

# 代謝物プロファイリングの高度化： ハード／ソフトイオン化 高分解能 飛行時間型質量分析（TOFMS）



LECO Corporation; Saint Joseph, Michigan USA

Key Words: メタボロミクス、化学イオン化-高分解能飛行時間型質量分析（CI-HR-TOFMS）、同定

## 1. Introduction

メタボロミクスとその解析手法群は、定量生物学の基盤を提供するものであり、生体内の細胞で生成または変換される低分子化合物を検出するうえで不可欠です<sup>1,2</sup>。複数の推定によれば、発現変動が認められる分析対象物の大部分ははまだ未知化合物のままであるとされています。ガスクロマトグラフィー質量分析（GC-MS）は、その高感度、高いピークキャパシティ、および再現性の高さにより、植物および動物由来サンプルの代謝物プロファイリングにおいて最も広く使用されている手法の一つです。

飛行時間型質量分析（Time-of-Flight Mass Spectrometry：TOFMS）は、分析時間の短縮、効果的なピークデコンボリューション、ならびにリッチなデータセットを新規化合物探索のために繰り返し解析できる点など、さらなる利点を提供します。加えて、高分解能 TOFMS 装置はマトリックス由来の干渉を低減し、分子式決定やライブラリデータベースとの比較に適した、高品質かつ高精度な質量データの取得を可能にします。

本アプリケーションノートでは、これらの複雑なメタボロミクスサンプル中の分析対象物を同定するうえで、電子イオン化（Electron Impact：EI）および化学イオン化 - 高分解能飛行時間型質量分析（Chemical Ionization-High Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry：HR-CI）の両方が有効であることを示します。これらのイオン化手法は相補的な情報を提供し、代謝物の同定に対する信頼性を高めます。

TMS 誘導体化された代謝物は不安定であり、生体分子は同族体が多いという特性を有することから、メタボロミクス解析においては分子イオンの検出が極めて重要となります。

## 2. Results and Discussions

メタボロミクスにおける GC-MS を用いた化合物同定は、主として保持指標（Retention Index）と質量スペクトルライブラリとの照合に依拠しています。本研究では、マウス肝臓抽出物サンプルについて、包括的なプロファイルを取得するために、電子イオン化（Electron Impact：EI）および高分解能化学イオン化（High Resolution Chemical Ionization：HR-CI）による解析を組み合わせたワークフローを適用しました（図 1）。

検出された各成分に対して約 1 ppm に近い質量精度が得られ、分子イオン、フラグメントイオン、アダクトイオンに対する元素組成の決定が高い信頼性で可能となりました。高品質な EI データにより、ノミナル質量ベースのライブラリに対する検索が有効に行われ、マウス肝臓抽出物中の代表的化合物について高い類似度スコアが得られています（表 1）。これらのトリメチルシリル（TMS）誘導体における類似度は、質量精度情報を考慮しない条件下でも、最大 1000 点中 831～919 の範囲に分布していました。

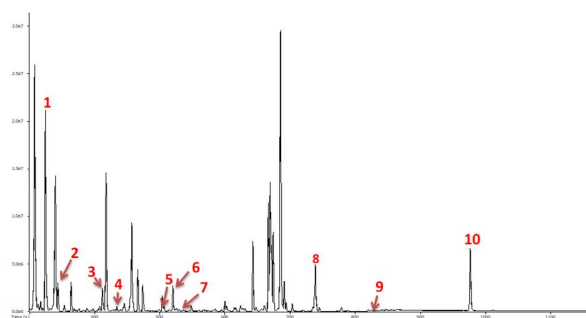


図 1. マウス肝臓抽出物の分析イオンクロマトグラム（AIC, EI）

表 1. マウス肝臓抽出物中の代表的化合物

Peak #	Name	Formula	R.T. (s)	Similarity
1	Lactic acid, bis(trimethylsilyl)oxy-, ester	C <sub>9</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub> Si <sub>2</sub>	324	916
2	L-Alanine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	C <sub>9</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>2</sub> Si <sub>2</sub>	344	904
3	N,O-Bis-(trimethylsilyl)valine	C <sub>11</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>2</sub> Si <sub>2</sub>	394	831
4	Glycine, N,N-bis(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	C <sub>11</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>2</sub> Si <sub>3</sub>	434	919
5	DL-Malic acid, O-trimethylsilyl-, bis(trimethylsilyl) ester	C <sub>13</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub> Si <sub>3</sub>	504	874
6	L-Proline, 5-oxo-1-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>2</sub> Si <sub>2</sub>	520	915
7	Erythronic acid, tetrakis(trimethylsilyl) deriv.	C <sub>16</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub> Si <sub>4</sub>	529	888
8	Glucopyranose, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, D-	C <sub>21</sub> H <sub>50</sub> O <sub>5</sub> Si <sub>5</sub>	643	911
9	Arachidonic acid, trimethylsilyl ester	C <sub>23</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> Si	779	859
10	Cholesterol trimethylsilyl ether	C <sub>30</sub> H <sub>54</sub> O <sub>2</sub> Si	977	906

5-オキソプロリンおよびコレステロールの 2 化合物については、Peak True（デコンボリューション後）スペクトルと NIST ライブラリスペクトルを図 2 および図 3 に示します。これらのスペクトルには分子イオンが明瞭に観測されており、同定結果の妥当性が強く裏付けられています。これら TMS 誘導体に対する質量精度は、それぞれ 0.72 ppm および -0.29 ppm でした。

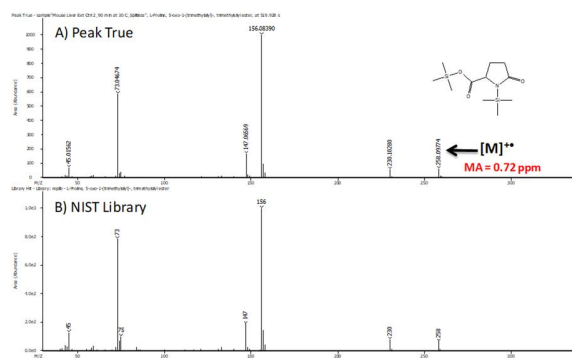


図 2. 5-オキソプロリン TMS 誘導体の Peak True (A) および NIST ライブラリ (B) 質量スペクトル

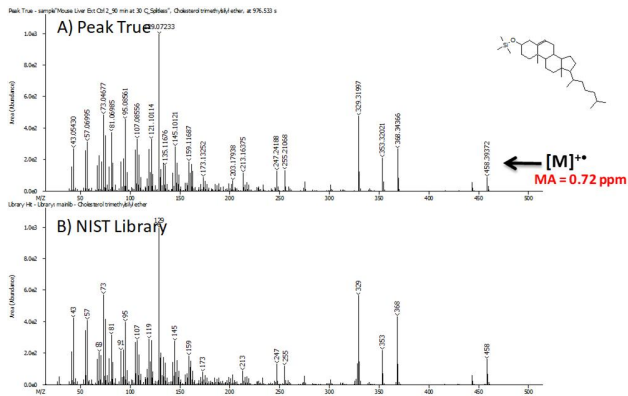


図3. コレステロール TMS 誘導体の Peak True (A) および NIST ライブラリ (B) 質量スペクトル

低濃度で存在する不安定 (labile) な分子の特性評価は、質量スペクトルの質が不十分である場合や、分子イオンが観測されない場合が多く、困難となることがあります。この課題は、ソフトイオン化と高精度質量に基づく分子式推定を組み合わせることで解決可能です。特に、TMS 誘導体化とハードイオン化およびソフトイオン化を併用する手法は、網羅的な代謝物プロファイリングにおいて、より信頼性の高いアプローチを提供します<sup>3</sup>。

HR-Cl の有用性を示す例として、2 型糖尿病患者における血糖変動性の指標として用いられる 1,5-アンヒドログルシトール (1,5-Anhydroglucitol : 1,5-AG) の TMS 誘導体を取り上げます<sup>4</sup>。1,5-AG (TMS) の EI ライブラリ類似度は 679/1000 と限定的であり、分子イオン ( $m/z$  452.22603) は Peak True の質量スペクトル中には観測されていませんでした (図 4 上段)。一方、候補として挙げた他の化合物には、ガラクトピラノシド TMS (628/1000)、アラビノフラノシド TMS (628/1000)、およびグルコピラノース誘導体 (625/1000) が含まれていましたが、これらはいずれも 1,5-AG とは分子式が大きく異なり (数十 amu の差)、妥当な候補とは言えません。

これに対し、提案された 1,5-AG (TMS) の HR-Cl スペクトル (図 4 下段) では、プロトン付加分子イオンが  $m/z$  453.23334 に明瞭に検出され、分子式  $C_{18}H_{45}O_5Si_4$  に対応し、その質量誤差は  $-1.1$  ppm でした。このように、ソフトイオン化による分子イオン検出と高精度質量情報を付加することで、EI スペクトルとライブラリ照合のみでは困難であった分析対象物の同定が、十分な確度をもって可能となりました。

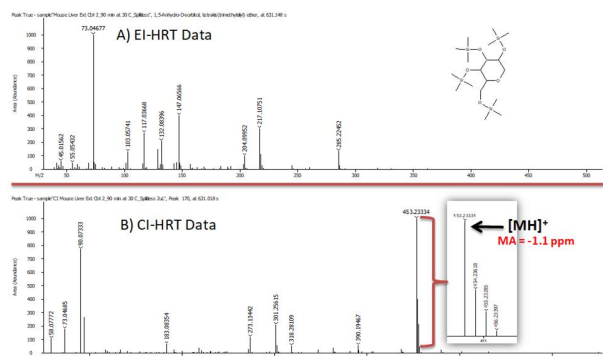


図4. 1,5-アンヒドログルシトールの Peak True EI (A) および HR-Cl (B) 質量スペクトル

### 3. Conclusions

GC 高分解能飛行時間型質量分析 (GC-HRT) は、複雑な生体マトリックス中に存在する代謝物のプロファイリングに適した分析手法です。電子イオン化 (Electron Impact : EI) と化学イオン化 (Chemical Ionization : CI) を組み合わせることで、1,5-アンヒドログルシトール (1,5-Anhydroglucitol : 1,5-AG) の明確な同定が実証されました。EI データは同定候補としての妥当性を示しましたが、擬分子イオンが 1,5-AG の分子式と完全に一致したことで、同定に関する不確実性は解消され、EI スペクトルに基づく他の候補化合物との明確な識別が可能となりました。

本アプローチは、分析対象物の信頼性の高い同定と、生化学的経路の解釈を確かな根拠に基づいて行うための有効な手段を提供します。特に、代謝物の発現量に差が認められる場合に有用です。高品質な質量スペクトルデータと優れた質量精度により、多くの分析対象物について高い確度で同定が可能でしたが、HR-Cl データを付加することで、サンプル中に低濃度で存在する不安定 (labile) な化合物の特性評価がさらに促進されました。

### 4. References

- 1) Kind T., Wohlgemuth G., Lee D.Y., Lu Y., Palazoglu M., Shahbaz S. and Fiehn O. "FiehnLib: Mass Spectral and Retention Index Libraries for Metabolomics Based on Quadrupole and Time-of-Flight Gas Chromatography/Mass Spectrometry" *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, 100038-10048.
- 2) Lisek J., Schauer N., Kopka J., Willmitzer L. and Fernie A.R. "Gas Chromatography Mass Spectrometry-Based Metabolite Profiling in Plants" *Nature Protocols*, **2006**, *1*(1), 387-396.
- 3) Warren C.R. "Use of Chemical Ionization for GC-MS Metabolite Profiling" *Metabolomics*, **2011**, 1-11.
- 4) Wang Y., Zhang Y.L., Wang Y.P., Lei C.H. and Sun Z.L. "A Study on the Association of Serum 1,5-Anhydroglucitol Levels and the Hyperglycaemic Excursions as Measured by Continuous Glucose Monitoring System Among People with Type 2 Diabetes in China" *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, **2012**, *28*(4), 357-62.

### 5. Sample Preparations

サンプルは以下の 2 段階で誘導体化を行いました。

- 1) 新たに調製したメトキシルアミン塩酸塩溶液 (ピリジン中 20 mg/mL) 20  $\mu$ L を抽出物に添加し、30 $^{\circ}$  C で 90 分間反応させました。
- 2) クロロトリメチルシラン 1% を含む BSTFA を 45  $\mu$ L 添加し、37 $^{\circ}$  C で 30 分間反応させました。

### 6. Experimental Conditions

#### Gas Chromatography

GC-MS 分析は、LECO Pegasus<sup>®</sup> GC-HRT と、Agilent 7890A ガスクロマトグラフおよび 7693 オートサンプラを用いて実施しました。測定条件の詳細を表 2 に示します。HR-Cl データは、より広い質量範囲で取得し、試薬ガスにはメタン中 5% アンモニアを用い、内部キャリブレーションには PFTBA を使用しました。

**Table 2. GC-HRT Instrument Parameters**

Injection	1 $\mu$ L (2 $\mu$ L CI), 250°C
Carrier Gas	He @ 1.0 mL/min.
Column	Rxi-5Sil MS, 30 m x 0.25 mm x 0.25 $\mu$ m (Restek, Bellefonte, PA, USA)
Temp. Program	50°C (1分) から 320°C (5分) まで 20°C/min
Transfer Line	300°C
Ionization Energy	70 eV (EI), 140 eV (CI)
Mass Range (m/z)	30-510 (EI), 50-650 (CI)
Acq. Rate	6 sps
Source Temp.	250°C (EI), 180°C (CI)
Mode	高分解能 (R = 25,000)
CI Reagent Gas	メタン中 5% アンモニア
Calibration	内部標準(PFTBA)