Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

血漿中における脂質クラスのHILICモードを用いたUPLC/MS分析

利点

- UPLC テクノロジーを用いた迅速な脂質の順相モード分析
- 順相モードで一般的に使用されているクロロホルムやヘキサン等の毒性の高い移動相の使用を回避
- 逆相分析手法では困難とされていた極性部分による脂質クラス分離を可能とし、脂質のクラス分類別帰属を簡便化

ソリューション

ACQUITY UPLC® システム
Xevo® QTof MS
ACQUITY® BEH HILICカラム

キーワード

脂質クラスによる分離
HILIC
順相
脂質
飛行時間型質量分析計（TOF）

はじめに

脂質はエネルギー貯蔵庫、シグナル伝達としての生物学的機能やガンや神経変性疾患、感染症、糖尿病等の病態生理学の上でも重要な役割を持っています。LC/MS の進歩により高感度で選択性の高い脂質研究が可能となりました。LC/MS 法の適用により同時溶出成分や類似成分の影響を回避でき、低含有量の脂質も検出する事ができるようになりました[1]。

現在一般的に用いられている脂質分析手法はダイレクトインフュージョン分析、順相や逆相の HPLC 分析などが挙げられます [2-4]。しかし、逆相、順相の HPLC 分析において、いくつかの課題があります。逆相分析手法は高分離に脂質を分析することができますが、クラスごとに脂質を完全に分離することができません [4,5]。これは、親油性部分の炭素鎖や二重結合の数を元に脂質が分離されるという逆相クロマトグラフィーの分離メカニズムに起因するものです。つまり、逆相分析において同時溶出の成分は異なるクラスの脂質であることが一般的です。一方、順相分析手法は一般的に脂質クラスごとに分離することができますが、分析時間や平衡化時間が長くなります。さらに、順相系では移動相にクロロホルムやヘキサンを用いますので、揮発性や毒性の問題から取り扱いに注意が必要です。また検出器に質量分析計を使用する場合イオン化の面においても課題が残ります。

HILIC は逆相分析で使用する移動相（有機 / 水系）を用いた順相クロマトグラフィーで、上記のような従来の課題を回避することが可能な手法です。更に HILIC の一般的な分析では有機移動相の含有率が高い（アセトニトリル 80%以上）ため、エレクトスプレーイオン化モード（ESI）において、脱溶媒効率や化合物のイオン化効率が改善する場合があります。1.7 µm の非修飾 BEH パーティクルを用いた HILIC は、UPLC の技術である、迅速、高分離、高感度そして再現性の高い分離分析を実現します。

このアプリケーションノートでは HILIC モードを用いた UPLC 分析手法を用いて現在の逆相分析手法にで課題となっていた脂質クラスにおける分離、順相 HPLC 分析の課題となっていた分析時間の短縮を実現しましたのでご紹介します。

分析条件

サンプル前処理

サルの血漿 100 µL にメタノール 900 µL を添加し、脂質の抽出を行いました。15 分間インキュベートした後遠心分離し、上清 900 µL を採取しました。更に残渣に 500 µL のメタノールを添加し上清 470 µL を採取し、最初の上清とあわせました。上清を乾固し、クロロホルム / メタノール 1/1 溶液を 120 µL 加えました。更にアセトニトリルで 10 倍に希釈した後、分析サンプルとしました。

LC 条件

LC システム :	ACQUITY UPLC
カラム :	ACQUITY UPLC HILIC カラム 2.1x100 mm、1.7 µm
カラム温度 :	30℃
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（95:5）pH=8.0
移動相 B :	10 mM 酢酸アンモニウム含有アセトニトリル / 水（50:50）pH=8.0
グラジエント :	100-80%B/10 分
注入量 :	3 µL

MS 条件

MS システム :	Xevo QTof MS
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 :	2800 V（ポジティブ）/1900 V（ネガティブ）
コーン電圧 :	35 V
脱溶媒温度 :	500℃
脱溶媒ガス :	1000 L/Hr
ソース温度 :	120℃
データ取り込み範囲 :	*m/z* 100-1200

結果及び考察

脂質分析では、プリカーサーイオンと、フラグメントイオンやニュートラルロス情報を元に脂質の各グループを同定します。フォスファチジルコリン (PC) とスフィンゴミエリン (SM) は同じ質量数 (*m/z* 184.0738) のフラグメントイオンが検出され、1Da でしか分離することができません。そのため、PC、SM の定量や定性の際はアイソトープの影響を受けることが考えられます。この影響は異なる脂質クラスを分離できない分析手法であるダイレクトインフュージョン分析や従来の逆相分析手法で両グループが同時溶出した場合問題となります。脂質クラス別溶出は順相分析手法で可能ですが、一般的に 1 時間程度の分析時間が必要です [8]。HILIC モードにおける UPLC/MS 分析メソッドは、脂質クラス別の分離を短い分析時間で（約 16 分）効率的に行う事ができます。

各種脂質クラスの標準品を用いて HILIC モードによる分離分析を行い、クロマトグラムを図 1 に表示しました。

脂質標準品は以下の 6 種類です：

N- (heptadecanoyl) -sphing-4-enine (Cer (d18:1/17:0))
dimyristoyl-phosphatidylglycerol (PG (14:0/14:0))
dimyristoyl-phosphoethanolamine (PE (14:0/14:0))
dimyristoyl-phosphatidylcholine (PC (14:0/14:0))
lauroyl sphingomyeline (SM (d18:1/12:0))
eicosanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (LPC (20:0))

また標準品の高コリジョンエネルギーで取得した MS^E データより、各脂質クラス特有のフラグメントイオンを確認し構造の確認をしました。

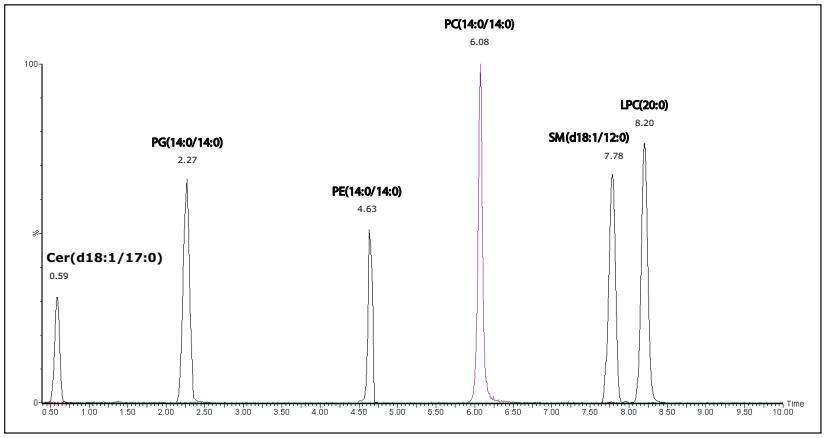

図 1　標準品の HILIC UPLC クロマトグラム

HILIC で分析した結果、逆相 UPLC 分析で得られた結果 [9] と比較して、各脂質はシャープなピーク形状が得られ、更に異なるクラス間の分離が改善しました。サルの血漿中の UPLC クロマトグラムを図 2 に表示します。図 2A のクロマトグラムではポジティブイオン化モードでフォスファチジルコリン (PC)、スフィンゴミエリン (SM)、リゾフォスファチジルコリン (LPC) が分離されていることが分かります。このような脂質クラス毎の明確な分離は逆相分析では得られません [9,10]。トリアシルグリセロールとジアシルグリセロールは HILIC カラムでは保持することができず、セラミド (Cer) より前に溶出していると考えられます。ネガティブイオン化モードでは、フォスファチジルグリセロール (PG)、フォスファチジルイノシトール (PI)、フォスファチジルエタノールアミン (PE) が PC の前に溶出し、分離されていることが分かります (図 2B)。

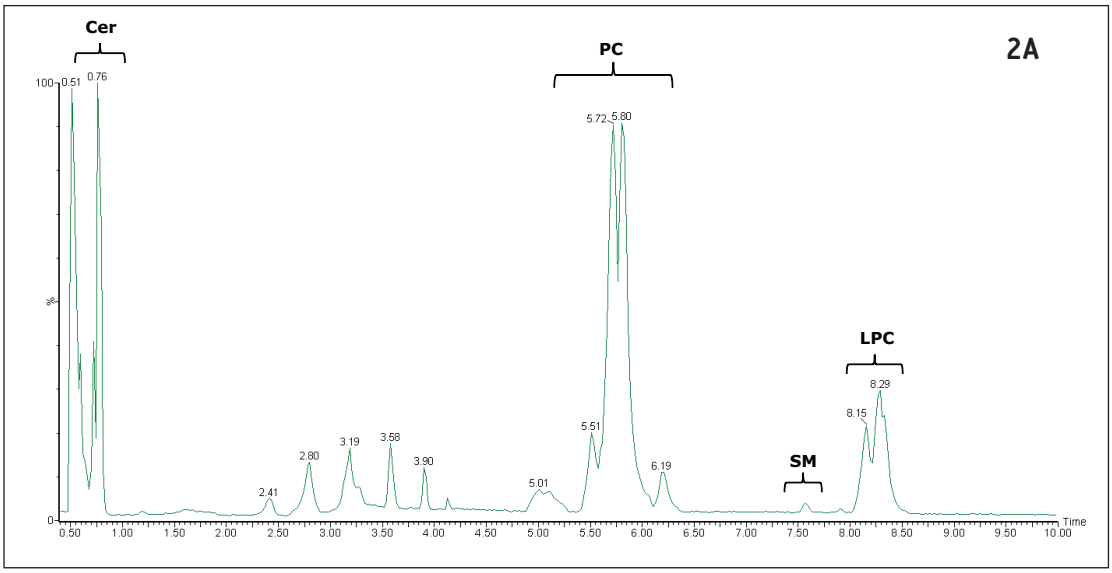

図 2A ESI+モードでのサルの血漿サンプルの HILIC UPLC クロマトグラム

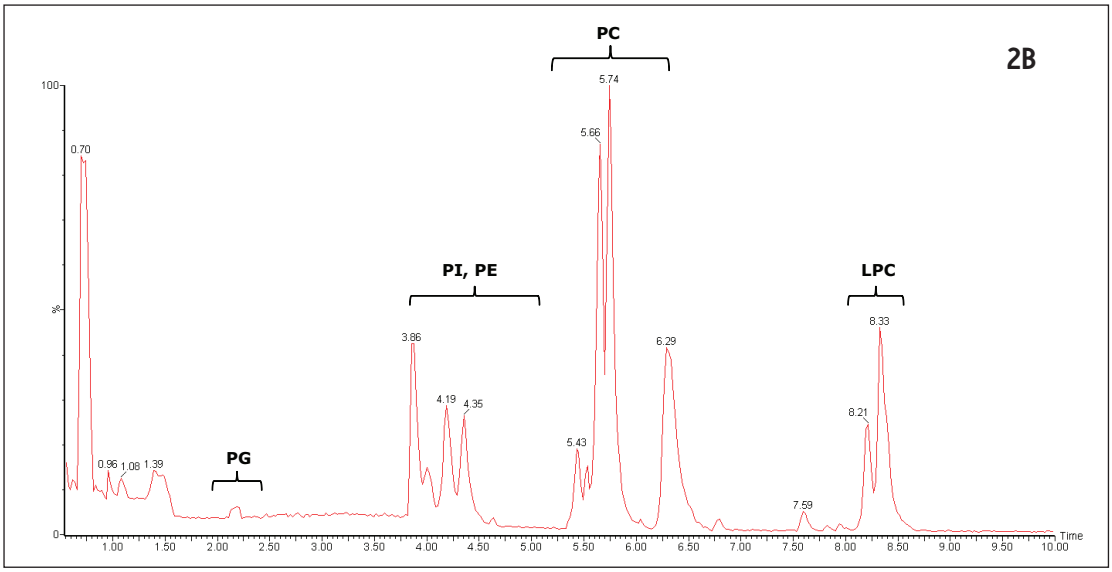

図 2B ESI- モードでのサルの血漿サンプルの HILIC UPLC クロマトグラム

HILIC モードでは PC と SM の分離が可能です。例えば、逆相モードでの UPLC 分析では非常に溶出時間が接近していた PC (32:1) *m/z*732.5545 と SM (d18:1/18:0) *m/z*731.6069 のような 1Da 違いの脂質を HILIC モードで明確に分離することができました。各脂質のマスクロマトグラムを図 3 に示しましたが、保持時間の違いはおよそ 2 分でした。このように脂質クラスによりクロマトグラム上で明確に分離することで脂質の測定と同定の簡便化を図ることができます。

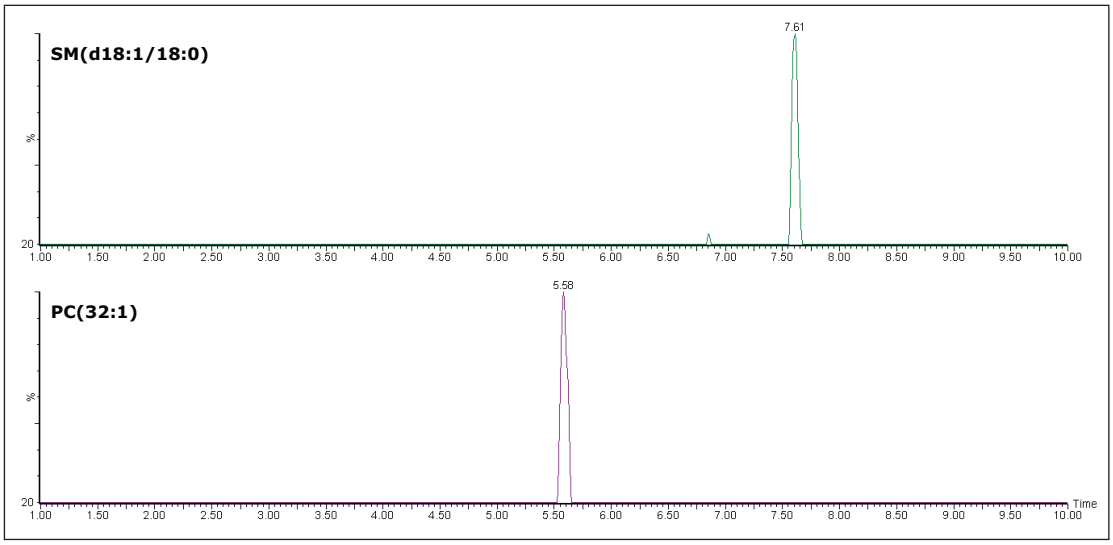

図 3　PC (32:1) *m/z*732.5545 と SM (d18:1/18:0) *m/z*731.6069 (抽出幅 2 mDa) のマスクロマトグラム

まとめ

HILIC モードでの UPLC メソッドを脂質分析に適用することにより、順相分析手法で得られるような脂質クラスによるクロマトグラム分離と以前に報告した[9]逆相分析手法で得られたシャープなピーク形状を得る事ができました。またこの分析手法は従来の順相分析[7]と比べて分析時間の短縮が可能です。更に、揮発性と毒性の高い溶媒の使用と廃棄を回避することができます。

参考文献

1. Shui G, *et al*. Sensitive profiling of chemically diverse bioactive lipids. *J. Lipid Res.* 2007, 48; 1976-1984.
2. Han X and Gross R W. Shotgun lipidomics: electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of the cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. *Mass Spectr. Rev.* 2005, 24; 367-412.
3. 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.
4. Castro-Perez J M, *et al*. 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; 2377-2389.
5. Peterson B L and Cummings B S. A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples. *Biomed. Chromato.* BMC 2006, 20; 227-243.
6. Perona J S and Ruiz-Gutierrez V. Simultaneous determination of molecular species of monoacylglycerols, diacylglycerols and triacylglycerols in human very-low-density lipoproteins by reversed-phase liquid chromatography. *J Chromato B.* 2003, 785; 89-99.
7. Henderson M A and McIndoe J S. Ionic liquids enable electrospray ionisation mass spectrometry in hexane. *Chem. Commun.* 2006, 2872-2874.
8. Shui G, *et al.* Characterization of substrate preference for Slc1p and Cst26p in *S cerevisiae* using lipidomic approaches and an LPA AT activity assay. *PLoS One.* 2010, 5; e11956.
9. Shockcor J, *et al.* Analysis of intact lipids from biological matrices by UPLC/high definition MS. Waters Application Note no. 720003349en, February 2010.
10. Rainville P D, *et al.* Novel Application of Reversed-Phase UPLC-oaTOF-MS for Lipid Analysis in Complex Biological Mixtures: A New Tool for Lipidomics. *J. Proteome Res*. 2007, 6; 552-558.

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 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 720004048 JA PDF