institute Smidt Heart Institute, Cedars-Sinai Medical Center
- <sup>2</sup> Agilent Technologies, Inc.

## はじめに

血漿メタボロミクスのサンプル前処理は、高品質で再現性の高い結果を得るうえで極めて重要です。このサンプル前処理方法は、代謝作用の抑制や、LC/MS 分析のための効果的な代謝物の抽出に対応している必要があります。しかし、血漿などの生体サンプルの前処理ステップは、標準化、検証、自動化がなされていません。基礎研究やトランスレーショナルリサーチ用に大量のサンプルを前処理する場合、非現実的な量の手作業が必要になることや、処理の不整合が発生することがあります。さらに、血漿中の代謝物の濃度は本質的に、代謝プロセスと触媒プロセスによって決定され、こらのプロセスには細胞および血液ベースの酵素の触媒作用が及びます。基本的に、関連代謝物の濃度を正確に測定するためには、サンプル収集時にこのような酵素の残存活性を最小限に抑えるか、または除去する必要があります¹。総じて、これらのハードルによって下流の定量分析の忠実度が低下し、日ごとの比較やラボ間の比較が困難になっている可能性があります。

これらのハードルに対処するために、血漿中の代謝物を Bravo Metabolomics Sample Prep Platform (Bravo) で分析する自動化サンプル前処理プロトコルを開発しました。このメソッドでは、血漿タンパク質を沈殿させて酵素の残存活性を抑制し、脂質を除去して、LC/MS 分析の前に代謝物を抽出します。サンプル溶液を変化させることによってタンパク変性沈殿処理を行い、タンパク質の階層的な超微細構造の維持に必要な非共有結合の分子内結合を妨げます。一般的なタンパク質沈殿処理方法には、有機溶媒の追加と、分子内静電相互作用を妨害するその他の試薬の追加の 2 つがあります。サンプル収集後も持続して代謝物の濃度を変える触媒および代謝プロセスについては、酵素抑制による沈殿処理を実施するために、タンパク質の超微細構造を破壊する必要があります。また、代謝物を分析するという目的のために、代謝物の溶解性も維持し、かつ代謝物抽出ワークフローと互換性のあるタンパク質沈殿処理方法を確立する必要があります。

2つの代表的なタンパク質沈殿処理方法を対象に、代謝物抽出のステップが遅れる可能性のある基礎研究またはトランスレーショナルリサーチの設定をシミュレートする条件下で、さまざまな血漿代謝物の一貫性のある定量を実現する能力についてテストしました。この技術概要では、トリクロロ酢酸 (TCA)-ベースとメタノール:エタノール (M:E) ベースの沈殿方法の両方の結果、その後に続く抽出ステップでの遅延に対する耐性について説明します。Agilent Bravo を用いて血漿から代謝物を抽出する自動化プロトコルを開発し、次のことを実現しました。

- 長期的な再現性の向上
- トレーニングの簡素化
- オペレータ間のばらつきの低減

最後に、プールヒト血漿標準を使用して日内および日間の再現性を評価することによって、このワークフローと LC/MS を確認しました。LC/MS の分析は、炭素中心代謝物用の Agilent MRM-ベース LC/MS/MS プラットフォームを用いて実施しました。

## ソリューションの概要

このプロトコルで規定される自動化ソリューションは、即座に処理するサンプルと、処理前に分析ラボに移送する必要があるサンプルに対応できるように設計されています。

調査結果に基き、最終的な血漿前処理メソッドでは、M:E ベースの沈殿ステップを実行してから、Agilent Captiva EMR-Lipid プレートを用いたタンパク質除去および脂質除去を実行します。溶出液を乾燥し、LC/MS 分析の前に代謝物を再懸濁します。サンプルのドライダウンを除くすべてのステップを、Bravo によって自動化できます。

#### Bravo 機器とアクセサリ

- Agilent Bravo Metabolomics Sample Prep Platform (p/n G5589AA)
- ・ Agilent Captiva EMR-Lipid プレート (p/n 5190-1001)
- Agilent 250 µL 使い捨てチップ (p/n 19477-002)
- ・ Agilent DuoSeal 96、96-ウェルプレート シール (p/n A8961008)
- Agilent Captiva コレクションプレート (p/n A69600100)
- Agilent Seahorse 保管用プレート、2 mL、四角すい型 (p/n 201240-100)
- Agilent PP、1 mL、丸底プレート (p/n 203426-100)
- Thermo Scientific Matrix 1.0 mL スクリュートップチューブとラック、
  2D V-底 (Thermo Scientific p/n 3741)

#### LC/MS システム

アジレントのメタボロミクスダイナミック MRM データベースおよびメソッドを用いたターゲットメタボロミクス分析用に、Agilent 6470 LC/TQ システムを構成しました (Agilent Publication 5991-6467EN)。

# 手法

血漿サンプルを採取する状況は、一様ではありません。管理された環境下において、Bravoから妥当な近距離で血漿サンプルを採取する場合は、タンパク質沈殿ステップを自動化ワークフローの一部としてオンサイトで実施できます。しかし、基礎研究やトランスレーションリサーチは共同で実施されるものであるため、血漿サンプルは第三者が離れた場所で採取し、分析ラボに届くまでに、ある程度の遅延が生じることがよくあります。この状況においては、オフサイトで手作業によるクエンチステップを実施し、血漿サンプリング後に生じる可能性のある、残留酵素による代謝物変化の影響を最小限に抑える必要があります。

血漿サンプルの代謝物の分析は次の 3 ステップで構成されます。

- 血漿タンパク質の沈殿 (サンプルクエンチ処理)
- 2. タンパク質と脂質の除去による 代謝物の抽出
- 3. LC/MS 分析

Bravo と Agilent Captiva EMR-Lipid プレートを用いてオンサイトとオフサイトの両方のサンプル収集に対応できる半自動ワークフローを開発しました (図 1)。

収集後、全血をできる限り早急に、かつ一貫した形で遠心分離機にかける必要があります。オンサイトサンプリングでは、120  $\mu$ L 以上の血漿を Thermo Scientific Matrix 1.0 mLスクリュートップチューブに移し、Thermo Scientific Matrix チューブラックに配置して、その後に Bravo デッキにロードします。オフサイトサンプリングでは、450  $\mu$ L の M:E (1:1)を含む Thermo Scientific Matrix 1.0 mLスクリュートップチューブに、100  $\mu$ L の血漿をできる限り早く移します。処理までに6時間を超える遅延が予想される場合は、チューブを-80°C で冷凍する必要があります。

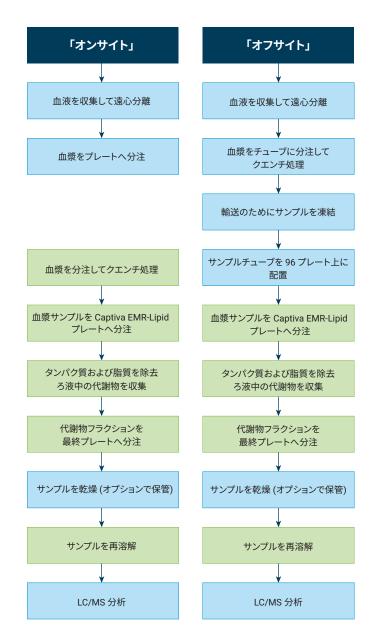


図 1. 血漿からの代謝物の自動抽出のワークフロー。 緑色のステップは Agilent Bravo プラットフォームで実行しました。

選択性と効率に優れた脂質除去を実現し、 血漿から沈殿タンパク質をろ過するために、 Captiva EMR-Lipid 脂質除去システムを選 択しました。 新しい EMR-Lipid 技術は、サ イズ排除と疎水性相互作用を組み合わせる ことで、脂質を除去します。効果的な脂質除 去により、対象代謝物のイオン抑制が最小限 に抑えられ、メソッドの信頼性と堅牢性が向 上します。このワークフローでは、プレートで LC/MS 分析用に乾燥と再溶解の準備が整っ た状態で代謝物の抽出物が提供されます。メ タボロミクスダイナミック MRM データベース およびメソッドを用いた 6470 LC/TQ プラット フォームでサンプルを分析しました。メタボロ ミクス dMRM データベースおよびメソッドの 詳細については、以前の別の資料で解説して います<sup>3</sup>。

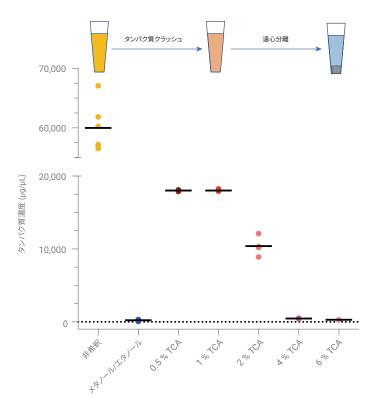
# 結果と考察

#### M:E により効果的なタンパク変性沈殿 処理が可能

酵素の活性によって、サンプリング後に血漿中の代謝物の相対的濃度が変化する可能性があり、これを抑制するうえで、タンパク変性沈殿処理が重要な要素であることがわかりました。タンパク変性沈殿処理(酵素のクエンチング)方法の開発にあたっては、下流の代謝物の抽出ステップと互換性があることを立証するとともに、血漿サンプルの採取から代謝物の抽出までに生じ得る遅延に伴う実際的な制約を克服することを目指しました。可能性のある2つの方法として、TCAベースの沈殿とM:Eベースの沈殿を研究しました。

最初のスクリーニングでは、それぞれの方法を単独で用いた場合に、血漿タンパク質をどの程度沈殿させることができるのかを調べました。そのために、 $450~\mu L$  の M:E (1:1) と、少しずつ濃度を高めた TCA (0.5、1、2、4、6% W/v) に、 $100~\mu L$  の標準プール血漿を加えて沈殿させました。その後、サンプルを撹拌して遠心分離機にかけ、上澄みについて BCA

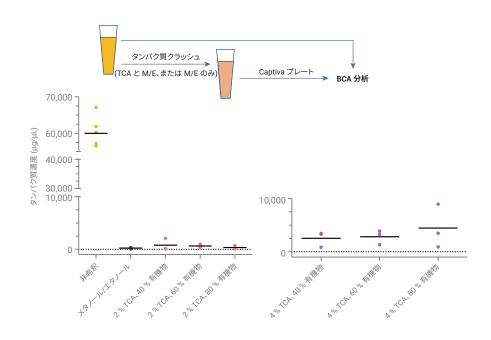
アッセイを使用して溶液に残っているタンパク 質を分析しました (図 2A)。実験から、M:E または  $2\% \sim 4\%$  (W/v) の TCA 濃度で十分に 血漿タンパク質の沈殿が起こることが示されました。



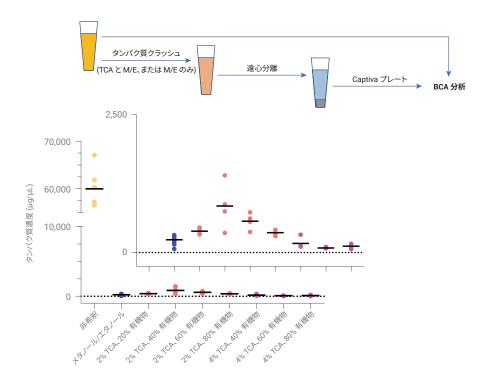
**図 2A.** 効果的なタンパク質沈殿処理は、メタノール/エタノールまたは 2 % を超える TCA (w/v) によって実現できます。 点線はタンパク質が検出されなかったことを示しています。

LC/MS 分析に先立つ代謝物抽出ステップで は、M:E などの混和性有機溶媒を追加する必 要があります。さらに、自動化に対応したワー クフローを構築するために、遠心分離のステッ プを省略し、Captiva EMR-Lipid プレートを 活用して、沈殿したタンパク質をふるい分け て脂質を除去しました。これらのプレートでは 最適な性能を得るために50%以上の有機 物が必要です。血漿タンパク質を M:E、2% TCA、または4%TCA(w:v)で最初に沈殿さ せることによって、Captiva EMR-Lipid プレー トのタンパク質をふるい落とす能力を評価し ました。40、60、または80%M:E(v:v)で補 完し、真空ろ過を使用した TCA による沈殿サ ンプルは、その後、M:E-沈殿サンプルと併せ て Captiva EMR-Lipid 除去プレートを通過し ました。 溶出されたタンパク質 (図 2B) は、 遠 心分離機を使用せず、Captiva EMR-Lipid プ レートベースのふるい分けのみ使用した場合、 低 TCA レベルまたは TCA なしが最も効果が あったことを示しています。さらに、TCA-沈殿 血漿サンプルが Captiva EMR-Lipid プレート を通過する率と容易さは、M:E による沈殿処 理ほど一貫していませんでした。M:E の高い 一貫性によって、TCA-沈殿サンプルと比べて BCA 結果の変動が改善した可能性があると 推測されます。

最後に、遠心分離ステップと上澄みのみのロードを統合して、Captiva EMR-Lipid プレートベースのふるい分け実験の評価を繰り返しました(図 2C)。EMR-Lipid プレートベースのタンパク質除去と TCA-沈殿サンプルの性能のために、サンプルロードの前に遠心分離ステップを含める必要がありましたが、この血漿タンパク変性沈殿処理は、Captiva EMR-Lipid プレートベースのタンパク質除去に対して互換性も効果もあり、遠心分離ステップの必要性が大幅に低下しました。この延長線上で、M:E 手法によりワークフローの合理



**図 2B.** Captiva EMR プレートベースのタンパク質のふるい分けは 低 TCA レベルまたは TCA がない場合に効果的です。点線はタンパク質が検出されなかったことを示しています。



**図 2C.** TCA による血漿タンパク質の沈殿処理では、最適な Captiva EMR プレートベースの沈殿処理済みタンパク質のふるい分けのために、遠心分離処理が必要です。点線はタンパク質が検出されなかったことを示しています。

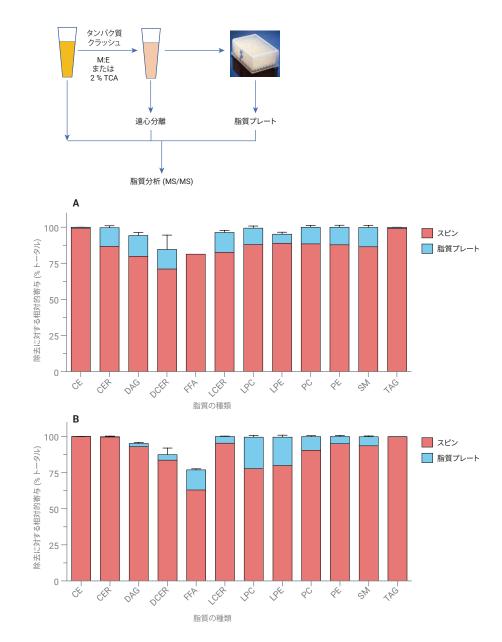
化および自動化を実現しました。結果として、M:E-ベースのタンパク変性沈殿処理の手順はより実用的で、自動化とより互換性があり、TCA-ベースの沈殿よりも優れた結果が得られることが示されました。

#### 脂質分析から示された Captiva プレートの効果的な脂質除去

脂質は、代謝物分析の精度と再現性に大き な課題をもたらします。脂質は固定相に付着 してカラム寿命を短くする傾向があるだけで なく、イオン抑制の重大な原因となって感度 の低下を引き起こす場合もあります。脂質は、 血漿中にさまざまな種類のものが大量に存在 し、非常に変わりやすい成分です。脂質の濃 度は、被験者間で異なるだけでなく、被験者 の食事やカロリー摂取量によっても異なりま す。脂質濃度は被験者間で変わるため、イオ ン抑制も変化し、LC/MS 測定の精度に影響 が及び、実験結果のばらつきが増大します。こ うした理由から、脂質除去をワークフローの 一部として統合することにしました。Captiva EMR-Lipid プレートでは、沈殿タンパク質の ふるい分けができるほか、LC/MS-ベースの 代謝物分析の前に脂質を除去することができ ます。脂質除去に対する Captiva EMR-Lipid プレートの相対的寄与を調べるために、M:E または 2 % TCA によるタンパク質沈殿と遠 心分離の後、また、遠心分離なしで Captiva EMR-Lipid プレートベースによって脂質除去 した後、プール血漿中の12の脂質クラスを MS/MS で分析しました (図 3)。図 2B で示 したように、2% を超える TCA 濃度では遠心 分離せずに Captiva EMR-Lipid プレートに適 用すると、一貫性が欠如しました。このため、 2% TCA を M:E-沈殿処理とともに使用して、 Captiva プレートによる血漿の脂質除去の効 率を評価しました。

12 の脂質クラスそれぞれの相対的除去を、未希釈の血漿で測定された濃度からの除去率として計算しました。この結果、Captiva EMR-Lipid プレートは、測定した 12 の脂質クラスのうち 2 つを除くすべてのクラスについて、ほぼ完全な除去を実現しました。脂質が多く残っている 2 つのクラスとは、ジアシルセラミド類

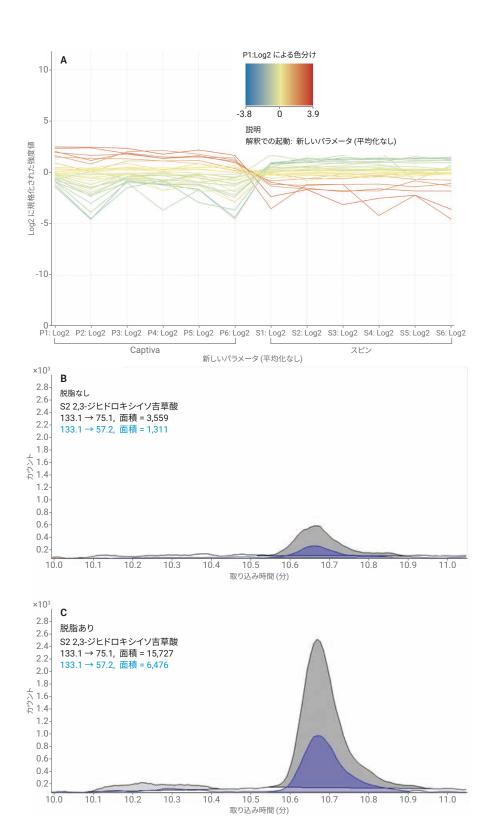
と遊離脂肪酸類ですが、これらは 75 % 以上 が除去されています。遊離脂肪酸類は血漿中 に比較的豊富に存在しますが、LC/MS 分析 におけるイオン抑制の候補物質になることは ほとんどありません。



**図 3.** M:E-ベース (A) および TCA-ベース (B) の沈殿処理についての MS/MS の結果は、Captiva EMR-Lipid 除去プレートが効率的に脂質を除去することを示しています。

重要なこととして、強力なイオン抑制物質であるリン脂質類が血漿サンプルから効率的に除去されたことが、測定結果から示されました。

dMRM によるプール血漿サンプルの代謝物の定量分析の上流に、このワークフロー全体を適用すると、再現性と感度に優れた代謝物分析を実現できることが判明しました。大半の代謝物の分析では、分取ワークフローにCaptiva EMR-Lipid プレートを含めた影響は見られなかったものの、全体として、脂質除去によって分析に大きな影響が出た代謝物は、信号強度が増大したことが示されました(図 4)。



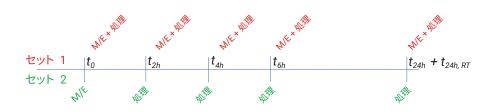
**図 4.** A に示されるように、ほとんどの代謝物が脂質除去による影響を受けていません。 しかし、2,3-ジヒドロキシイソ吉草酸 (B と C) に示されるように、いくつかの代謝物については脂質除去により 信号が大幅に向上します。

## M:E-ベースの血漿タンパク変性沈殿 処理により、サンプリング後の血漿中の 代謝物濃度が安定

M:E-媒介タンパク変性沈殿処理が血漿の代 謝物濃度をどの程度安定させることができる かを調べました。このために、4人のボランティ アから新鮮な血液を採取しました。実験の1 番目のセット (セット 1) では、血漿に対して、 すぐに、または氷の上で 2、4、6、24 時間後 に、同様に室温でも 24 時間後に、一連の M:E タンパク変性沈殿処理とサンプル処理を実行 しました。並行して、2番目のセット (セット2) では、血漿はすぐに M:E タンパク質沈殿処理 され、その後に氷の上で 2、4、6、24 時間後 と室温で 24 時間後にサンプル処理されまし た (図 5)。 つまり、セット 1 ではタンパク変性 沈殿処理とサンプル処理が遅延する場合に血 漿代謝物がどの程度変化するかを調査でき、 一方、セット 2 ではすぐに M:E タンパク質沈 殿処理をした後で遅れてサンプル処理すると セット 1 のような変化を回避できるかどうかを 調査できます。

これらの実験セットで実施された教師なし主成分分析では、個々の提供者によってデータが分かれることが示されました。これにより、代謝物の分析に関する限り、個人間のばらつ

きの方が、処理の遅延やタンパク変性沈殿処理を原因とするばらつきよりも大きい可能性が高いということが、強く示されました。



**図 5.** クエンチ処理と処理の遅延、またはクエンチ処理の遅延のいずれか、およびそれに続く処理に関して、 代謝物の安定性を調べるための実験計画

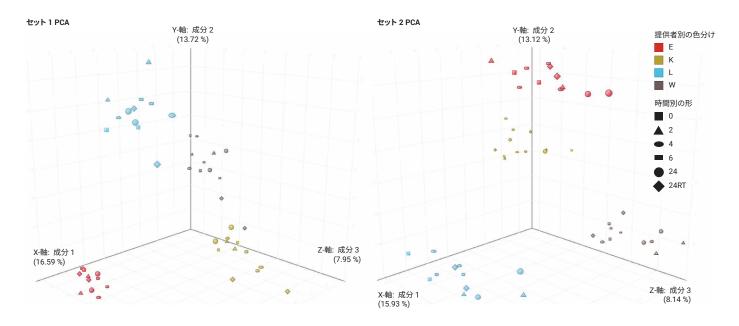


図 6. 個人ごとの経過時間によるクラスタリングを用いた PCA で示されるように、処理の遅延による代謝物の濃度への影響は、血漿をすぐにクエンチ処理した場合は最小でしたが (セット 2)、クエンチ処理も遅らせた場合には悪影響を示しています (セット 1)。代謝物プロファイルは個人によって異なります。

しかし、これはサンプル間の生物学的ばらつきであり、各個人の代謝物のアバンダンスを適切に分析するために保持しなければなりません。さらに、血漿源 (提供者)と時間 (遅延したタンパク変性沈殿処理とサンプル処理、または遅延したタンパク質沈殿処理) について、二元配置 ANOVA を使用してデータを調べました。この分析では、タンパク変性沈殿処理およびサンプル処理を組み合わせなかった場合に、遅延時間に基づき、定量値が大きく異なる合計 26 種類の代謝物がセット 1 にあることがわかりました。一方、即座の M:E タンパク変性沈殿処理 (セット 2) では定量値が大きく異なる代謝物が 8 種類少なくなりました (図 7)。

タンパク質が沈殿処理された血漿中の代謝物 の濃度は、24時間の期間では、血漿タンパク 質が沈殿処理されない場合よりも安定してい たことが、これらのデータによって示されてい ます。あらゆる生体分析ワークフローと同様 に、サンプルの処理と解析がほぼ同時の場合 に、血漿代謝物分析は生物学上の状態を最も 正確に反映します。Bravo でのオンサイトワー クフローはこの理想的なシナリオに対応でき るように設計されています。実環境において 即座のサンプル処理および分析は実現不可能 ですが、オフサイトの M:E 血漿タンパク変性 沈殿処理によってサンプリング後の血漿代謝 物濃度の変動を最小に抑える実践的な方法 を調査担当者に提供します。このシナリオで は、代謝物を抽出し分析する前に 100 µL の 血漿を 450 µL の M:E に分注して冷却 (冷凍) 保存できます。Bravo でのオフサイトワークフ ローはこのようなサンプルを処理するために 設計されています。

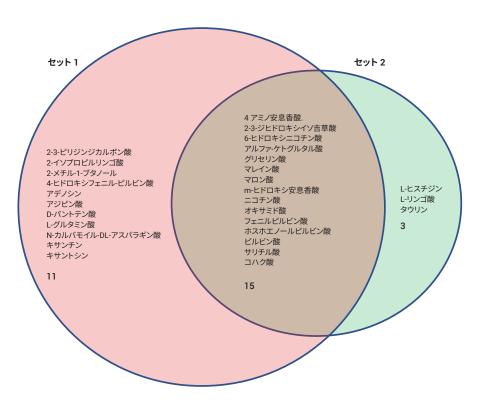


図7. 即座の M:E 沈殿処理 (セット 2) の結果は、血漿のクエンチ処理の遅延 (セット 1) と比較して時間経過において大きな違いを示す代謝物が少ないことを示しました。

#### 自動化ワークフローによる再現性の向上

酵素作用を効果的にクエンチングして代謝物 の濃度を安定させることができ、また自動化 に対応する再現性の高い血漿代謝物ワークフ ローを開発しました。自動化は、スループット の向上という明白な利点だけでなく、ラボ間、 プロジェクト間、スタッフ間、経時後における 再現性の向上という利点もあります。このプロ トコルを Bravo において一連の分析および 2 日間にわたって実行した場合の再現性が、ア ジレントの最も熟練した科学者が手作業で前 処理して得た結果と比べてどの程度であるか についても、事前に評価しました。図8のヒス トグラムは、2日間の自動および手動での前 処理に共通した再現性が最も高い 50 種類の 代謝物を示しています。Bravo ワークフロー は 50 種類すべての代謝物で 20 %CV 未満と なり、手動での前処理では 20 %CV (カットオ フ値) 未満の変動の代謝物は37種類でした。

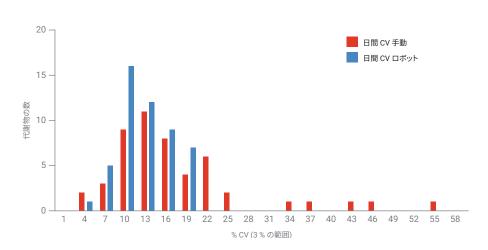


図8. 自動化ワークフローによる再現性の向上

表 1. 自動化ワークフローまたは手作業によってプールヒト血漿から抽出される代謝物 (次のページに続く)

	手作業でのサンプル前処理								自動化ワークフローでのサンブル前処理							
	1 日目 (ピーク面積)			2 日目 (ピーク面積) 日			日間の	1 日目 (ピーク面積)			2 日目 (ピーク面積)			日間の		
代謝物	平均値	標準偏差	%CV	平均値	標準偏差	%CV	%CV	平均値	標準偏差	%CV	平均値	標準偏差	%CV	%CV		
乳酸	538564	56314	10.46	533911	11689	2.19	6.32	564447	28684	5.08	560027	22601	4.04	4.56		
3-インドール酢酸	11785	1324	11.24	10706	1103	10.31	10.77	11523	776	6.73	13368	900	6.73	6.73		
ミオイノシトール	2344610	159752	6.81	2991103	175289	5.86	6.34	2735068	219292	8.02	2936028	199752	6.80	7.41		
タウロコール酸	1115	51	4.61	1079	96	8.92	6.77	1144	79	6.87	1369	113	8.26	7.56		
4-ピリドキシン酸	9444	1417	15.00	10320	822	7.96	11.48	11189	958	8.56	12121	945	7.79	8.18		
D-マンノース	252158	21894	8.68	275690	25477	9.24	8.96	287252	25463	8.86	316711	24325	7.68	8.27		
m-ヒドロキシ安息香酸/サリチル酸	149553	7050	4.71	153578	8532	5.56	5.13	130351	9432	7.24	186727	18494	9.90	8.57		
L-ソルボース	278839	35112	12.59	354144	27556	7.78	10.19	336469	38195	11.35	370177	21507	5.81	8.58		
D-パントテン酸	4083	1136	27.83	3886	400	10.29	19.06	4069	332	8.15	4881	445	9.12	8.64		
L-フェニルアラニン	283128	77958	27.53	325659	32187	9.88	18.71	345905	36227	10.47	374417	27184	7.26	8.87		
L-ロイシン/ L-イソロイシン	3298	551	16.72	3396	320	9.43	13.08	3737	388	10.38	3449	256	7.43	8.90		
マレイン酸	36110	9200	25.48	28250	1305	4.62	15.05	22717	2630	11.58	34292	2169	6.32	8.95		
L-トレオニン	7334	910	12.41	5119	683	13.35	12.88	6446	696	10.80	5816	416	7.15	8.97		
2-3-ジヒドロキシイソ吉草酸	1598	414	25.93	2043	182	8.92	17.42	2454	178	7.26	2722	331	12.15	9.70		
L-トリプトファン	78158	20582	26.33	48076	6398	13.31	19.82	73580	6687	9.09	64435	6718	10.43	9.76		
N-アセチル-D-グルコサミン 6-リン酸	7286	2350	32.26	10190	891	8.74	20.50	9016	1081	11.99	10428	878	8.42	10.21		
タウリン	10253	1227	11.97	7468	846	11.33	11.65	10069	1024	10.17	8506	898	10.56	10.37		
グリセリン酸	15329	4373	28.53	13975	1814	12.98	20.75	15089	2027	13.43	16926	1514	8.95	11.19		

代謝物	手作業でのサンプル前処理								自動化ワークフローでのサンプル前処理							
	1 日目 (ピーク面積)			2 日目 (ピーク面積)			日間の	1 日目 (ピーク面積)			2 日目 (ピーク面積)			日間の		
	平均値	標準偏差	%CV	平均値	標準偏差	%CV		平均値	標準偏差	%CV	平均値	標準偏差	%CV			
クレアチニン	9498	1832	19.29	9553	899	9.41	14.35	10038	1014	10.10	11055	1405	12.71	11.40		
2-3-ピリジンジカルボン酸	14843	954	6.43	10869	1873	17.23	11.83	11972	1370	11.45	16479	1903	11.55	11.50		
キサントシン	1478	446	30.16	1058	214	20.22	25.19	1185	149	12.59	1508	158	10.47	11.53		
L-メチオニン	15409	1228	7.97	15583	2112	13.56	10.76	17351	2277	13.13	15068	1552	10.30	11.71		
O-ヒドロキシ馬尿酸	6760	717	10.61	5168	537	10.40	10.51	6043	729	12.06	6842	812	11.87	11.97		
L-アラビノース	6209	784	12.62	7428	733	9.87	11.25	6481	799	12.33	7885	919	11.66	11.99		
N-アセチルノイラミン酸	3514	853	24.28	3967	632	15.93	20.11	4149	507	12.23	5166	612	11.85	12.04		
D-キシロース	4969	450	9.05	5154	734	14.25	11.65	5352	747	13.95	5513	614	11.13	12.54		
フェニルピルビン酸	3544	298	8.39	5352	524	9.80	9.10	3508	473	13.49	6752	833	12.34	12.91		
ウリジン	45844	5392	11.76	40848	4211	10.31	11.03	47620	9537	20.03	45493	2866	6.30	13.16		
L-シトルリン	2477	352	14.22	2159	335	15.50	14.86	2285	332	14.51	2383	306	12.85	13.68		
キナ酸	4925	2567	52.12	4480	799	17.84	34.98	4559	670	14.69	5374	701	13.05	13.87		
L-チロシン	33702	4266	12.66	28831	4269	14.81	13.73	30842	6468	20.97	30901	2235	7.23	14.10		
L-ホモセリン	2381	411	17.28	1838	289	15.71	16.49	2189	295	13.48	1750	263	15.04	14.26		
クレアチン	1997	226	11.31	1711	270	15.78	13.55	1931	326	16.89	2008	243	12.13	14.51		
メリビオース	1146	200	17.47	1032	166	16.09	16.78	1399	175	12.53	1172	194	16.58	14.55		
L-ヒスチジン	1374	308	22.41	1401	336	24.00	23.20	1298	205	15.76	1355	190	13.99	14.87		
ホモクエン酸	3600	343	9.51	3021	398	13.17	11.34	3220	498	15.47	3642	556	15.26	15.36		
D-マルトース	1989	326	16.41	1334	190	14.25	15.33	2137	392	18.34	1610	202	12.55	15.45		
L-セリン	1401	202	14.43	1006	291	28.96	21.70	1249	241	19.28	1229	147	11.99	15.64		
ピルビン酸	4063	942	23.19	5897	670	11.35	17.27	5172	770	14.89	7716	1464	18.98	16.94		
L-キヌレニン	11609	3218	27.72	10583	1532	14.47	21.10	10858	1886	17.37	12949	2192	16.93	17.15		
ウリジン 5-ジホスホグルコース	1603	91	5.65	1270	527	41.49	23.57	1469	281	19.14	1527	234	15.35	17.24		
2-デオキシ-D-グルコース 6-リン酸	285	195	68.33	430	74	17.29	42.81	577	91	15.83	601	116	19.26	17.55		
ヒポキサンチン	7204	898	12.47	6602	885	13.40	12.94	8481	2208	26.04	7072	708	10.01	18.02		
DL-グリセルアルデヒド 3-リン酸	1234	791	64.11	1326	162	12.23	38.17	1223	281	22.95	1284	168	13.12	18.04		
2-メチル-1-ブタノール	3509	767	21.86	5048	610	12.08	16.97	4389	695	15.84	6756	1521	22.51	19.17		
D-グルコース 6-リン酸	1429	1059	74.08	1502	263	17.50	45.79	1551	343	22.09	1545	254	16.41	19.25		
D-フルクトース 6-リン酸	1429	1059	74.08	1390	506	36.42	55.25	1551	343	22.09	1538	254	16.53	19.31		
L-リンゴ酸	241628	75100	31.08	47815	5129	10.73	20.90	67521	13788	20.42	75067	13683	18.23	19.32		
ニコチン酸	568	189	33.20	461	325	70.46	51.83	772	148	19.22	941	183	19.45	19.34		

# 結論

M:E-ベースのタンパク変質沈殿処理はCaptiva EMR-Lipid プレートベースの除去に適しており、血漿でのクエンチングに効果的であるという結果が得られました。TCA はタンパク質の沈殿については効果的でしたが、実験時間の経過中の変化に悪影響を及ぼしました。これは、いくつかの種類の代謝物のイオン化や化学的変化に関する影響が原因と考えられます (データは示していません)。さらに、TCA を介したタンパク変性沈殿処理で、一貫性のあるフロースルーを実現するためには、Captiva EMR-Lipid プレート脂質除去の前に追加の遠心分離ステップが必要になりました。

M:E ベースのタンパク変性沈殿処理により、 サンプリング後の代謝物の濃度の変化を最 小限に抑えることができます。この方法を Captiva EMR-Lipid プレートと組み合わせる ことで、LC/MS 分析に先立つタンパク質除 去、脂質除去、代謝物抽出のための効果的 なワークフローが実現しました。最終的に、 Bravo で新鮮な血漿サンプル (オンサイトワー クフロー)または M:E-沈殿処理された血漿サ ンプル (オフサイトワークフロー) からのサン プル処理ワークフローの自動化を実現できま す。Bravo による自動化によって、ラボ間、プ ロジェクト間、スタッフ間、時間経過における 再現性について明確な利点のあるプロトコル が標準化されました。自動化ワークフローに よって実現するスループットの向上は、大規模 なトランスレーショナルおよび長期的研究にお ける明確な利点となります。

### 参考文献

- La Frano, M. R.; et al. Impact of postcollection freezing delay on the reliability of serum metabolomics in samples reflecting the California mid-term pregnancy biobank. Metabolomics 2018, 14, 151.
- Bruce, S. J.; et al. Investigation of Human Blood Plasma Sample Preparation for Performing Metabolomics Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. Anal. Chem. 2009, 81, 3285.
- The Agilent Metabolomics Dynamic MRM Database and Method. Agilent Technologies Technical Note, publication number 5991-6482,
  2016.

ホームページ

#### www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ

0120-477-111

email\_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、 医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。 本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに 変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社 © Agilent Technologies, Inc. 2019 Printed in Japan, March 6, 2019 5994-0685JAJP

