



Zastosowanie LC/QTOF w analizach metabolomicznych – zalety, ograniczenia i wyzwania

Emilia Fornal, Anna Warpas, Grażyna Wójcicka, Jerzy Bełtowski*

Spektrometria mas sprzężona z chromatografią cieczową (LC/MS) lub chromatografią gazową oraz spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) są trzema technikami analitycznymi, które umożliwiają i w największym stopniu przyczyniają się obecnie do rozwoju badań metabolomicznych. Wśród technik LC/MS szczególną rolę odgrywają te zapewniające dokładny pomiar masy. W badaniach metabolomicznych najczęściej wykorzystywane są wysoko-rozdzielcze spektrometry mas (HRMS) typu kwadrupol-analizator czasu przelotu jonów (QTOF) oraz Orbitrap. W pracy przedstawiono przykłady zastosowań LC/QTOF w analizach metabolomicznych, krótko omówiono rolę optymalizacji metody analitycznej do badań metabolomicznych, wskazano zalety i ograniczenia techniki oraz wyzwania i perspektywy jej rozwoju w tym obszarze badawczym.

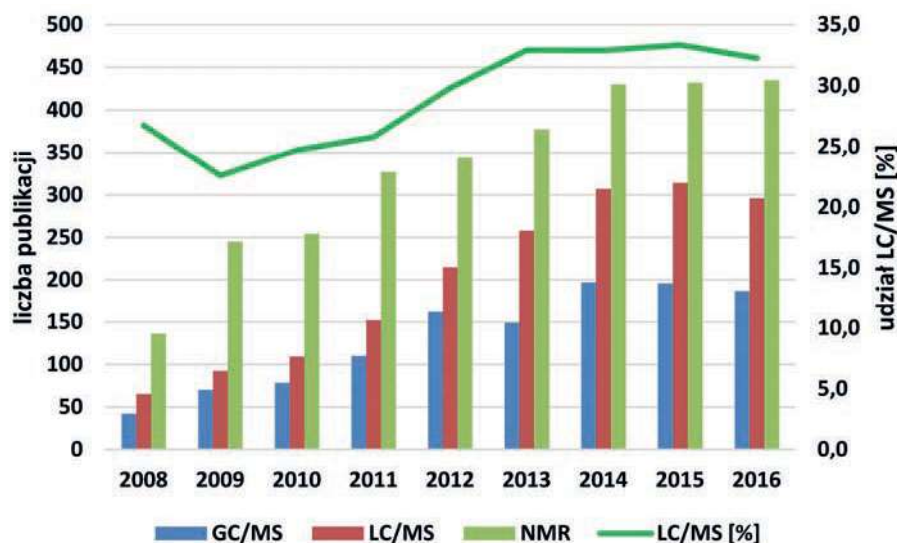
Wprowadzenie

Badania metabolomiczne, które obejmują analizę jakościową i ilościową endogennych i egzogennych metabolitów w komórkach, tkankach i płynach fizjologicznych prowadzone są obecnie głównie z wykorzystaniem trzech technik analitycznych: chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas, chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas i spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (rys. 1). Analiza danych literaturowych z ostatnich dziewięciu lat wskazuje, że około 30% analiz metabolomicznych wykonywanych jest przy pomocy LC/MS. Metabolomice opartej na pomiarach LC/MS poświęcono w obszerne prace przeglądowe [1-6], w których omówiono sposoby przygotowanie próbek do analiz, meto-

dy zbierania i analizy danych, procedury identyfikacji metabolitów i oznaczenia ilościowe, przedstawiono dostępne bazy metabolitów, ukierunkowane i nieukierunkowane sposoby pracy oraz wady i zalety metody LC/MS w ozna-

czeniu metabolomicznych. Badania metabolomiczne z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas znajdują zastosowania w różnych dziedzinach nauki m.in. w naukach medycznych, badaniach kli-

nicznych, analizie żywności, ochronie środowiska, biologii i naukach rolniczych. W każdym z tych obszarów badawczych szczególną rolę odgrywają oznaczenia, do których wykorzystywane są wysoko-rozdzielcze spektrometry



Rys. 1. Liczba publikacji dotyczących badań metabolomicznych prowadzonych z wykorzystaniem technik analitycznych GC/MS, LC/MS i NMR w latach 2008-2016, na podstawie bazy Scopus



mas (HRMS), które zapewniają dokładny pomiar masy, obecnie na poziomie poniżej 1 ppm przy zastosowaniu korekcji wewnętrznej przy pomocy jonów referencyjnych lub wewnętrznej kalibracji. Najczęściej wykorzystywane są spektrometry mas typu kwadrupol - analizator czasu przelotu jonów, (QTOF) oraz Orbitrap. W tabeli 1 zestawiono podstawowe parametry charakterystyki tych dwóch analizatorów masy na przykładowych modelach o najlepszych osiągnięciach pracy. Bardziej szczegółowe porównanie tych dwóch spektrometrów opisano w pracy [3].

Spektrometry QTOF zapewniają dużą szybkość skanowania i są idealnymi analizatorami mas do sprzęgania z ultra wysoko sprawną chromatografią cieczową (UHPLC). Zapewniają szybkość próbkowania odpowiednią dla wąskich, kilku-kilkunastosekundowych, pików chromatograficznych otrzymywanych na kolumnach UHPLC wypełnionych sorbentem o średnicy ziarna 1,7-2 μm oraz umożliwiają fragmentację koelujących związków bez potrzeby wydłużania czasu analizy w celu rozdzielania analitów, aby zapewnić selekcję maksymalnie dużej ilości prekursorów. Wysoka czułość uzyskiwana bez dodatkowych elementów wyposażenia, bez potrzeby zmiany źródła zapewnia dużą przepustowość analiz w laboratorium oraz detekcję metabolitów występujących w niskich stężeniach bez potrzeby zateżnienia próbek przed analizą. Duża dokładność pomiaru masy pozwala ustalić z dużą pewnością wzór

Tabela 1. Parametry specyfikacyjne spektrometru QTOF i Orbitrap LC/MS

Parametr	QTOF ^{a)}	Orbitrap ^{b)}
Rozdzielczość	40 000	500 000
Dokładność pomiaru masy	< 1 ppm	< 1 ppm
Szybkość skanowania (spectra/s)	50	18
Czułość	1000:1 RMS dla 1 pg rezorpiny dozowanej na kolumnę, przepływ 0,4 ml/min	czułość pułapki jonowej 100:1 test wykonany ze źródłem HESI (opcja wyposażenia) dla 0,1 pg rezorpiny, przepływ 0,5 ml/min
Cena	\$\$	\$\$\$

a) Agilent Technologies 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS,

b) Thermo Fisher Scientific Orbitrap Fusion™ Tribrid™ Mass Spectrometer

sumaryczny analitów, liczba generowanych wzorów jest nieduża, co ułatwia identyfikację metabolitów i skraca czas identyfikacji. Koszt zakupu spektrometru QTOF jest istotnie niższy, co jest istotnym parametrem decyzyjnym dla wielu laboratoriów. Mając na uwadze, że w przypadku badań metabolomicznych analizowane są związki niskocząsteczkowe dla większości aplikacji rozdzielczość rzędu 40 000 jest wystarczająca. Ponadto możliwość sprzęgania QTOF z UHPLC sprawia, że rozdzielczość masowa jest uzupełniana rozdzielczością chromatograficzną. Niższy stopień koelucji związków wynikający z wyższej rozdzielczości chromatograficznej obniża wymagania co do koniecznej wielkości rozdzielczości mas. Liczba wykrytych metabolitów jest porównywalna dla obu spektrometrów. Spektrometry wysokich rozdzielczości charakteryzuje duża wszechstronność zastosowań. Mogą być one wykorzystywane zarówno do wykrywania, identyfikowania oraz ilościowego oznaczania metabolitów.

Celem niniejszych pracy było dokonanie oceny czy i w jakim zakresie należy prowadzić

optymalizację metody LC/QTOF, aby zapewnić wysokie czułości analiz oraz wykryć maksymalnie dużą ilość metabolitów osocza. Ponadto celem była ocena możliwości wykorzystania znanych i opisanych w literaturze biomarkerów dla danego schorzenia, jako parametru/ów walidujących procedurę profilowania metabolitów przy pomocy LC/MS.

Część eksperymentalna

Ekstrakcję metabolitów i precypitację białek z osocza prowadzono na zimno wykorzystując mieszaninę metanolu i etanolu (1:1 v/v). Ekstrakt wiorowano, supernatant filtrowano przez filtry 0,22 μm . Analizy metaboliczne wykonywano przy pomocy chromatografu cieczowego Agilent Technologies seria 1290 sprzężonego z wysoko rozdzielczym spektrometrem mas Agilent Technologies 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS, który był wyposażony w źródło jonów ESI Agilent Technologies JetStream. Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie C18 2,1 x 10 mm, ziarno 1,7 μm . Jako fazę ruchomo stosowano 0,1% kwas mrówkowy w wodzie i w acetonitrylu (v/v),

wszystkie składniki fazy ruchomej o stopniu czystości LC-MS. Gradient liniowy od 5 do 95% w 30 min, przepływ fazy ruchomej 0,4 ml/min. Zbierano jony dodatnie oraz ujemne w zakresie m/z 100-1000. Analizy wykonywano w trybie skan MS oraz targeted MS/MS. Korekcję masy prowadzono z wykorzystaniem jonów referencyjnych, dokładność pomiaru masy <1 ppm. Analizę danych prowadzono przy pomocy oprogramowania Agilent Technologies MassHunter Qualitative, MassHunter Quantitative, Personal Database and Library Metlin PCDL oraz Mass Profiler Professional.

Wyniki

Jedną z podstawowych zalet stosowania LC/QTOF w badaniach metabolomicznych jest możliwość jednoczesnego wykrycia wielu metabolitów endo- i egzogennych różniących się właściwościami chemicznymi. Ponieważ metoda ma wykrywać związki o różnym składzie, budowie i właściwościach optymalizacja metody prowadzona jest zwykle w bardzo ograniczonym stopniu, co wynika z faktu, że zmiana jednego parametru może wpłynąć korzystnie na



Rys. 2. Zmiana wysokości pików metabolitów na skutek zmiany stosunku plazma-rozpuszczalnik ekstrakcyjny oraz zmiany napięcia fragmentora spektrometru mas dla 65 metabolitów przedstawionych w tabeli 1.

sygnał jednej grupy związków i osłabić sygnał dla innych. Stosowane są warunki ekstrakcji, chromatografii i spektrometrii mas, które pozwalają izolować i wykrywać jak największy wachlarz związków. Warunki prowadzenia analizy w istotnym stopniu wpływają na liczbę wykrywanych metabolitów oraz poziom detekcji tych związków. Wiele biomarkerów występuje w bardzo niskich stężeniach stąd też bardziej pożądane są metody i warunki zapewniające maksymalną czułość oznaczenia. Przy czym optymalizacja czułości w przypadku metod skriningowych ma charakter wyłącznie globalny i dobór parametrów metody jest

oparty na obserwacji jak zmienia się intensywność sygnału dla większości metabolitów, a nie dla pojedynczego związku. Niesie to za sobą ryzyko, którego nie da się jednak uniknąć, że np. poszukiwany biomarker będzie w mniej licznej grupie związków, których sygnał uległ osłabieniu wraz ze zmianą parametru metody a tym samym w konsekwencji może nie zostać wykryty w prowadzonych badaniach metabolicznych. Przed rozpoczęciem badań metabolicznych nie powinno się jednak unikać etapu optymalizacji metody LC/QTOF zmierzającej do jak największego pokrycia metabolomu. Wraz z większym pokryciem meta-

bolom zwiększa się prawdopodobieństwo identyfikacji szlaków metabolicznych, które zostały zakłócone. W dalszych etapach badań optymalizacja metody LC/QTOF może zostać ukierunkowana specyficznie już na związki z danego szlaku metabolicznego.

Celem doboru warunków metody ekstrakcji metabolitów z plazmy i oceny w jakim stopniu zmiana tych warunków wpływa na wielkość sygnału przeprowadzono ekstrakcję metabolitów stosując mieszaninę metanol-etanol (1:1 v/v) w stosunku plazma:MeOH/EtOH 1:3 oraz 1:2 v/v. W tabeli 2 wymieniono wykryte w ekstrakcji związki eluujące w czasie retencji 15,4 - 17,5 min.

W dwuminutowym oknie elucyjnym wykryto obecność 65 związków, dla celów niniejszej pracy i uproszczenia prezentowanych wyników zastosowano minimalną wysokość pików 500000 jako kryterium wyszukiwania metabolitów. W celu lepszej wizualizacji wpływu zmiany stosunku plazma:MeOH/EtOH podczas ekstrakcji metabolitów z plazmy na wysokość pików metabolitów zmiany wysokości pików wyrażone w procentach przedstawiono na rysunku 2. Dla 43 związków zaobserwowano większą wysokość pików (> 10%) w ekstrakcji uzyskanym w wyniku ekstrakcji prowadzonej dla stosunku plazma:MeOH/EtOH 1:2 v/v, co można powiązać

Tabela 2. Porównanie wielkości sygnału metabolitów dla różnych parametrów metody analitycznej dla 65 związków wykrytych w ekstrakcji z plazmy wymywanych z kolumny w czasie retencji 15,4 - 17,5 min. Warunki analizy: 1 – ekstrakcja stosunek plazma do rozpuszczalnik 1:3 (v/v), napięcie fragmentora 400V, 2 – ekstrakcja stosunek plazma do rozpuszczalnik 1:2 (v/v), napięcie fragmentora 400V, 3 – ekstrakcja stosunek plazma do rozpuszczalnik 1:3 (v/v), napięcie fragmentora 600V

Lp.	R _T [min]	m/z	1	2		3	
			wysokość pików	wysokość pików	zmiana [%]	wysokość pików	zmiana [%]
1.	15,46	163,1118	521707	2402840	361	985197	89
2.	15,47	192,1384	2653127	2736526	3	2653145	0
3.	15,48	318,3004	4522510	3676373	-19	4720110	4
4.	15,72	518,3241	1150224	1711227	49	1291272	12
5.	15,72	536,3345	2342618	3332419	42	2348194	0
6.	15,74	343,2959	-	519269	100*	-	-
7.	15,76	301,0756	817361	803493	-2	783916	-4



8.	15,76	279,0935	5103697	5199297	2	5458185	7
9.	15,88	274,2740	21249620	23910132	13	21735132	2
10.	15,90	304,2489	776547	640517	-18	692782	-11
11.	15,92	584,3348	-	630225	100	-	-
12.	16,00	230,2480	1474521	2560270	74	1477165	0
13.	16,01	318,3002	2097474	3510484	67	2241774	7
14.	16,04	542,3240	-	641959	100*	525740	-
15.	16,04	560,3343	1161817	1636513	41	1139878	-2
16.	16,07	288,2891	4065767	4021580	-1	4052059	0
17.	16,06	518,3237	-	663996	100*	560038	-
18.	16,06	536,3339	1326451	1973031	49	1356114	2
19.	16,11	158,1517	2286266	2279270	0	2230286	-2
20.	16,11	409,1604	767844	581710	-24	760718	-1
21.	16,11	387,1784	769832	510501	-34	637099	-17
22.	16,12	290,2671	1367701	2037634	49	1383272	1
23.	16,20	355,2613	9690320	11547733	19	10193342	5
24.	16,19	223,0639	-	623490	100*	-	-
25.	16,21	373,2722	6054168	7322055	21	5889548	-3
26.	16,20	431,2768	652879	841244	29	771881	18
27.	16,21	443,2374	-	500246	100	-	-
28.	16,21	817,5824	3459927	5083188	47	3470375	0
29.	16,21	834,6094	1095591	1260741	15	1026620	-6
30.	16,21	839,5638	1132341	1582506	40	1194086	5
31.	16,24	584,3350	-	703594	100*	-	-
32.	16,28	225,1961	9926956	9862168	-1	9836916	-1
33.	16,28	288,2900	2448620	3145414	28	2636028	8
34.	16,31	271,1882	2846009	2728742	-4	2843155	0
35.	16,37	244,2638	593944	815664	37	590620	-1
36.	16,52	214,0880	503818	-	-100*	-	-100*
37.	16,64	391,2098	930711	881404	-5	977703	5
38.	16,64	560,3350	1054453	1531947	45	1099279	4
39.	16,65	357,2791	5330066	6745456	27	5193734	-3
40.	16,65	785,5933	506538	860180	70	-	-100*
41.	16,69	288,2894	11328531	13163428	16	11657809	3
42.	16,72	244,2634	4868203	5845257	20	4670011	-4
43.	16,87	272,2581	-	1157075	100*	-	-
44.	16,88	299,1833	1089488	1058494	-3	1100702	1
45.	16,93	304,2849	1013702	1345072	33	1077176	6
46.	17,04	404,2073	1216036	1232985	1	1250684	3
47.	17,04	425,1366	1152883	1188429	3	1222673	6
48.	17,04	790,3805	782968	841015	7	822574	5
49.	17,04	409,1625	4437048	4824084	9	5196731	17
50.	17,04	406,1550	-	521371	100*	-	-
51.	17,04	795,3355	1300708	1514074	16	1384532	6
52.	17,05	105,0703	1895094	2146266	13	1960592	3
53.	17,05	387,1808	10129838	11461993	13	10391660	3
54.	17,05	121,0654	863444	939488	9	885940	3
55.	17,05	489,2277	994936	1418065	43	1031440	4
56.	17,08	288,2898	22035198	24518036	11	23283406	6
57.	17,21	332,3156	555156	750066	35	570375	3
58.	17,21	244,2632	10658959	12846986	21	10585108	-1
59.	17,07	560,3355	691465	616494	-11	744230	8
60.	17,26	230,2469	891812	3037391	241	888681	0
61.	17,30	304,2849	17006092	19164836	13	16779342	-1
62.	17,22	560,3344	-	1041278	100*	-	-
63.	17,44	443,2320	895195	-	-100*	735498	-18
64.	17,47	409,1624	792532	801774	1	821019	4
65.	17,47	387,1808	1038025	992312	-4	931644	-10

*) Wartość przypisana dla wizualizacji: 100 dla nowego związku, który się pojawił w skanie MS; -100 dla związku, który zniknął w skanie MS



z wyższym stężeniem związku w ekstrakcie (niższe rozcieńczenie próbek). Dla 6 związków stwierdzono spadek wysokości pików ($< -10\%$), gdy stosunek plazma:MeOH/EtOH został zmieniony z 1:3 v/v na 1:2 v/v. Osłabienia sygnału można wyjaśnić większym efektem matrycowym i efektem tłumienia sygnału metabolitu wynikającym z wyższych stężeń koeluujących związków. Dla 16 związków wielkość sygnału się nie zmieniła, zmiana nie przekraczała 10%. Zwiększenie sygnału nastąpiło dla 66% związków, osłabienie dla 10%. Proporcja niniejsza wskazuje, że prowadzenie ekstrakcji plazma:MeOH/EtOH w stosunku 1:2 v/v zapewni niższe limity detekcji i z dużym prawdopodobieństwem wyższe pokrycie metabolomu.

Obok warunków ekstrakcji również parametry pracy spektrometru mas mają istotny wpływ na wielkość sygnału MS metabolitów. W celu doboru napięcia fragmentora i oceny w jakim stopniu zmiana tego napięcia wpłynie na wielkość sygnału przeprowadzono analizę dla napięcia fragmentora 400 i 600 V. Należy zwrócić uwagę, że zakresy wartości napięcia pracy fragmentora są bardzo różne dla różnych modeli spektrometrów mas, co wynika z różnic konstrukcyjnych. Nie mogą być bezpośrednio przenoszone z modelu na model spektrometru. Mogą być również porównywane tylko w ramach jednego modelu lub generacji spektrometrów. Wysokość pików metabolitów eluujących w czasie retencji

15,4 - 17,5 min zmierzone przy ustawieniu fragmentora 400 i 600 V przedstawiono w tabeli 2, zmiany wysokości pików zobrazowano na rysunku 2. W ujęciu globalnym zmiany fragmentora z 400 V na 600 V w niewielkim stopniu wpłynęły na wielkość sygnału. Dla 45 związków zmiana sygnału była mniejsza niż 10%. Dla 6 związków sygnał się obniżył, dla 4 uległ podwyższeniu. Optymalizacja fragmentora w przypadku modelu LC/QTOF 6550 może być pomijana, gdyż nie wpłynie najprawdopodobniej istotnie na zwiększenie pokrycia metabolomu.

Z uwagi na fakt, że badania metabolomiczne z wykorzystaniem LC/QTOF, z powodu ich dużej czułości oraz selektywności, pozwalają na duże pokrycie metabolomu wydaje się, że mogą być one również skuteczne w wykrywaniu biomarkerów metabolomicznych dobrze znanych i opisanych w literaturze, które mogą posłużyć jako element walidujący zastosowaną dla celów metabolomicznych procedurę analityczną, której ogólny schemat przedstawiono na rysunku 3.

Obejmuje ona etap ekstrakcji metabolitów, analizy LC/QTOF, obróbki danych – generowania związków z wykorzystaniem algorytmów grupujących wszystkie jony przynależące do jednego potencjalnego związku oraz identyfikacji metabolitów, statystycznego profilowania związków z wykorzystaniem np. oprogramowania typu Mass Profiler Professional oraz identyfikacji szlaków metabo-



Pomiary w laboratorium chemicznym

Rozwiązania METTLER TOLEDO do laboratorium obejmują automatyczne pomiary analityczne, wydajne opracowywanie procesów chemicznych oraz automatyzację pomiarów laboratoryjnych i procesów produkcyjnych. Dodatkowe usługi gwarantują zgodność z oficjalnymi normami oraz spójne i dokładne dane pomiarowe.

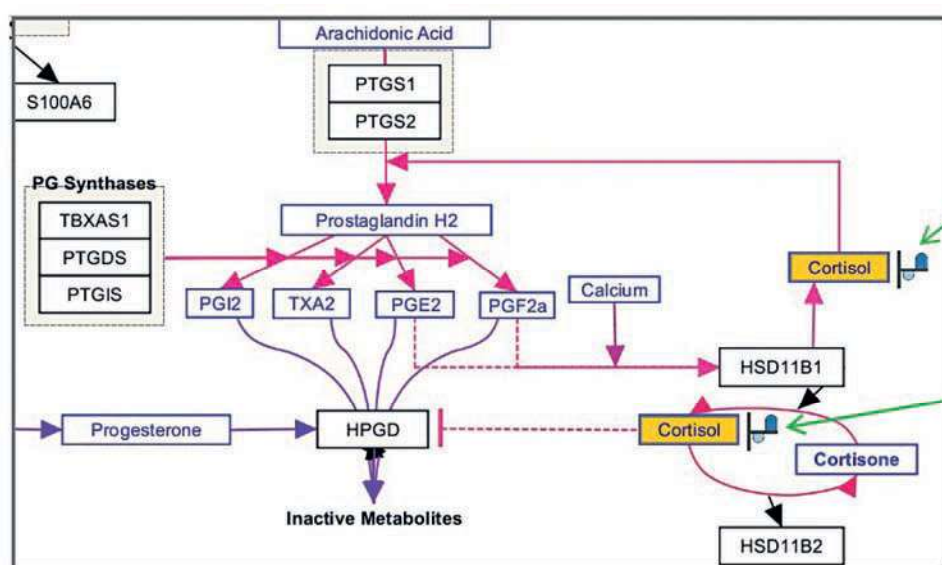
Produkty i rozwiązania

Automatyzacja badań chemicznych
Wagi, ważenie laboratoryjne
Instrumenty analityczne
Pipety i końcówki
Analiza termiczna



www.mt.com

METTLER TOLEDO



licznych, które mogą zostać zakłócone na skutek zmiany stężenia metabolitu.

W celu oceny możliwości wykorzystania znanych biomarkerów jako metabolitów walidujących procedurę metabolomiczną przeprowadzono profilowanie metabolitów pomiędzy grupami różniącymi się funkcjonowaniem nerek. Zgodnie z oczekiwaniami dla badanego schorzenia stwierdzono podwyższony

Jedną z podstawowych zalet stosowania LC/QTOF w badaniach metabolomicznych jest możliwość jednoczesnego wykrycia wielu metabolitów endo- i egzogennych różniących się znacznie właściwościami chemicznymi. Pociąga to za sobą jednak ograniczenie

zakresu prowadzenia optymalizacji metody do globalnego traktowania związków i doboru parametrów na podstawie zmian odpowiedzi dla większości związków, gdy dla innych sygnał może ulec osłabieniu. W przypadku zmiany stosunku objętości plazmy i rozpuszczalnika ekstrakcyjnego dla 66% metabolitów wielkość sygnału wzrosła, gdy zmieniono stosunek z 1:3 na 1:2 v/v, zmalała dla 10%

- [1] I. Artez, D. Meierhofer, *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (2016) 632.
- [2] S. Velghe, S. Capiiau, C.P. Stove, *Trends in Analytical Chemistry*, 84 (2016) 61.
- [3] B. Rochat, *Trends in Analytical Chemistry*, 84 (2016) 151.
- [4] K. Ortmayr, T.J. Causon, S. Hann, G. Koellensperger, *Trends in Analytical Chemistry*, 82 (2016) 358.
- [5] E. Gorrochategui, J. Jaumont, S. Lacorte, R. Tauler, *Trends in Analytical Chemistry*, 82 (2016) 425.
- [6] M. Vinaixa, E.L. Schymanski, S. Neumann, M. Navarro, R.M. Salek, O. Yanes, *Trends in Analytical Chemistry*, 78 (2016) 23.

* Emilia Fornal, Anna Warpas,
Grażyna Wójcicka, Jerzy Beł-
towski – Uniwersytet Medyczny
w Lublinie, II Wydział Lekarski
z Oddziałem Anglojęzycznym,
Katedra i Zakład Patofizjologii,
e-mail: efornal@poczta.onet.pl