

Metabolomika

– wyzwanie dla współczesnej spektrometrii mas (cz. 2)

Agnieszka Ulanowska, Grzegorz Strączyński*

Metabolomika należy do jednych z najtrudniejszych dziedzin nauki, jednakże w ostatnim czasie jej popularność stale rośnie. Wiele grup badawczych w całej Polsce zajmuje się badaniem metabolitów i codziennie podejmuje wyzwania związane z analizą próbek o bogatej matrycy. Odmiernym, ale bardzo istotnym aspektem tego typu badań jest ogromna różnorodność analitów oraz ich niskie granice wykrywalności. W metabolomice bardzo często wykonuje się badania nieukierunkowane w celu zidentyfikowania nowych, nieznanych dotąd substancji, jak np. metabolity nowo zsyntezowanych środków odurzających lub też poszukuje się substancji, które mogłyby zostać uznane jako biomarkery chorób.

W poprzedniej części artykułu podjęto próbę wykazania użyteczności spektrometrii mas czasu przelotu sprzężonej z chromatografią gazową (GC-TOFMS) do analizy próbek biologicznych i oznaczania metabolitów. Szczególnie ważnym instrumentem, z punktu widzenia analizy metabolitów, który zapewnia wspiane rozdzielenie chromatograficzne oraz doskonałej jakości

dane spektralne, umożliwiając jednocześnie automatyczną identyfikację analitów występujących na śladowym poziomie stężeń, jest układ GCxGC-TOFMS o nazwie Pegasus 4D. W ciągu ostatnich kilku lat obserwuje się znaczny postęp w dziedzinie spektrometrii mas czasu przelotu, przede wszystkim ze względu na elastyczność tej techniki związanej z praktycznym brakiem ograniczeń co do wydłużania toru przelotu jonów, w wyniku czego można zwiększyć rozdzielczość systemu, jak również nie ma tu ograniczenia co do górnej granicy mas analizowanych jonów.

Firma LECO Corporation wniosła ogromny wkład w rozwój techniki TOFMS. W ubiegłym roku wprowadzono na rynek spektrometr mas skonstruowany według technologii Folded Flight Path, wyposażony w wieloodbiciowy analizator czasu przelotu (ang. multi-reflecting TOF). Jego unikalna konstrukcja umożliwiła wydłużenie toru przelotu jonów do 40 m, bez konieczności zwiększania rozmiarów analizatora, praktycznie nie powodując przy tym obniżenia czułości aparatu. Dzięki technologii FFP spektrometry mas LECO osią-

gają rozdzielczość do 100 000, zachowując przy tym dużą szybkość akwizycji danych równą 200 widm/s. Ten wysokorozdzielczy spektrometr mas czasu przelotu dostępny jest w połączeniu z chromatografią cieczą pod nazwą Citius LC-HRT™ oraz układzie sprzężonym z chromatografią gazową o nazwie Pegasus GC-HRT™. Citius LC-HRT i Pegasus GC-HRT wykrywają substancje na poziomie części pikogramów, a ponadto dokonują pomiaru mas z dużą dokładnością (do pięciu miejsc po przecinku), przez co umożliwiają pewną identyfikację analitów, które nie zostały dobrze chromatograficznie rozdzielone. Citius LC-HRT został wyposażony w źródło jonów o unikalnej budowie, w tzw. kompletne CID (ang. comprehensive CID, MSc²), które powoduje, że wszystkie jony molekularne ulegają dalszej fragmentacji. Przy czym widma mas w wysokiej rozdzielczości rejestrowane są zarówno dla jonów macierzystych jak i jonów potomnych. Źródło MSc² sposobem jonizacji przypomina układ MS/MS, z tym, że wszystkie substancje wprowadzone do systemu poddawane są jonizacji wielokrotnej, co

zyskuje na znaczeniu w przypadku prowadzenia analiz nieukierunkowanych. Dzięki wymienionym właściwościom wysokorozdzielcze spektrometry mas LECO mogą być z powodzeniem stosowane podczas prowadzenia analiz metabolomicznych. Wykazują one przewagę nad tradycyjną tandemową spektrometrią mas, która umożliwia analizę tylko wybranych analitów, co w przypadku poszukiwania nowych, nieznanych substancji może stanowić poważny problem. We wszystkich wysokorozdzielczych spektrometrach mas firmy LECO zastosowano specjalny system zapisywania danych na dysku o nazwie KADAS®. Dzięki temu algorytmowi, rejestrowane są wyłącznie sygnały analityczne, a eliminowane sygnały pochodzące z tła. Zabieg ten pozwala na znaczną redukcję ilości zapisywanych danych, które następnie ulegają przetwarzaniu jak w przypadku spektrometrów mas o nominalnej rozdzielczości.

Podstawowym zadaniem prowadzonych oznaczeń metabolitów jest ich analiza jakościowa. Jednakże w wielu przypadkach istotne staje się dokładne zbadanie również



ilości określonego metabolitu w próbce. Połączenie analizy ilościowej z jednoznaczną identyfikacją analitów zapewnia stosowanie systemu o nazwie **Citius LC-HRT™** stanowiącego połączenie wysokorozdzielczego spektrometru mas czasu przelotu z wysokociśnieniową chromatografią cieczową. Citius LC-HRT wykorzystano do oznaczania metabolitów leków: acetaminofenu (APAP), dekstrometofanu (DXM) oraz doksyliny (DOX) w moczu. Leki te w glikolu polietylenowym (PEG) podano osobie, od której następnie pobrano mocz do badań [1]. Próbkę moczu zebrano bezpośrednio po podaniu leków (próbka referencyjna) i po upływie 8 godzin, aż leki zostaną zmetabolizowane. W celu usunięcia soli oraz protein, do próbek dodano metanolu i odwirowano. Pozostałość odparowano, ponownie dodano metanolu, wody i kwasu mrówkowego, a następnie poddano analizie za pomocą systemu

Tabela 1. Metabolity DXM zidentyfikowane w próbce moczu [1]

Szlaki metaboliczne dekstrometofanu (DXM)	Teoretyczne m/z	Zmierzone m/z	Błąd masy Δ m/z [ppm]
Dextromethorphan	272,200891	272,200420	-1,7
O-Demethylation	258,185241	258,185525	1,1
N-Demethylation	258,185241	258,184840	-1,6
Didemethylation	244,169591	244,169981	1,6
Demethylation + Glouronidation	434,217329	434,218197	2,0
Didemethylation + Glouronidation	420,201679	420,202434	1,8
Demethylation + Sulfation	338,142055	338,142917	2,5
Didemethylation + Sulfation	324,126405	324,126819	1,3

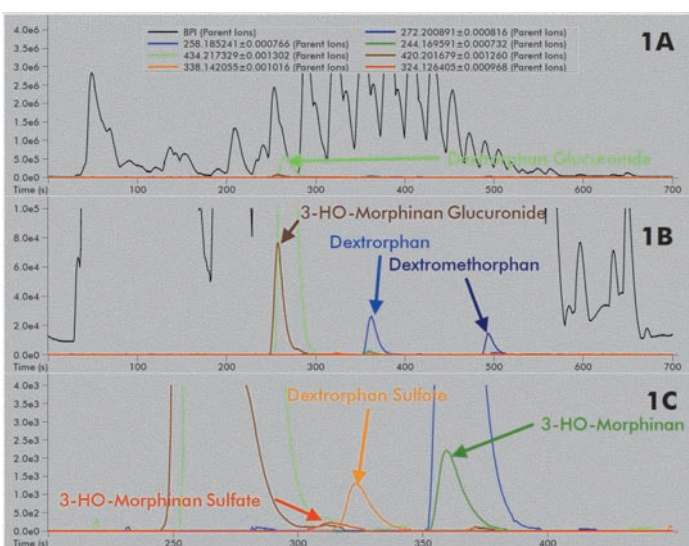
Citius LC-HRT. Przykładowy chromatogram próbki moczu wykonany techniką LC-HRT z zaznaczonymi metabolitami dekstrometofanu zaprezentowano na rysunku 1.

W próbce moczu wykryto i zidentyfikowano 7 metabolitów DXM. Wszystkie te substancje wraz z dokładnością pomiaru mas oraz błędem pomiaru zaprezentowano w tabeli 1. Ponadto w moczu wykryto również 7 metabolitów DOX oraz 5 metabolitów APAP. Obliczony maksymalny rozrzut pomiędzy masą teoretyczną i eksperymentalną jonów wynosił

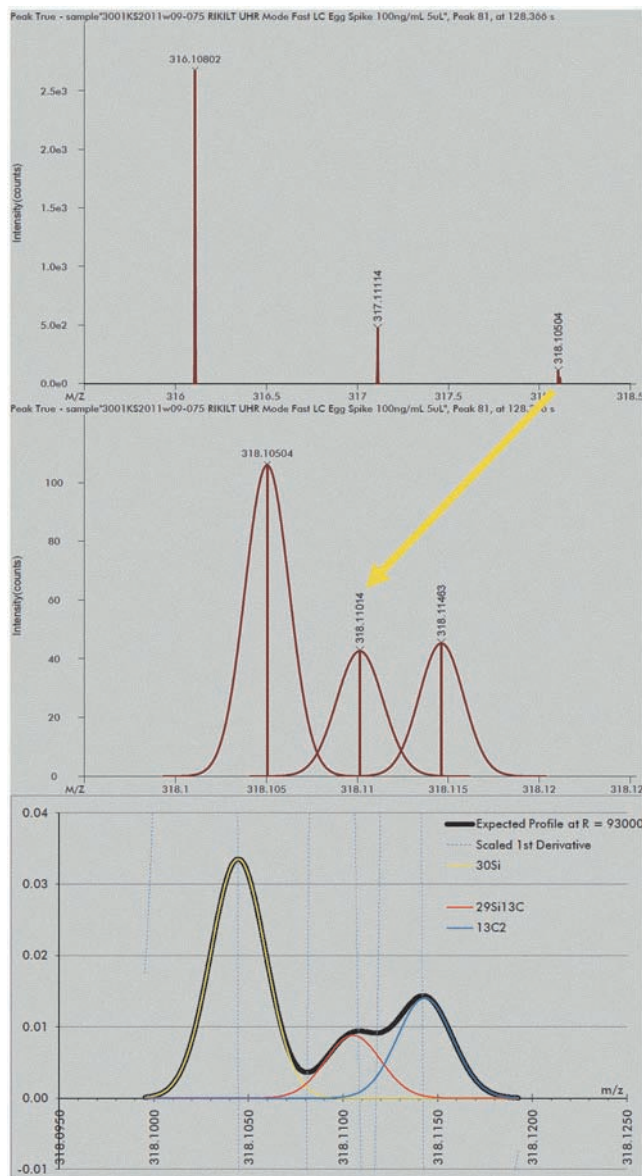
$\pm 2,2$ ppm, co jednoznacznie wskazuje na zachowanie dokładności pomiaru mas, nawet w przypadku próbek o bardzo bogatej matrycy.

Widma mas jonów macierzystych oraz jonów potomnych metabolitów leków zostały zarejestrowane w wysokiej rozdzielczości, co pozwoliło na pewną identyfikację wszystkich metabolitów występujących w próbce moczu, nawet na śladowym poziomie stężeń. Do obróbki danych zastosowano oprogramowanie ChromaTOF-HRT™ oraz dostępną w nim funkcję True Signal Deconvolution®, która umożliwiła automatyczną dekonwolucję widm jonów macierzystych i potomnych, co zdecydowanie ułatwiło proces identyfikacji analitów przykrytych matrycą lub kolujących z innymi substancjami. Podczas identyfikacji program uwzględnia zawsze charakterystyczny profil izotopowy pierwiastków. W przypadku pomiarów wykonywanych za pomocą spektrometrii mas, zdolność rozdzielcza oraz stabilny i dokładny pomiar mas są podstawowymi parametrami pozwalającymi osiągnąć sukces w postaci rzetelnego wyniku.

Zastosowanie rozdzielczości równej 50 000 umożliwia określenie, czy zmierzona masa M+2 oprócz atomów ^{18}O i ^{13}C zawiera również atom ^{34}S [2]. W przypadku rozdzielczości 35 000 lub 40 000 rozróżnienie tych sygnałów staje się niemożliwe. Bardzo ciekawym przykładem wykorzystania wysokiej rozdzielczości Citius LC-HRT wraz z uwzględnieniem profilu izotopowego pierwiastków jest rozróżnienie sygnałów $^{29}\text{Si}^{13}\text{C}$ i $^{13}\text{C}_2$ dla masy M+2 flusilazolu ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{N}_3\text{Si}$) zmierzonej przy $R_{\text{FWHM}} > 88\ 000$. Dzięki zastosowaniu ultra-wysokiej rozdzielczości możliwe było zaobserwowanie również monoizotopowego piku flusilazolu (patrz rysunek 2). Stosowanie ultrawysokiej rozdzielczości pozwala na rozdzielanie substancji będących izobarami i izomerami geometrycznymi (izomery cis i trans). Integralną częścią badań związanych z analizą metabolitów leków jest oznaczanie ich w postaci koniugatów glutationu (GSH, γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycyna). Elektrofilowe metabolity leków w organizmie żywym ulegają detoksykacji w wyniku sprzężenia z glutationem i w tej



Rys. 1. Chromatogram próbki moczu wykonany techniką LC-HRT (1A), ten sam chromatogram w zbliżeniu 40-krotnym (1B) i 1000-krotnym (1C) ze wskazanymi metabolitami DXM [1]



Rys. 2. Widmo flusilazolu (od góry), obserwowane sygnały izotopowe flusilazolu dla M+2 (poniżej), oczekiwany profil widma flusilazolu M+2 dla sygnału wygenerowanego przy rozdzielczości $R_{FWHM} = 93\ 000$ [2]

postaci, tj. sprzężonych koniugatów glutationu (GSH), podlegają analizie. Do oznaczania GSH najczęściej wykorzystuje się układy LC-MS, w przypadku których identyfikacja opiera się na analizie charakterystycznego fragmentu o masie 129 Da (kwas poliglutaminowy, „neutral loss” 129 Da). Jednakże ogromne bogactwo metabolitów powoduje, że taki sposób analizy GSH może być

skomplikowany i pracochłonny, a w efekcie i tak bardzo trudno jest jednoznacznie zidentyfikować analit. Dlatego też naukowcy z Institute of Pharmacy and Food Chemistry, Julius Maximilians-Universität w Wuerzburgu we współpracy z naukowcami z LECO European LSCA Centre w Moenchengladbach i LECO Corporation w St. Joseph opracowali metodę oznaczania

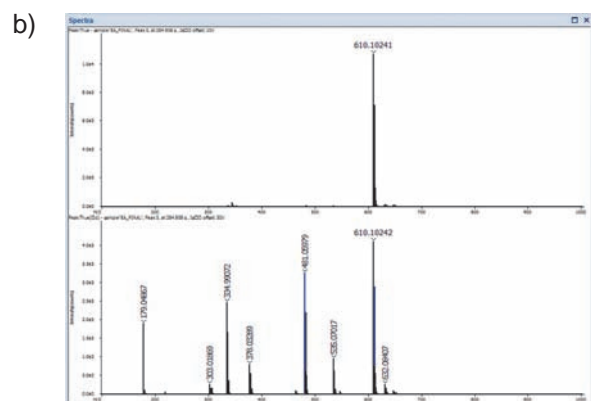
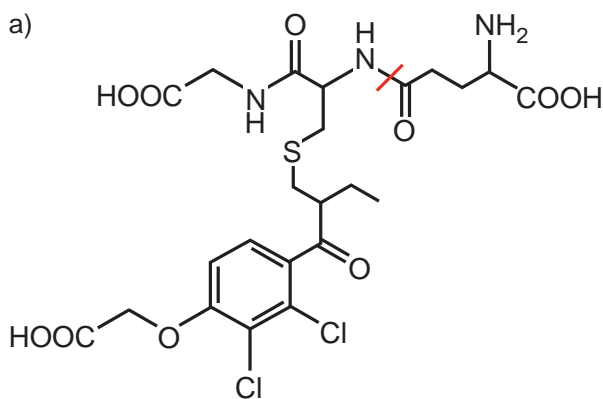
metabolitów leków po przekształceniu ich w reaktywne metabolity poprzez działanie na nie cytochromu P450 z wątroby ludzkiej [3]. Badania wykonano przy użyciu mikrosomów z wątroby ludzkiej w buforze fosforanowym (pH 7,4), które poddano reakcji z badanymi lekami, GSH oraz NADPH, jako katalizatora reakcji. Próbkę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C, następnie oczyszczono przy użyciu SPE i przeanalizowano za pomocą Citius LC-HRT [4]. Przeprowadzony eksperyment pozwolił na wykrycie i zidentyfikowanie 6 koniugatów GSH na podstawie zarejestrowanych widm mas jonów macierzystych i jonów fragmentacyjnych po utracie charakterystycznego fragmentu o masie 129,0426 Da (patrz tabela 2). Przykład cząsteczki koniugatu glutationu kwasu etakrynowego oraz sposób fragmentacji cząsteczki zaprezentowano na rysunku 3. Badania wykonano przy zastosowaniu trybu wysokiej rozdzielczości spektrometru mas $R > 50\ 000$. Obliczony błąd pomiaru mas pomiędzy masą teoretyczną jonu a zmierzoną, w przypadku jonów macierzystych i fragmentacyjnych nie przekraczał 0,5 ppm. Tak dokładny pomiar mas jonów oraz doskonałe możliwości analityczne wynikające z zastosowania źródła typu MSc^2 pozwoliły na szybką i bezbłędną identyfikację analitów występujących w próbkach biologicznych. Z danych eksperymentalnych wynika, że poszczególne jony (macierzysty i fragmentacyjne) wykazują różną energię

zderzeń (patrz rysunek 4). W przypadku zastosowania tandemowych systemów kwadrupolowych typu triple quad do oznaczania GSH poprzez skanowanie jonów charakterystycznych, energia ta musi zostać zoptymalizowana, w przeciwnym razie mamy do czynienia ze spadkiem czułości detektora. Dzięki MSc^2 wszystkie jony monitorowane są równocześnie, co daje pewność zapisania także wszystkich sygnałów pochodzących od jonów fragmentacyjnych. Znaczna część metabolitów jest stabilna w wysokich temperaturach, dlatego można je oznaczać za pomocą wysokorozdzielczej spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią gazową. Taki system wykorzystano w badaniach metabolitów produkowanych przez komórki wątroby. Powszechnie wiadomo, że spożywanie alkoholu powoduje różnego rodzaju niedoczynności wątroby z tym związane. Istnieje również grupa chorób wątroby, które wynikają z wpływu także innych czynników jak np. narażenie na działanie polichlorowanych bifenyli (PCB) oraz stosowanie wysokotłuszczowej diety. W celu określenia wpływu czynników zewnętrznych na stan wątroby oraz zidentyfikowania metabolitów, które sygnalizują znaczne zmiany chorobowe w komórkach wątroby, badaniu poddano ekstrakty sporządzone z wycinków wątroby myszy [5]. Zbadano tkanki pobrane od dwóch grup osobników: jednym podawany był alkohol, kolejne zaś narażone były na działanie PCB. W obu przypadkach myszy karmione były



Tabela 2. Sprzężone koniugaty glutationu zidentyfikowane w mikrosomach wątroby ludzkiej [3]

Koniugaty GSH	Wzór sumatyczny	Teoretyczne m/z jonu macierzystego	Błąd masy $\Delta m/z$ [ppm]	Rozdzielczość (FWHM)	Teoretyczne m/z jonu potomnego	Błąd masy $\Delta m/z$ [ppm]	Rozdzielczość (FWHM)
2,4-Dinitrophenyl-S-glutathione (DNP-SG)	$C_{16}H_{19}N_5O_{10}S$	474,09254	0,32	55040	345,04995	0,39	52576
2-Chloro-4-nitrophenyl-S-glutathione (CNP-SG)	$C_{16}H_{19}ClN_4O_8S$	463,06849	0,28	56672	334,02589	0,25	52800
4-Nitrochinoliny-N-oxid-S-glutathione (QNO-SG)	$C_{19}H_{22}N_4O_7S$	451,12819	0,13	54944	322,08560	0,21	51832
4-Nitrobenzyl-S-glutathione (NB-SG)	$C_{17}H_{22}N_4O_8S$	443,12311	0,18	54656	314,08052	0,45	52416
Ethacrynic-acid-S-glutathione (EA-SG)	$C_{23}H_{29}Cl_2N_3O_{10}S$	610,10235	0,29	58592	481,05975	0,08	58592
Clozapine-S-glutathione (CLP-SG)	$C_{28}H_{34}ClN_7O_6S$	632,20526	0,32	57234	503,16266	0,21	55998



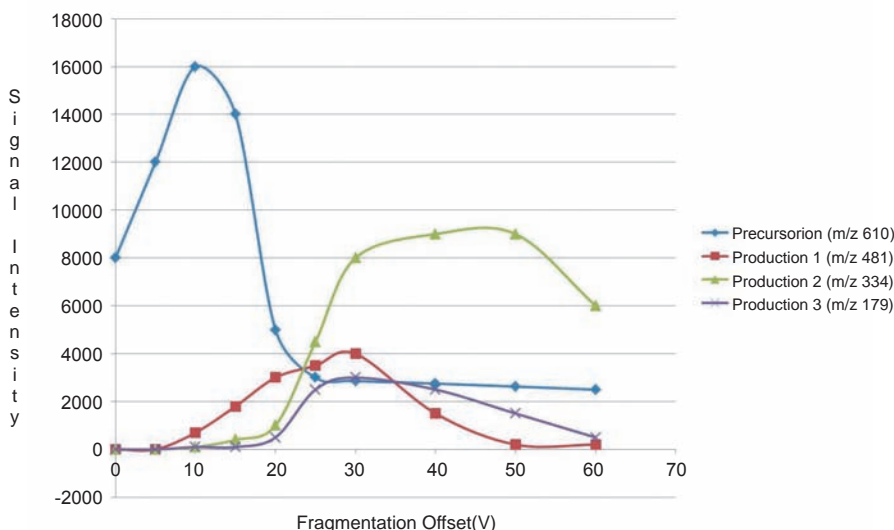
Rys. 3. Koniugat glutationu kwasu etakrynowego (EA-SG) z zaznaczonym fragmentem „neutral loss” o masie 129 Da (3A), widmo mas jonu macierzystego EA-SG i potomnego z zaznaczonym jonem macierzystym oraz fragmentacyjnym po utracie fragmentu 129 (3B) [3]



FARMACJA I METABOLOMIKA



Leco Polska Sp. z o.o., ul. Czarna 4, 43-100 Tychy
tel.: (32) 2000 760, (32) 2000 352, fax: (32) 2000 536
e-mail: leco@leco.com.pl



Rys. 4. Krzywe rozpadu jonu macierzystego i jonów potomnych dla EA-GSH [3]

wysokotłuszczową karmą. Grupę odniesienia stanowiły ekstrakty z komórek wątroby myszy będących na diecie o podwyższonej zawartości tłuszczów. Przed wykonaniem analiz za pomocą wysokorozdzielczego spektrometru mas czasu przelotu sprzężonego z chromatografem gazowym o nazwie **Pegasus GC-HRT™** (GC-TOFMS), próbki poddano derywatywacji za pomocą MTBSTFA (1% TBS). Na podstawie zgromadzonych danych zaobserwowano zmianę stężenia leucyny i izoleucyny w ekstrakcie z wątroby w zależności od diety oraz czynników zewnętrznych. Badania wykazały obniżenie stężenia obu tych substancji w przypadku myszy narażonych na bezpośredni kontakt z PCB o około 20% w odniesieniu do zwierząt spożywających duże ilości tłuszczów. U myszy, którym podawano etanol zaobserwowano 2-3-krotny wzrost ilości leucyny i izoleucyny w wątrobie w porównaniu z grupą referencyjną. Dzięki zastosowaniu wysokorozdziel-

czej spektrometrii mas, masy jonów fragmentacyjnych pochodnych leucyny i izoleucyny zostały zmierzone z dużą dokładnością, a błąd pomiaru mas nie przekraczał 2 ppm. Identyfikacja analitów została wykonana automatycznie za pomocą oprogramowania ChromaTOF-HRT i przy wykorzystaniu funkcji automatycznego wyszukiwania pików i dekonwolucji. Przeprowadzony eksperyment pozwolił zaobserwować jeszcze jedną zależność: trzykrotne zwiększenie stężenia kwasu trans-13-oktadekanowego w przypadku osobników mających kontakt z PCB, ale karmionych żywnością zawierającą nienasycone kwasy tłuszczowe, w odniesieniu do grupy odniesienia, czyli nie narażonych na wpływ PCB. Obliczono także, że ilość kwasu trans-13-oktadekanowego uwalnianego przez komórki wątroby myszy zwiększyła się nawet 8-krotnie u osobników, które spożywały etanol. Fakt ten jednoznacznie wskazuje ogromny wpływ diety oraz czynników zewnętrz-

nych na stan zdrowia organizmów żywych. Zaprezentowane powyżej przykłady potwierdzają dużą użyteczność stosowania systemów HRT w metabolomice. Ich wysoka rozdzielczość i związany z tym bardzo dokładny pomiar mas jonów, zdecydowanie ułatwiają identyfikację nieznanych dotąd substancji. Dzięki sprzężonym układom HRT, analityk uzyskuje znaczne zażęczenie grupy potencjalnych substancji np. z liczby 4000 potencjalnych analitów do około 10, co skutkuje zmniejszeniem prawdopodobieństwa popełnienia błędu podczas identyfikacji. Ponadto, stosowanie automatycznego wyszukiwania pików i dekonwolucji powoduje, że nie rozdzielone chromatograficznie substancje lub przykryte matrycą zostają z powodzeniem oznaczone jakościowo i ilościowo. Wysokorozdzielcze spektrometry mas LECO sterowane są za pomocą przyjaznego dla użytkownika i bardzo intuicyjnego oprogramowania ChromaTOF-HRT™, które pozwala na pełną kontro-

lę chromatografu i detektora, na rejestrowanie i przetwarzanie danych. A dzięki dostępnym funkcjom w oprogramowaniu proces obróbki danych może stać się bardziej efektywny, a czas analizy skrócony do minimum.

Literatura

[1] LECO Corporation, Analysis of Urinary Metabolites of Acetaminophen, Dextromethorphan, and Doxylamine by Liquid Chromatography/High Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry, LECO Application note No. 203-821-400 7/11 (2011)

[2] LECO Corporation, Relative Isotope Abundance at Ultra High Resolving Power (100,000 (FWHM)) for Improved Formula Identification, LECO Application note No. 203-821-417 2/12 (2012)

[3] M. Volker, M. Unger, J. Wendt, L. Zhang, Identification of glutathione conjugates by liquid chromatography-high resolution time of flight mass spectrometry and high performance fragment ion analysis, LECO poster

[4] Z. Yan, G.W. Caldwell, Stable-Isotope Trapping and High-Throughput Screenings of Reactive Metabolites Using the Isotope MS Signature, Anal. Chem. 76 (2004) 6835-6847

[5] LECO Corporation, Application of GC High Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry to Mouse Liver Metabolic Analyses, LECO Application note No. 203-821-422 3/12 (2012)

* LECO Polska Sp. z o.o., ul. Czarna 4, 43-100 Tychy; e-mail: leco@leco.com.pl