

# GC/MS システムと Agilent Fiehn GC/MS メタボロミクス RTL ライブラリによる 血漿中の代謝物同定

## アプリケーションノート

### 著者

Mine Palazoglu and Oliver Fiehn  
UC Davis Genome Center  
Davis, CA 95618

### 概要

ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) は、高い分離能と感度をメタボローム研究に提供します。メタボロームスクリーニングの有用性は、同定される代謝物の数と、それらの生物学的解釈へつながるリンクによって大きく左右されます。多くの場合、こうした代謝物の同定は難しいステップです。最新版の Agilent Fiehn GC/MS メタボロミクス RTL (リテンションタイムロッキング) ライブラリは、特に代謝物の同定を容易にすることを目的として開発されたものです。

複雑な生体マトリックスからの代謝物の同定を実証するためにヒト血漿を使用しました。同定作業を進める過程では、補完的な作業として、質量スペクトルのデコンボリューション処理を行い、高速かつ柔軟なハイスループット検索によってサンプルピークスペクトルと Agilent Fiehn ライブラリススペクトルとの照合を行いました。確実な同定を行うために最も重視した判定基準の 1 つにサンプルのリテンションタイムがあり、リテンションタイムには、内標準の d27- ミリスチン酸の絶対リテンションタイムをロックしたものを用いました。Agilent Fiehn ライブラリの機能の 1 つであるリテンションタイムロッキングは同定の信頼性を高めます。リテンションタイムの平均偏差が 0.15 分未満となり、代謝物アノテーションの精度と信頼性が高くなることがわかりました。最近 NIH/NIDDK やメタボロミクス学会などによって提唱されているメタボロミクスの結果のレポートを標準化する上で、このような同定手順の実施は次第に重要性を増して行くと思われます。



**Agilent Technologies**

## はじめに

「メタボロミクス」と呼ばれる複雑な生体マトリックスから多種多様な低分子代謝物 (30 ~ 1,500 Da) を包括的に同定/定量することは、分析化学にとって、最新機器をもってしても困難な作業です。単一のメソッドでこの目的を達成することはできません。たとえば、テルペン類のような揮発性の高い化合物は、液体クロマトグラフィーベースのメソッドでは評価できません。ガスクロマトグラフィー (GC) を使用する必要があります。同じように、ポリフェノール系化合物の分離にはキャピラリー電気泳動 (CE) よりも液体クロマトグラフィー (LC) の方が適していますが、(解糖系やカルビン回路の経路で生じるような) 2リン酸類や 3リン酸類の分離にはキャピラリー電気泳動が適しています。とはいえ、特に明確かつ高感度な検出を行うために質量分析法 (MS) を使用する場合には、上記 3つのどの分離メソッドを使用しても一定範囲の化合物クラスをマルチパラレルな形で検出/定量できます。GC/MS は、高い分離能と感度をメタボローム研究に提供します。主な分離メソッドによる同定作業の結果を比較すると、各メソッドの分離メカニズムには大きな違いがあるにもかかわらず、往々にして、同定される化合物には数多くの重複が見られます。(核磁気共鳴法と比較しても) こうした広範な重複が見られる根本的な原因は、存在比の最も高い代謝中間物が破壊されないうで保存される性質を持っていることです。

代謝物は、複雑な生体マトリックスの中にさまざまな濃度で存在しています。そうしたマトリックスの中から各代謝産物をそれぞれの構造の完全性や相対存在比を損なわずに抽出しなければなりません。その上、一定範囲の中心的な代謝経路は、異なる種 (マウス、ラット、ヒトなど) の間でも、種を越えた生物間 (哺乳類や鳥類、あるいは酵母菌のような単純な真核生物など) でも非常に似通った機構を備えています。このような保存経路は、エネルギーを引き出すために炭素源を酸化させたり、逆に炭水化物/アミノ酸/脂肪酸を細胞の成長に利用できるような形にグリコーゲンや脂肪などのタンパク質/複合脂質/貯蔵生体高分子を供給するというような働きを行っている、一

般的な代謝要求に寄与している部分です。こうした保存中間代謝物の相対存在比は、あとから、基礎となる異化/生合成経路の働きから推測できます。したがって、メタボロームスクリーニングの有用性は、同定される代謝物の数と、それらの生物学的解釈へつながるリンクによって大きく左右されます。本アプリケーションノートでは、単一の溶媒混合液によるタンパク質の沈殿/抽出、化学的な誘導体化、GC/MS による分析、質量スペクトルのデコンボリューションによるデータ処理、同定代謝物リストの検証という手順でヒト血漿中の代謝物を同定する方法を示し、外部の化学/生物学データベースの参照方法についても説明します。

## 実験

血液サンプルは、正午から午後 3:00 時までの時間帯にボランティアから採取しました。血小板を取り除いた血漿は、血漿の回収から 15 分以内にただちに (再度遠心分離器にかけて) 単離を行いました。この間、各サンプルは氷の上に置き、血漿はただちに -80°C で凍結しました。サンプルをいったん解凍してから、等分し、GC/MS 分析に合わせた調製しました。インプロパノール:アセトニトリル:水から成る単一相の混合液 (体積比 3:3:2) を 1 mL 使用し、20°C で 5 分かけて 30  $\mu$ L の血漿を抽出しました。遠心分離器にかけたのち、上澄みを 0.5 mL 取り分けて試験管に入れ、SpeedVac 濃縮器で完全に乾固させました。その後、2 段階の手順を踏んでこの試験管内の残留物を誘導体化しました。まず、メトキシアミン塩酸塩濃度 40 mg/mL のピリジン溶液を 10  $\mu$ L 使用し、30°C で 90 分のメトキシム化処理を行うことによってカルボニル基を修飾しました。次に、化合物の揮発性を高めるために、1% のトリメチルクロロシランを含む N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド (MSTFA + 1% TMCS, Pierce) の混合溶液を 90  $\mu$ L 使用し、37°C で 30 分かけてサンプルを誘導体化しました。この手順により、誘導体化されたアルデヒドとケトンに対応する 2 つのピークが検出されました。1 つは syn 型のピークで、もう 1 つは anti 型のピークでした (たとえば、グルコース 1 とグルコース 2 など)。

以下の GC/MS 条件を使用しました。Agilent 6890 GC オープンを 10°C/min 温度勾配で 60°C (初期時間は 1 分) から 325°C まで昇温しました (最終時間は 10 分)。この結果、測定時間は 37.5 分になりました (60°C までの冷却を含む)。10  $\mu$ L シリンジを使用して 1  $\mu$ L のサンプルをアジレントのスプリット/スプリットレスインジェクタに 250°C で注入しました。サンプルのポンプ注入を 4 回行い、溶媒 A と溶媒 B の両方を使用して注入前に 1 回、注入後に 2 回洗浄しました。高速のブランチ速度での注入のため、粘性ディレイやドウェルタイムは適用しませんでした。サンプルの注入は、スプリットレスとスプリットの両方で行いました。スプリットレスの場合、10.5 mL/min のヘリウムパージを 1 分間後に行いました (8.2 psi)。20 mL/min のセーバ流量でガスセーバを 3 分後に稼働させました。長さ 10 m の Duragard プレカラムのある 29 m の DB-5MS カラム (内径 0.25 mm、膜厚 0.25  $\mu$ m) を使用しました。1 mL/min の定流量のヘリウムをキャリアガスとして使用しました。質量選択検出器 (MSD) のシグナル取込速度を 20 Hz に設定し、MSD のトランスファーラインを 290°C に設定しました。5.90 分の溶媒ディレイ時間が経過した時点でフィラメントをオンにし、*m/z* 50 ~ 600 で走査を行いました。イオン源温度は 230°C、四重極温度は 150°C に設定しました。データの取り込みを行う前に、機器のマニュアルに従って、FC43 (パーフルオロトリブチルアミン) による MSD のオートチューンを行いました。スプリット注入の場合も、上記と同じパラメータを使用し、スプリット比を 1:10、スプリット流量を 10.3 mL/min に設定しました。アジレントの ChemStation ソフトウェアに標準装備されている RTL システムを使用して、絶対リテンションタイムを内標準の d27-ミスチン酸にロックしました。リテンションタイムをロックングすることにより、分析ごとのリテンションタイムの変動が少なくなります。代謝物の同定には Agilent Fiehn GC/MS メタボロミクス RTL ライブラリ (2008 年 6 月更新版) を使用しました。このライブラリは、代謝物 GC/MS スペクトルに関する最も包括的な市販のライブラリです。このライブラリには、一般的な約 700 種の代謝物に関する GC/MS EI スペクトルとリテンションタイムインデックスが検索可能なデータとして収められています。

## 結果

現在継続中の薬理ゲノム学研究計画において 22 歳の女性から 4 週間の間隔をあけて採取した 2 つの検体を分析して血漿中メタボロームを調べました。この研究計画の趣旨は、治療介入の有効性を予測するために個々の患者の代謝状況を評価することにあります。血漿サンプルは、GC/MS システムへのスプリットレスおよびスプリット注

入を用いて分析しました。血漿中の主な成分は、「血糖」と呼ばれることもあるグルコースで、すべての器官、とりわけ脳にエネルギーを供給するために体内で常に 5 mM 前後の濃度に調節されています。このほか、高い存在比の予想される代謝物には、遊離コレステロール、飽和遊離脂肪酸、一部のアミノ酸 (特に、骨格筋と肝臓との間の 3 炭素キャリアとして働くアラニン) などがあります。血漿の取り扱い、

各病院の臨床検査ラボの間で標準化されていないため、分析結果に差異が出る可能性もあります。凝固を防ぐために EDTA の使用を好む病院がある一方で、同じ目的のためにヘパリンやクエン酸塩を使用する病院もあります。最良の結果を得るためには凝固防止剤の使用に決めつけを設ける必要があります。目下、米国国立衛生研究所 (NIH) がプロトコルの標準化/調整を目的とした「ベストプラクティス」文書の作成作業を進めているところですが、まだ公開にされていません。

Agilent ChemStation ソフトウェアを使用すると、スプリット比 1 対 10 のスプリット注入については大きなピークがいくつも検出されました。バックグラウンドを差し引いたピーク検出を行った後、NIST MS 検索または ChemStation の PBM 機能を使用して質量スペクトルの実測データを Agilent Fiehn GC/MS メタボロミクス RTL ライブラリのデータと照合しました。この結果、アラニン、クエン酸、グルコース、およびコレステロールがそれぞれ 7.72、16.59、17.65、および 27.55 分のリテンションタイムで容易に同定できることを確認しました (図 1)。上記の各化合物に関する質量スペクトルの一致率は、生のスペクトルの状態でも、PBM 検索で 90 を超え、NIST MS 検索で 900 を超えています。クエン酸のピークのアバンダンスが高く EDTA ピークが欠落していることから、当該サンプルは臨床検査ラボにおいてクエン酸の添加による血漿安定化処理 (内発性クエン酸の測定を不能にする処理) を施されたものであることが確認できます。しかし、存在量の少ない化合物を詳しく分析するためには AMDIS (自動質量スペクトルデコンボリューション) が必要とされます。米国国立標準技術研究所 (NIST) で開発された自動 GC/MS 同定プログラム、AMDIS は Agilent Fiehn ライブラリに含まれています。質量スペクトルデコンボリューション機能を使用すると、ピークが自動的に検出され、共溶出した化合物は特定のピーク成分の存在を最も良く表すモデルイオントレースによってスペクトルがデコンボリューションされ、続いてユーザーが定めた質量スペクトルライブラリと照合されます。この機能により、検索作業が迅速かつ簡単に行えるようになります。

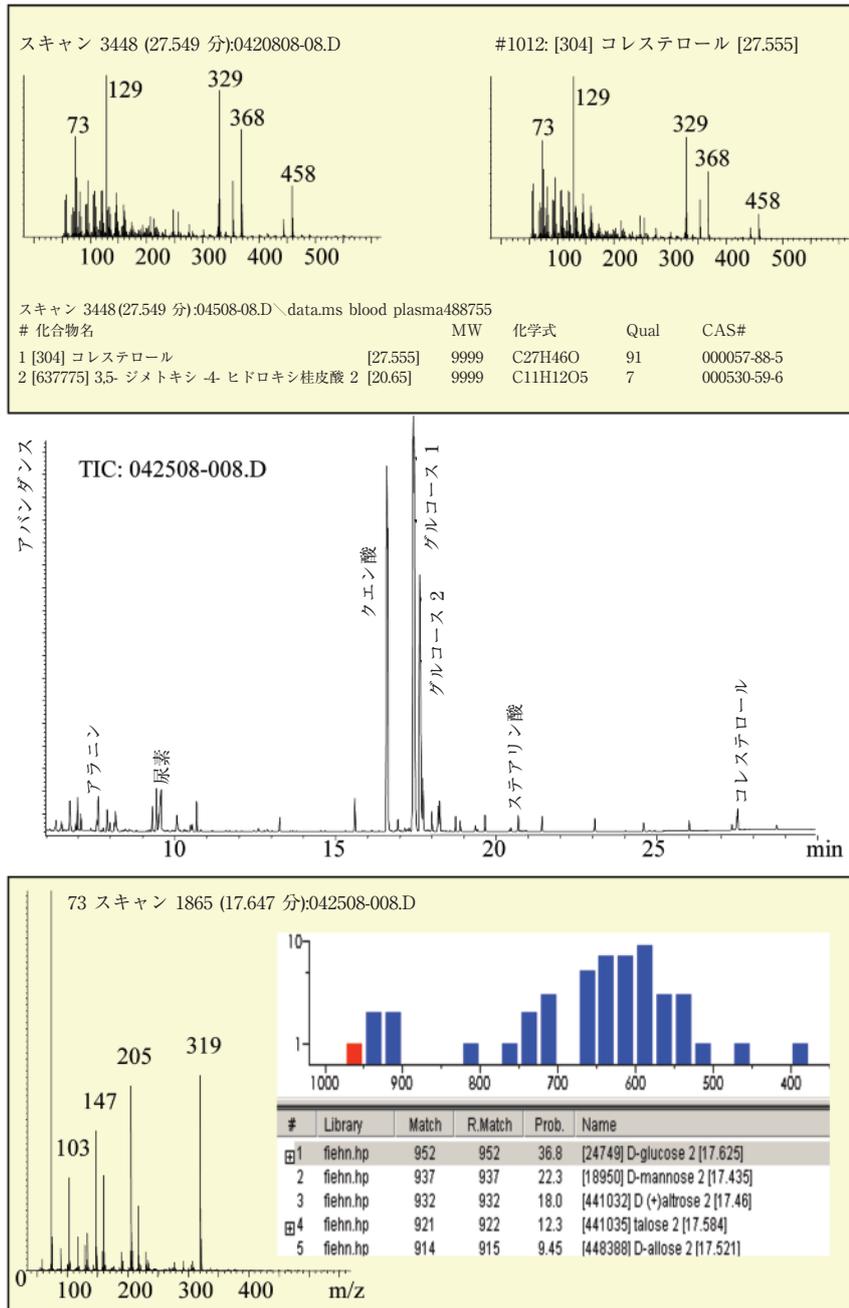


図 1. ヒト血漿中の代謝物の同定 (メトキシ化およびトリメチルシリル化した後に GC/MS 分析を実行し、Agilent Fiehn ライブラリを使用して分析結果を照合)  
 中央のパネル:全イオンクロマトグラム (1:10 のスプリット注入)  
 上のパネル:Agilent ChemStation において PBM クイックサーチを使用したコレステロールの同定  
 下のパネル:NIST MS 検索システムおよびリテンションタイム情報を使用したグルコース 2 の同定

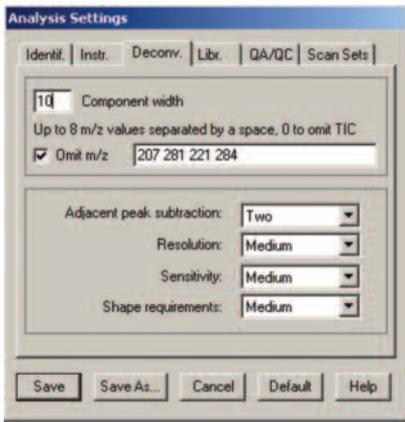


図 2. AMDIS における質量スペクトルデコンボリューションの設定

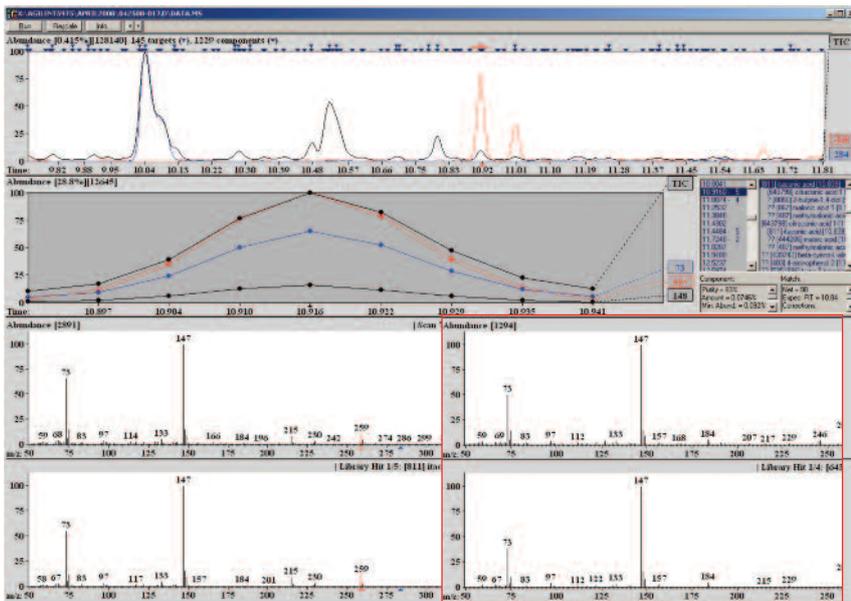


図 3. スペクトルの類似性が高く（一番下のパネル）リテンションタイムの近接したイタコン酸とシトラコン酸とをヒト血漿中から同定（各ピークが一番上のパネルのクロマトグラムに赤線で表示されています）

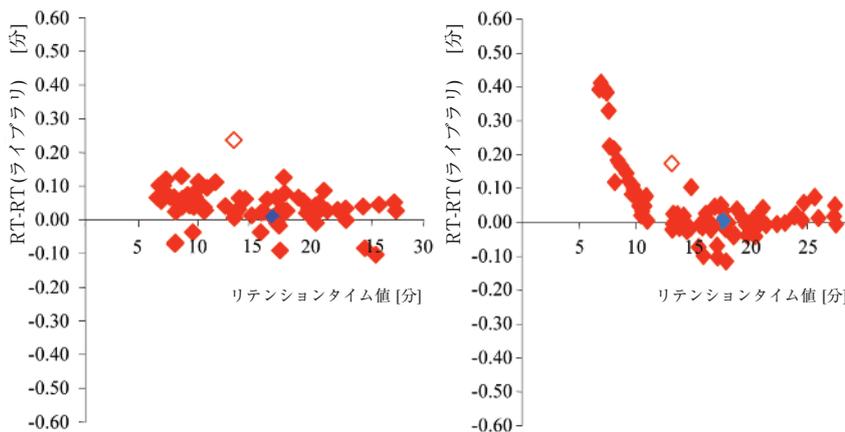


図 4. リテンションタイムの実測値と Agilent Fiehn ライブラリのリテンションタイムデータとの偏差。左のパネル: スプリット比 1:10 の注入 (ライブラリスペクトルの作成に使用したメソッド)。右のパネル: スプリットレス注入。青色の菱形マーク: リテンションタイムロッキングを行った化合物は d27- ミリスチン酸。白抜き菱形マーク: トレイトール。リテンションタイムの差が 0.15 分以上あることから見て、誤同定である可能性が高い。リテンションタイムが 9 分未満の代謝物に見られるリテンションタイムのずれ (右のパネル) は、スプリットレス注入とスプリット注入とのガス流量の違いによるもの。

ピークの数とデコンボリューションスペクトルの品質は、サンプルクロマトグラムの複雑さと、AMDIS に使用する設定値によって変化します。最適な AMDIS 設定値は存在しません。その代わりに、ユーザーが AMDIS を使いはじめるときには、まず、2つの近接ピークの減算機能 (図 2) を使用し、分離能/感度/ピーク形状の要求条件に中間的な値を設定してみて、分析結果に偽陽性や偽陰性のピーク検出がないかどうか調べます。

本調査では、スプリットおよびスプリットレス注入で分析したサンプルに関してこの方法を実行し、中レベルの設定値から非常に高いレベルの設定値に変更してみました。この結果、検出ピーク数は変化しましたが、サンプル内で同定された代謝物の数には大きな変化は見られませんでした。スプリットレス注入した血漿サンプルに関して、上記の各方法を組み合わせて 102 のピークを同定しました。この同定は、デコンボリューションした質量スペクトルを Agilent Fiehn GC/MS メタボロミクス RTL ライブラリで検索し、実測値と Agilent Fiehn ライブラリとのリテンションタイムの差でヒット件数を絞り込み、一致したスペクトルを手動で検証する手順で行いました (表 1)。約 90% のケースで、AMDIS のピークリストの先頭に正しく一致したものが表示されました。こうした自動照合の実例を図 3 に示します。2 つの有機酸 (それぞれ 319 と 172 の S/N 比で検出されたイタコン酸とシトラコン酸) を照合したものです。m/z 73、147、215 というイオンアバンダンスを比較すれば分かる通り、この 2 つの酸のスペクトルには高い類似性があり、リテンションタイムの差も 0.1 分未満 (5 秒未満) という極めて僅かなものです。こうした類似性があるにもかかわらず、アバンダンスの低いイオンに関するスペクトルの差異とリテンションタイムの差によって、あまり一般的ではない 2 つの酸を明確に同定することができました。しかし、他のケース (同定されたピークのほぼ 10% に相当するケース) では、正しい代謝物のスペクトルとの一致率がその異性体のスペクトルとの一致率よりも若干低かったことから、リテンションタイムの僅かな差に基づいて同定を行わなければなりません。特に炭水化物類や糖アルコール類 (グルコース、フルクトース、リボース、リビトールなど) の場合は、こうした事態が発生しました。しかしながら、ほとんどの場合、誤った同定は、リテンションタイムの実測値と Agilent Fiehn ライブラリのリテンションタイムとの差を調べることによって簡単に除外できました (図 4)。ただし、スプリットレス注入については留意すべき点があります。スプリットレス注入ではガス流量の条件が異なるため、9 分未満のリテンションタイムで溶出する代謝物は、予想リテンションタイムは、スプリット比 1:10 の条件で得られたリテンションタイムよりも最大 0.4 分遅れて溶出してくる傾向があるということです (図 4)。ほとんどすべてのケースにおいて、同定されたピークに関するリテンションタイムの差は 0.15 分未満でした。トレイトールの場合のように 0.15 分を超える差が観察された場合、スペクトルがよく似ていてもそのピークは誤同定されたものであると判断できます。トレイトールの異性体、エリトールは、2008 年版の Agilent Fiehn GC/MS メタボロミクス RTL ライブラリに含まれていませんでした。

化合物名	CAS	PubChem	MSnet	RT	RT (ライブラリ)	RT-RT (ライブラリ)	純度	m/z	S/N m/z
4- ヒドロキシプロリン 2	51-35-4	5810	68	13.29	13.27	0.02	21%	230	37
アラニン 1	56-41-7	5950	95	7.72	7.50	0.22	33%	116	125
β- シアノ -L- アラニン	45159-34-0	439742	83	11.25	11.29	0.05	29%	158	73
クレアチニン	60-27-5	588	95	13.65	13.63	0.02	64%	329	44
シスチン 3	56-89-3	67678	90	21.15	21.10	0.04	31%	266	19
ε- カプロラクタム	105-60-2	7768	97	6.78	6.39	0.39	67%	170	252
グルタミン酸 1	56-86-0	33032	53	13.33	13.34	-0.01	12%	174	17
グルタミン酸 2	56-86-0	33032	76	14.41	14.40	0.01	20%	246	35
グルタミン酸 3 (オキソプロリン)	56-86-0	33032	98	13.21	13.23	-0.02	73%	156	152
グルタミン 3	56-85-9	738	96	16.12	16.09	0.03	96%	156	185
グリシン	56-40-6	750	97	10.48	10.46	0.02	91%	174	245
イソロイシン 2	443-79-8	791	84	10.28	10.23	0.05	10%	158	73
ロイシン 1	61-90-5	6106	91	8.48	8.30	0.18	62%	86	123
ロイシン 2	61-90-5	6106	66	9.99	9.95	0.05	39%	158	102
L-メチオニン 1	63-68-3	6137	84	11.83	11.84	-0.04	12%	396	20
リシン 2	56-87-1	5962	88	17.68	17.64	0.03	57%	317	142
オルニチン	70-26-8	6262	60	14.35	14.35	0.00	21%	142	22
フェニルアラニン 1	63-91-2	994	79	13.55	13.55	0.00	23%	120	61
プロリン 1	147-85-3	145742	85	8.73	8.57	0.17	53%	70	177
プロリン 2	147-85-3	145742	74	10.35	10.32	0.03	66%	142	102
セリン 1	56-45-1	5951	96	9.80	9.71	0.10	76%	132	98
セリン 2	56-45-1	5951	87	11.18	11.17	0.01	31%	204	62
トレオニン 1	72-19-5	6288	95	10.29	10.22	0.07	81%	147	71
トリプトファン 2	73-22-3	6305	89	20.44	20.47	-0.02	40%	202	207
チロシン 2	60-18-4	6057	97	17.84	17.86	-0.02	93%	218	242
尿素	57-13-6	1176	99	9.68	9.60	0.08	93%	147	479
バリン 1	72-18-4	6287	91	7.63	7.30	0.33	31%	72	168
バリン 2	72-18-4	6287	88	9.26	9.15	0.11	85%	144	159
2- ヒドロキシピリジン	142-08-5	8871	92	6.93	6.52	0.41	23%	152	83
3- インドール酢酸	87-51-4	802	80	18.09	18.09	0.00	5%	202	36
3- インドール乳酸 2	1821-52-9	92904	65	20.06	20.08	-0.02	5%	202	24
4- ヒドロキシ安息香酸	114-63-6	135	62	14.48	14.51	-0.03	47%	267	29
6- ヒドロキシニコチン酸	5006-66-6	72924	90	13.82	13.83	0.04	8%	266	19
ベンゼン -1,2,4- トリオール	533-73-3	10787	94	14.18	14.16	0.02	29%	342	47
安息香酸	65-85-0	243	97	9.70	9.59	0.11	18%	179	61
カフェイン酸	331-39-5	1549111	84	19.72	19.75	-0.04	13%	396	20
ニコチン酸	59-67-6	938	71	10.32	10.27	0.05	8%	180	25
p- クレゾール	95-48-7	2879	90	8.39	8.21	0.18	4%	165	30
ピコリン酸	98-98-6	1018	78	10.68	10.60	0.00	6%	202	36
ピロガロール	87-66-1	1057	89	13.48	13.46	-0.01	35%	312	61
尿酸 1	66-22-8	1175	98	19.34	19.33	0.01	89%	441	184
アラビトール	488-82-4	94154	77	15.53	15.60	-0.07	37%	217	30
フルクトース 1	57-48-7	5984	92	17.11	17.18	-0.07	85%	307	138
フルクトース 2	24259-59-4	5984	75	17.18	15.11	-0.11	75%	217	77
フコース 1	2438-80-4	17106	91	15.61	15.61	0.09	5%	147	184
グルコース 1	59-23-4	24749	95	17.48	17.43	0.05	100%	319	420
グルコース 2	87-78-5	18950	94	17.62	17.62	0.00	100%	205	497
グリセリン	56-81-5	753	91	10.03	9.94	0.09	27%	147	184
グリセリン -1- リン酸	34363-28-5	754	93	15.96	16.06	-0.10	44%	357	45
グリコール酸	79-14-1	757	87	7.43	7.05	0.38	21%	147	72
イソマルトース 1	499-40-1	439193	93	25.70	25.63	0.07	44%	361	54
リキソース 1	1114-34-7	65550	65	14.85	14.74	0.10	21%	217	19
マルトース 1	69-79-4	6255	88	24.76	24.70	0.06	67%	361	69

表 1. リテンションタイムロッキングとAMDIS - Agilent Fiehnライブラリ照合を併用し、スプリットレス注入モードの四重極 GC/MS システムにより同定したヒト血漿中の 102 種類の化合物。誘導体化が不完全な化合物からは複数の誘導体化合物が生成されるので、こうした誘導体化合物には、化合物名のあとに数字 (1、2、3...など) が付けられています。このような表は、AMDIS の「レポートの作成」オプションを使用して作成します。

化合物名	CAS	PubChem	MSnet	RT	RT (ライブラリ)	RT-RT (ライブラリ)	純度	m/z	S/N m/z
マルトース 2	69-79-4	6255	98	24.96	24.92	-0.03	12%	218	244
イノシトール	87-89-8	892	94	19.39	19.35	0.03	75%	318	78
サッカリン酸	87-73-0	5460673	64	18.57	18.61	-0.04	14%	333	22
スクロース	111-11-5	5988	96	24.01	23.99	0.02	46%	361	55
トレイトール	6968-16-7	169019	93	13.13	12.95	0.17	43%	217	31
カブリン酸メチル	110-42-9	C10	93	10.70	10.65	0.05	71%	74	110
ドコサン酸メチル	929-77-1	C22	96	23.08	23.08	0.00	66%	74	70
エイコサン酸メチル	1120-28-1	C20	88	21.43	21.44	-0.01	43%	74	75
ヘキサコサン酸メチル	5802-82-4	C26	94	26.03	26.02	0.01	40%	74	58
ラウリン酸メチル	111-82-0	C12	84	13.24	13.25	-0.01	54%	74	80
リノセリン酸メチル	2442-49-1	C24	96	24.61	24.60	0.01	49%	74	55
ミリスチン酸メチル	124-10-7	C14	90	15.59	15.60	-0.01	70%	74	119
オクタコサン酸メチル	55682-92-3	C28	91	27.37	27.35	0.02	15%	74	38
パルミチン酸メチル	112-39-0	C16	93	17.74	17.72	0.01	60%	74	129
ペラルゴン酸メチル	1731-84-6	C9	95	9.37	9.25	0.12	48%	74	107
ステアリン酸メチル	112-61-8	C18	93	19.65	19.66	-0.01	65%	74	81
ミリスチン酸 d27	60658-41-5	C14 RTL	80	16.72	16.73	-0.01	21%	312	72
アラキジン酸	506-30-9	10467	95	22.36	22.37	-0.01	51%	369	38
ベヘン酸	112-85-6	8215	89	23.91	23.90	0.02	23%	397	25
カブリン酸	334-48-5	2969	85	12.41	12.40	0.15	8%	200	39
カプリル酸	124-07-2	379	87	9.89	9.81	0.09	13%	201	37
ヘプタデカン酸	506-12-7	10465	92	19.80	19.80	0.00	38%	327	36
ラウリン酸	143-07-7	3893	69	14.77	14.79	-0.02	23%	257	32
リノール酸	60-33-3	5280450	94	20.41	20.40	0.01	81%	337	85
ミリスチン酸	544-63-8	11005	70	16.93	16.89	0.05	2%	285	58
オレイン酸	112-80-1	445639	90	20.46	20.50	-0.04	64%	339	106
パルミチン酸	64519-82-0	985	98	18.88	18.85	0.04	93%	313	293
パルミトレイン酸	373-49-9	445638	62	18.69	18.73	-0.04	2%	311	29
ピメリン酸	111-16-0	385	60	14.19	14.19	0.00	23%	155	20
ステアリン酸	57-11-4	5281	98	20.69	20.68	0.02	95%	341	330
10- ヒドロキシデカン酸	362-06-1	74300	92	16.36	16.51	-0.02	76%	202	207
1- ヘキサデカノール	36653-82-4	2682	75	17.93	18.05	-0.12	3%	299	30
2- フロ酸	88-14-2	6919	73	8.19	8.07	0.12	2%	125	18
2- ヒドロキシ酪酸	565-70-8	11266	75	8.07	7.85	0.22	33%	147	41
2- ケトイソカブロン酸 2	4502-00-5	70	85	9.19	9.04	0.15	65%	200	39
アジピン酸	124-04-9	196	86	13.02	13.00	0.00	27%	120	60
α- ケトグルタル酸	328-50-7	51	74	13.84	13.86	-0.02	35%	147	21
シトラコン酸 1	498-23-7	643798	91	11.01	11.00	0.00	70%	147	107
クエン酸	5949-29-1	311	96	16.59	16.61	-0.02	100%	347	290
グリセリン酸	473-81-4	439194	87	10.78	10.73	0.05	30%	189	38
イタコン酸	97-65-4	811	95	10.92	10.84	0.08	87%	147	180
乳酸	79-33-4	107689	95	7.24	6.85	0.39	60%	147	293
リン酸	7664-38-2	1004	97	10.04	9.97	0.08	88%	299	633
ビルビン酸	127-17-3	1060	76	7.11	6.71	0.39	24%	174	64
コハク酸	29915-38-6	1110	82	10.54	10.51	0.03	22%	148	88
trans-アコニット酸	585-84-2	444212	95	15.83	15.84	-0.02	91%	229	146
シュウ酸	144-62-7	971	63	7.78	7.88	-0.11	25%	147	367
α- トコフェロール	10191-41-0	2116	84	27.43	27.38	0.05	15%	502	67
コレステロール	57-88-5	304	97	27.55	27.56	-0.01	89%	368	198

表 1 の続き

同定されたピークを詳しく調べてみた結果、血漿中の代謝物の質量スペクトルの類似性に関する最終的な正味一致率は S/N 比とピーク純度の両方に基づいて算出されることが判明しました (図 5)。S/N 比が 100 を超えると、どのピークについても、Agilent Fiehn ライブラリでの正味一致率は必ず 80 点を超える高いスコアになりました。ピーク純度については、ピーク純度が上がるにつれてスペクトルの正味一致率も高まるという一般的な傾向が見られました。ただし、ピーク純度に関するこの傾向には、S/N 比に見られたような明瞭な相関関係もカットオフできる範囲もありません

でした。その後、同定された 102 種類の代謝物を主な化学官能基別に「ステロールおよび芳香族化合物類」、「アミノ化合物類」、「ヒドロキシ酸類」、「炭水化物類」、「脂肪酸および脂肪族アルコール類」というグループに分類しました。上記のどのグループについても、15 以上のピークが同定されていますが (図 6)、「アミノ化合物類」グループ (アミノ酸および尿素のようなアミノ基を備えた他の化合物) のピークは他のグループよりも若干多く検出されています。この図は、一次代謝における主な化合物類のすべてが GC/MS によって血漿から分析/同定できることを示しています。

Agilent Fiehn GC/MS メタボミクス RTL ライブラリから得られる結果には、代謝物の同定に関する情報だけでなく、生理学や生化学情報の検索に使用できる一意の化合物 ID、PubChem 番号も表示されます。これは、特に、「イタコン酸」といったような、あまり知られていない化合物を調べる際に役立ちます。PubChem の Web サイトで PubChem 番号 (Agilent Fiehn ライブラリで各化合物名の前に付けられているカギ括弧の中の番号) を検索すると、生化学経路データベース KEGG へのリンクが表示されます (図 7)。そのリンクをたどると、当該化合物に関係した酵素および経路概要に関する KEGG の情報が表示されます。図 7 のイタコン酸エステルの例では、「C5-BRANCHED DIBASIC ACID METABOLISM (C5 の分岐二塩基酸の代謝)」という経路情報が示されています。これを見ると、この経路がシトラコン酸とイタコン酸 (図 3 で同定された化合物) で構成されていることが分かり、このことから、それぞれの化合物のアバundanceがシトラリンゴ酸エステルに対して調整されているものと推測することができます。さまざまな腸内微生物がヒトの血管系に代謝物を排泄している可能性や、外発性化合物が食物 (たとえば、植物由来の化合物など) を介してヒトの体内に摂取されている可能性があるため、このような KEGG の経路情報を調べる際には、ヒト血漿の代謝物検索を「ヒト」経路に限定しないことが重要です。この結果、化合物の種類は多岐にわたり、血漿メタボロームは極めて複雑化するものと予想されます。これが、血漿プロファイルから検出されたピークの多くがまだ同定されていない主な理由です。

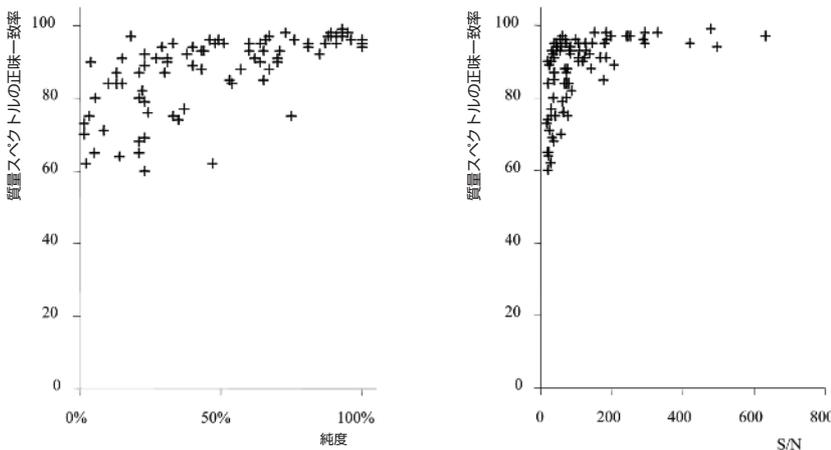


図 5. 同定された代謝物に関する質量スペクトルの正味一致率の依存性。左のパネル:AMDIS デコンボリューション後の質量スペクトルの純度。右のパネル:定量イオンの S/N 比

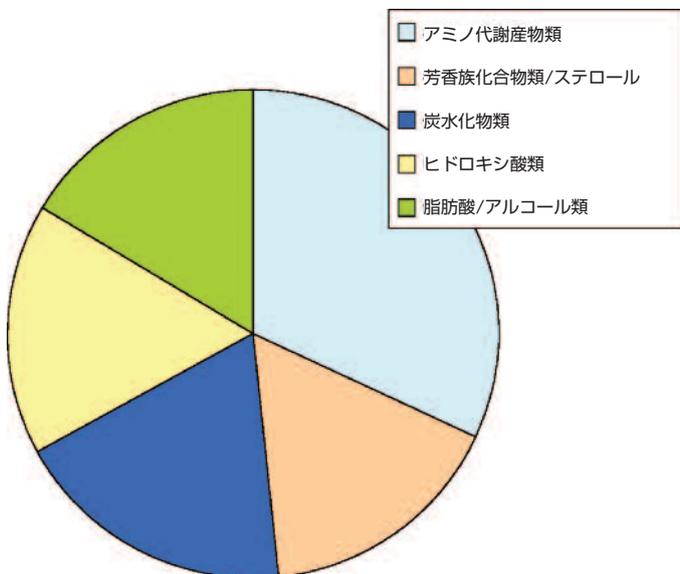


図 6. 同定された血漿代謝物に含まれていた各化合物グループの割合

## 結論

最新版の Agilent Fiehn GC/MS メタボロミクス RTL ライブラリを使用してヒト血漿中の代謝物を分析しました。本実験では、ChemStation ソフトウェアで実行される同定ルーチンを AMDIS 質量スペクトルデコンボリューション、および各ピークのスペクトルと Agilent Fiehn ライブラリスpectルとの照合によって補完でき、高速かつ柔軟でハイスループットな検索が可能になることを示しました。確実な同定を行うために最も重視した判定基準の1つは、サンプルのリテンションタイムです。リテンションタイムは、内標準、d27-ミリスチン酸の絶対リテンションタイムにロックしました。Agilent Fiehn ライブラリの機能の1つであるリテンションタイムロックによって同定の信頼度を高めます。リテンションタイムの平均偏差が0.15分未満となり、代謝物アノテーションの精度と信頼度が高まること分かりました。このような同定手順は、最近 NIH/NIDDK やメタボロミクス学会などによって提唱されているメタボロミクス関連の論文のレポートの標準化作業に重要な役割を果たすものと予想されます。

### 参考資料:

Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beger R, Beale MH, Daykin C, Fan TW, Fiehn O, Goodacre R, Griffin JL, Hankemeier T, Hardy N, Higashi R, Kopka J, Lindon JC, Lane AN, Marriott P, Nicholls AW, Reilly MD, Viant M (2007) Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* 3, 211-221

Castle LA, Fiehn O, Kaddurah-Daouk R, Lindon JC (2006) *Metabolomics standards workshop and the development of international standards for reporting metabolomics experimental results.* *Brief. Bioinformatics* 7, 159-165

Halket JM, Przyborowska A, Stein SE, Mallard WG, Down S, Chalmers RA (1999) Deconvolution gas chromatography mass spectrometry of urinary organic acids - Potential for pattern recognition and automated identification of metabolic disorders. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 13, 279-284

Agilent Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library Product Note. May 2008. Agilent literature PUB: 5989-8310EN

G1676AA Agilent Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library: List of Compounds. June 2008. Agilent literature PUB: 5990-3311EN

Agilent G1676AA Agilent Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library User Guide. June 2008. Agilent P/N: G1676-90000

### C5-BRANCHED DIBASIC ACID METABOLISM

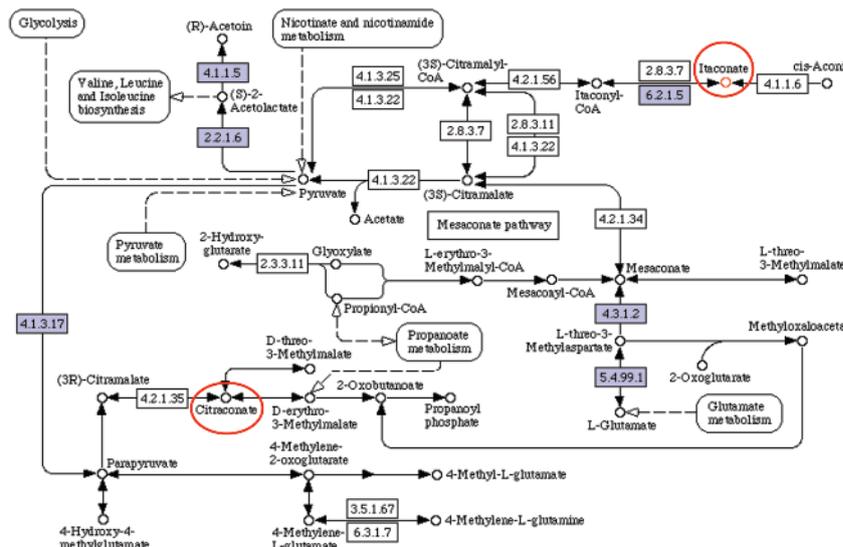


図 7. PubChem 番号を使用した同定代謝物の生理学関連情報の検索

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

本文書は研究用途を目的としたものです。診断を目的としたものではありません。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。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., 2009  
Printed in Japan April 1, 2009  
5990-3638JAJP



Agilent Technologies