

Agilent 6546 LC/Q-TOF: 代謝物分析の信頼性とスループットの向上

著者

Karen E. Yannell, PhD Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA

Christian Klein PhD Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA

Nicola Zamboni, PhD ETH Zurich Zurich, Switzerland

はじめに

メタボロミクスは、質量分析計 (MS) による複雑な分析の限界を常に押し広げています。大量サンプル 収集の高スループットプロファイリングでは、クロマトグラフィー分離を加速させ、時間的分解能の損失 を質量分解能と精度によって補う傾向があります。最も極端な形態では、クロマトグラフィーを省き、フ ロー注入によって1日あたり数千回の注入を達成しています。効果的な手法ではあるものの、複雑な 生体抽出物のハイスループット分析は、生体抽出物の代謝物濃度のダイナミックレンジが広いため、困 難が伴います。また、質量分析計はクロマトグラフィーの使用の有無に関係なく、質量範囲全体にわた り、同ースキャン内での広いダイナミックレンジにおいて、しかも高い採取レートで、高分解能と優れた 質量精度を提供する必要があります。

この技術概要では、Agilent 6546 LC/Q-TOF の機能を解説します。Agilent 6546 の機能向上により、 複雑な生物マトリックスの分析が、事前の分離なしで可能になります。大腸菌メタボロームサンプルは、 グルコース最少培地で指数関数的に培養させたバクテリアのエタノール抽出によって調製しました。サ ンプルは、リストリクションキャピラリー付き Infinity II ポンプを使用し、フロー注入 (1.5 µL) によって分 析しました。6546 LC/Q-TOF をネガティブモードでチューニングし、データを 1.5 Hz、m/z 50 ~ 1,000 の質量範囲で取り込みました。この結果、m/z 118 を超える成分での 30,000 超の分解能、質量精度 の向上、広いスペクトルダイナミックレンジ、高い感度と同位体忠実度が示されました。最終的に、こう した機器性能の向上により、大腸菌サンプル中でより多くのフィーチャーを発見し、プロファイリングし て注釈を付けることができました。

分解能と質量精度

6546 LC/Q-TOF は、*m/z* 118 を超える場合 は 30,000 以上の分解能、より大きなイオン の場合は 60,000 以上の分解能を達成しま す (*m/z* 1,521、R = 60,000)。これらの値は 複雑な大腸菌抽出物においても、ピーク強度 や取り込みスピードに関係なく達成されまし た (図 1)。質量精度は、ピーク強度に関係な く、質量範囲全体で概ね 0.3 mDa 以内でし た (図 2)。この性能により、事前にクロマトグ ラフィー分離をしなくても分子式を同定でき、 その結果、スループットが向上します。







図 2. 6546 LC/Q-TOF と組み合わせたフロー注入によって大腸菌サンプルを分析し、その抽出成分の 質量範囲に対して質量誤差 (mDa) をプロットしました。イオン強度は色で示しています。

感度とイントラスキャンの ダイナミックレンジ

大腸菌抽出物の一連の希釈は、9倍濃縮から 81 倍希釈までの範囲で、水を用いて調製しま した。1 倍濃縮は、前世代の Q-TOF 機器で一 般的に使用されていた濃度に相当します。各 サンプルは、一様に¹³C ラベルが付けられた 同量 (1X) の大腸菌抽出物と組み合わせて、 記録された強度内での多様なマトリックス効 果を確認しました。注入を3回実行しました。

各成分が質量範囲内で抽出され、成分の強 度がプロットされ、低濃度つまり希釈物にお ける 6546 LC/Q-TOF の感度が示されまし た (図 3)。信号強度はより低い濃度でも安定 しており、誤差が大きくなり始めたのは 81 倍 希釈あたりでした。1倍濃縮での大腸菌抽出 物の分析において、6546 LC/Q-TOF はその 感度により、Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS と同等の複数の代謝物を検出できま した (図 4)。



図 3.4 種類の抽出成分のイオン強度を大腸菌サンプルの希釈に対してプロットしました。 誤差バーは n = 3 での標準偏差を表しています。 グレーで強調表示されたサンプル (1X) は、 前世代の Q-TOF で使用されていた大腸菌サンプルの標準濃度です。





図 4. 6546 LC/Q-TOF と 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS で分析した場合の 1X 大腸菌サンプル内のフィーチャーを 示す代謝物マップ。色を付けた円は、サンプル内で検出されたフィーチャー (つまり代謝物) を表しています。 6546 LC/Q-TOF は、複数の異なる代謝物類内のフィーチャー (赤色の四角形) を、6550 Q-TOF LC/MS よりも 多く同定できました。

さらに、6546 LC/Q-TOF は 5 桁のスペクトル 内ダイナミックレンジを実現します。この範囲 は純粋な大腸菌を使用して調査する場合より も広いため、サンプルに¹³C₂-コハク酸をスパ イクしました。6546 LC/Q-TOF の新しい 10 GHz のアナログ/デジタル (ADC) 取り込みシ ステムにより、同一スキャン内で4桁近くにわ たる複雑な強度のサンプルでも、ピークを正 確に検出できます (図 5)。そのため、複雑な 抽出物のダイナミックレンジ全体に存在する 代謝物の定量と同定が可能です。この点は、 複雑なマトリックスの高スループット測定で、 サンプル前処理やクロマトグラフィー分離をほ とんど実施しない場合に、特に重要となりま す。こうしたサンプルの分析対象成分には、強 度が低いものも高いものもあるためです。つ まり、6546 LC/Q-TOF では、分解能、精度、 感度、スキャンスピードを損なうことなく、イン トラスキャンのダイナミックレンジ全体を常に 利用できます。



図 5.6546 LC/Q-TOF のイントラスキャンのダイナミックレンジ。1 つの 1X ¹³C 濃縮大腸菌抽出物に $^{13}C_2$ -コハク酸をスパイクしました。3 つのテクニカルレプリケートを重ね表示しました。強度の違いが大きい (10⁴ ~ 10⁸ カウント) にもかかわらず、精度と分解能が保持され、同一スペクトル内の存在量の多いピークと 希少なピークの両方を正確に決定できます。

同位体の分解能と忠実度

さらにテストして、6546 Q-TOF LC/MS の同 位体ラベリング性能を評価しました。原則とし て、正確な同位体比分析は、スペクトル分解 能と直線ダイナミックレンジに依存します。ク ロマトグラフィー分離がない場合でも、6546 LC/Q-TOF の高分解能により、混み合った領 域内の大半の¹³C および²H 同位体種を明確 に分離することができました。図6は、最小分 解能 (m/z 100) の質量範囲における分離を 示しています。質量とアバンダンスの全範囲に わたり誤差が 0.3 mDa ppm 未満という質量 精度により、高い信頼性での分子式の予測が 可能になります。数十種類もの代表的な代謝 物について、相対的同位体精度の誤差 (RIAE) を計算しました。大半のフィーチャーにおい て、RIAE は 20 % 未満 でした (つまり、トリ プル四重極検出器で実現できる範囲内です)。 20%以上の誤差は、強度が104近くのモノア イソトピックピークを持つ成分でのみ観察され ました。これらの成分は 103 以下の同位体が あり、そのためにベースライン内にあります。 6546 LC/Q-TOF は、定量において高精度を 維持することによって、安定した高い分解能と 同位体忠実度を実現します。



図 6. 6546 LC/Q-TOF でフロー注入を使用して測定した濃縮大腸菌抽出物の低 *m/z* 範囲に含まれる隣接した ¹³C および²H ピークのスペクル分解能。



図 7. 同位体測定の精度。RIAE は理論上の M+1/M+0 と測定した M+1/M+0 の比をパーセント誤差として 示します。RIAE 値が 20 未満の場合、優秀と判断されます。10 回のスキャンにおけるイオン強度の合計の 記録が色で示されています。RIAE 値の悪化は、低強度のピークイオンでのみ観察されました。 モノアイソトピックピークの約5~10%の M+1 のイオンカウントで、ベースラインの範囲となりました。

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, February 21, 2019 5994-0724JAJP

