



包括的な分析を実現するには？——高分解能飛行時間型質量分析計によるヒト分子プロファイリング

LECO Corporation; Saint Joseph, Michigan USA

Key Words: メタボロミクス、ガスクロマトグラフィー、高分解能飛行時間型質量分析計 (GC-HRT)、PFAS、GC-MS、HR-MS、TOFMS、環境分析、汚染物質、ノンターゲット (NTS)、スクリーニング

1. Introduction

古くから尿はヒトの疾患診断に利用されてきました。^{1,2} かつて尿は神聖な液体であり、身体の状態を映し出す窓と考えられていました。実際、尿分析（ウロスコピー）はパピロニア時代からビクトリア時代に至るまで、主要な診断手法として用いられていました。中世において医師は、尿を採取するためのマトウラ (Matula) と尿色表を用い、患者を直接診察することなく健康状態を評価していました。

現代の臨床検査においても尿検査は非常に重要です。尿には妨害となるタンパク質や脂質が比較的少なく、さらに大量のサンプル (サンプル) を容易に採取・保存できるためです。加えて、薬物や代謝物などの化合物は長期間にわたり尿中で検出可能です。³

本研究では、高分解能飛行時間型質量分析計 (HRT) を用いて尿サンプルを分析しました。Pegasus® GC-HRTは、薬物乱用などの行動モニタリングに加え、適切な前処理を施した尿に対して、より包括的な分子プロファイリングを実施するために用いられました。本装置は高速データ取得、1 ppm未満の質量精度、高い分解能 (最大50,000) を備えており、大規模で確立されたライブラリに対して検索可能な高品質スペクトルデータを提供します。豊富な高精度質量データに基づき、スペクトル比較や分子式・フラグメント式・アダクト式の解析を通じて、高い確度で化合物同定を迅速に行うことができます (図1)。

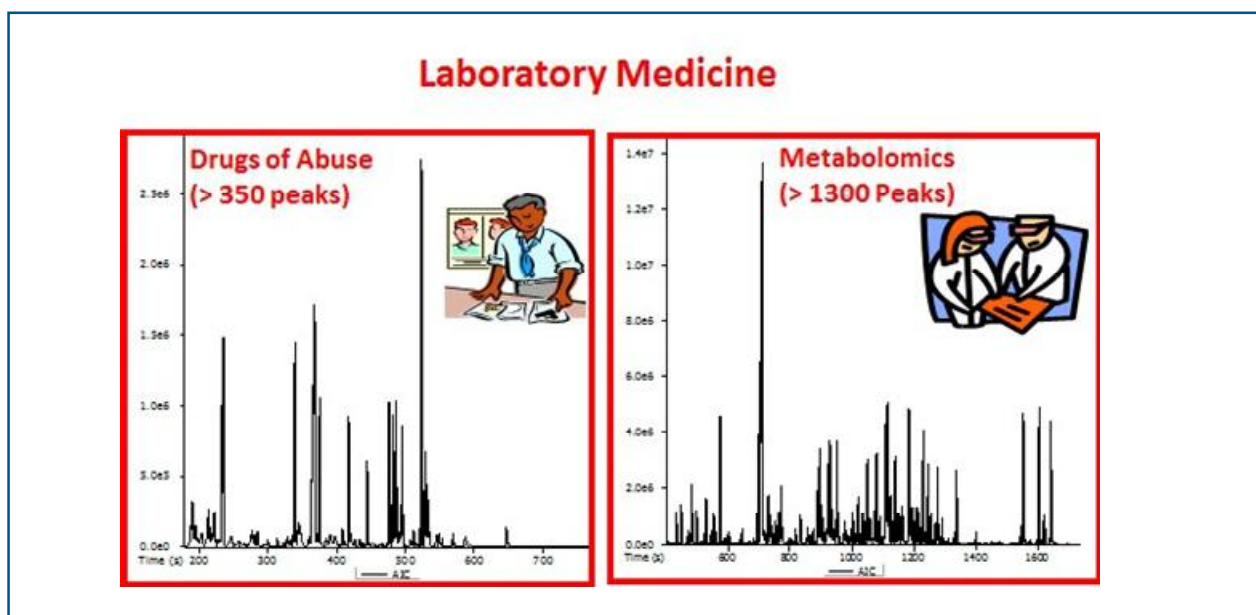


Figure 1. Laboratory medicine.

2. Experimental

サンプル前処理は分析ワークフローにおいて重要な工程です。尿サンプルは、1) 薬物モニタリング、または 2) 詳細な分子プロファイリング (誘導体化) を目的として、異なる手法で前処理しました。

Method 1

1.5 mL の尿を 56°C で 1 時間、 β -グルクロニダーゼとインキュベートしました。その後、HyperSep Verify-CX カートリッジに移し、3% $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (0.5 mL \times 2) で抽出し、2 mL の GC バイアルに移して分析に供しました。

Method 2

1 mL の尿にウレアーゼ処理を行い、Speed Vac と凍結乾燥機で濃縮しました。残渣は 2 段階の手順で誘導体化しました。1) MEOX (ピリジン中 20 mg/mL メトキシルアミン塩酸塩) 20 μL を加え、60°C で 60 分間メトキシミ化した後、2) MSTFA 80 μL を加えて 60°C で 60 分間反応させました。対応する GC-HRT のサンプル分析パラメータは表1および表2に示します。

Table 1. GC-High Resolution TOFMS (Pegasus GC-HRT) Conditions - Drug Monitoring.

Gas Chromatograph	Agilent 7890 with 7693 Autosampler
注入	2 μL , スプリットレス, 280°C
キャリアガス	He 1.0 ml / min, Constant Flow
カラム	J&W VF-DA, 12 m x 内径0.20 mm x 膜厚0.33 μm (Agilent)
昇温プログラム	70°C (1 分)、25°C / min で 320°Cまで昇温 (5 分保持)
Mass Spectrometer	LECO Pegasus GC-HRT
トランスファーライン	300°C
イオン源温度	250°C (EI); 200°C (CI)
取得モード	高分解能, R = 25,000 (FWHM)
イオン化モード	EI および CI (反応ガス: CH_4 中 5% NH_3)
質量範囲 (m/z)	45-520 (EI); 60-800 (CI)
取得スピード	10 spectra/s

Table 2. GC-High Resolution TOFMS (Pegasus GC-HRT) Conditions—Molecular Profiling.

Gas Chromatograph	Agilent 7890 with 7693 Autosampler
注入	1 μL , スプリットレス 250°C (CI は 2 μL)
キャリアガス	He, 1.0 mL/min、定流量
カラム	Rxi-5 Sil MS, 30 m x 内径0.25 mm x 膜厚0.25 μm (Restek, Bellefonte, PA,USA)
昇温プログラム	70°C (4 分)、10°C / min で 300°Cまで昇温 (6 分保持)
Mass Spectrometer	LECO Pegasus GC-HRT
トランスファーライン	300°C
イオン源温度	250°C (EI); 200°C (CI)
取得モード	高分解能, R = 25,000 (FWHM)
イオン化モード	EI および CI (5% NH_3 in CH_4)
質量範囲 (m/z)	45-520 (EI); 60-1000 (CI)
取得スピード	10 spectra/s

3. Results and Discussion

A) 薬物モニタリング 包括的 GC-HRT データ取得により、尿サンプルを解析しました。この技術で得られる高情報量データの一例を、以下の分析イオンクロマトグラム (AIC) に示します (図2)。本サンプルからは、ニコチン、ニコチン代謝物、ステロール類など、多様な化合物が検出されました。代表的な化合物 (1-34) の化学式、保持時間、スペクトル類似度、質量精度 (平均 $|\text{ppm}| = 0.52$) を表3に示します。



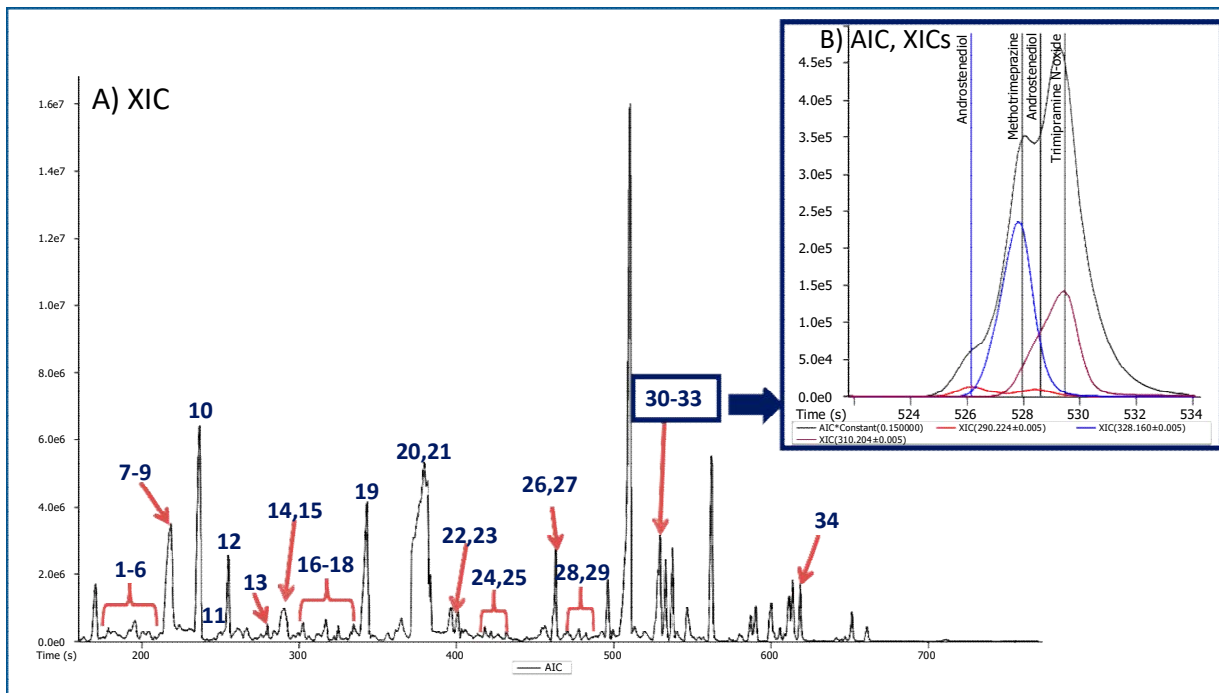


図2 薬物モニタリングワークフローに基づき前処理した未誘導体化尿サンプルの AIC

表3 尿中に含まれる代表的化合物

Peak #	Name	Formula	R.T. (s)	Area	Similarity	PPM
1	3-Pyridinol	C ₅ H ₅ NO	183	6185856	812	-0.09
2	Dihydrothymine	C ₈ H ₉ N ₂ O ₂	187	621464	746	0.73
3	N,2-Dimethylimidazole	C ₅ H ₈ N ₂	188	178643	813	-0.47
4	Ethanol, 2-phenoxy-	C ₈ H ₁₀ O ₂	194	4463665	809	-0.68
5	Octanoic acid, 2-methyl-	C ₉ H ₁₈ O ₂	204	3662983	726	-0.29
6	Dihydrobenzofuran	C ₈ H ₈ O	208	399549	737	0.00
7	Creatinine ME	C ₅ H ₉ N ₃ O	218	36375929	773	-0.92
8	o-Ethynylaniline	C ₈ H ₇ N	221	3330816	792	-0.19
9	5-methylhydantoin	C ₄ H ₇ N ₂ O ₂	232	24651088	793	-0.46
10	Nicotin	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	237	43628594	889	-1.04
11	1H-Indole, 3-methyl-	C ₉ H ₈ N	249	1481839	808	-1.11
12	2-(Methylmercapto)benzoxonitrile	C ₈ H ₇ NS	255	5421426	868	-0.74
13	Creatinine, 1-acetyl-	C ₈ H ₉ N ₃ O ₂	276	1017562	767	-0.13
14	Methyl 4-hydroxyphenylacetate	C ₉ H ₁₀ O ₃	288	1417270	738	-0.68
15	2,3,5-Trimethyl-6-ethylpyrazine	C ₉ H ₁₄ N ₂	292	207732	734	-0.91
16	4-vinyl-syringol	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	298	219900	764	0.44
17	Hexahydropyrrolizin-3-one	C ₇ H ₁₁ NO	302	2541535	730	-0.10
18	4-(3-Pyridyl)-tetrahydrofuran-2-one	C ₉ H ₉ NO ₂	317	1453261	862	-0.95
19	Cotinine	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	343	23921315	865	-0.91
20	methyl 1H-indole-3-acetate	C ₁₁ H ₁₁ NO ₂	371	1792478	792	-0.85
21	Hydroxycotinine	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₂	382	63335156	795	-0.57
22	Theobromine	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	397	5447784	790	-0.31
23	Proline anhydride	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₂	401	5113606	854	-0.52
24	Acridine, 9-methyl-	C ₁₄ H ₁₁ N	410	519170	707	-0.47
25	Imidazo[2,1-a]isoquinoline	C ₁₁ H ₈ N ₂	419	1196366	741	-0.13
26	Hydroxyandrostene	C ₁₉ H ₃₀ O	461	1102975	824	-0.81
27	Trimipramine	C ₂₀ H ₂₆ N ₂	463	8095369	783	-0.47
28	Androsta-5,16-dien-3-ol	C ₁₉ H ₂₈ O	478	541953	813	0.22
29	Cyclo (Phe-Pro)	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	492	1442590	747	-1.17
30	Androsterone	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	526	252420	834	0.06
31	LEVOMEPROPAPAZINE	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₅	528	12302443	883	0.13
32	Androstenediol	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	529	798453	736	0.06
33	Trimipramine-M (OH)	C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O	530	9437706	903	-0.63
34	Cholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O	619	799390	909	-0.35

この尿サンプルには、一般用医薬品、医療用医薬品、およびその代謝物も含まれていました（図3、表4）。これらの化合物の質量精度は -1.33~0.95 ppm の範囲であり、平均絶対値は 0.54 ppm でした。

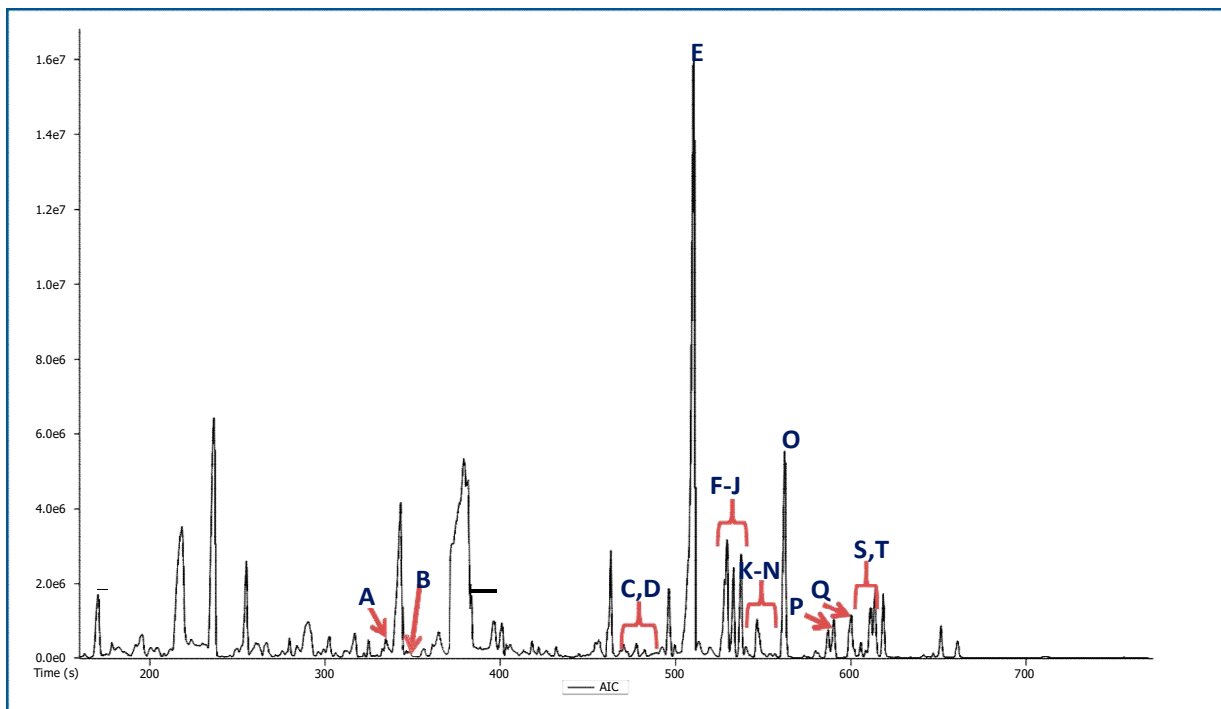


図3 尿サンプル中の一般用医薬品、医療用医薬品および代謝物

表4 尿サンプルで同定された医薬品の代表例.

Peak	Name	Formula	R.T. (s)	Area	Similarity	Ion	PPM
A	Ibuprofen	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	326.6	351091	745	M ⁺⁺	-0.82
B	Tramadol-M	C ₁₂ H ₁₄ O	345.4	121179	669	M ⁺⁺	-0.68
C	Chlorprothixene-M/A	C ₁₃ H ₇ ClOS	476.3	370789	729	M ⁺⁺	-0.33
D	Chlorprothixene-M (-(-CH ₃) ₂ N,-2H)	C ₁₆ H ₁₁ ClS	485.8	313724	761	M ⁺⁺	-0.42
E	Citalopram	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O	510.5	72567737	873	M ⁺⁺	0.33
F	Levomepromazine	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ OS	528	12302443	883	M ⁺⁺	0.13
G	Trimipramine-M (OH)	C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O	529.5	9437706	903	M ⁺⁺	-0.63
H	Quetiapine-M/A (N-Desalkyl,desulfo) ME	C ₁₈ H ₁₉ N ₃	533.1	7754648	897	M ⁺⁺	-0.39
I	Quetiapine-M (Desalkyl) ME	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ S	537.4	4936057	842	M ⁺⁺	-0.28
J	Trimipramine-M (OH,OCH ₃)	C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₂	538.8	263624	683	M ⁺⁺	0.56
K	Quetiapine-M/A (N-Desalkyl,desulfo)	C ₁₇ H ₁₇ N ₃	540.2	1287954	844	M ⁺⁺	-0.04
L	Quetiapine-M (Desalkyl)	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ S	546.4	4157125	900	M ⁺⁺	-0.75
M	3-hydroxytrimepazine	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ OS	547.7	2440199	711	M ⁺⁺	-0.15
N	Quetiapine-M (N-Ethyl,desulfo)	C ₁₉ H ₂₁ N ₃	549.3	231108	792	M ⁺⁺	0.89
O	Hydroxylevomepromazine Isomer	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₂ S	562.4	30115502	742	M ⁺⁺	0.31
P	7-Hydroxylevomepromazine	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₂ S	589.1	1001851	792	M ⁺⁺	0.95
Q	Levomepromazine-M/A (sulfoxide)	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₂ S	600.2	5887408	769	M ⁺⁺	0.28
R	Quetiapine-M (Formyloxy)	C ₂₀ H ₂₁ N ₃ O ₂ S	610.8	1447470	859	M ⁺⁺	-0.38
S	Quetiapine-M (-CH ₂ OC ₂ H ₄ OH,Oxo)	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ OS	613.8	2986947	761	M ⁺⁺	-1.08
T	Quetiapine	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₂ S	651.4	1805190	886	M ⁺⁺	-1.33

本分析では、抗うつ薬であるシタロプラムの質量スペクトルを図4に示します。シタロプラムの質量精度とライブラリーマッチ値は、それぞれ 0.33 ppm と 873/1000 でした。分子イオンが欠如、または極めて小さい場合には、相補的な CI-HRT データが同定に特に有用となります。抗精神病薬クエチアピンではその典型例が見られ、CI-HRT スペクトルには m/z = 384.17450 (1.25 ppm) に強いプロトン化分子イオンが明確に観測されました (図5)。

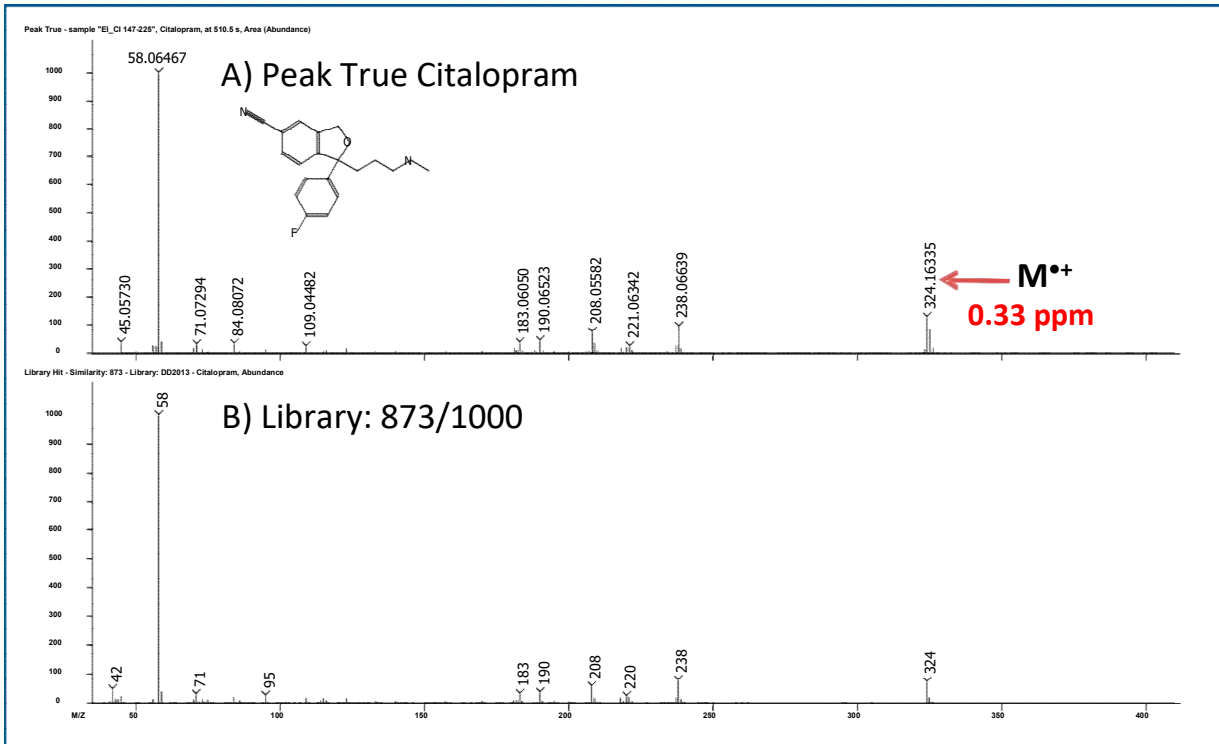


図4 A) Peak True および B) シタロプラムのライブラリースペクトル

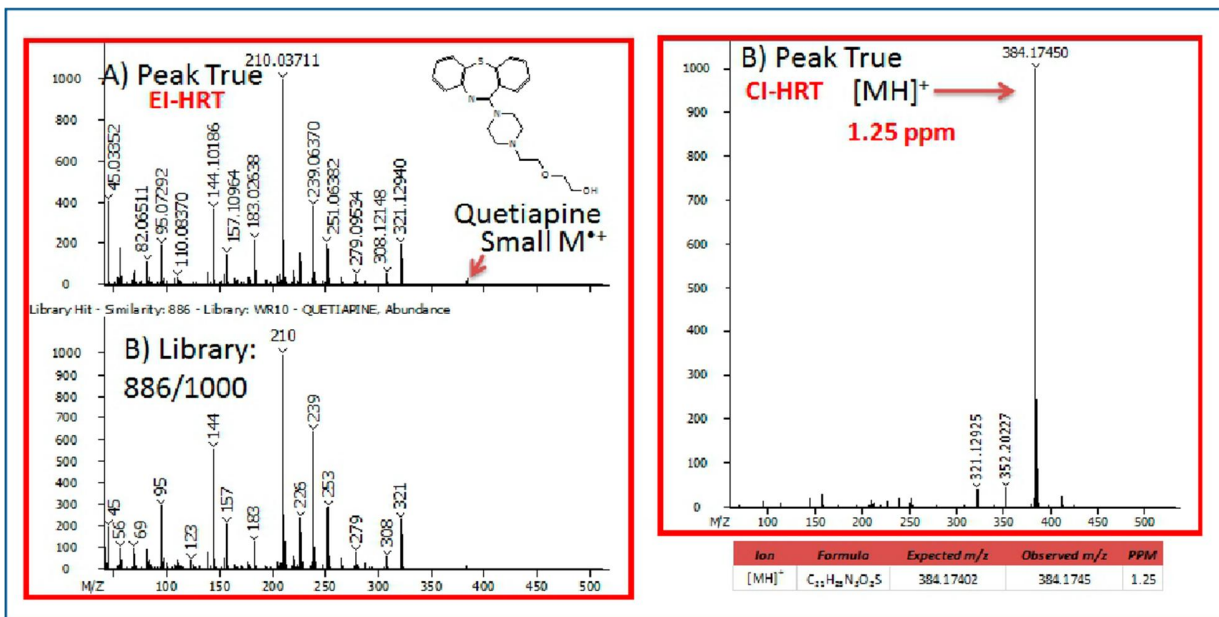


図5 A) Peak True (EI-HRT)、B) ライブラリー (EI-MS)、C) Peak True (CI-HRT) によるクエチアピンのスペクトル

B) 尿を実験セクションで示した 2 段階の誘導体化プロセスで処理することで、個人のより詳細な分子プロファイルを取得できます (図6)。誘導体化により、酸、二酸、アミノ酸、単糖、脂肪酸、二糖などのイオン性・極性化合物を含む解析範囲が大幅に拡大し、1300 以上のピークが観測されました (図7)。表5には、これら化合物の代表例を示しており、平均スペクトル類似度は 851/1000 でした。

c) EI-HRT スペクトルでは、スペクトル類似度検索と高精度質量イオンを利用した組成式推定により、代謝物を迅速かつ高信頼に同定できます (図8)。キナ酸フラグメント [M-C₆H₁₀O₅Si]⁺ および [M-C₆H₁₂O₅Si]⁺ の高精度質量イオンには、それぞれ 0.56 ppm および -0.65 ppm の質量精度が得られました。さらに、相補的な CI-HRT データにおける分子付加イオンは、同定の確証に利用できます。本酸では、m/z = 553.26832 に観測されたプロトン化分子イオン [MH]⁺ が 0.04 ppm の質量精度を示しました。

D) .

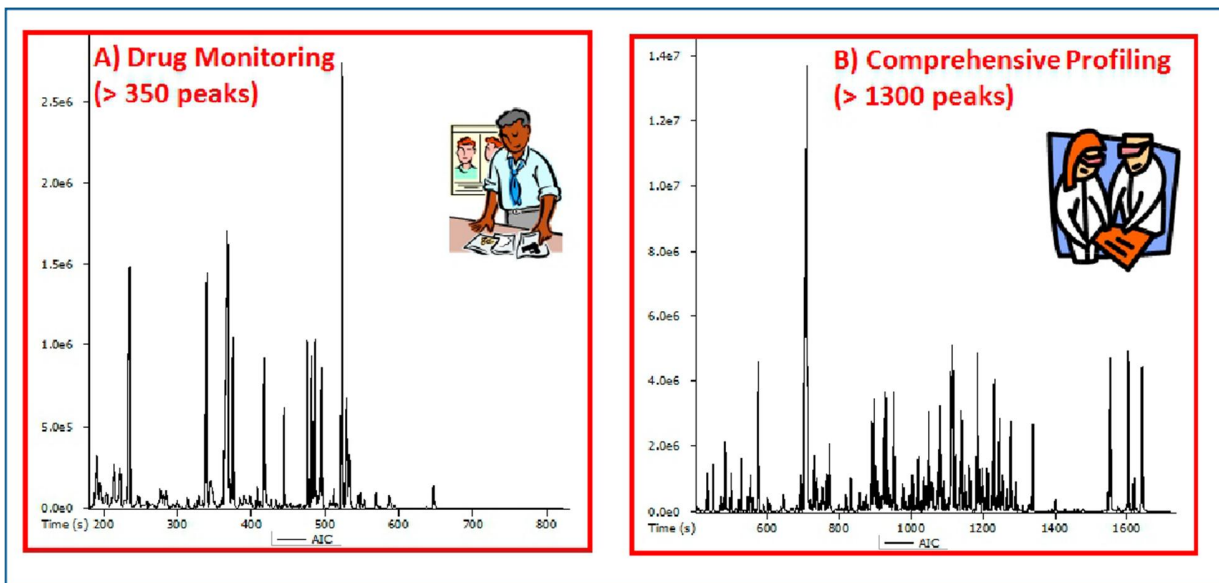


図6 A) 薬物モニタリングおよび B) サンプル前処理手法の違いを用いた尿サンプルの包括的プロファイリング

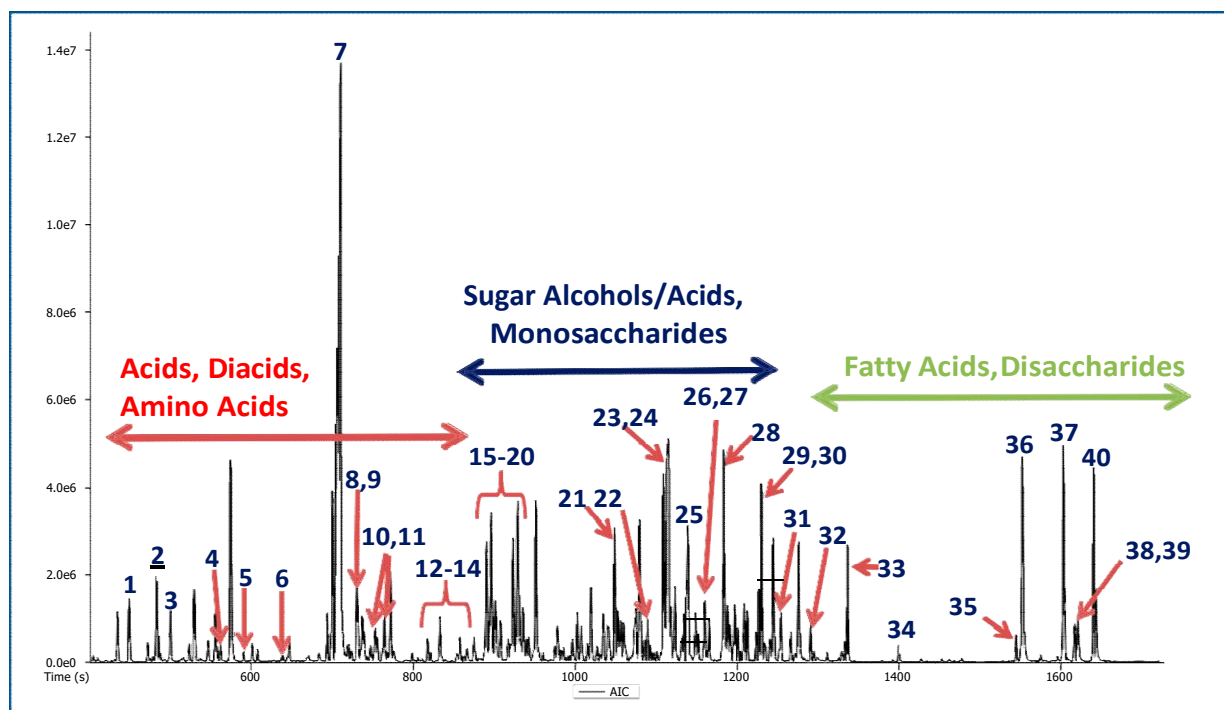
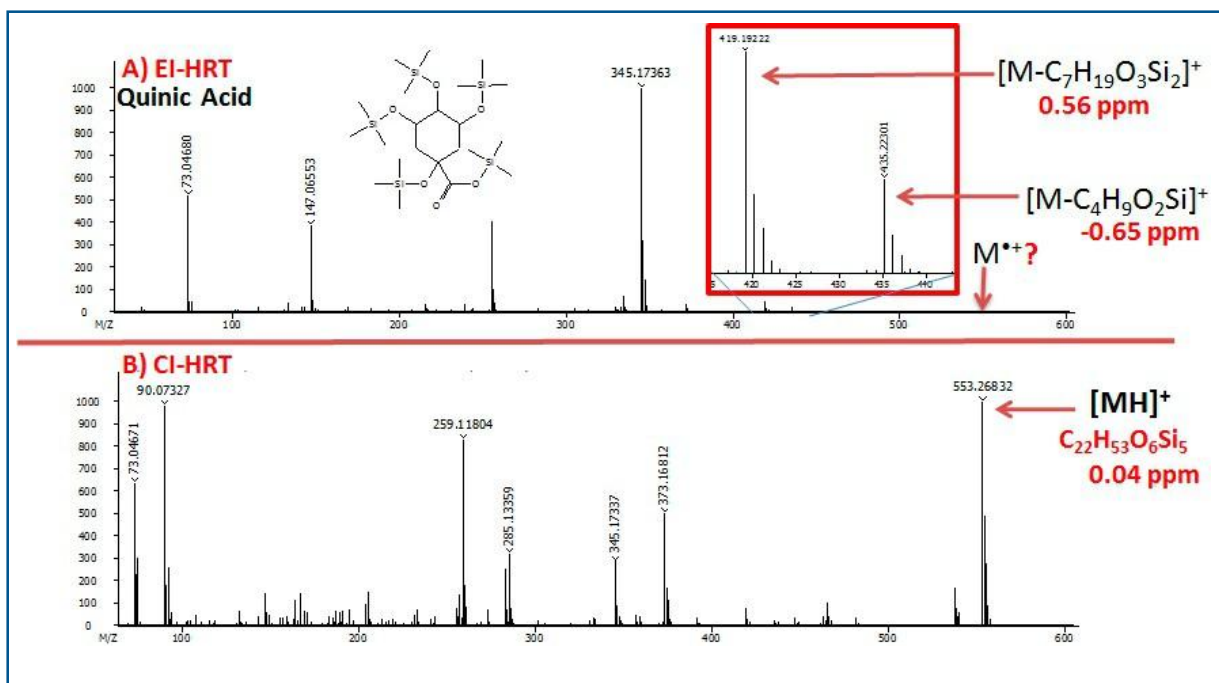


図7 誘導体化尿サンプルの AIC.

表5 誘導体化尿に含まれる代表的化合物

Peak	Name	Formula	R.T. (s)	Area	Similarity
1	3-Hydroxypyridine TMS	C ₈ H ₁₃ NOSi	449	15623393	781
2	Lactic acid 2TMS	C ₈ H ₂₂ O ₅ Si ₂	483	9907588	925
3	Glycolic acid 2TMS	C ₈ H ₂₀ O ₅ Si ₂	499	6617490	940
4	Oxalic acid 2TMS	C ₈ H ₁₈ O ₄ Si ₂	561	2282579	784
5	3-Hydroxyisobutyric acid 2TMS	C ₁₀ H ₂₄ O ₅ Si ₂	590	1340172	865
6	3-Hydroxyvaleric acid 2TMS	C ₁₁ H ₂₆ O ₅ Si ₂	638	592061	881
7	Phosphoric acid 3TMS	C ₉ H ₂₇ O ₄ PSi ₃	710	251511040	802
8	Glycine 3TMS	C ₁₁ H ₂₉ NO ₂ Si ₃	730	9514329	889
9	Methylmalonic acid 2TMS	C ₁₀ H ₂₂ O ₄ Si ₂	731	9167327	868
10	Glyceric acid 3TMS	C ₁₂ H ₃₀ O ₄ Si ₃	751	800170	857
11	Uracil 2TMS	C ₁₀ H ₂₀ N ₂ O ₂ Si ₂	755	1376869	897
12	3-Deoxytetric acid 3TMS	C ₁₃ H ₃₂ O ₄ Si ₃	818	1975789	828
13	3,4-Dihydroxybutanoic acid 3TMS	C ₁₃ H ₃₂ O ₅ Si ₃	833	5525926	917
14	2-Methylmalic acid 3TMS	C ₁₄ H ₃₂ O ₅ Si ₃	866	1962484	787
15	Threitol 4TMS	C ₁₆ H ₄₂ O ₄ Si ₄	890	9912288	916
16	Erythritol 4TMS	C ₁₆ H ₄₂ O ₄ Si ₄	896	11656512	928
17	5-oxo-Proline 2TMS	C ₁₁ H ₂₃ NO ₂ Si ₂	901	11765910	910
18	2-Hydroxyglutaric acid 3TMS	C ₁₄ H ₃₂ O ₅ Si ₃	907	1523178	734
19	Creatinine 3TMS	C ₁₃ H ₃₁ N ₃ O ₃ Si ₃	929	18522090	901
20	Threonic acid 4TMS	C ₁₆ H ₄₀ O ₅ Si ₄	935	4557440	924

Peak	Name	Formula	R.T. (s)	Area	Similarity
21	Arabitol 5TMS	C ₂₁ H ₅₄ O ₅ Si ₅	1049	9711476	933
22	Ribonic acid 5TMS	C ₂₀ H ₅₀ O ₅ Si ₅	1089	3706793	869
23	Hippuric acid TMS	C ₁₂ H ₁₇ NO ₃ Si	1115	51167658	780
24	Ribofuranose 4TMS	C ₁₇ H ₄₂ O ₅ Si ₄	1118	6671597	751
25	Quinic acid 5TMS	C ₂₂ H ₅₂ O ₆ Si ₅	1139	12127180	845
26	Altronic acid, 1,4-lactone 4TMS	C ₁₈ H ₄₂ O ₆ Si ₄	1160	2199226	615
27	Quinic acid-Isomer 5TMS	C ₂₂ H ₅₂ O ₆ Si ₅	1172	364426	680
28	Mannitol 6TMS	C ₂₆ H ₆₂ O ₆ Si ₆	1183	18592900	909
29	Gluconic acid, (6TMS)	C ₂₄ H ₆₀ O ₇ Si ₆	1227	6344075	855
30	Palmitic acid TMS	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si	1230	10291823	912
31	Salicylic acid 2TMS	C ₁₅ H ₂₅ NO ₄ Si ₂	1252	798597	703
32	3-Hydroxyhippuric acid 2TMS	C ₁₅ H ₂₅ NO ₄ Si ₂	1290	2592321	845
33	Stearic acid TMS	C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si	1337	5947507	928
34	Pseudouridine 5TMS	C ₂₄ H ₅₂ N ₂ O ₆ Si ₅	1400	2121203	865
35	Lactulose 8TMS	C ₂₆ H ₆₆ O ₁₁ Si ₈	1545	2385317	857
36	Lactose 8TMS, Isomer 1	C ₂₆ H ₆₆ O ₁₁ Si ₈	1552	34444484	930
37	Lactose 8TMS, Isomer 2	C ₂₆ H ₆₆ O ₁₁ Si ₈	1603	19257409	920
38	Lactose MEOX, 8TMS	C ₃₇ H ₈₉ NO ₁₁ Si ₈	1616	2647365	832
39	Maltose MEOX, 8TMS, Isomer 1	C ₃₇ H ₈₉ NO ₁₁ Si ₈	1620	4930508	813
40	Maltose MEOX, 8TMS, Isomer 2	C ₃₇ H ₈₉ NO ₁₁ Si ₈	1640	10556846	856



図B A) キナ酸の EI-HRT スペクトルおよび B) CI-HRT スペクトル。

4. Conclusion

LECO Pegasus GC-HRT は、尿サンプルを用いた薬物モニタリングおよび分子プロファイリングにおいて非常に優れたツールです。EI と相補的 CI データの組み合わせにより、大規模データベースを用いたスペクトル類似度検索に加えて、フラグメントイオン、分子イオン、付加イオンの的確な組成式推定が可能になります。包括的な前処理と GC-HRT データ取得を組み合わせることで、より詳細な被験者プロファイルが得られます。

5. References

¹Armstrong J.A., *Kidney International*, **2007**, *72*, 384-397.

²Schummer J. and Spector T.I., *HYLE*, **2007**, *13*, 3-41.

³Wishart D.S., et al., *PLOS ONE*, **2013**, *8*, e73076.



LECO, Pegasus, ChromaTOF-HRT, High Resolution Deconvolution, HRD are registered trademarks of LECO Corporation.

LECO Corporation | 3000 Lakeview Avenue | St. Joseph, MI 49085 | Phone: 800-292-6141 | Fax: 269-982-8977
info@leco.com • www.leco.com | ISO-9001:2008 | HQ-Q-994 | LECO is a registered trademark of LECO Corporation.