

極性代謝物に最適化された 探索メタボロミクス LC/MS メソッド

著者

Yuqin Dai and Jordy J. Hsiao
Agilent Technologies, Inc.

概要

高 pH と低 pH の親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) メソッドを開発して、多くの一般的な内因性代謝物クラスの包括的な分析を実現しました。本メソッドは、高分離能、精密質量の LC/Q-TOF 質量分析装置 (MS) で使用するために開発されました。目的の代謝物クラスには、ビタミン類、アミノ酸類、ポリアミン類、糖類、糖リン酸類、有機酸類、ヌクレオチド類、コエンザイム A (CoA) 誘導体類が含まれています。LC グラジエントおよびイオン源を系統的に最適化して、異性体の適切なクロマトグラフィー分離を実現し、調査したすべての代謝物クラスで最適な信号応答を得ました。この手法の堅牢性を実証するために、HILIC LC/Q-TOF MS メソッドを使用して酵母抽出物を 25 時間の分析時間にわたり評価しました。

はじめに

LC/Q-TOF MS は、生体内の低分子の包括的な特性評価を目標とする探索研究のためのメタボロミクスにおいて日常的に使用されています。アンターゲットの質量分析に基づくメタボロミクスは、非常に多くの分子特性を導き出します。しかし、メタボロミクスの同定プロセスに起因する問題のために、各分子特性の高い信頼度でのアノテートおよび同定を実現できない可能性があります。検出された質量電荷比 (m/z) 信号は多くの場合、精選された代謝物データベースから推定された代謝物に割り当てられます。このため、代謝物を確実に同定するには、信頼のおける標準物質から得られるリテンションタイムや MS/MS フラグメンテーションのスペクトルなどの追加の物理的情報が必要です。¹ しかし、イオン性代謝物のリテンション、生体関連異性体、広い範囲の代謝物クラスのクロマトグラフィー分離を含む、極性代謝物の問題は残ったままです。

これらの問題に対処するために、メタボロームプロファイリングの分析性能を向上させる高 pH と低 pH の HILIC LC/Q-TOF MS メソッドを開発しました。広い範囲の代謝物（ビタミン類、アミノ酸類、ポリアミン類、単糖類、二糖類、糖リン酸類、有機酸類、ヌクレオチド類、CoA 誘導体類、酸化還元代謝物類を含む）を、クロマトグラフィーメソッド開発のための代表的な分析対象化合物として使用しました。さらに、広範なクラスの調査対象代謝物で最良の分析感度が得られるように、AJS (Agilent Jet Stream) イオン源の条件を最適化しました。最後に、酵母抽出物を使用して、このメソッドでの再現性、質量真度、同位体忠実度などの分析性能を実証しました。

実験方法

メソッド

HILIC LC/Q-TOF MS メソッド開発のために、さまざまな化学物質クラスおよび 20 ペアの生体関連異性体を含む代謝物標準を選択しました。表 1 に記載したように、クロマトグラフィー分離は、2 つの異なる溶媒システムを使用し、Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラム、2.1 mm × 150 mm、2.7 μm、PEEK ライナ付き (p/n 673775-924) で実行しました。

LC/MS 分析には LC/MS グレードアセトリルと Milli-Q 精製水を使用しました。表 1 に、溶媒バッファ調製のための詳細な手順を示します。

極性イオン性代謝物のシステム内の微量レベルの金属への結合を最小に抑えるために、InfinityLab ピークシャープナー（不活性化添加剤、p/n 5191-4506）を高 pH 移動相に添加しました。²

表 1. LC/MS 分析用の移動相の調製

	イオン化極性	10X 原液バッファ	移動相 A	移動相 B	移動相添加物
高 pH メソッド	ネガティブイオンモード (有機酸類、糖リン酸類、 ヌクレオチド類、 CoA 誘導体類など)	100 mM 酢酸アンモニウム、pH 9.0、 (水酸化アンモニウムで調整)	100 mL 原液バッファを 900 mL の水と混合	100 mL 原液バッファを 50 mL の水および 850 mL の ACN と混合	不活性化添加剤を移動相 A と B の両方に 添加して最終濃度を 2.5 μM とする
低 pH メソッド	ポジティブイオンモード (アミノ酸類、ビタミン類、 ポリアミン類)	100 mM ギ酸アンモニウム	100 mL 原液バッファを 900 mL の水と混合	100 mL 原液バッファを 900 mL の ACN と混合	ギ酸を移動相 A と B の両方に添加して 最終濃度を 0.1 % (v/v) とする

装置構成

LC/MS 分析には、Agilent 1290 Infinity II LC と Agilent Jet Stream イオン源付 Agilent 6545 LC/Q-TOF を組み合わせて使用しました。LC は次のモジュールで構成されています。

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプリング、サーモスタット付き (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (MCT) (G7116B)

リファレンス質量の追加には、イソクラティックポンプ (G1310A) と 100:1 スプリッタ (G1607-60000) を使用しました。ダイナミック質量軸補正は、リファレンス質量溶液を連続注入することによって実施しました。表 2 および 3 に、LC と MS の最適条件を示します。データの取り込みと解析には Agilent MassHunter ソフトウェアを用いました。

表 2. 最適な LC パラメータ

Agilent 1290 Infinity II LC システム																																												
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 mm × 150 mm, 2.7 μm, PEEK ライナ付き (p/n 673775-924)																																											
	ポジティブイオンモード	ネガティブイオンモード																																										
溶媒	A) 10 mM 酢酸アンモニウムの水溶液と 0.1 % 酢酸 B) 10 mM 酢酸アンモニウムの水/ACN 10:90 (v/v) 溶液と 0.1 % 酢酸	A) 10 mM 酢酸アンモニウムの水溶液と 2.5 μM InfinityLab 不活性化添加剤、pH = 9 B) 10 mM 酢酸アンモニウムの水/アセトニトリル 15:85 (v/v) 溶液と 2.5 μM InfinityLab 不活性化添加剤、pH = 9																																										
非直線グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>98</td></tr> <tr><td>3</td><td>98</td></tr> <tr><td>11</td><td>70</td></tr> <tr><td>12</td><td>60</td></tr> <tr><td>16</td><td>5</td></tr> <tr><td>18</td><td>5</td></tr> <tr><td>19</td><td>98</td></tr> <tr><td>20</td><td>98</td></tr> </tbody> </table>	時間 (分)	%B	0	98	3	98	11	70	12	60	16	5	18	5	19	98	20	98	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>96</td></tr> <tr><td>2</td><td>96</td></tr> <tr><td>5.5</td><td>88</td></tr> <tr><td>8.5</td><td>88</td></tr> <tr><td>9</td><td>86</td></tr> <tr><td>14</td><td>86</td></tr> <tr><td>17</td><td>82</td></tr> <tr><td>23</td><td>65</td></tr> <tr><td>24</td><td>65</td></tr> <tr><td>24.5</td><td>96</td></tr> <tr><td>26</td><td>96</td></tr> </tbody> </table>	時間 (分)	%B	0	96	2	96	5.5	88	8.5	88	9	86	14	86	17	82	23	65	24	65	24.5	96	26	96
時間 (分)	%B																																											
0	98																																											
3	98																																											
11	70																																											
12	60																																											
16	5																																											
18	5																																											
19	98																																											
20	98																																											
時間 (分)	%B																																											
0	96																																											
2	96																																											
5.5	88																																											
8.5	88																																											
9	86																																											
14	86																																											
17	82																																											
23	65																																											
24	65																																											
24.5	96																																											
26	96																																											
ポストタイム	4 分	3 分																																										
カラム温度	25 °C	50 °C																																										
流速	0.25 mL/min																																											
注入量	3 μL																																											
オートサンプリング温度	4 °C																																											

表 3. 最適化された MS パラメータ

Agilent 6545 LC/Q-TOF		
イオン化極性	ポジティブ	ネガティブ
イオン化モード	デュアル AJS	デュアル AJS
ガス温度	225 °C	225 °C
ドライガス	6 L/min	13 L/min
ネブライザ圧力	40 psi	35 psi
シースガス温度	225 °C	350 °C
シースガス流量	10 L/min	12 L/min
キャピラリー電圧	3,000 V	3,500 V
ノズル電圧	0 V	0 V
フラグメンタ電圧	125 V	125 V
スキマ電圧	65 V	45 V
オクタポール 1 RF 電圧	450 V	750 V
取り込み範囲	<i>m/z</i> 50 ~ 1,000	<i>m/z</i> 60 ~ 1,600
MS 取り込みレート	1 スペクトル/秒	1 スペクトル/秒
参照質量	<i>m/z</i> 922.009798	<i>m/z</i> 68.9957 <i>m/z</i> 980.0163

結果と考察

2つの堅牢かつ高性能の HILIC LC/MS メソッドを、Agilent HILIC-Z カラムを用いて開発しました。HILIC-Z カラムを使用する利点には、分析対象化合物の優れたピーク形状、高塩濃度耐性、クロマトグラフィーでの良好なリテンションタイムの再現性、広い pH 安定性があります。³ 広い代謝物クラスに包括的に対応するために、ポジティブイオンとネガティブイオンの両方のモードのメソッドを開発しました。ビタミン類、アミノ酸類、ポリアミン類を包含する3つの主要な代謝物クラスの検出を容易にするために、低 pH 移動相バッファをポジティブイオンモード用に最適化しました (図 1)。同様に、アミノ酸類、糖類、糖リン酸類、有機酸類、ヌクレオチド類、エネルギーおよび酸化還元代謝物類、CoA 誘導体類を含む7つの主要代謝物クラスを使用し、高 pH 移動相バッファをネガティブイオンモード用に最適化しました (図 2)。ポジティブおよびネガティブの両イオンモード分析のための単一移動相条件使用のオプションを調べるために、ポジティブイオンモードでのアミノ酸類、ビタミン類、ポリアミン類の検出のための高 pH の移動相バッファを調査しました。調査結果は、低 pH 移動相により、アミノ酸類、ビタミン類、ポリアミン類でより良好なピーク形状と信号強度が得られたことを示す、以前に発行されたデータと一致しました。³ このように、高 pH と低 pH のメソッドの使用によって最大限に、代謝物クラスの範囲を広げ、分析感度を向上させることができます。

これらの最適化されたメソッドを用いると、15 ペアの生体関連異性体をクロマトグラフィー分離できます (図 3 の例を参照)。15 ペアの中には、ロイシン (Leu) およびイソロイシン (Ile)、2-ホスホグリセリン酸 (2-PG) と 3-ホスホグリセリン酸 (3-PG)、イソペンテンニルニリン酸 (IPP) とジメチルアリル

ニリン酸 (DMAPP)、果糖とブドウ糖とイノシトール、グルコース-1-リン酸 (G-1-P) とグルコース-6-リン酸 (G-6-P)、5'-ADP と 3',5'-ADP が含まれています (図 3)。表 4 および 5 は、調査した類似質量を持つ構造異性体と代謝物の完全なリストを示しています。

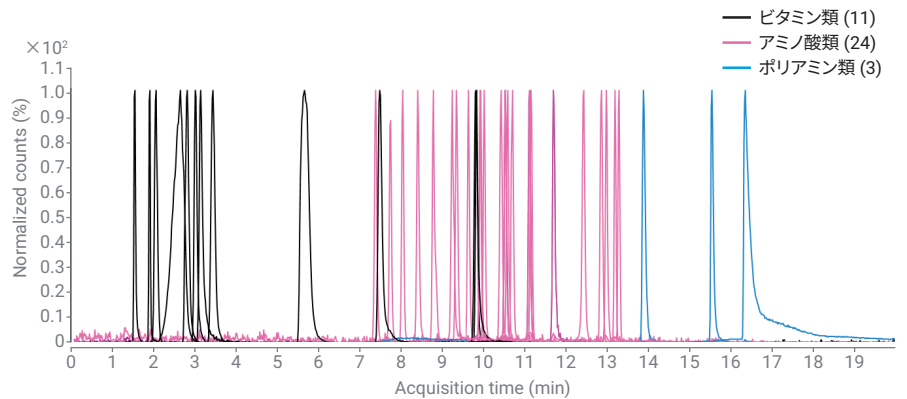


図 1. 低 pH 移動相バッファを用いた、ポジティブ分析モードでの 38 代謝物標準の抽出イオンクロマトグラム (EIC) の重ね表示

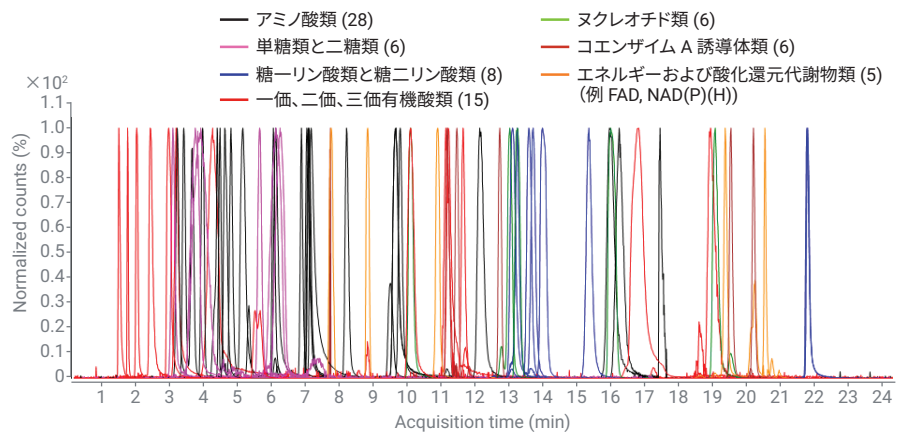


図 2. pH 9.0 移動相バッファを用いた、ネガティブ分析モードでの 74 代謝物標準の EIC の重ね表示

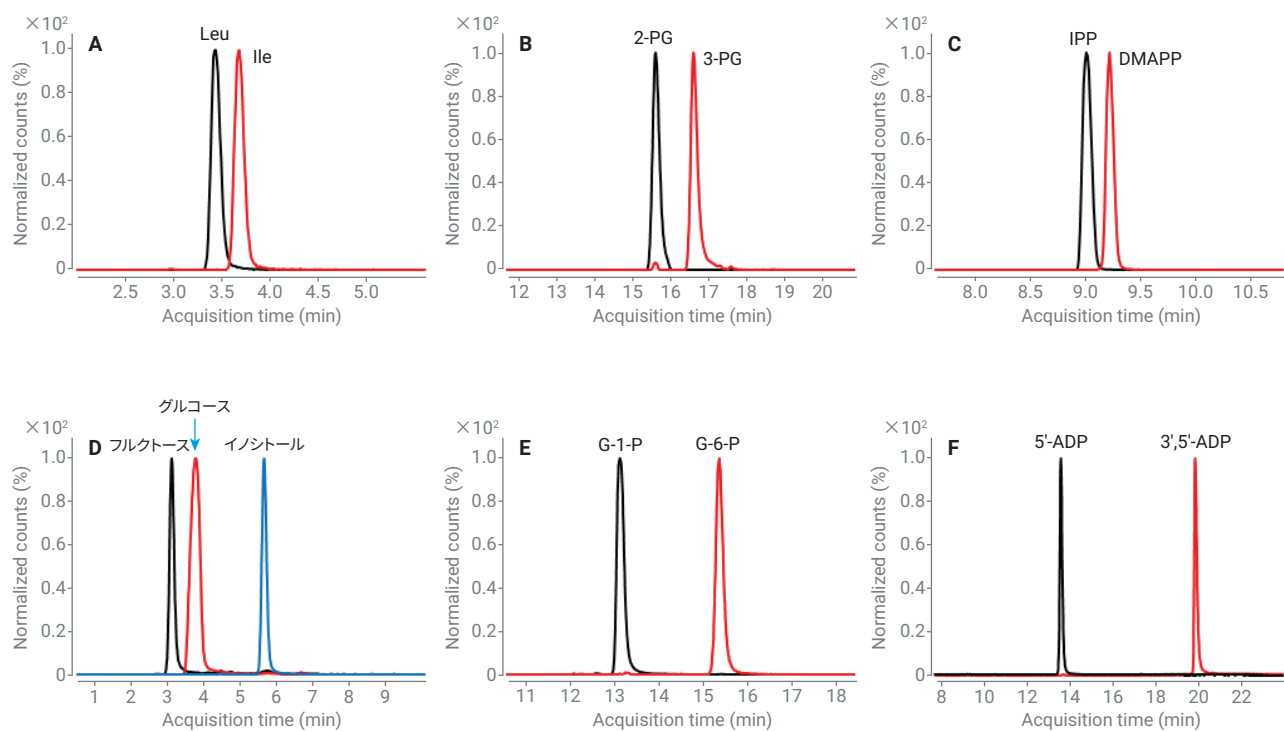


図 3. 生体関連異性体の 6 グループのクロマトグラフィー分離を示す EIC の重ね表示

表 4. 構造異性体の分離

No.	代謝物	化学式	分子量	極性	分離
1	β-アラニン/L-アラニン/L-サルコシン	C ₃ H ₇ NO ₂	89.0477	Pos/Neg	分離
2	L-α-アミノ-n-酪酸/D, L-β-アミノイソ酪酸	C ₄ H ₉ NO ₂	103.0633	Pos/Neg	分離
3	マレイン酸/フマル酸	C ₄ H ₄ O ₄	116.0110	Neg	分離
4	メチルマロン酸/コハク酸	C ₄ H ₆ O ₄	118.0266	Neg	分離
5	L-ロイシン/L-イソロイシン	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.0946	Pos/Neg	分離
6	O-アセチル-L-セリン/L-グルタミン酸	C ₅ H ₉ NO ₄	147.0532	Neg	分離
7	ジヒドロキシアセトンリン酸/グリセルアルデヒド3-リン酸	C ₃ H ₇ O ₆ P	169.9980	Neg	分離
8	cis-アコニット酸/trans-アコニット酸	C ₆ H ₆ O ₆	174.0164	Neg	分離
9	果糖/ブドウ糖またはガラクトース/イノシトール	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.0634	Neg	分離
10	ブドウ糖/ガラクトース	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.0634	Neg	共溶出
11	2-ホスホグリセリン酸/3-ホスホグリセリン酸	C ₃ H ₇ O ₇ P	185.9929	Neg	分離
12	クエン酸/イソクエン酸	C ₆ H ₈ O ₇	192.0270	Neg	部分分離
13	イソペンテニルピロリン酸 (IPP) /ジメチルアリルニリン酸 (DMAPP)	C ₅ H ₁₂ O ₇ P ₂	246.0058	Neg	分離
14	α-グルコース-1-リン酸/D-グルコース-6-リン酸	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	260.0297	Neg	分離
15	フルクトース-6-リン酸/フルクトース-1-リン酸	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	260.0297	Neg	分離
16	α-D-マンノース-1-リン酸/D-マンノース-6-リン酸	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	260.0297	Neg	共溶出
17	フルクトース-1,6-ビスリン酸/フルクトース-2,6-ビスリン酸	C ₆ H ₁₄ O ₁₂ P ₂	339.9960	Neg	共溶出
18	麦芽糖/α-ラクトース	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.1162	Neg	共溶出
19	アデノシン-5'-ニリン酸 (5'-ADP) /アデノシン-3',5'-ニリン酸 (3',5'-ADP)	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂	427.0294	Neg	分離
20	メチルマロニル CoA/サクシニル CoA	C ₂₅ H ₄₀ N ₇ O ₁₉ P ₃ S	867.1313	Neg	分離

メソッド最適化の1つとして、各化学物質クラスを代表する代謝物類で全体的に最良の分析感度が得られるようにAJSの条件を最適化しました。図4は、ドライガスやシースガスの温度の違いが、標準混合物の検出にきわめて大きな影響を与えることを示しています。例えば、低pH移動相バッファを用い、ポジティブイオンモードで分析した場合、すべての分析対

表5. 質量がほぼ等しい代謝物の分離

グループ	代謝物	化学式	分子量	極性	分離
1	グルタル酸	C ₅ H ₈ O ₄	132.0423	Neg	分離
	L-アスパラギン	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132.0535	Neg/Pos	分離
	L-オルニチン	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₂	132.0899	Neg/Pos	分離
2	α-ケトグルタル酸	C ₉ H ₈ O ₅	146.0215	Neg	分離
	L-グルタミン	C ₉ H ₁₀ N ₂ O ₃	146.0691	Neg/Pos	分離
	L-リジン	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146.1055	Neg/Pos	分離
3	cis-アコニット酸	C ₆ H ₈ O ₆	174.0164	Neg	分離
	L-アルギニン	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.1117	Neg/Pos	分離
	N-アセチル-オルニチン	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	174.2000	Pos	分離

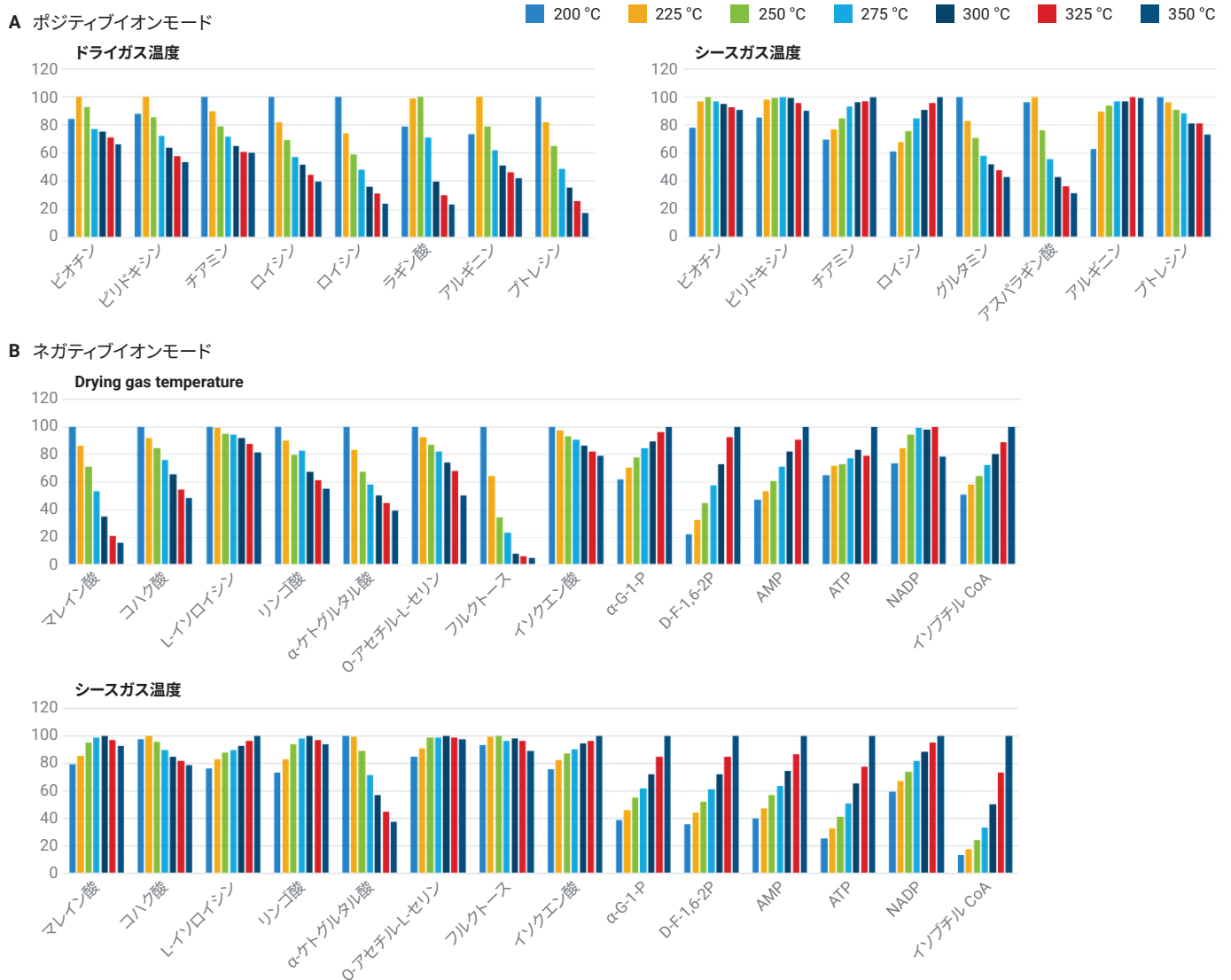


図4. (A) ポジティブと (B) ネガティブの両方のイオンモードでの HILIC LC/MS メソッドの AJS イオン源パラメータの最適化。ドライガスとシースガスの温度最適化結果の例。

象化合物について、ドライガスの温度が 225 から 350 °C へ高くなるほどピーク高は低くなりました (図 4A、左パネル)。逆に、シースガスでは温度が高くなると、グルタミン、アスパラギン酸、プロレシンを除く大半の分析対象化合物で、応答が向上しました (図 4A、右パネル)。また、pH 9 の移動相バッファを用い、ネガティブイオンモードで分析した場合、ドライガスの温度が 200 から 350 °C へと高くなるほど、有機酸類、アミノ酸類、糖類の応答は大幅に低下しました (図 4B)。しかしながら、糖リン酸類、ヌクレオチド類、酸化還元代謝物類、CoA 誘導体など、リン酸を含む分子類は、ドライガスの温度が高くなると応答が向上しました (図 4B)。また、シースガスでも温度の違いによって、ネガティブイオンモードメソッドで分析される代謝物類で同様の傾向が示されました。表 3 のドライガスとシースガスの最終的な温度は、すべての被試験代謝物クラスを包含する最適化されたメソッドを実現するために選択されました。個々のアプリケーションで分析対象とする特定の代謝物クラスに合わせて、イオン源パラメータを選択して調整できます。

最適化されたネガティブイオンモードの pH 9 メソッド (一般的に研究対象となる主要な代謝物クラスをカバーするメソッド) により酵母抽出物を評価し、生物サンプル分析での HILIC LC/MS メソッドの堅牢性を実証しました。図 5 に、酵母抽出物からの代表的な代謝物類の EIC を示します。

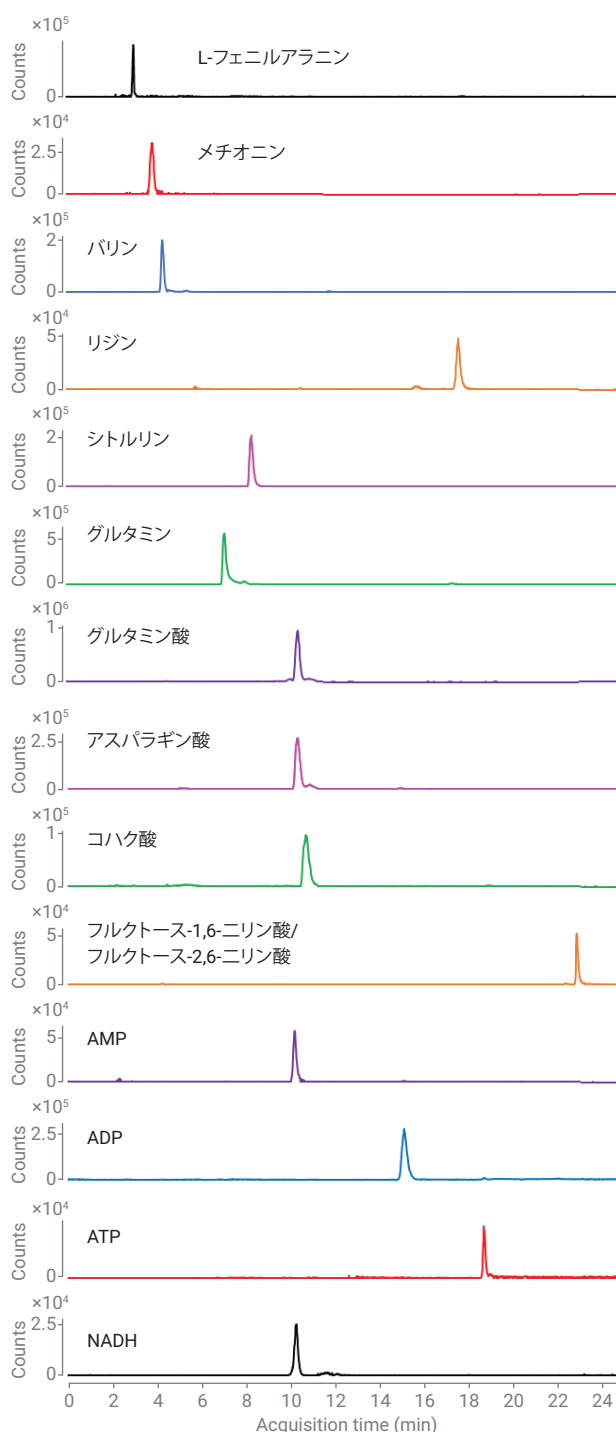


図 5. 最適化された pH 9 メソッドをネガティブイオンモードで使用した場合の酵母抽出物からの 14 の代表的な代謝物の EIC

45 の代謝物のターゲットリストについて、クロマトグラフィーリテンションタイムの安定性、信号応答、質量真度を評価しました (図 6 および 7)。評価の結果、酵母抽出物で検出される 45 の代表的な内因性代謝物の 25 時間にわたる分析において、リテンションタイム (%RSD <1.1 %) と信号応答 (%RSD <15 %) の両方で優れた再現性が示されました (図 6)。さらに、今回、25 時間にわたって優れた質量真度と精度が、1.6 ppm 以下の絶対質量誤差の平均値、1.2 ppm 以下の RSD として得られ (図 7)、この分析時間枠での機器および HILIC LC/MS メソッドの安定性が示されました。

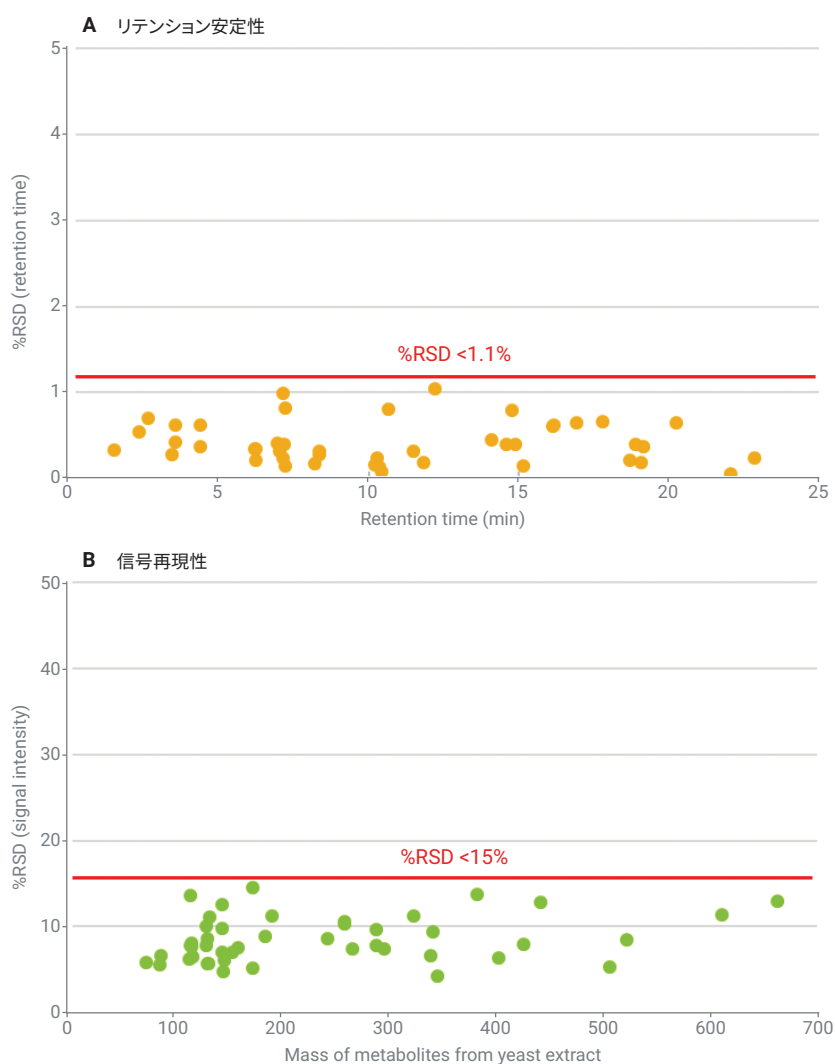


図 6. 酵母から抽出された代謝物の 25 時間にわたる分析によるリテンションタイムと信号応答の優れた再現性。ネガティブイオンモードでの 50 回分析において、(A) リテンションタイムの %RSD は 1.1 % 未満、(B) 信号強度の %RSD は 15 % 未満 (n = 45 の代謝物)

結論

クロマトグラフィー条件の最適化によって、重要な生体異性体に適した優れた分析選択性を実現し、広いクラスの代謝物を検出しました。15 の生体関連異性体のペア/グループおよび 3 つの質量が近似する代謝物のグループで、ベースライン分離を実現できました。また、AJS パラメータも系統的に最適化し、全体的に最良の分析感度を得ることができました。最後に、25 時間に及ぶ分析時間の全 50 回の注入による生体サンプルの分析によって、クロマトグラフィーメソッドと LC/MS 機器の堅牢性が示されました。優れた性能を提供する Agilent LC/MS システムは、メタボロミクスプロファイリングにとって傑出したシステムです。

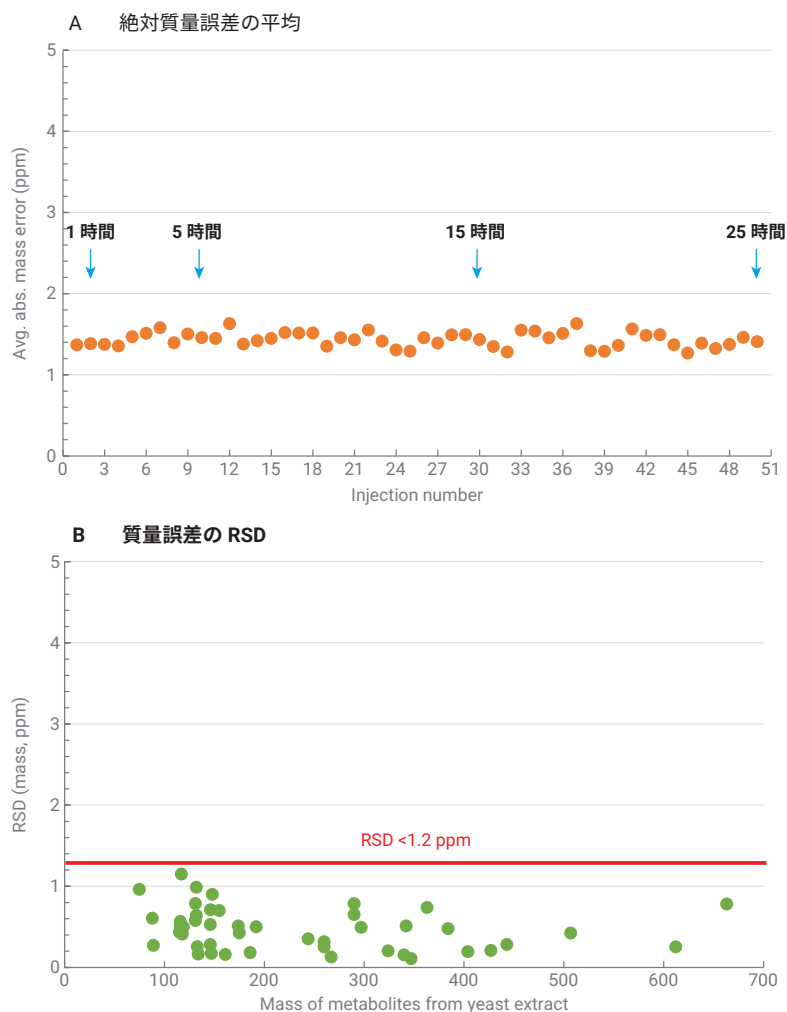


図 7. 酵母から抽出された代謝物の 25 時間にわたる分析による優れた質量真度の安定性。ネガティブイオンモードでの 50 回分析において、(A) 絶対質量誤差の平均は 1.6 ppm 以下、(B) 質量誤差の RSD は 1.2 ppm 以下 (n = 45 の代謝物)

参考文献

1. Schrimpe-Rutledge, A. C. et al. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2015** Dec, 27(12), 1897–1905.
2. Hsiao, J. J. et al. Anal.Chem. **2018** Aug, 90(15), 9457–9464.
3. Hsiao, J. J. et al. LCGC Special Issues **2018** June, 36(6), 30–35.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタ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, December 9, 2019
5994-1492JAJP