

# ノンターゲット高分解能リポドミクスデータの ターゲットデータマイニングとアノテーション

包括的で信頼性の高いワークフロー



## 著者

Sheher Banu Mohsin,  
Layla Cosovic,  
Mark Sartain, Tracy Blethen,  
Pietro Morlacchi, and  
Daniel Cuthbertson  
Agilent Technologies, Inc.

## 概要

ノンターゲットリポドミクス手法において、脂質の完全で明確な特性解析は、未だに困難な作業です。この課題を解決するため、多くのラボ環境で容易に導入できる標準化された手法を用いて、LC/Q-TOF およびイオンモビリティ LC/Q-TOF に適した十分に精査されたリポドミクスデータベースが作成されました。このために、主要な全脂質クラスの合計 763 種類の脂質を網羅する、堅牢で十分に精査された包括的な LC/TQ メソッドが使用されました。<sup>1</sup> これらの脂質が、リテンションタイム (RT)、MS/MS スペクトル、衝突断面積を含むパーソナル化合物データベースライブラリ (PCDL) の作成の出発点となりました。これらの脂質は、信頼性の高い脂質同定のためのオーソゴナルな測定パラメータとして使用されます。このアプリケーションノートでは、リポドミクスデータからユーザーが重要な生物学的知見を得るために設計されたノンターゲットリポドミクスワークフロー内での、この十分に精査された PCDL<sup>2</sup> の使用について説明します。

## 概要

質量分析ベースのリピドミクスプロファイリングでは、1回の分析で、多様な構造を持つ多くの脂質を分離してから同定することが重要です。特に複雑な生体抽出物において、脂質を正確かつ明確に同定するには、クロマトグラフィー技術によって脂質を効率的に分離することが非常に重要です。各脂質クラス内には多くの異性体種や同重体種が含まれており、それらのクロマトグラフィー挙動は似ているため、脂質の分離とアノテーションは非常に困難です。

脂質の異性体と同重体の分離用の液体クロマトグラフィー技術は、ここ数年で大きく進歩しました。逆相メソッドと順相メソッド、および SFC 手法を使用できます。ただし、質量分析による脂質の同定は、このように大幅に改良されていても未だに困難です。(LC/MS によって) 脂質を完全かつ明確に特性解析するには、一般的に、クラス、元素組成、アルキル基の位置、二重結合の数、場所、形状、およびその他のパラメータを特定する必要があります。この構造情報の多くは、高分解能質量分析 (HRMS) タンデム MS/MS の実験で取得できます。この実験では、フラグメントライブラリを用いてスペクトルデータが解析され、化合物が同定されます。純正標準試料の小規模な MS/MS スペクトルライブラリも使用できますが、多くの脂質 MS/MS スペクトルは、インシリコライブラリを用いてアノテーションします。これらの方法でも脂質クラスとアルキル基の鎖長についてある程度の情報は得られるかもしれませんが、その他の必須の分子情報は得られないことが多いため、完全な脂質アノテーションは不可能です。

脂質同定の信頼性を上げ、アノテーションの不明確さを克服するため、質量分析では一般的に純正標準試料が使用されます。これらの標準試料は、その RT、精密質量、フラグメンテーションパターン (入手可能な場合) に基づいて質量フィーチャーを照合するために使用されます。残念ながら、この手法は限定的である可能性があります。数千もの脂質に利用できる標準試料はないからです。この課題に対応するには、信頼性の高い脂質アノテーションのための代替策が必要です。

血漿中の脂質のプロファイリング作業は、高い信頼性で実行できました。まず 763 種類の脂質で、堅牢で十分に精査された包括的な LC/TQ メソッドを使用しました。<sup>1</sup> このメソッドは、血漿中のすべての主要な脂質クラス (小さいリソ脂質から大きい非極性トリアシルグリセロールまで) を網羅するように設計しました。このメソッドは、膨大な数の脂質異性体をアノテーションしやすくするために十分精査しました。このためには、特定の異性体特性を持つ脂質標準の合成も必要でした。<sup>3</sup>

このメソッドを LC/Q-TOF とイオンモビリティ LC/Q-TOF に移管しました。このためには、各プリカーサ/フラグメントペアのユニット質量分解能の質量を、対応する精密質量に変換する必要がありました。これらの精密質量と対応する RT を、LC/Q-TOF システムを用いて実施するターゲット実験とノンターゲット実験で、プリカーサイオンとして使用しました。これらの実験で使用された HPLC 分離メソッドは、元の LC/TQ メソッドと同じです。次に、LC/Q-TOF によって生成された MS/MS スペクトルをエクスポートして PCDL を作成しました。この PCDL は、精密質量、RT、MS/MS スペクトルに基づく推定脂質エントリの同定に使用できます。

RT は、信頼性の高い脂質アノテーションにおける最も重要なパラメータの一つです。4 つの異なる拠点でのラボ間研究による RT の相対標準偏差 (RSD) を用いて、RT の日ごと、拠点ごとのばらつきを測定しました。<sup>4</sup> 600 種類超の脂質の RT の RSD は、0.2 % 未満でした。脂質アノテーションの信頼性を上げるため、イオンモビリティ LC/Q-TOF で一連の衝突断面積 (CCS) 値を生成しました。CCS 値を含めることで、精密質量、RT、MS/MS スペクトルの照合、CCS フィルタリングによる ID 検索ができるようになり、アノテーションの信頼性が向上しています。

信頼性の高い PCDL を作成するプロセスと高レベルな精査を実現するためのステップについては、アジレント資料番号 5994-7627EN で詳しく説明しています。<sup>2</sup>

この技術概要では、信頼性の高い PCDL を用いた脂質アノテーションのためのワークフローの導入について説明しています。また、信頼性の高いデータベースを用いた脂質アノテーションについて、脂質の抽出から、データ取り込み、最終ステップまでの全ステップを説明しています。

## ワークフローの導入

このワークフローでは、10  $\mu$ L の血漿サンプルまたは同等量の細胞または組織ホモジネート内の 44 の脂質クラスから 677 の異なる脂質種をプロファイリングする方法について詳しく取り上げます。脂質は逆相液体クロマトグラフィーで分離された後、高分解能質量分析計で分析されます。合計分析時間は、シングルカラムメソッドの場合はサンプルあたり 16 分、デュアルカラムシステムの場合は 13 分でした。データ処理には、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアを使用しました。

## 実験

### サンプル前処理

サンプル前処理の手順（分離を含む）は過去のアジレント資料で説明しています。<sup>1</sup> 簡単に説明すると、脂質抽出は 1.5 mL の小型遠心管で、ポリプロピレン製容積式ピペットを用いて実行しました。10  $\mu$ L の血漿を、ブタノール:メタノール（1:1）と 10 mM ギ酸アンモニウムおよび内部標準の混合物からなる 100  $\mu$ L の抽出溶媒と混合しました。次に、各サンプルを 5 秒間ボルテックスし、続いて温度を 21 ~ 25  $^{\circ}$ C に保ちながら 1 時間超音波洗浄器で超音波処理しました。次に、サンプルを遠心分離し（13,000 rpm、10 分、20  $^{\circ}$ C）、上清を 200  $\mu$ L のガラスインサート（部品番号 5183-2085）付きの 1.5 mL ガラスサンプルバイアル（部品番号 5190-9062）に移しました。サンプルは PTFE/S キャップ（部品番号 5185-5820）で密栓して分析まで -80  $^{\circ}$ C で保管しました。

### LC 機器

アジレントは最近、標準のマルチオミクス LC 構成を導入しました。これにより、あらゆる質量分析計モデルで代謝物、脂質、タンパク質の分析メソッドを簡単に導入できます。この LC 構成を分析に導入し、さらに LC 標準化で可能な RT アライメントを示しました。

LC は、Agilent 1290 Infinity II LC システムと次のモジュールで構成されます。

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ（G7120A）
- Agilent 1290 Infinity II バイアルサンブラ、サーモスタット付（G7129B）
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116B）

ターゲットリポミクス分析用の LC 構成では、LC/TQ を使用しました。ノンターゲットプロファイリング実験では、質量スペクトルとイオンモビリティの測定に、Agilent Revident LC/Q-TOF と Agilent 6560 イオンモビリティ LC/Q-TOF を使用しました。表 1 に、一般的なクロマトグラフィー条件を示します。

表 1. Agilent Revident LC/Q-TOF と Agilent 6560 イオンモビリティ LC/Q-TOF によるリポミクス分析のクロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値																						
分析カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 $\times$ 100 mm, 1.8 $\mu$ m (部品番号 959758-902)																						
インラインフィルタ	Agilent 1290 Infinity II インラインフィルタ, 0.3 $\mu$ m, 内径 2 mm, 130 MPa (部品番号 5067-6189)																						
カラム温度	45 $^{\circ}$ C																						
注入量	1 $\mu$ L (血漿 0.1 $\mu$ L に相当)																						
オートサンブラ温度	20 $^{\circ}$ C																						
ニードル洗浄	洗浄バイアル, 3 秒, 1:1 ブタノール:メタノール または、1:1 移動相 A:B でポートを 10 秒間洗浄																						
移動相	A) 水:アセトニトリル:2-プロパノール 5:3:2 中 10 mM ギ酸アンモニウム, 5 $\mu$ M Agilent InfinityLab 不活性化添加剤 (部品番号 5191-3940) B) 水:アセトニトリル:2-プロパノール 1:9:90 中 10 mM ギ酸アンモニウム (注: 移動相 B には InfinityLab 不活性化添加剤を添加しないでください)																						
流量	0.4 mL/min																						
グラジエントプログラム	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>15</td></tr> <tr><td>2.5</td><td>50</td></tr> <tr><td>2.6</td><td>57</td></tr> <tr><td>9</td><td>70</td></tr> <tr><td>9.1</td><td>93</td></tr> <tr><td>11</td><td>96</td></tr> <tr><td>11.1</td><td>100</td></tr> <tr><td>12</td><td>100</td></tr> <tr><td>12.2</td><td>15</td></tr> <tr><td>16</td><td>15</td></tr> </tbody> </table>	時間	%B	0	15	2.5	50	2.6	57	9	70	9.1	93	11	96	11.1	100	12	100	12.2	15	16	15
時間	%B																						
0	15																						
2.5	50																						
2.6	57																						
9	70																						
9.1	93																						
11	96																						
11.1	100																						
12	100																						
12.2	15																						
16	15																						
ストップタイム	16 分																						
ポストタイム	なし																						

## Agilent Revident LC/Q-TOF 取り込みメソッド

MS/MS データの取り込みには、Revident LC/Q-TOF プラットフォームと Agilent Jet Stream ESI イオン源を使用しました。データはポジティブモードとネガティブモードの両方で採取しました。クロマトグラフィーおよび Auto MS/MS 質量分析パラメータの実験メソッドの詳細を表 2 に示します。

表 2. Agilent Revident LC/Q-TOF Auto MS/MS パラメータ

パラメータ	設定値
ガス温度	300 °C
ガス流量	10 L/min
ネブライザ圧力	25 psig
シースガス温度	300 °C
シースガス流量	12 L/min
キャピラリ電圧	3,500 V (+), 3,000 V (-)
ノズル電圧	0 V
フラグメンタ電圧	150 V
スキマ電圧	45 V
オクタポール RF Vpp	750 V
リファレンス質量	m/z 121.050873, m/z 1221.990637 (+) m/z 119.03632, m/z 980.016375 (-)
MS および MS/MS 範囲	m/z 50 ~ 3,000 (+)
最小 MS および MS/MS 取り込みレート	3 スペクトル/秒
選択幅	狭い (~ 1.3 m/z)
コリジョンエネルギー	25 eV
1 サイクルあたりの最大プリカーサ数	3
プリカーサアバンドンスベースのスクラン スピードとプリカーサアバンドンスベースの 取り込みスピード	あり、ターゲット 25,000 カウント/スペクトル
MS/MS 累積時間制限の使用	あり
ターゲット TIC に到達できないプリカーサの 除去	なし
MS/MS のスレッショールド	5,000 カウントおよび 0.001 %
アクティブな排除の有効化	あり、1 回繰り返して 0.05 分間排除
純度	ストリンジェンシー 70 %、カットオフ 0 %
同位体モデル	一般的な有機分子
プリカーサの順位	1、2、不明
静的排除範囲	m/z 40 ~ 151 (+) m/z 40 ~ 210 (-)

## Agilent 6560 イオンモビリティ LC/Q-TOF 取り込みメソッド

脂質の CCS 値の測定には、Agilent 6560 イオンモビリティ LC/Q-TOF プラットフォームと Agilent Jet Stream ESI イオン源を使用しました。イオンモビリティ (IM) 質量分析データは、m/z 50 ~ 3,000 のポジティブおよびネガティブイオン化モードで採取しました。サイクルタイムは 1 s/スペクトル、IM トラップの充填時間は 3,800  $\mu$ s、トラップのリリース時間は 250  $\mu$ s です。4 ビットのパルス連鎖長のマルチプレックスを使用しました。脂質は、データ非依存型取り込みの All Ions メソッドと 0 ~ 25 V のコリジョンエネルギーの交流フレームを用いた衝突誘起解離によってフラグメント化しました。IM LC/Q-TOF の取り込みパラメータを表 3 に示します。

表 3. Agilent 6560 イオンモビリティ LC/Q-TOF データ非依存型取り込みパラメータ

パラメータ	設定値
ガス温度	300 °C
ガス流量	10 L/min
ネブライザ圧力	25 psig
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	11 L/min
キャピラリ電圧	3,500 V (+), 3,000 V (-)
ノズル電圧	1,000 V
フラグメンタ電圧	400 V
オクタポール RF Vpp	750 V
リファレンス質量	m/z 121.050873, m/z 1,221.990637 (+) m/z 119.03632, m/z 980.016375 (-)
MS および MS/MS 範囲	m/z 50 ~ 3,000 (+)
フレームレート	0.9 フレーム/秒
IM 過渡レート	17 IM 過渡/フレーム
コリジョンエネルギー	25 eV
最大ドリフト時間	60 ms
ドリフトチューブ入口電流	1,750 V

## データ解析用ソフトウェア

脂質ライブラリ (PCDL) の管理と編集には、Agilent ChemVista ソフトウェアを使用しました。ポジティブイオン用にチェックされた (+H) と (+NH<sub>4</sub>)、およびネガティブイオン用にチェックされた (-H) と (+CH<sub>3</sub>COO)<sup>-</sup> を用いたバッチターゲットフィーチャー抽出には、データ解析メソッド Lipids.m を使用しました。

差分解析には、Agilent MassHunter Mass Profiler Professional (MPP) ソフトウェアバージョン 15.1 を使用しています。リビドミクス実験タイプを用いて、2 種類の実験（ポジティブイオンまたはネガティブイオン）を作成しました。パーセントシルシフト正規化アルゴリズム（75%）を使用し、すべてのサンプルの中央値に対してデータセットをベースライン補正しました。Agilent MassHunter Mass Profiler (MP) ソフトウェアと MPP は、複雑なリビドミクスの結果を調査および解釈するための統計解析ソフトウェアツールを備えています。MP と MPP により、サンプル全体のフィーチャーの RT および  $m/z$  アライメント、反応の正規化、サンプル間の有意な差異の特定の統計が可能になります。MPP にはアノテーション済み脂質分析の実験タイプが追加されました。これにより、脂質クラススペースの正規化ツールと視覚化ツールを使用できます。

Agilent MassHunter ID Browser バージョン 10.0 を MPP で使用して、ノンターゲットワークフローでアノテーションを作成しました。要求基準として  $\pm 5$  ppm の質量と  $\pm 0.10$  分の RT を用いました。

### IM LC/Q-TOF および LC/Q-TOF データファイルのデータ解析

ファイルの処理には MP ソフトウェアを使用しました。マルチプレックスデータファイルの場合、MP を使用する前に、まずファイルがデマルチプレックスされます。つまり、IM LC/Q-TOF からのデマルチプレックスされたデータファイルまたは LC/Q-TOF からの .d ファイルが、バッチモードで MP または MPP にインポートされます。フィーチャー抽出の後に、信頼性の高い PCDL を用いてエンティティをアノテーションします。アノテーションは精密質量、RT、MS/MS スペクトルの一致に基づきます。IM LC/Q-TOF データファイルでは、CCS 値も照合して、脂質アノテーションの高い信頼性を確保しています。データ取り込みとデータ解析の一般的なワークフロー図を図 1 に示します。データ解析のステップとワークフローを図 2 に示します。

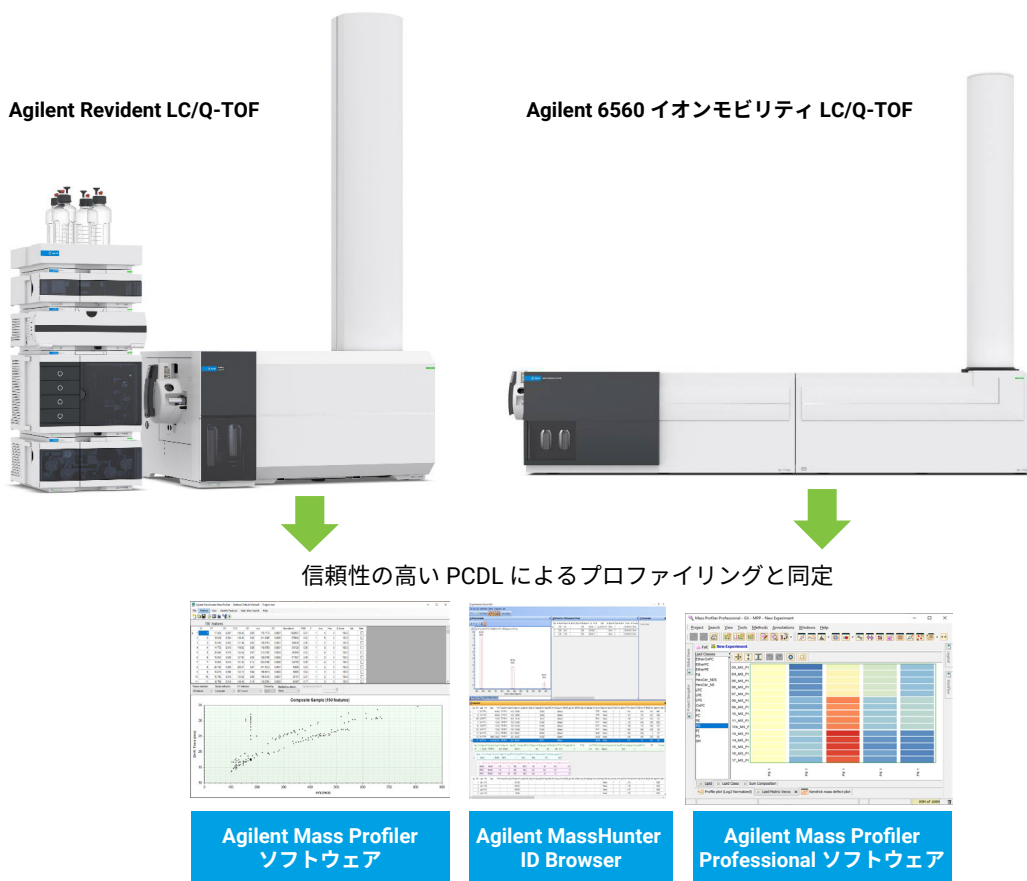


図 1. データ取り込みとデータ処理のワークフロー

ステップ 1. Agilent Mass Profiler  
ソフトウェアによるデータファイルの処理

ステップ 2. ステップ 1 でエクスポートした  
.cef ファイルを用いた Agilent Mass Profiler  
Professional ソフトウェアによる統計解析

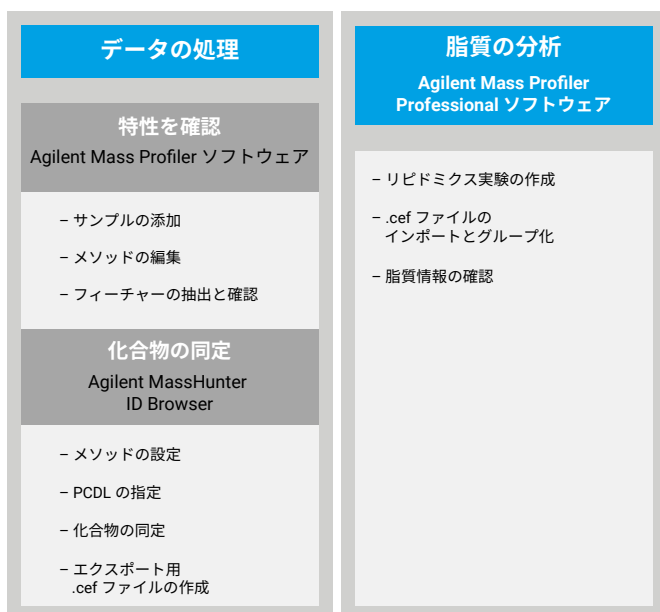


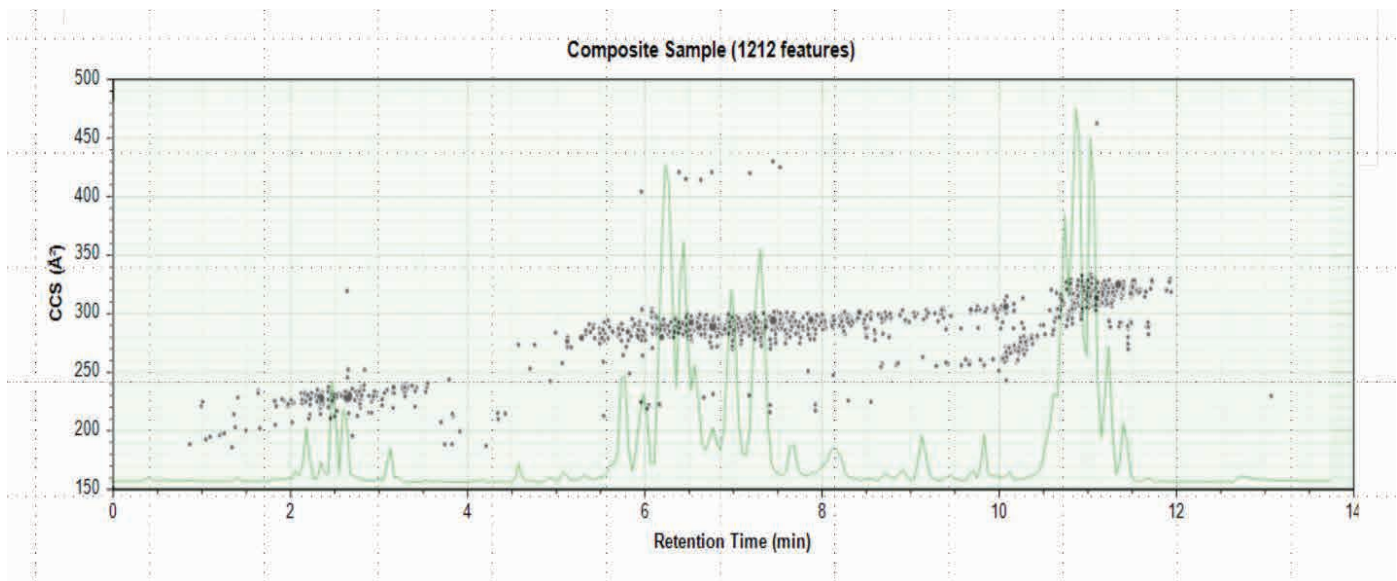
図 2. データ解析のワークフロー図

## 結果と考察

図 2 のデータ処理ステップのステップ 1 の結果（フィーチャー検出とアノテーションを含む）を、図 3 に示します。図 3 の表の各行を詳しく調べて、選択したフィーチャーの抽出されたイオンクロマトグラムと質量スペクトルを示すことができます。

脂質マトリックスは、MPP で脂質データを表示するために使用できるいくつかの視覚化ツールの一つです。グラフィック表示には、PC クラスの各脂質のサンプル内のさまざまなアバundanceレベルが表示されます。青はアバundanceが低いことを示しています。赤はアバundanceが高く、青と赤の間の色は、黄、オレンジ、赤へと変化するにつれて、アバundanceレベルが上がることを示します。脂質データを表示するためのいくつかのプロットの一つを図 4 と図 5 に示します。図 5 では、質量と RT の関係を脂質クラスに従って色分けしています。

図 6 の Kendrick 質量欠損プロットは、同族列の視覚化に便利なツールです。<sup>5</sup> ヘテロ原子の数とリングおよび二重結合の数が同じであるが CH<sub>2</sub> 基の数が異なる化合物は、Kendrick 質量欠損が同じになります。これらの化合物がプロット上に水平に並んでいます。データベースとの不一致やアノテーションの欠損の可能性があれば、簡単に特定できます。



6121 features															
ID	Name	Formula	RT (DB)	Ion Species	Mass (DB)	RT	SD	DT	SD	CCS	SD	m/z	SD	Abundance	
1	1 SM (d18:1/16:0)	C39 H79 N2 O...	5.856	(M+H)+	702.5676	5.955	0.008	33.818	0.059	282.42	0.49	703.5746	0.0009	3348672	
2	2 LPC (16:0) [sn1]	C24 H50 N O7 P	2.591	(M+H)+	495.3325	2.645	0.007	27.273	0.042	229.55	0.35	496.3407	0.0015	2749995	
3	3 PC (18:1_18:1)	C44 H84 N O8 P	7.239	(M+H)+	785.5935	7.523	0.011	34.848	0.039	290.43	0.32	786.5994	0.0011	2521345	
4	4 PC (16:0_18:1)	C42 H82 N O8 P	7.055	(M+H)+	759.5778	7.184	0.011	34.331	0.035	286.29	0.29	760.5849	0.0011	2278330	
5	5 LPC (18:0) [sn2]	C26 H54 N O7 P	3.111	(M+H)+	523.3638	3.290	0.009	28.224	0.029	237.22	0.25	524.3704	0.0008	2185121	
6	6 TG (52:2) [SIM]	C55 H102 O6	11.314	(M+NH4)+	858.7676	11.313	0.003	38.602	0.058	321.16	0.48	876.7991	0.0029	2108318	
7	7 PC (18:1_18:2)	C44 H82 N O8 P	6.494	(M+H)+	783.5778	6.766	0.010	34.705	0.045	289.25	0.37	784.5845	0.0008	2080693	
8	8 PC (16:0_18:2)	C42 H80 N O8 P	6.355	(M+H)+	757.5622	6.460	0.009	34.044	0.175	283.91	1.46	758.5683	0.0016	2009853	
9	9 LPC (18:2) [sn2]	C26 H50 N O7 P	2.174	(M+H)+	519.3325	2.340	0.008	27.095	0.076	227.77	0.64	520.3397	0.0009	1995130	
10	10 TG (52:3) [SIM]	C55 H100 O6	11.116	(M+NH4)+	856.7520	11.156	0.006	38.486	0.075	320.21	0.62	874.7841	0.0007	1977839	
11	11 PC (15:0_18:1) ...	C41 H73 D7 N ...	6.517	(M+H)+	752.6061	6.634	0.010	34.102	0.191	284.43	1.59	753.6113	0.0012	1967886	
12	12	C32 H52 N2 O4		(M+H)+	528.3927	2.774	0.007	27.776	0.091	233.40	0.77	529.3991	0.0005	1943741	
13	13 PC (38:6) (a)	C46 H80 N O8 P	5.767	(M+H)+	805.5622	6.206	0.008	34.749	0.043	289.49	0.36	806.5679	0.0019	1915518	
14	14 PC (16:0_18:2)	C42 H80 N O8 P	6.355	(M+H)+	757.5622	6.460	0.009	34.319	0.130	286.20	1.09	758.5696	0.0013	1796827	

図 3. 信頼性の高い PCDL を用いた NIST 血漿抽出物のアノテーションの結果

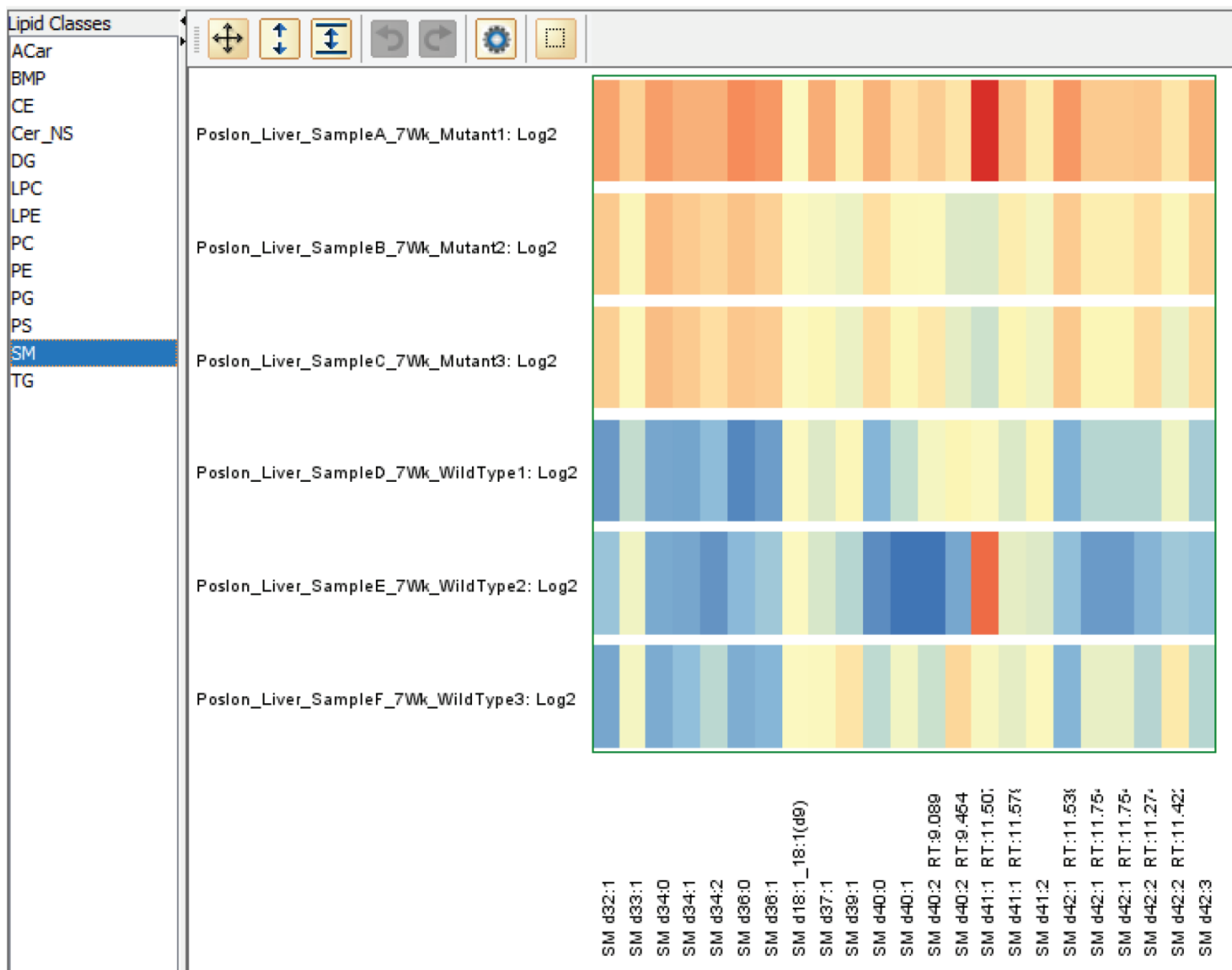


図 4. 図 2 のステップ 2 の Agilent Mass Profiler Professional ソフトウェアを用いて生成された脂質マトリックス。結果は PC 用に表示



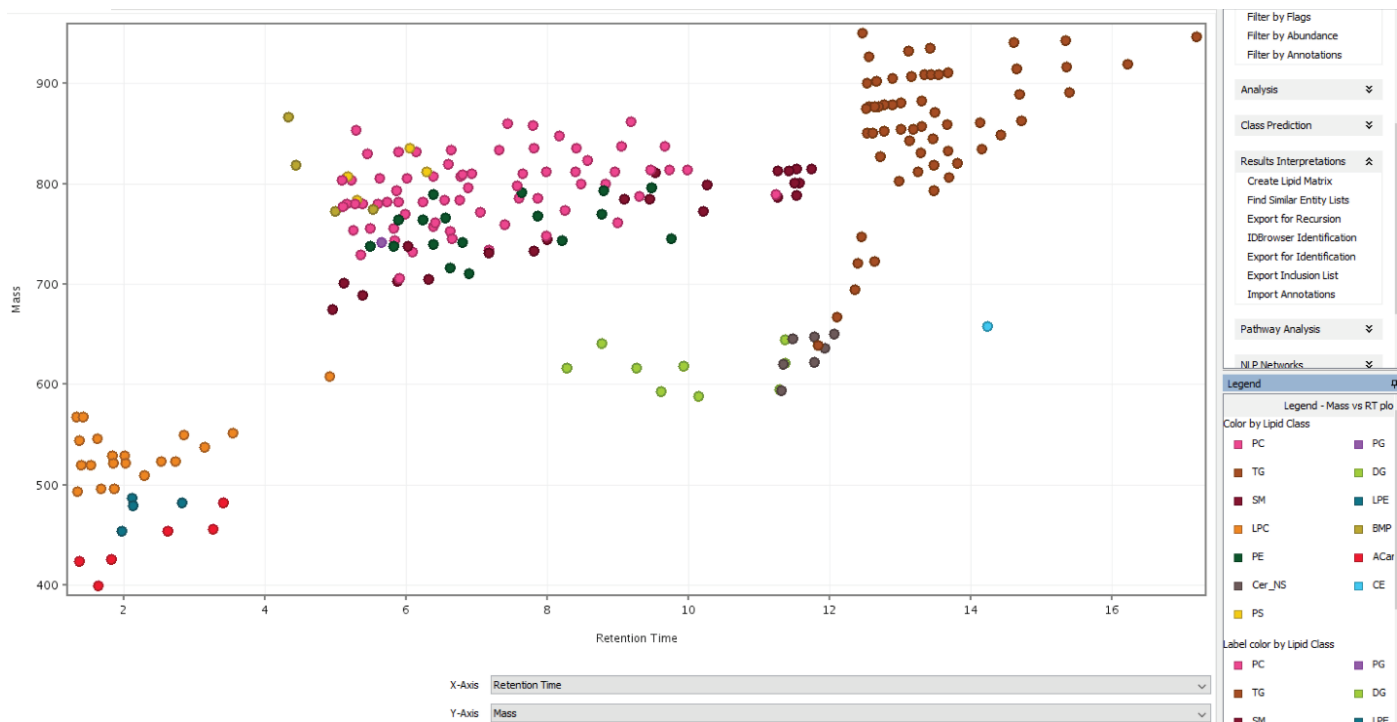


図 5. さまざまな脂質クラスの質量と RT のプロット

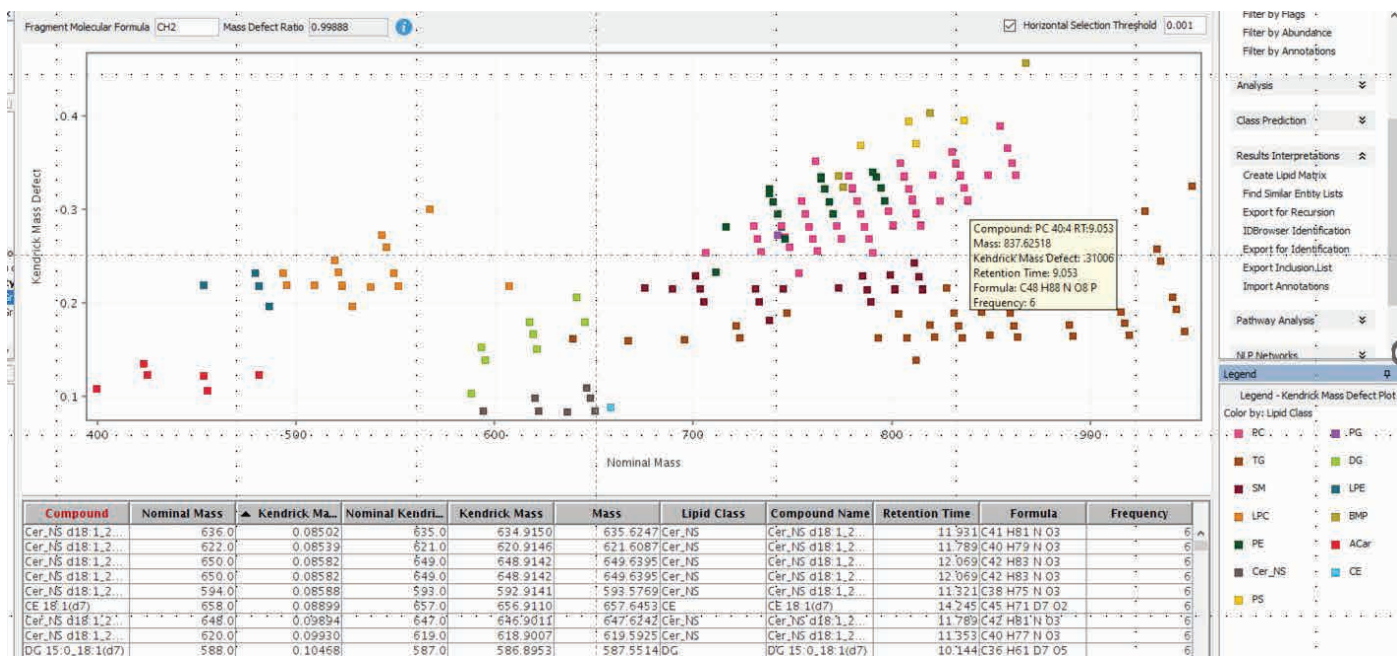


図 6. 1つの CH<sub>2</sub> 基の異なる脂質を示す Kendrick 質量欠損プロット

## 結論

- LC/Q-TOF と IM LC/Q-TOF のノンターゲットデータから品質と信頼性の高い脂質アノテーションを生成するワークフローについて説明しました。
- すべての主要な脂質クラスを網羅する PCDL を作成しました。
- LC/Q-TOF と IM LC/Q-TOF のワークフローでは、精密質量、RT、MS/MS、衝突断面積エントリを含む信頼性の高い脂質 PCDL を使用します。
- このワークフローにはサンプル前処理、データ取り込み、データ解析が含まれるため、LC/Q-TOF と IM LC/Q-TOF のノンターゲットデータの信頼性の高い脂質アノテーションが可能です。

## 参考文献

1. Huynh, K.; Sartain, M.; et al. 包括的なハイスループットメソッドによる血漿リポドームの詳細分析 Agilent Technologies application note, publication number 5994-3747JAJP, **2021**.
2. Mohsin, S.; et al. Creation of a High-Confidence Lipidomics Personal Compound Database Library – for Targeted Data Mining and Annotation of Untargeted High-Resolution Lipidomics Data. Agilent Technologies technical overview, publication number 5994-7627EN, **2024**.
3. Huynh, K.; Barlow, C. K.; Jayawardana, K.S; Weir, J. M.; Mellett, N. A.; Cinel, M.; Magliano, D. J.; Shaw, J. E.; Drew, B. G.; Meikle, P. J. High-Throughput Plasma Lipidomics: Detailed Mapping of the Associations with Cardiometabolic Risk Factors. Cell Chem. Biol. **2019**, 26(1), 71–84. DOI: [10.1016/j.chembiol.2018.10.008](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.10.008)
4. Sartain, M.; et al. An Interlaboratory Evaluation of a Targeted Lipidomics Method in Plasma. Agilent Technologies application note, publication number 5994-6830EN, **2024**.
5. Korf, A.; Vosse, C.; Schmid, R.; Helmer, P. O.; Jeck, V.; Hayen, H. Three-Dimensional Kendrick Mass Plots as a Tool for Graphical Lipid Identification. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2018**, 32(12), 981–991. DOI: [10.1002/rcm.8117](https://doi.org/10.1002/rcm.8117)

ホームページ

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

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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。

RA45484.6137962963

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, August 12, 2024

5994-7588JAJP