[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

UPLC-タンデム四重極型質量分析計を用いた血清中の脂質迅速プロファイリング

利点

- Xevo® TQ MS を用いたポジティブ / ネガティブ両モードによる脂質 194 成分の同時分析を 10 分で実行
- 移動相にクロロホルムを用いない逆相 ACQUITY UPLC®高分離分析
- IntelliStart™、QUANPEDIA™、TargetLynx™ による装置のセットアップ、分析、解析までの一連のシンプルなワークフローの適用

ソリューション

ACQUITY UPLC システム
Xevo TQ MS
IntelliStart ソフトウェア
QUANPEDIA
TargetLynx アプリケーションマネージャ
MassLynx™ ソフトウェア

キーワード

リピドミクス、逆相分離、MRM、ワークフロー

はじめに

リピドミクスアプローチは、疾病のより深い理解とその診断手段の開発など、その適用範囲は急速に広がっています。脂質プロファイリングの手法は様々ですが、課題を克服するため多くの研究者が様々なライフサイエンスのワークフローを用いて分析法の開発を行っています。

多くのラボでは前処理を行ったサンプルを LC 分離を行わず直接 ESI-MS 分析を行っています。このダイレクトインフュージョン分析は分析時間の短縮は可能ですが、いくつかの課題も存在します。

複雑な生体サンプルを用いる場合、分析においてダイナミックレンジと感度に影響を及ぼします。また、同時溶出する生体成分によるイオン化抑制や付加体形成も考慮に入れなければなりません。このような影響は脂質の微量成分や類似成分の検出や同定において大きな課題となります。

脂質の同定 / 定量する際に、未分離サンプルは精度面においても影響を及ぼします。脂質成分は、多岐のクラスにわたり、多くの構造が存在します。同じクラスの脂質は 2Da 違いで区別することができ、簡単に分離することができます。しかし、異なるクラスの脂質は区別が難しく影響を及ぼしあう可能性があります。

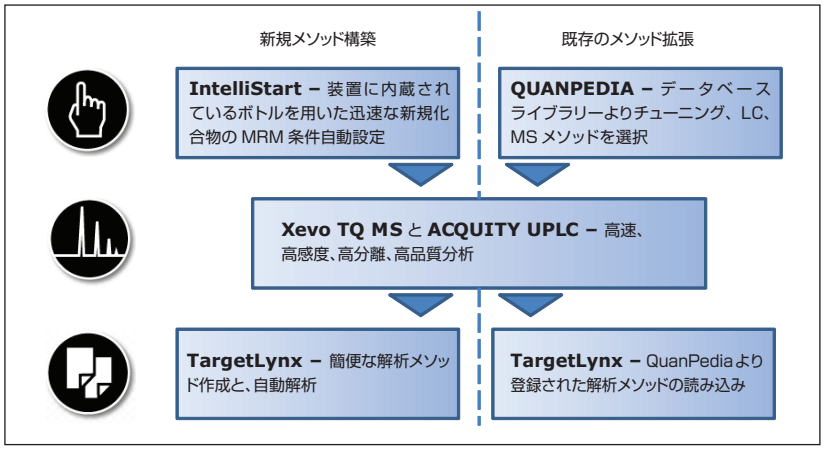

図1　QUANPEDIAデータベースを活用した脂質のMRM分析ワークフロー

分析条件

サンプル前処理

サルの血漿をコールドメタノール抽出した後、上清を乾燥させ、クロロホルム / メタノール（1：1）で再溶解しました。サンプル間の標準化のため非生物由来脂質を複数添加（チューニング時にも同じ脂質を使用）した後、アセトニトリルで 10 倍に希釈しました。つまり、分析時の注入量 5 µL 中に 0.14 µL の血清が含まれており、インジェクションサンプル溶解液はアセトニトリル / クロロホルム / メタノール（95：5：5）です。各サンプル 3 回繰り返し注入を行いました。

LC 条件

以前報告されている LC 条件 [1,2] を用いました

LC システム：	AQUITY UPLC
カラム：	AQUITY HSS T3 2.1x100 mm 1.8 µm
カラム温度：	65℃
流速：	500 µL/min
移動相 A：	10 mM 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：	10 mM 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：	5 µL

MS 条件

MS システム：	Xevo TQ MS
イオン化モード：	ESI ポジティブ / ネガティブスイッチング
キャピラリー電圧：	3.2 kV
脱溶媒温度：	500℃
ソース温度：	150℃
脱溶媒ガス：	800 L/Hr
ソース温度：	120℃
データ取り込みモード：	マルチプルリアクションモニタリング（MRM）
コリジョンセル圧：	3.5×10^{-3} mbar

MS システムチューニング

図 1 のワークフローに示すように、新規化合物の取り込み条件は IntelliStart で自動設定が可能です。混合標準品を用いリン脂質成分の MRM 取り込み条件を IntelliStart により作成しました (表 1)。メソッド構築に必要な各種パラメーター設定は QUANPEDIA より自動読みこみが可能です。

化合物	質量	プリカーサーイオン *m/z*	コーン電圧	プロダクトイオン *m/z*	コリジョンエネルギー	イオン化モード
DMPA	592.5	591.5	50	153.0	32	ESI-
DMPG	666.6	665.5	50	153.0	34	ESI-
DMPS	679.6	678.5	42	591.5	22	ESI-
C8 PI	586.5	585.4	48	241.0	30	ESI-
DMPC	677.5	678.6	36	184.1	30	ESI+
L-SM	646.5	647.6	36	184.1	24	ESI+
C17-Cer	551.5	552.6	20	264.2	26	ESI+
Glu-Cer	587.5	588.5	20	264.2	20	ESI+
DMPE	635.5	636.5	26	495.5	18	ESI+
Lyso PC	551.5	552.5	42	184.1	26	ESI+
Lyso PE	435.5	452.3	26	313.2	18	ESI+

表1　IntelliStartを用いたリン脂質のMRM取り込み条件

ESI+		ESI-	
脂質クラス	MRM数	脂質クラス	MRM数
Lyso PE	10	Lyso PS	4
Lyso PC	8	Lyso PI	4
Ceramides	8	PIs	22
Glucoceramides	13	PAs	11
PEs	38	PGs	11
Sphingomyelins	11	PSs	20
PCs	36		

表2　脂質クラス別分析化合物数

結果と考察

ターゲット脂質の定量解析は TargetLynx を用いました。TargetLynx では MassLynx 上で読み込んだ MRM クロマトグラムをマウスでクリックすることで保持時間、チャンネル、MRM 条件を自動で解析メソッド中に読み取り、各化合物に対して簡単に解析パラメーターを設定することができます。また内部 / 外部標準物質を用いてノーマライズや定量解析を行うこともできます。また、一度 TargetLynx 解析メソッドを作成、保存するといつでも再読み込みや変更を行う事ができます。

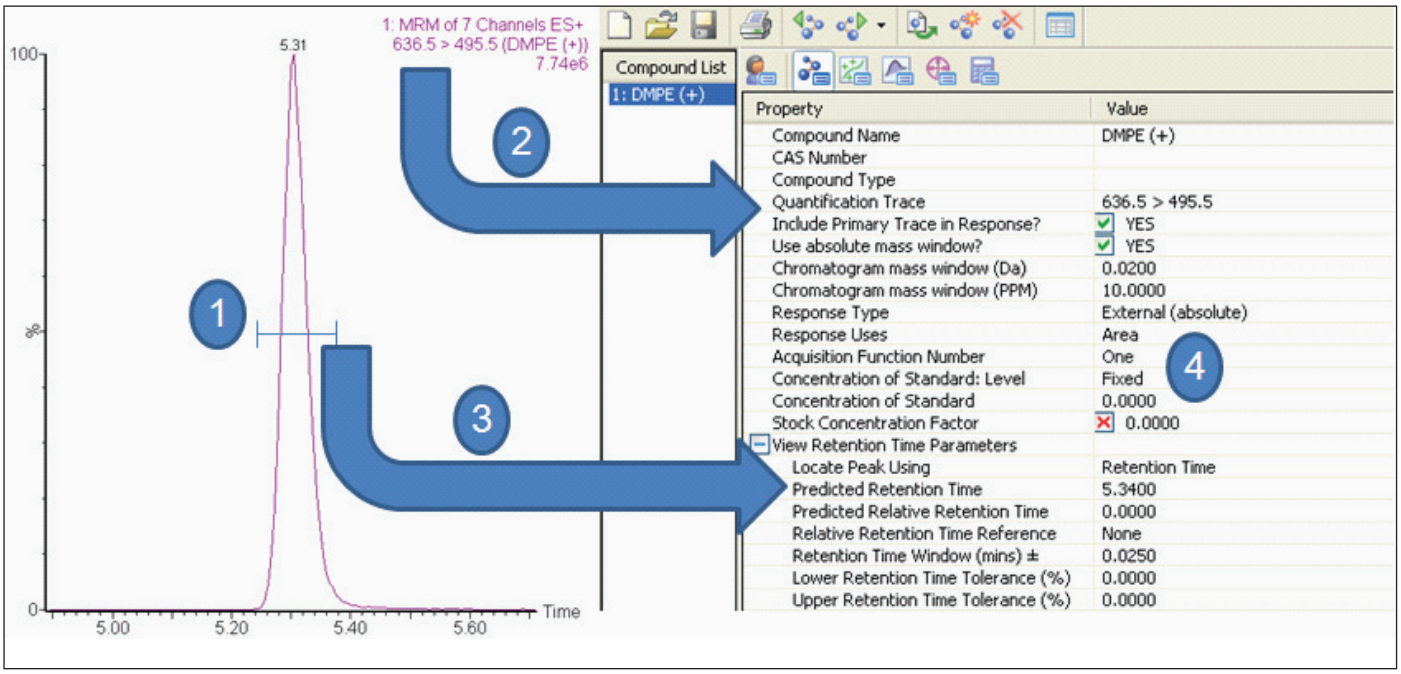

図 2　TargetLynx の設定画面　1）MassLynx のクロマトグラム表示画面で、ターゲット化合物のクロマトグラム上で右クリックとドラッグを実行　2）MRM トランジッションが TargetLynx 化合物情報フィールドに自動入力　3）保持時間が TargetLynx 化合物情報フィールドに自動入力　4）標準物質と比較し、検出面積のノーマライズ計算が可能

ターゲットとした全てのリン脂質において約 5 桁のダイナミックレンジが得られました。TargetLynx で得られた各脂質の面積値をエクスポートした結果を図 3 に表示しました。また 3 回インジェクションの平均 %RSD は 10%以下と非常に良好な結果が得られました。

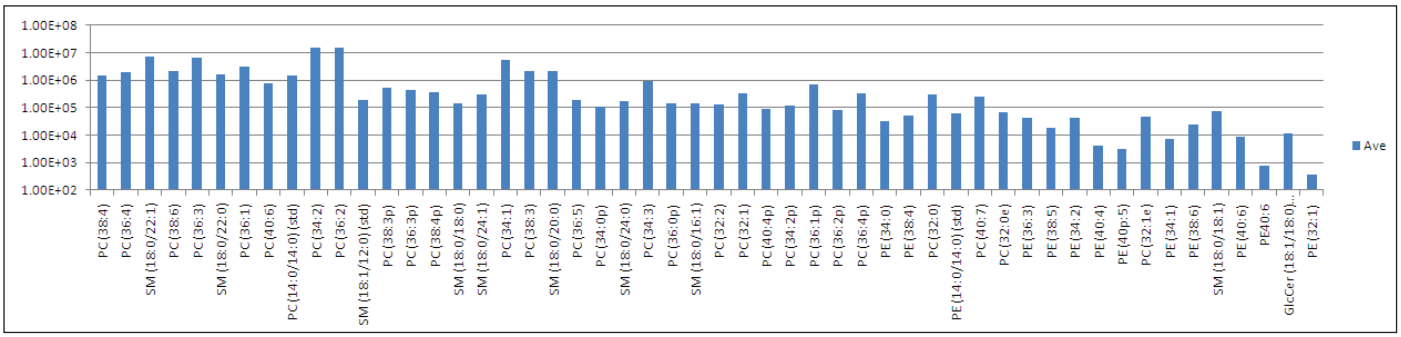

図 3 血清中の脂質の強度結果

前回、脂質分析メソッドの信頼性と再現性を報告しました[1, 2]。今回の結果でも高分離に脂質を分析することができました。図 4 に不飽和セラミドとグルコセラミドの分離例を示します。α 鎖が 2 炭素ずつ増えると、約 30 秒保持時間が変化することが分かりました。ダイレクトインフュージョン分析手法を用いた脂質分析では、共溶出する飽和度が 1 つ異なる成分間でのアイソトープパターンのオーバーラップにより脂質成分が正確に定量できない場合があります。つまりサンプル中に非常に多く含まれる脂質成分の M+2 アイソトープが飽和数の異なる微量脂質成分と重なった場合、微量脂質成分が実際より高濃度で報告される可能性があります。UPLC 分離では、このような飽和度の異なる脂質成分を完全に分離することが可能です。図 5 にフォスファチジルコリンの分離例を示します。PC36:1、36:2、36:3、36:4、36:5 が、飽和度が高い成分からおよそ 20 秒保持時間が変化して飽和度が異なる各脂質が溶出することが分かります。UPLC の高分離技術を適用することにより、ダイレクトインフュージョン分析で問題となっていたアイソトープパターンのオーバーラップを回避することができます。

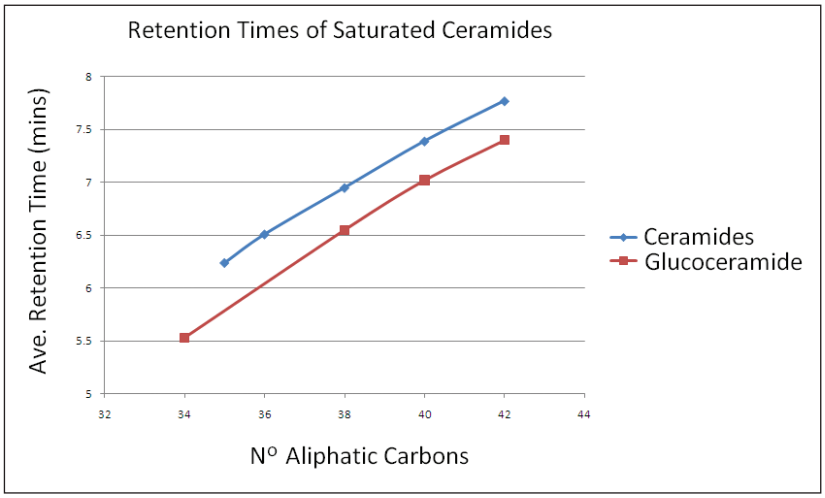

図 4　UPLC 逆相分析時の α 位の炭素鎖の異なる飽和セラミドとグルコセラミドの保持時間

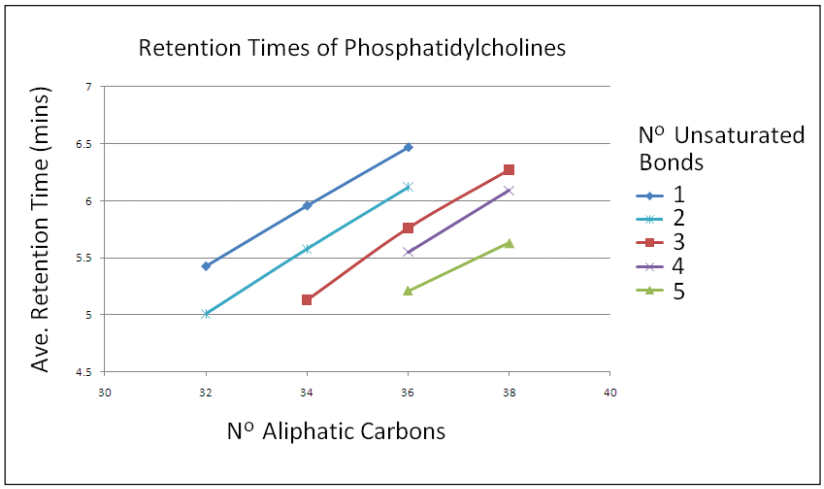

図 5　UPLC 逆相分析時の飽和度の異なる PC の保持時間。炭素鎖数が同等で飽和度の異なる 2Da 違いの脂質成分を明確に分離することで、定量時におけるアイソトープの影響を回避することができます。

まとめ

ACQUITY UPLC/Xevo TQ MS システムを用いた逆相分析において、複雑な生体サンプル中の脂質を高感度で精度よく分析することができました。脂質分析において逆相分析技術を適用することで、順相分析と比べてより安定で毒性の少ない移動相を用いることができるようになります。また生体サンプル中に含まれる数多くの類似成分を高分離で分析でき、アイソトープの問題も回避することができます。

更にUPLCによる類似成分の高分離分析は、ダイレクトインフュージョン分析や従来の HPLC 分析と比べ脂質成分の検出感度が向上し、イオン化抑制を回避することができます。従来に比べて高感度で分析が可能ですので、ダイレクトインフュージョン分析と比べおよそ 1/10 のサンプル量で脂質分析が可能です。

IntelliStart の自動チューニングや自動 MRM メソッド作成、QUANPEDIA データベース、TargetLynx による簡便な解析機能は、脂質分析の非常に多くのデータセットの定性 / 定量操作の簡便化が可能なワークフローを提供することができます。

参考文献

1. Castro-Perez JM, Kamphorst J, DeGroot J, Lafeber F, Goshawk J, Yu K,
Shockcor J, Vreeken RJ, Hankemeier T. Comprehensive LC-MS^E Lipidomic Analysis using a Shotgun Approach and Its Application to Biomarker Detection and Identification in Osteoarthritis Patients. *J. Proteome Res.*, 2010, 9 (5), pp 2377–2389.

2. Shockcor J, Crowe H, Yu K, and Shion H. Analysis of Intact Lipids from Biological Matrices by UPLC/High Definition MS. Waters Application Note 720003349EN.

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、UPLC、ACQUITY UPLC、および Xevo は Waters Corporation の登録商標です。The Science of What's Possible、IntelliStart、QUANPEDIA、TargetLynx、および Masslynx 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 10 月 720004035 JA PDF