[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

UPLC/HDMSを用いた生体試料中のインタクト脂質分析

利点

ACQUITY UPLC®システムとSYNAPT® G2 High Definition Mass Spectrometry™ (HDMS™) を組み合わせることにより、脂質分析のワークフローの簡便化を図ることができます。シンプルで効率的な分析手法で、従来の HPLC 分析法 [1,2] と比べ高い分離能で感度良く分析が可能であり、迅速に結果を得る事ができます。

- UPLC/HDMS による多種脂質クラスの迅速分離と同定
- 脂質分析における高品質なデータの取得
- コストを抑えた効率的な分析手法

ソリューション

ACQUITY UPLC
SYNAPT G2 HDMS

キーワード

脂質クラスの分離
リピドミクス
MS^E
イオンモビリティ
飛行時間型質量分析計

はじめに

脂質は人体においてエネルギー貯蔵、細胞膜の構成、シグナル伝達等重要な役割を持ちます。脂質とそのクラス情報は多くの疾患状態の理解に役立ちます。そのため、多くのラボで非常に複雑な手法で、生体試料中における脂質クラスの同定 / 定量が行われています。従来の移動相 / カラムを用いた分析手法では同時に多岐にわたる脂質クラスを分離するためには、多くの課題が存在します。そのため複数の分離メソッドの適用、分取、再分析などが行われています。

歴史的には脂質分析は、薄層クロマトグラフィー（TLC）を用いて分離する、非常に時間のかかるものでした。更に脂肪酸部分の解析には、TLC から脂肪酸部分を分取した後メチルエステル化させ、GC/MS で分析する手法が用いられていました。

HPLC を用いた脂質分析では、順相クロマトグラフィー法が用いられ従来の TLC 法の課題を克服、そして MS を検出器として用いることにより更に発展しました。しかし、一般的に長い分析時間を要し、ブロードなピーク形状のため分離の点でも課題が残っていました。このアプリケーションノートでは UPLC®を用いることで従来の HPLC 分析と比較し、脂質クラスを短時間で高分離にそして高感度に分析した例をご紹介します。

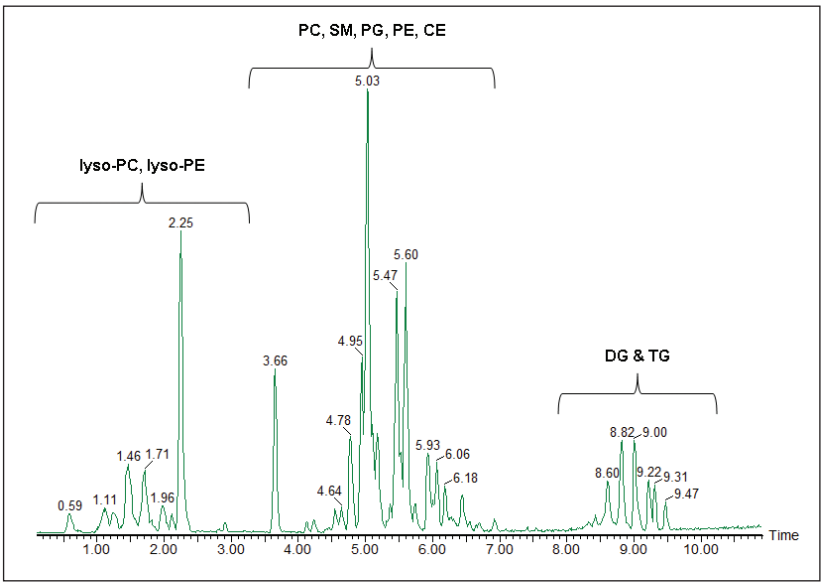

図1　UPLCクロマトグラム　ヒト血漿中の脂質分析（ESI^+）

分析条件

サンプル前処理

ヒト血漿（30 µL）にメタノール（180 µL）を加えた後、ジクロロメタン（360 µL）を加え脂質成分を抽出しました。13,000RPM で遠心分離し有機層を抽出し、移動相 A で 5 倍希釈しました。

LC 条件

LC システム：	Waters ACQUITY UPLC システム
カラム：	ACQUITY UPLC HSS T3 カラム 2.1x100 mm、1.8 µm
カラム温度：	65 ℃
流速：	500 µl/min
移動相 A：	10mM 酢酸アンモニウム含有アセトニトリル / 水（40 : 60）pH = 5.0
移動相 B：	10mM 酢酸アンモニウム含有アセトニトリル / イソプロパノール（10 : 90）pH = 5.0
グラジエント：	40 - 100% B / 10 分
注入量：	10 µl

MS 条件

MS システム：	SYNAPT G2 HDMS システム
イオン化モード：	ESI ポジティブ / ネガティブ
キャピラリー電圧：	3200 V
コーン電圧：	35 V
脱溶媒温度：	400 ℃
脱溶媒ガス：	800 L/Hr
ソース温度：	120 ℃
データ取り込み範囲：	*m/z* 100 -1000
モビリティキャリアガス：	32 mL / min（窒素）

結果及び考察

ヒト血漿中の脂質を UPLC とイオンモビリティ / 飛行時間型質量分析計（IMS-TofMS）を組み合わせて用い分析を行いました。その結果、主要な脂質クラス成分を良好に分離することができました。また、血漿中の主要な脂質を ESI ポジティブモードで検出する事ができました。

図 1 に ESI ポジティブモードで検出される主要な脂質クラスであるリゾフォスファチジルコリン（lyso-PC）、リゾフォスファチジルエタノールアミン（lyso-PE）、フォスファチジルコリン（PC）、スフィンゴミエリン（SM）、フォスファチジルグリセロール（PG）、フォスファチジルエタノールアミン（PE）、コレステロールエステル（CE）、ジアシルグリセロール（DG）、トリアシルグリセロール（TG）のマスクロマトグラムを示しました。

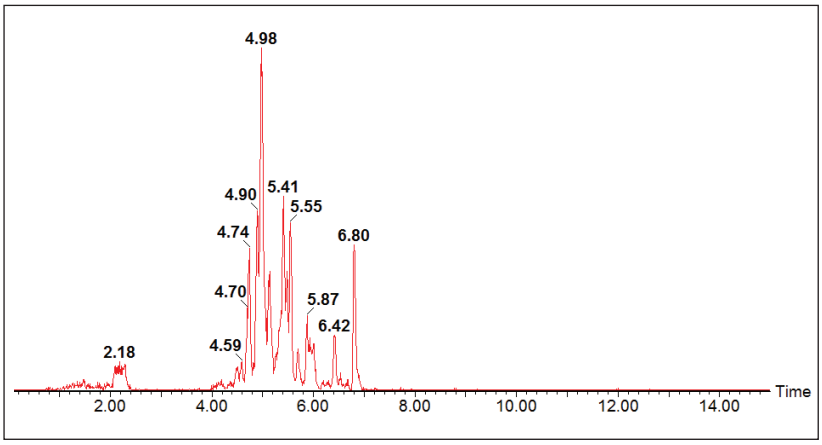

図2　抽出クロマトグラム（*m/z* 184.0760　抽出幅5 mD、MS ^{E}データ）

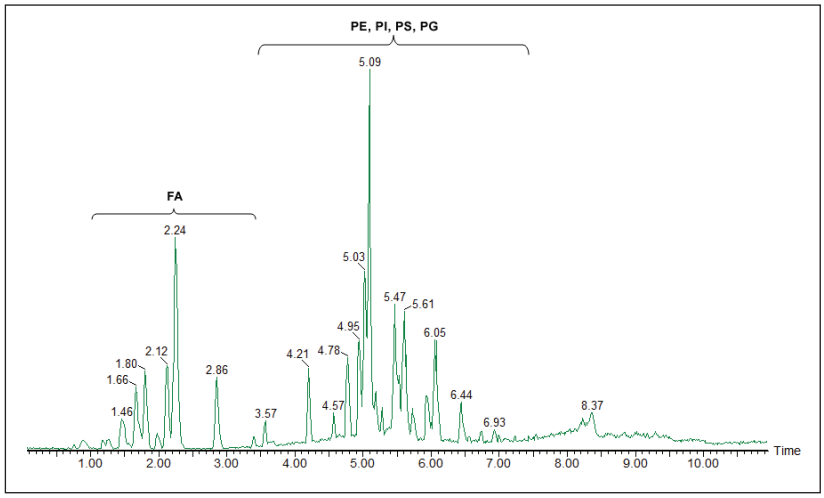

図 3　UPLC クロマトグラム　ヒト血漿中の脂質分析（ESI $^{-}$）

MS^E データより *m/z* 184.0760 で抽出したマスクロマトグラムを図 2 に示しました。この *m/z* 184.0760 は親水性ヘッドであるコリンを部分構造にもつスフィンゴミエリン（SM）、リゾフォスファチジルコリン（lyso-PC）、フォスファチジルコリン（PC）のフラグメントイオンです。MS^E では、第 1 ファンクションで低コリジョンエネルギー、第 2 ファンクションで高コリジョンエネルギーデータを同時に取り込むことができます。

図 3 に ESI ネガティブモードで検出される血漿中の主要な脂質クラスを示しました。ESI ネガティブモードでは脂肪酸（FA）、フォスファチジルイノシトール（PI）、フォスファチジルセリン（PS）、フォスファチジルエタノールアミン（PE）、PG を検出する事ができます。

まとめ

ACQUITY UPLC システムと IMS-Tof MS である SYNAPT G2 HDMS システムは脂質分析に最適なシステムです。UPLC を用いた分離メソッドでは従来の HPLC メソッドと比べて、分離と感度を向上すると同時に分析時間が短縮され、迅速に結果を取得することができる非常にシンプルなメソッドです。[1,2] 更に UPLC/HDMS ソリューションは、網羅性が向上し、迅速な分離と異なるクラスの脂質を同定する能力が向上します。この脂質分析ワークフローはデータの品質を維持したまま、分析コストの効率化も同時に図ることができます。

参考文献

1. Christie W. Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass（light-scattering）detection. J. Lipid Res. 1985, 26; 507-512.
2. Sommer U, et. al. LC-MS-based method for the qualitative and quantitative analysis of complex lipid mixtures. J. Lipid Res. 2006, 47;804-814.

適用規格：JISQ9001：2008（ISO9001：2008）
登録番号：JMAQA-331 登録日：1999年05月31日
審査登録範囲：理科学機器（液体クロマトグラフ・質量分析装置・データ管理システム等）の輸入・販売から保守業務までのトータルサポート及び保守プランの設計・開発

Waters、ACQUITY UPLC、UPLC および SYNAPT は Waters Corporation の登録商標です。High Definition Mass Spectrometry、HDMS および The Science of What's Possible は Waters Corporation の商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

このISO9001認証登録ロゴは、Waters Corporationのものです。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

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 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡

©2011 Waters Corporation. Produced in Japan. 2011 年 9 月 720003349 JA PDF