ApplicationNOTE

Waters

LC/TOFMS を用いたメタボノミクス研究
Ultra Performance LC™ (UPLC™)による革新

Application Note No. 720000866J

概要

メタボノミクス研究を、ターゲットバリデーション、薬効、病気診断、そしてテイラーメイド医療などに応用する時、一般的にプラズマ(血漿)、尿、脳脊髄液などの生体試料を用いて行われます。このような生体液はプロトン NMR や質量分析計のような情報量の多い分光(スペクトル分析)技術で分析されています。

生体液のような複雑なサンプルを質量分析計で測定するには、高分解能での分離を行い、イオン化抑制を最小限にし、最大限の感度を保つ必要があります。実際は HPLC で 3.5 μm から 10 μm のシリカベースの固定相を使用し、6000psi までの圧力で分析するのが一般的でした。しかしながら、粒子径、カラム長、流速、背圧などの変動要因の組み合わせによって、HPLC の能力をさらに引き出すことが理論的に可能です。

そこで Waters では粒子径の平方根が分離能に反比例する理論を利用し、より小さな粒子径でより高い分離能が得られるテクノロジーUltra Performance LC を開発しました。このテクノロジーはカラムの粒子径を 1.7 μm にすることにより従来の HPLC に比べて感度、分離能を飛躍的に改善しています。

本アプリケーションノートではこの UPLC テクノロジーを紹介しつつ、高感度・広いダイナミックレンジをもつ LC/TOFMS である LCT Premier を組み合わせて内因性代謝分析を行った例をご紹介いたします。

分析条件

装置

LC 条件:

UPLC: ACQUITY Ultra Performance LC
カラム: ACQUITY Ultra Performance LC BEH C_{18} 1.7μm、2.1mm×100 mm
移動相: A) 0.1 % ギ酸
B) 0.1 % ギ酸を含むアセトニトリル
グラジェント:

	%A	%B	Curve
0 min	100	0	—
0.5 min	100	0	6
5.0 min	5	95	6

流速 : 0.75mL/min
注入量: 5 μL

HPLC:
カラム: C_{18}、3.5μm、2.1mm×100 mm
移動相: A) 0.1 % ギ酸
B) 0.1 % ギ酸を含むアセトニトリル
グラジェント:

	%A	%B	Curve
0 min	100	0	—
0.5 min	100	0	6
5.0 min	5	95	6

流速 : 0.6mL/min

Mass Spectrometer

LockSpray 付き LCT Premier
イオン化 : ESI
測定モード: ポジティブ
コーン電圧: 60V
キャピラリー電圧: 3000V
脱溶媒温度: 250℃
イオンソースブロック温度: 120℃
分解能: 約 12,000FWHM(W モード)
Dwell タイム: 0.05sec
コリジョンガス: アルゴン
ロックマス: Leucine Enkephalin 25fmol/μL

図 1. UPLC テクノロジー　(Van Deemter plot)

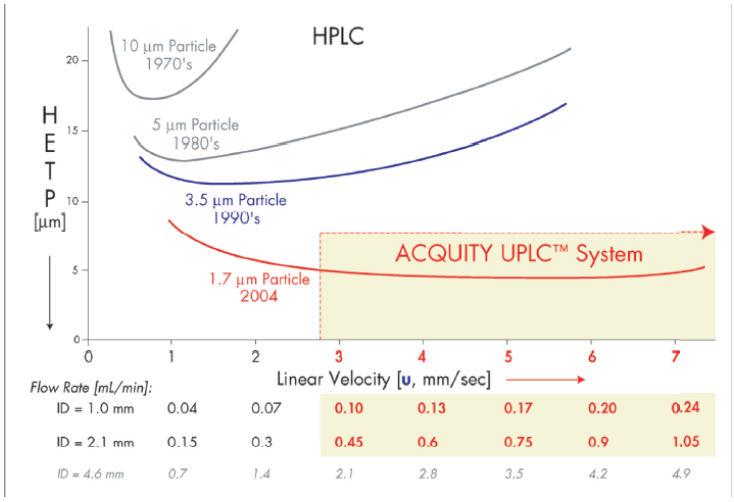
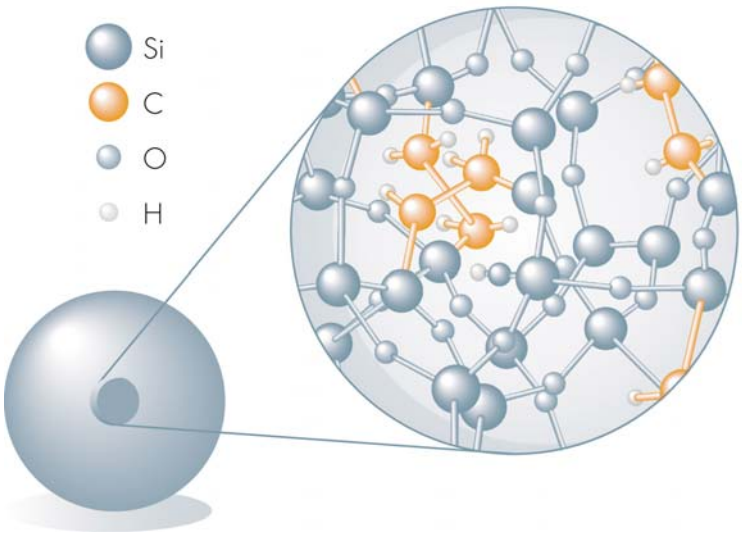


図 2. UPLC テクノロジー (カラム粒子テクノロジー)



Ultra Performance LC™ テクノロジー

図 1 が、粒子径の平方根が分離能に反比例する理論の図表です。縦軸は HETP（理論段高さ: µm）、横軸は線速度（mm/sec）です。HETP はカラムの長さを理論段数で割った値です。つまり HETP が値として低くなるほど、分離能は向上します。

図 1 から HPLC で従来使用されている粒子径 5～3.5 µm の場合、理論段高さの限界値が見て取れます。さらに注目すべきは線速度を上げると、理論段高さも上がり、分離能が低下するということです。

Ultra Performance LC の場合、粒子径 1.7 µm を採用し、より高い分離能が得られるようにしました。しかし単純に粒子径を小さくするだけでは従来の HPLC と同様、圧力をかけることによる粒子の変形やカラム設計が問題になるため、カラム設計だけでなく、カラム粒子自体にも新しいテクノロジーを採用しています。図 2 に粒子模式図を示しました。粒子の高次構造にエタン架橋を採用し、線速度を上げて圧力をかけても、高分離能を維持できるような革新的なテクノロジーが実現されました。

このカラムの改良に伴い、HPLC での圧力限界 6000psi 以上の耐高圧 LC が必要になりました。今回紹介している ACQUITY UPLC システムは最大 15000psi まで背圧をかけることが出来る Ultra Performance LC テクノロジーに対応する唯一の LC システムです。

粒子径の微細化、カラム粒子の架橋、高圧システムの総合的なバランスから、高速、分離能向上、感度上昇、シャープなピーク幅をもたらす次世代 LC システムが完成しました。

次項では HPLC との比較結果を掲載します。

図 3.HPLC/MS-UPLC™/MS 分離能比較

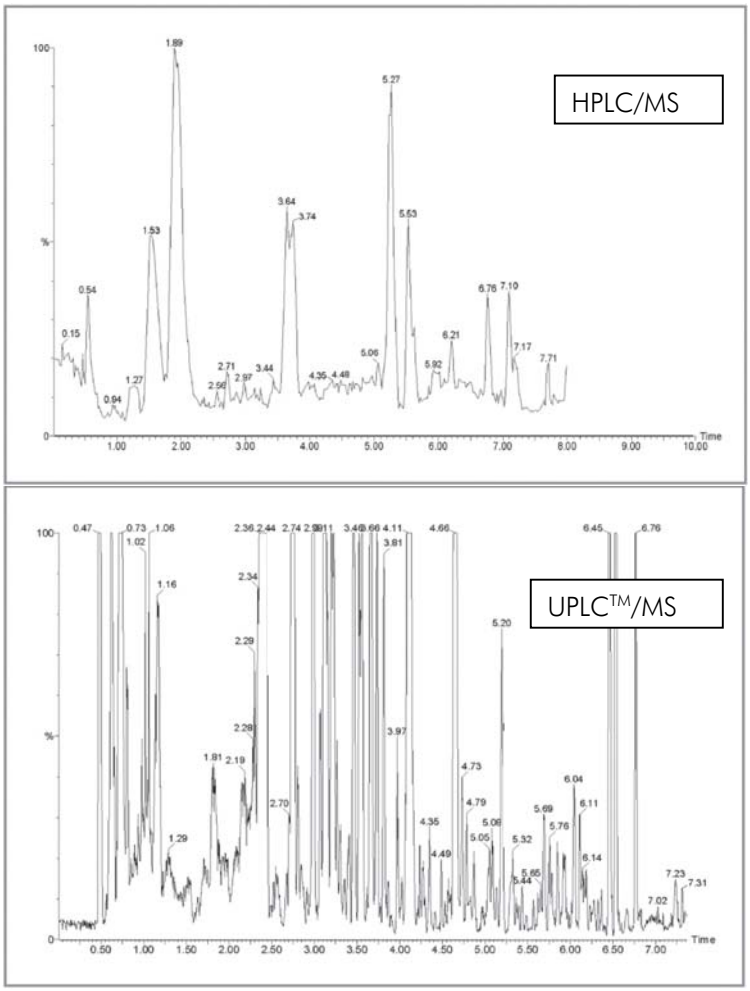


図 4.HPLC/MS-UPLC™/MS 感度比較

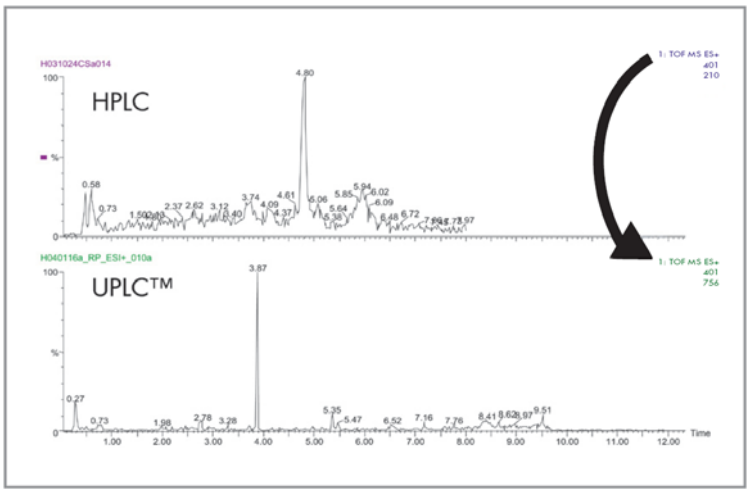


図 3 は UPLC/MS と HPLC/MS のトータルイオンクロマトグラム比較結果です。
サンプルはマウス尿を用い、10 分グラジェント条件で行っています。

UPLC で検出されたピーク数(~250)は従来の HPLC(~80-90)の約 3 倍と非常に高いピークキャパシティを示しています。UPLC™ で得られたクロマトグラムは非常にピークがシャープで分離能が高いことが確認できます。

実際のメリットとしてクロマトグラムのピーク数が多いという事は、LC でサンプルが効率的に分離され、各内因性代謝物が個別に質量分析計で測定されることを意味します。また、分離能が向上したことにより、イオン化抑制は最低限まで抑えられ、より多くの代謝成分が正確かつ精密に解析できます。

なお、今回使用した LCT Premier はこのシャープなピーク幅でも 10-20 データポイントを得る高いデータ取り込みスピードを有しています。

図 4 は感度比較を行った結果です。

UPLC/MS の場合、HPLC/MS に比べシグナルのレスポンスが非常に向上しています。これは、ピーク幅が狭くなり S/N 比が向上したため、またイオン化抑制が大きく改善されたためと考えられます。結果的に同じ質量分析計を用いながら、測定されたレスポンスは 210 から 756 と 3 倍以上に LC/MS の性能が向上しています。

図 5.ヌード、白、黒マウスの尿のクロマトグラム結果

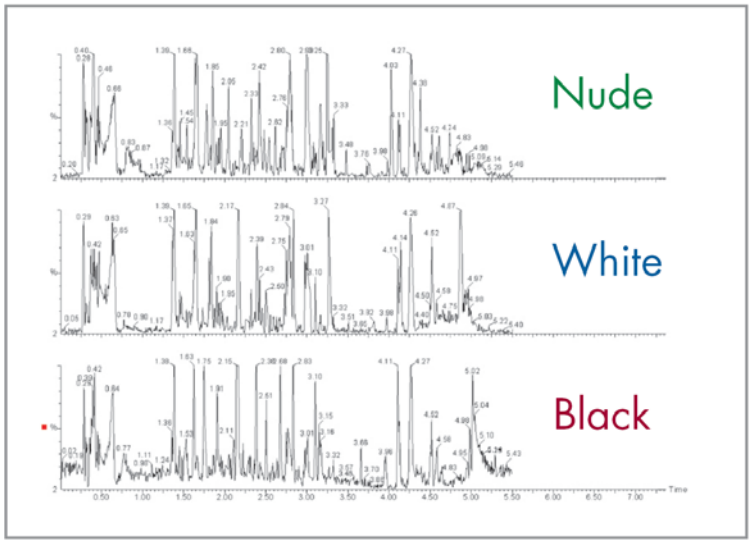
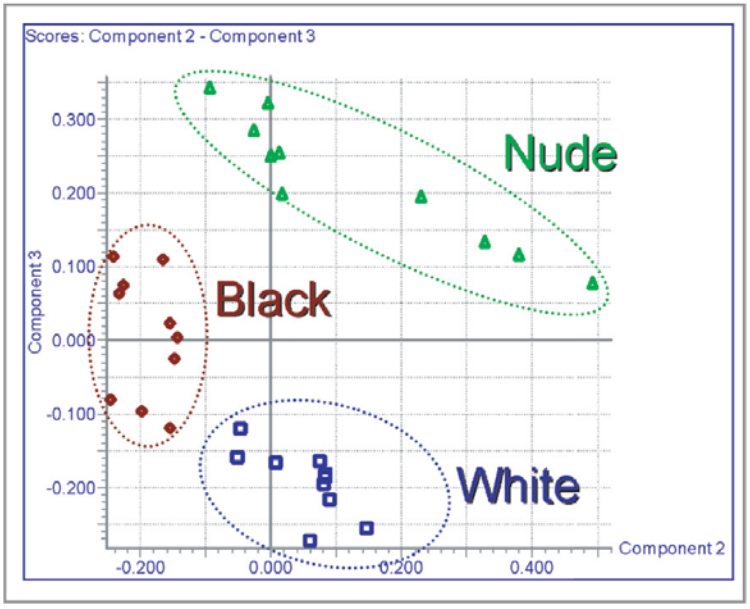


図 6. ヌード、白、黒マウスの尿の主成分解析
（スコアプロット）



UPLC/MS によるメタボノミクス

図 5 は、免疫抑制されたヌード、白、黒マウスの尿からのメタボノミクス分析です。

測定には、UPLC™/MS を使用しています。サンプルは、オスとメス(各 10 匹)から午前と午後に分けて計 120 サンプルの尿を採取しています。一旦冷凍保存を行い、測定時に解凍及び遠心分離した後、上澄を蒸留水で 4 倍希釈して用いました。これがメス午前(AM)を分析したクロマトグラムです。UPLC を使用しているため非常にシャープなピークが確認できます。生体試料など成分数が非常に多いサンプルの場合、各々の差を視覚的に分析することには限界があります。そのため一般的には統計学的手法を用いて解析されます。

統計学的手法として、多変量統計解析を用いるケースが一般的です。多変量統計解析には主成分分析（PCA: Principle conpoment analysis）や部分最小二乗回帰分析（PLS: Partial Least Squares）などいくつかの手法があります。

UPLC/MS データの統計学的解析

図 6 は、主成分分析（スコアプロット）の結果です。スコアプロットではサンプル間にある成分の差を総合的に判断して、グループ分けを行うことができます。

今回、LC/MS を制御するソフトウェアとして用いた MassLynx の専用ソフト MarkerLynx アプリケーションマネージャーには主成分分析が機能として内蔵されており、測定後に簡単な操作で自動解析を行うことが可能です。

図 7.　ヌード、白、黒マウスの尿の主成分解析
（ローディングプロット）

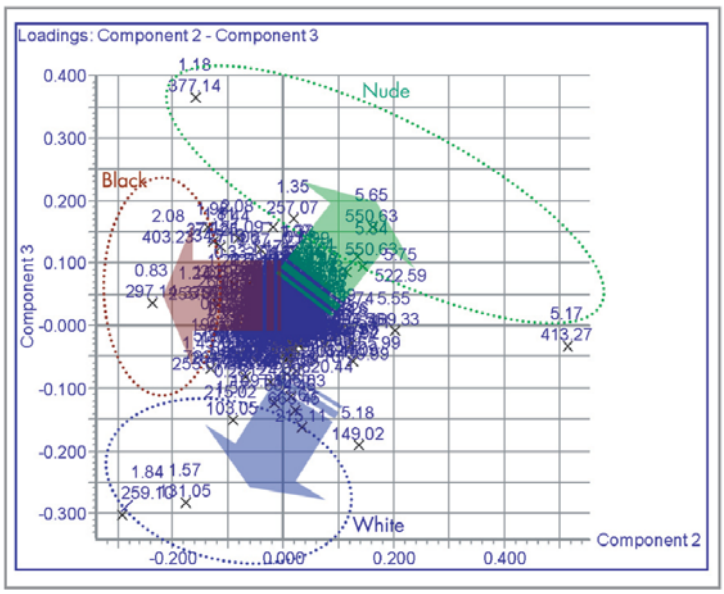


図 8. *m/z=259* で抽出したマスクロマトグラム比較
(黒-白マウス)

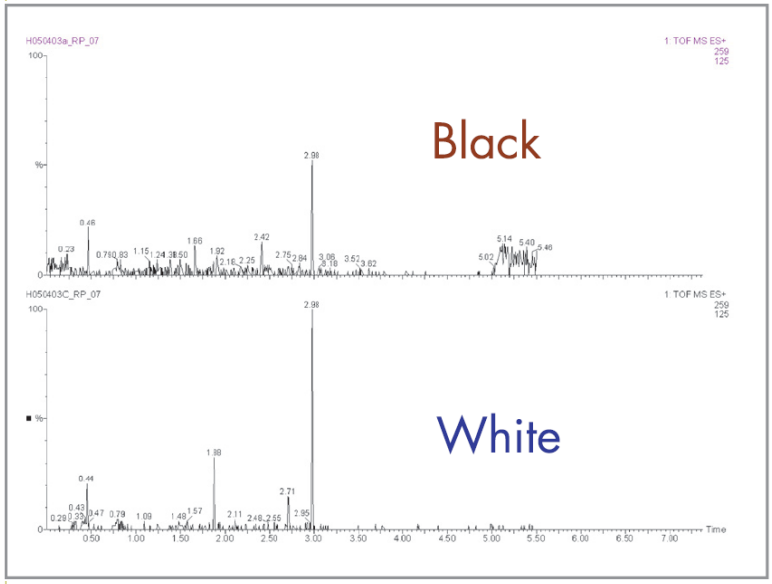


図 7 は、測定された全ての成分（化合物）をプロットしたローディングプロットです。

主成分解析によって、グループ間に差がない化合物は中心点（0.0） 近辺にプロットされます。あるグループ特有の化合物の場合は、中心点から大きくはずれた場所にプロットされます。つまり中心から大きく外れたものは、そのグループ特有の化合物（バイオマーカー候補）と考えられます

また、図 6 のスコアプロットで得られたグループの位置と、スコアプロットで得られた成分の位置は、同じ軸を取る限り、位置相関があります。2 つの図を重ね合わせることで、どのグループ特有の成分かを推定できます。一例として、白マウスのグルーピングに大きく寄与している *m/z*=259、保持時間(分) ：1.8 の化合物を確認します。

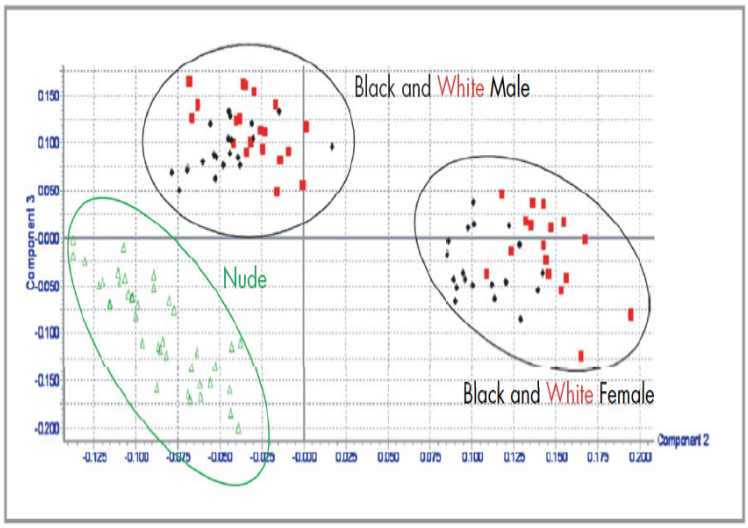
図 8 は、*m/z*=259 マスクロマトグラム比較です。黒マウスと白マウスで比較をしています。

このデータから、白マウスでは保持時間(分) ：1.8 のところにピークがみえますが、黒いマウスには見られません。サンプル間で明らかな差が発生しています。

MarkerLynx アプリケーションマネージャーにはこのようなグループ特有の化合物が、サンプル間及びグループ間でどの程度存在しているのかをパーセンテージ（%） 表示できるトレンドプロットという機能もあります。

またこのクロマトグラムでは生成されるピーク幅がわずか 1-2 秒程度であることが分かります。これは UPLC による高速・高分離能が大きく寄与している結果です。

図 9. 1 分間の UPLC™/MS 分析で得られた黒、白、ヌードマウスの尿のスコアプロット



まとめ

メタボノミクス研究では、LC に高い分離能と感度が必須です。Ultra Performance LC™ はカラム粒子径の小さい専用カラムを用い、最大 15,000psi という超高圧で分離分析が出来る画期的なテクノロジーです。このテクノロジーは非常にシャープなピーク幅と大幅な高速分析、感度上昇、分離能向上をもたらします。UPLC™ は、メタボノミクスのような代謝化合物のスクリーニングに最適です。

また、内因性代謝物は非常に数が多く、またサンプル及び成分間の濃度差が大きい傾向があります。これに対応する質量分析計として高感度と幅広いダイナミックレンジを持ち、かつフルスペクトルを取得可能な LCT Premier™ は最適といえます。

今回の実験から、複雑な生体マトリックスからのメタボノミクス研究に対し、ACQUITY UPLC™ と LCT Premier™ の組み合わせは理想的と考えられます。

UPLC による超高速分析

図 9 が、先のメタボノミクス研究に用いたものと同一のサンプルを使用し、1分間グラジェントで実験を行った結果です。

前の実験で行った5分間グラジェントに比べ検出ピーク数は少ないものの、免疫抑制されたヌードマウスと黒、白マウスは PCA 解析上、十分にグループ分けされており、また黒及び白マウスの性別でも確実にグループ分けできております。これの結果から UPLC™ は非常に高い処理能力を保持していると判断できます。

Waters
日本ウォーターズ株式会社　www.waters.co.jp
東京本社　〒140-0001 東京都品川区北品川 1-3-12 第 5 小池ビル
TEL 03-3471-7191　FAX 03-3471-7118
大阪支社　〒532-0011 大阪市淀川区西中島 5-14-10 カトキチ新大阪ビル 11F
TEL 06-6304-8888　FAX 06-6300-1734

LLOYD'S REGISTER QUALITY ASSURANCE ISO9001
UKAS QUALITY MANAGEMENT 001
VIT