

コアファシリティ重点運用機器「Orbitrap Exploris 240 UHPLC-MS」の運用 状況および、現在の取り組みについて

○小川直也¹、高濱謙太郎^{1,2}

¹分析・物質技術支援室 組成分析・構造解析技術グループ

²設備・機器共用推進室

概要

東海国立大学機構は、令和3年度に「先端研究基盤競争促進事業（コアファシリティ構築支援プログラム）」に採択され、優れた研究設備・機器を広く機構内外で共用できる体制の構築を進めている。その中でも、技術職員が主体となって運用し、稼働時間の全てを学内外への共用に充てることのできるコアファシリティ重点運用機器の一つとして、「Orbitrap Exploris 240 UHPLC-MS（以下、Orbitrap）」を令和4年度に導入した。本装置は高い分解能と精度を備えた質量分析計であり、様々な分野の研究に極めて有用な汎用研究機器である。また、機器担当の技術職員と技術相談等のマネジメントを担当するコアファシリティアドミニストレータ（CFA）と緊密に連携し、充実した研究支援を継続的に実施している。その結果、順調に利用実績を伸ばし、研究支援の成果をあげている。

1 コアファシリティ重点運用機器とは

東海国立大学機構は令和3年度に文部科学省「先端研究基盤共用促進事業（コアファシリティ構築支援プログラム）」に採択されている。コアファシリティ構築支援プログラムとは、大学・研究機関が組織として継続的に、優れた研究設備・機器を戦略的に整備・活用し、全ての研究者がより研究に打ち込める環境を実現するために、新たな共用システムの成果を発展させ、研究機関全体の研究基盤として戦略的に導入・更新・共用する仕組みを強化（コアファシリティ化）するとともに、研究設備・機器のサポート・維持管理に必要不可欠な技術職員の組織的な育成・確保に取り組んでいく事業である^[1]。現在、コアファシリティ重点運用機器として5台の装置が導入されており、これらの装置は、技術センター所有の装置として技術職員が主体となって運用し、稼働時間のほぼ全てを共用に充てている。特に、Orbitrapは重点運用機器として最初に導入され、現在最も成果を上げている装置となっている（図1）。



図1. Orbitrap Exploris 240

2 利用促進の取り組み

Orbitrap は令和4年度の4月から正式な運用を開始しているが、CFAと連携して利用促進の取り組みを行ってきた。測定事例を「アプリケーションノート」や「Data Report」といった形でメールでの配信や統括技術センターのホームページに掲載している^[2] (図2、3)。標準試料等を使用し、測定条件や分析結果をまとめた資料となっている。需要があると見込んだ試料(アミノ酸・神経伝達物質・脂質等)の分析事例を紹介しており、利用者の増加に繋がっている。また、測定代行業務の流れの中で、CFAと緊密に連携することで、技術相談から測定結果の解析のサポートまで十分な研究者支援を可能としてきた。

Application Note
Orbitrap Exploris 240 UHPLC-MS

東海国立大学機構
統括技術センター
全学共用機器

アミノ酸分析用カラムを用いた非誘導体化アミノ酸の分析

分析の特徴

- アミノ酸分析専用カラムを用い、疎相・イオン交換クロマトグラフで非誘導体化アミノ酸を分離し、精密質量を測定した。
- アミノ酸分析専用カラムメーカー推奨条件でLC分離を行い、20種類の必須アミノ酸全てを質量分析計で計測することができた。

協力

名古屋大学生命農学研究所
栄養生化学研究室
北浦慎之講師

参考文献

- Anal Sci (2016) 32:893-900.
- Mass Spectrom Lett (2018) 9:30-36.
- J Chromatogr B (2019) 1124:72-81.

問い合わせ先

物質・分析技術支援室
担当職員 小川直也、河合ゆかり
E: masssupport@agr.nagoya-u.ac.jp

概要

アミノ酸分析はHPLCで分離分析する前後に発色、または、蛍光試薬で誘導体化して検出する方法が一般的である。しかし、誘導体化反応が定量的に行きない、あるいは、誘導体化アミノ酸の安定性が低いことが問題になる場合には、非誘導体化アミノ酸を直接LC-MSで分析する方法が用いられる¹⁾。

Intakt社の非誘導体化アミノ酸専用カラムは、シリカを基材とした疎相・イオン交換カラムである。必須アミノ酸標準試料液を溶剤液A 100%アセトニトリル/0.3%酢酸と溶剤液B 2.0%アセトニトリル/8.0% 100mM 酢酸アンモニウムで濃度勾配で分離し、ESI法でイオン化して質量分析を行った。

その結果、20種類のアミノ酸全てを分離し、質量分析で計測することができた。

図1. Intakt社 IntraAmino Acidカラム

Application Note
Orbitrap Exploris 240 UHPLC-MS

バイオサイエンス
アミノ酸分析

アミノ酸分析専用カラムを用いた非誘導体化アミノ酸の分析

アミノ酸標準試料

シグマアルドリッチのアミノ酸標準試薬 (AAS18) にグルタミン、アスパラギン、トリプトファンを加え、各アミノ酸の濃度が各10 μMになるよう希釈し、測定量5 μLを使用した。

LC分析

- Intakt Amino Acid #WAA24 疎相カラム (粒径3.0 μm, 2.0 mm × 100 mm)
- カラムオープン: 37°C
- 流速: 600 μL/min
- 移動相 A: 100% アセトニトリル / 0.3% 酢酸
- 移動相 B: 20% アセトニトリル / 80% 100 mM 酢酸アンモニウム
- 濃度勾配 20 % B × 4 min
20 → 100 % B × 10 min
100 % B × 2 min

MS条件

- イオン化法: ESI 法
- 測定モード: ポジティブ
- スプレー電圧: 3500 V
- 脱溶媒温度 350°C
- MSフルスキャン分解能 30,000
- フルスキャン範囲 50 - 400 m/z

結果

20種類のアミノ酸の [M+H]⁺イオンが検出された。各アミノ酸 50 pmolで得られたEICのピーク強度は5.0E+4 ~ 2.0E7であった (図2)。

図2. 各アミノ酸の検出イオンクロマトグラム

図2. アプリケーションノート

DATA REPORT No. 7, Oct. 31, 2023 Orbitrap Exploris 240 UHPLC-MS

LC/MSによるプロスタグランジン及び脂肪酸の分析

分離装置	Thermo Fisher Scientific Vanquish UHPLC		
使用カラム	Thermo Scientific Accuzone Vanquish C18 UHPLC column (内径 2.1 mm × カラム長 150 mm, 粒径 1.5 μm)		
溶剤液A	CH ₃ CN: 4.2%	溶剤液B	CH ₃ CN: 84%
	CH ₃ OH: 0.75%		CH ₃ OH: 15%
	H ₂ O: 94.99%		HC ₂ OOH: 1%
カラム温度	40°C		
流速	0.3 mL/min		
イオン化法	ESI		
グラジエント条件	21%B (0-1 min), 21-26%B (1-1.5 min), 26-51%B (1.5-10 min), 51-66%B (10-19 min), 66-98%B (19-23 min), 98% (23-27 min)		
インジェクション量	5 μL (Standard samples 1 μM each in CH ₃ OH)		

参考文献

- Development of an Optimized LC-MS Method for the Detection of Specialized Pro-Resolving Mediators in Biological Samples. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00169>

問い合わせ先 全学技術センター分析・物質技術支援室 小川直也、真道藤夫
E: mass-support@agr.nagoya-u.ac.jp

図3. Data Report

3 運用実績

令和4年度のOrbitrapの総利用時間は157時間であった（図4）。四半期毎の利用時間を確認したところ、第1四半期と第2四半期はほぼ同等の利用時間であるが、第3四半期は第2四半期までの約2倍、第4四半期は第3四半期の約2.5倍に増加している。このことから、運用開始から時間を経過することで、徐々にユーザーからの利用時間が増加していることが確認できる。次に令和5年度の総利用時間だが、令和4年度と比較すると大幅に増加しており、約5倍弱となる746時間であった。令和5年度の四半期毎の利用時間は、卒業論文や修士論文の執筆を控えた第3四半期が最も多く、それ以外の四半期はほぼ同等との結果が得られた。

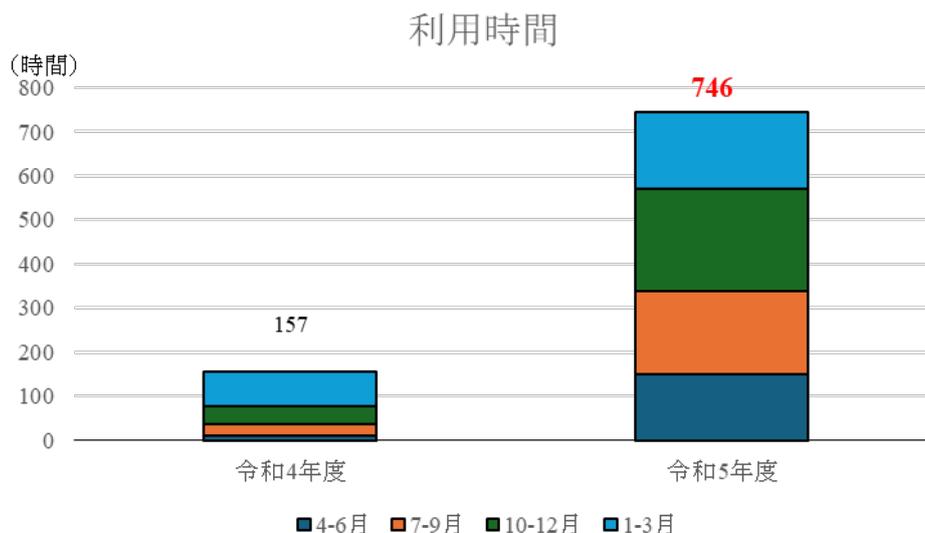


図4. 利用時間

また、令和4年度のユーザー属性に対応して利用時間の内訳を確認したところ、本装置が敷地内にある名古屋大学大学院生命農学研究科・農学部に所属する研究者からの利用時間が117時間と大半を占めており、それ以外の研究科等である機構内からの利用が40時間であった（図5）。令和5年度についても同様ユーザー属性に対応して利用時間の内訳を見ると、名古屋大学大学院生命農学研究科・農学部に所属する研究者からの利用時間が666時間となり、大幅に増加している。また、機構内からの利用は若干増加傾向を示しているが前年度とほぼ同等であった。特筆すべき点としては、令和4年度には無かった他大学等を示す機構外（非営利）からの利用が38時間あった。令和5年度になり大幅に利用時間が増加した要因としては、利用促進等によってOrbitrapの学内認知度が一定レベルで向上した為だと考えられる。名古屋大学大学院生命農学研究科・農学部に所属する研究者からの利用時間が大幅に上昇した一方、それ以外の部局からの利用は伸び悩んでいるように見られる。これは、名古屋大学大学院生命農学研究科・農学部以外へのアピールの弱さを示していると考えられ、令和6年度には一層の情報発信が必要であると思われる。更に、機構外（非営利）のユーザーについて分析すると、学内ユーザーからの紹介である所謂「ロコミ」が40%、残り60%が東海国立大学機構設備・機器共用システムを見て担当者にコンタクトをとってきたものであった。また、利用者の殆どが愛知県内の組織に所属していた。このことから、WEBページの一層の充実化を図ると共に、地域に向けた情報発信が今後重要になると考えている。

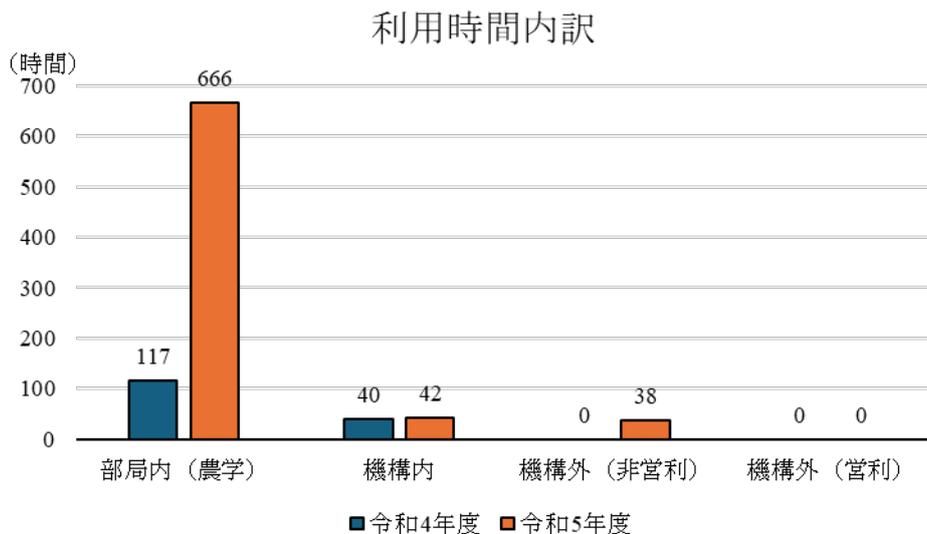


図5. 利用時間内訳

4 事例紹介

運用開始以降、様々なサンプルの測定を行ってきたが、その中で最も技術相談が多い測定の一つはアミノ酸の定量測定である。本装置が名古屋大学大学院生命農学研究科・農学部の敷地内にあることもあり、動物の血漿や血清、食品等に含まれているアミノ酸の測定依頼が多くある。特に、微量なアミノ酸を、誘導体化等を経ることなく迅速に測定したいという相談があり、その需要に対応するため、Imtakt 社製の非誘導体化アミノ酸カラム「Intrada Amino Acid (2 x 100 mm、3 μm)」を所有しており、こちらのカラムを使用してアミノ酸の測定を行ってきた。

アミノ酸を質量分析装置で測定する際、ピーク面積にばらつきが生じ正確な定量ができないといった問題がある。「アミノ酸混合標準液，H型（富士フイルム 和光純薬株式会社）」を標準サンプルとして 10 nM～1 mM にそれぞれ調製し、測定を行った³⁾。このデータを用い定量解析ソフトの「TraceFinder 5.1」を使用して絶対検量線法による検量線を作成したところ、検量線が大きな曲線を描く結果となっている（図 6）。標品の定量値（Calc Amount）を確認すると、設定値（Std Amount）から大きく外れている結果が広い濃度範囲で生じている（表 1）。したがって、アミノ酸を定量測定する場合は、ピーク面積のばらつきを抑制する必

表1. 絶対検量線法による検量線データ

Level	Std Amount	Std Area	Calc Amount	Units
L1	0.01	32040	0.011	uM
L2	0.04	153631	0.051	uM
L3	0.1	428064	0.143	uM
L4	0.4	1986148	0.664	uM
L5	1	4403653	1.472	uM
L6	4	20955421	7.022	uM
L7	10	50628190	17.035	uM
L8	40	184368462	63.214	uM
L9	100	358077189	126.037	uM
L10	400	966459322	381.378	uM
L11	1000	1795821709	1009.179	uM

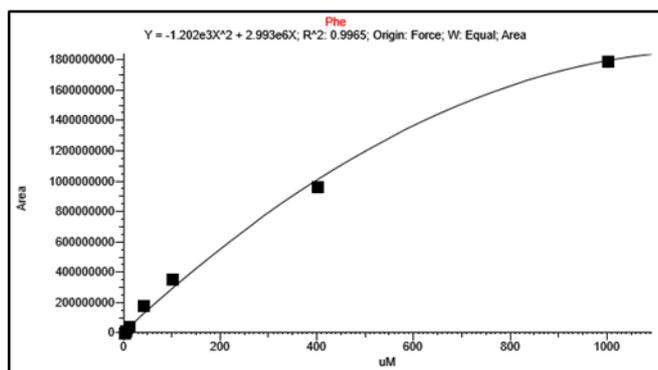


図6. 絶対検量線法により作成したフェニルアラニン（Phe）の検量線

要がある。

ピーク面積のばらつきを抑制するために、当分析室では、¹³C,¹⁵N 同位体標識アミノ酸混合物水溶液を内部標準として使用し、内部標準法による検量線の作成を行っている。こちらは全て ¹³C,¹⁵N に標識化されたアミノ酸混合液となっている。内部標準をサンプルに添加し、同様に測定したデータを「TraceFinder 5.1」を使用して内部標準法による検量線を作成したところ、検量線の直線性は高い結果となった（図7）。また、標品の定量値（Calc Amount）を確認すると、設定値（Std Amount）との誤差は広い範囲で小さくなっている（表2）。同位体標識されたアミノ酸を内部標準として使用することで、ピーク面積のばらつきによる影響を抑制することができ、質量分析装置を用いた測定で精度の高い定量値を求めることが可能としている。

表2. 内部標準法による検量線データ

Level	Std Amount	Std Area	Calc Amount	Units
L1	0.01	32040	0.012	uM
L2	0.04	153631	0.058	uM
L3	0.1	428064	0.099	uM
L4	0.4	1986148	0.416	uM
L5	1	4403653	0.993	uM
L6	4	20955421	4.061	uM
L7	10	50628190	9.788	uM
L8	40	184368462	42.939	uM
L9	100	358077189	98.713	uM
L10	400	966459322	400.019	uM
L11	1000	1795821709	1000.005	uM

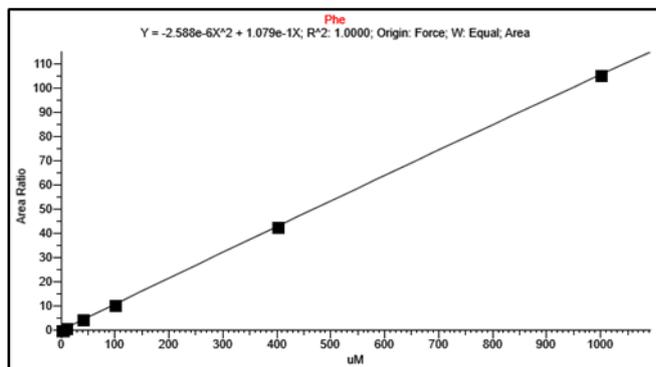


図7. 内部標準法により作成したフェニルアラニン（Phe）の検量線

5 まとめ

Orbitrap は令和4年度より正式に運用が開始され、時間経過とともに利用時間が増加している。また、令和5年度の総利用時間は令和4年度と比較すると約5倍増加している。その要因としては、利用促進等によって Orbitrap の学内認知度が一定レベルで向上した為だと考えられる

今後の課題としては、名古屋大学大学院生命農学研究科・農学部以外の利用時間を増やしていくことである。CFA と緊密に連携し、WEB ページの一層の充実化を図ると共に、地域に向けた情報発信を行っていく必要がある。

参考文献

- [1] 国立研究開発法人科学技術振興機構 先端研究基盤共用促進事業 コアファシリティ構築支援プログラム <https://www.jst.go.jp/shincho/program/corefacility.html> (2024年3月13日 最終閲覧)
- [2] 東海国立大学機構 統括技術センター アプリケーションノート & 測定事例 https://www.tech.thers.ac.jp/application_notes/ (2024年3月13日 最終閲覧)
- [3] Imtakt Technical Information No. TI770E, <https://www.imtakt.com/TecInfo/TI770E.pdf>