[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

オキシリピン類（酸化脂肪酸）のターゲットリピドミクス

Katrin Strassburg,[1,2] Billy Joe Molloy,[5] Claude Mallet,[3] André Duesterloh,[4] Igor Bendik,[4] Thomas Hankemeier,[1,2] James Langridge,[5] Rob J. Vreeken,[1,2] Giuseppe Astarita[3]

[1]Analytical Biosciences, LACDR, Leiden University, Leiden, The Netherlands; [2]Netherlands Metabolomics Centre, Leiden University, Leiden, The Netherlands; [3]Waters Corporation, Milford, MA, USA; [4]DSM Nutritional Products Europe Ltd., Switzerland; [5]Waters Corporation, Wilmslow, UK

アプリケーションのメリット

血漿中で生理活性を持つオキシリピン類（酸化脂肪酸）をプロファイリングするためのハイスループットなアプローチについてご紹介します。ミックスモードの固相抽出（Oasis® MAX SPE）と UPLC®-ESI-MRM 質量分析計（Xevo® TQ-S）の組み合わせにより、ターゲット分析ワークフローの流れでオキシリピン類の網羅的な分析を行う事ができます。血漿サンプル中のオキシリピン類 107 成分（プロスタグランジン、プロスタサイクリン、トロンボキサン、ジヒドロプロスタグランジン、イソプロスタンを含め）をルーチン高速分析の対象とし、その保持時間とトランジッションを示しました。健康あるいは疾患状態（例：炎症）におけるオキシリピン類の優れた役割を考慮すると、栄養学的研究、臨床研究、医薬品の探索や開発において UPLC をベースにした分析は、重要なものになると考えられます。

ウォーターズのソリューション

Xevo TQ-S 質量分析計

Oasis MAX SPE カートリッジ

TargetLynx™ アプリケーションマネージャ

キーワード

UPLC-MS/MS、脂肪酸、メタボロミクス、リピドミクス、トリプル四重極、オキシリピン類、マルチプルリアクションモニタリング、MRM、Xevo TQ-S

はじめに

オキシリピン類は、多くの鍵となる生物学的プロセス、例えばストレスの緩和や平滑筋組織の収縮、血液凝固、中でも注目すべきは炎症といった生理学的な調節において、優れた役割を果たすシグナル伝達に関与する脂質です。オキシリピン代謝の変化は、心疾患、宿主防衛、組織傷害、そして外科的介入に関連するものです。血漿試料中でのさまざまなオキシリピンを半定量的にプロファイルすることで、病気の診断または予後のバイオマーカーとして活用できるだけでなく、同時に健康あるいは疾患時のオキシリピンの役割を理解するためにも役立ちます。

オキシリピン類は、酵素（例：モノまたはジオキシゲナーゼ触媒）を介して、あるいはオメガ -6 多価不飽和脂肪酸基質（例：リノレン酸、ジホモ - γ - リノレン酸、アドレン酸やアラキドン酸）やオメガ -3 多価不飽和脂肪酸基質（例：α - リノレン酸、エイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸）配列の非酵素的な酸化を通して生成されます（図 1A、1B）。オキシリピン類の生成に関与している 3 つの主要な酵素反応経路：シクロオキシゲナーゼ（COX）、リポキシゲナーゼ（LOX）、チトクローム P450（CYP）。これらの経路は、複数の疾病に対する医薬品ターゲットとして重要です（図 1A、1B）。

オキシリピンの測定における主な課題の一つは、非常に微量な脂質種を対象にしている点と、その安定性の悪さにあります。さらにオキシリピン類は、組織中に蓄積されず、必要に応じてエステル化されたものから前駆体となる脂肪酸が遊離することで生成されます。最終的に、同じ脂肪酸がアシル鎖の異なる位置で酸化され、それぞれ特異的な代謝反応を持つ多数の異性体種へと導かれます。これらの事から、迅速で高感度な固有の分析メソッドが求められます。歴史的に、オキシリピン類の測定は、放射分析や酵素免疫測定法を使用して行われてきました。その手法では、多くの場合、特異性に欠けており、ごく少数の化合物のみがターゲットとされていました。GC-MS による手法もよく使用されていますが、オキシリピン類の揮発性と安定性を向上するための誘導体化を伴う多段階の処理が依然として必要とされています。

近年、様々な LC-MS 手法により少量のオキシリピン類 [1-5] を広範囲にモニターした例が発表されています。特に Strassburg ら [2] により報告された方法は、ヒト血漿中での酵素的および非酵素的の両方で生成される幅広いオキシリピン類に関するものです。こういった手法が感度と選択性の両方を持ち合わせているにも関わらず、広範囲にわたるリピドミクス研究を可能にする網羅的でハイスループットなスクリーニング手法への要求が、増加しています。

ここでは、血漿試料中のプロスタグランジン、プロスタサイクリン、トロンボキサン、ジヒドロプロスタグランジンやイソプロスタンを含む 100 以上のオキシリピン類をプロファイルする為のハイスループット分析についてご紹介します。

内部標準	Cayman # 番号	MRMトランジッション	保持時間（分）	コーン電圧（V）	コリジョンエネルギー（eV）
d4-6-Keto PGF1α	315210	373.20 >167.20	2.28	35	15
d4-TBX2	319030	373.20 >173.10	2.86	35	15
d4-PGF2α	316010	357.30 >197.20	3.12	35	20
d4-PGE2	314010	355.20 >275.20	3.19	40	16
d4-PGD2	312010	355.20 >275.20	3.31	10	16
d5-LTE4	10007858	443.10 >338.00	4.11	35	20
d4-LTB4	320110	339.20 >197.10	4.48	35	15
d4-12,13-DiHOME	10009994	317.30 >185.20	4.56	35	15
d4-9,10-DiHOME	10009993	317.30 >203.20	4.69	35	15
d11-14,15-DiHETrE	10008040	348.30 >207.10	4.77	35	15
d4-15-deoxy-Δ12,14-PGJ2	318570	319.20 >275.30	5.20	35	15
d6-20-HETE	390030	325.20 >281.10	5.24	20	18
d4-9-HODE	338410	299.20 >172.10	5.53	35	20
d8-12-HETE	334570	327.30 >184.20	5.78	35	20
d8-5-HETE	334230	327.30 >116.10	5.97	35	20

表 1. 血漿中に存在するオキシリピン類をプロファイルするために使用した内部標準と UPLC-ESI-MS の設定

測定条件

サンプル調製

試薬類

全ての試薬は、分析用または高純度のものとし、Sigma-Aldrich（ドイツ）から購入しました。オキシリピン類の標準品は、Cayman Chemicals（Ann Arbor, MI）、Biomol（Plymouth Meeting, PA）、Larodan（Malmo, スウェーデン）から購入しました。ミックスモードの固相抽出には、Waters® Oasis MAX 3 cc Vac カートリッジ、充填量 60 mg、粒子径 30 µm（p/n 186000367）を使用しました。同位体ラベル化された 16 化合物を含む内部標準混合物を使用しました（表 1）。

サンプル前処理

（13×100 mm のホウ珪酸ガラス試験管で希釈）：

1. ガラス試験管に 10% グリセロール水溶液 200 µL を入れる。
2. 50 – 250 µL の血漿（使用可能な最大限のサンプル量）試料を試験管に加え、十分に混合。
3. BHT 10 mg/mL のエタノール溶液 5 µL を加え、十分に混合。
4. 内部標準溶液（400 ng/mL）5 µL を加え、混合。
5. 25% アセトニトリル水溶液を用いて、試料溶液量を 3 mL にし、十分に混合。

MAXミックスモード固相抽出

1. 3 mL のアセトニトリルで Oasis MAX SPE カートリッジをコンディショニング。
2. 3 mL の 25% アセトニトリル水溶液で Oasis MAX SPE カートリッジをコンディショニング。
3. Oasis MAX SPE カートリッジに前処理した全試料をロード。
4. 3 mL の 25% アセトニトリル水溶液で Oasis MAX SPE カートリッジを洗浄。
5. 3 mL のアセトニトリルで Oasis MAX SPE カートリッジを洗浄。
6. 1% ギ酸含有アセトニトリル溶液 1.3 mL で対象成分を溶出*。
7. 溶出物をガラス製 HPLC バイアルに移しいれる（TruView™ Max リカバリーバイアル）。
8. グリセロール残留物のみになるまで溶出物を濃縮（40℃の窒素下）。
9. メタノール / アセトニトリル＝ 50：50 の溶液を 60 µL 加え、十分に混合。
10. UPLC-MS/MS システムへ 3 µL 注入。

＊10% グリセロール含有メタノール 200 µL が入っているガラス試験管にサンプルを溶出。

UPLC 条件

システム：　ACQUITY UPLC®

カラム：　ACQUITY UPLC BEH C_{18}、1.7 µm、2.1 × 100 mm

移動相 A：　0.1% 酢酸水溶液

移動相 B：　アセトニトリル / イソプロピルアルコール（90：10 v/v）

流速：　0.6 mL/min

カラム温度：　40℃

注入量：　3.0 µL

グラジエント：

分	A%	B%	曲線
0.0	75	25	
1.0	75	25	6
8.0	5	95	6
8.50	5	95	6
8.51	75	25	6
10.00	75	25	6

MS条件

保持時間の再現性を得るためには、UPLC 分析カラムと ESI プローブの接続に、下記のチュービングを推奨：PEEK チューブ、1/16 in.（1.6 mm）O.D. X 0.004 in.（0.100 mm）I.D. X 5 ft（1.5 m）長さのものを、長さ 400 mm にカット

MS システム：　Xevo TQ-S（ESI ネガティブモード）

測定モード：　MRM

キャピラリー電圧：　2.5 kV

コーン電圧：　10 - 40 V（化合物ごとの最適値、デフォルト＝ 35 V）

ソース温度：　150℃

脱溶媒ガス温度：　600℃

脱溶媒ガス流量：　1000 L/h

コーンガス流量：　150 L/h

コリジョンエネルギー：15 - 20 eV（化合物ごとの最適値、デフォルト＝ 15 eV）

データ解析

TargetLynx アプリケーションマネージャ

結果および考察

この研究における最大の焦点は、血漿試料中の生理活性物質であるオキシリピン類をプロファイルするためのハイスループットメソッドを作成することにあります。

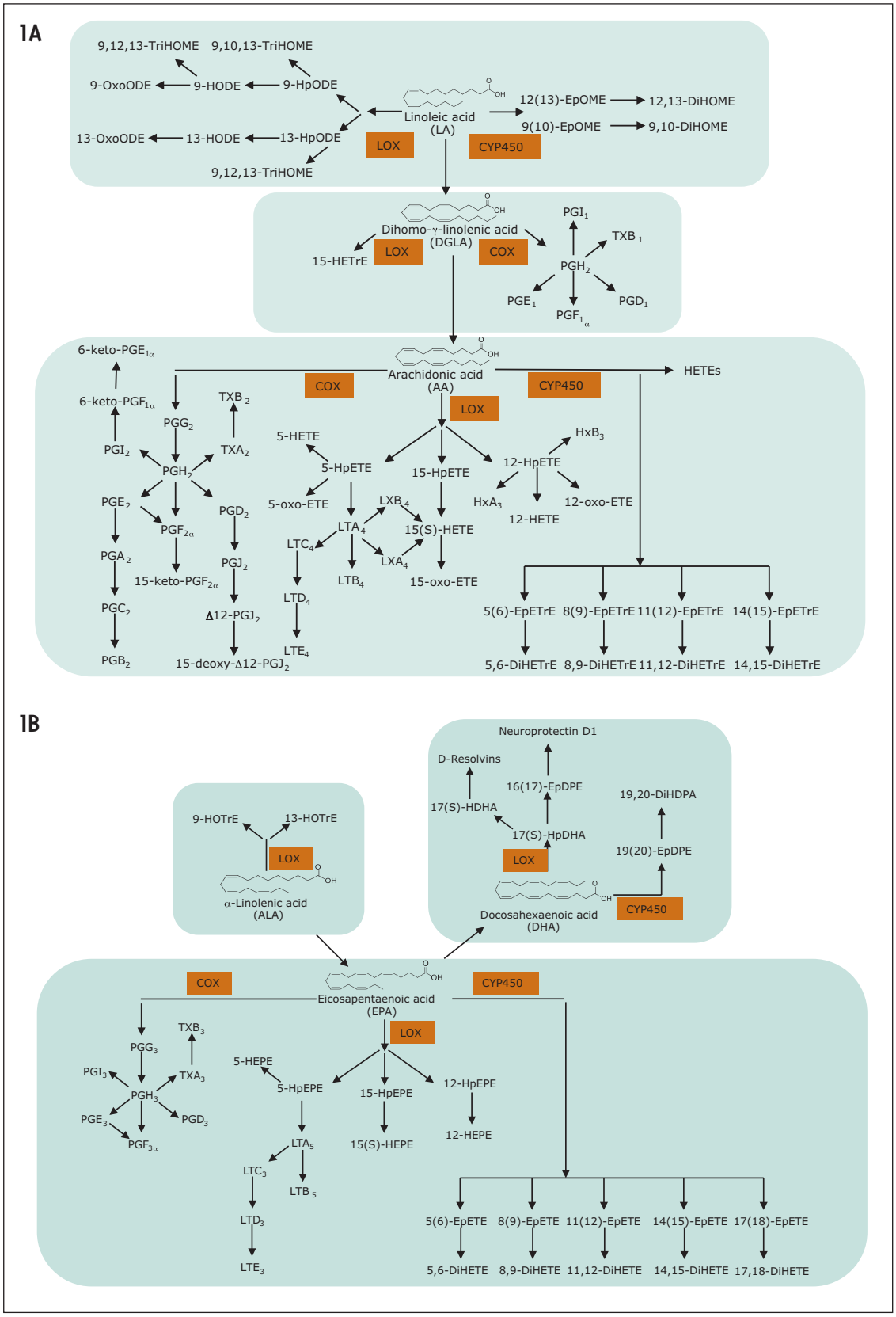

図 1. A. シクロオキシゲナーゼ(COX)、リポキシゲナーゼ(LOX)、CYP-450 やフリーラジカルによる触媒経路によって、リノレン酸 C18 : 2 (LA)、ジホモ - γ - リノレン酸 C20:3 (DHGLA) とアラキドン酸 C20:4 (AA) によって産生されるオメガ - 6 シリーズのオキシリピン類の概略図

B. COX、LOX、CYP-450 やフリーラジカルによる触媒経路によって、α - リノレン酸 C18 :3 (ALA)、エイコサペンタエン酸 C20:5 (EPA) とドコサヘキサエン酸 C22:6 (DHA) によって産生されるオメガ -3 シリーズのオキリリピン類の概略図

略称 : ジヒドロキシエイコサテトラエン酸 (DiHETE)、エポキシオクタデセン酸 (EpOME)、ヒドロキシ - エイコサトリエン酸 (HETrE)、ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (HETE)、ヒドロキシ - ヘプタデカトリエン酸 (HHTrE)、ヒドロキシオクタデカジエン酸 (HODE)、ヒドロキシエイコサペンタエン酸 (HEPE)、オキソ - エイコサテトラエン酸 (KETE)、オキソ - オクタデカジエン酸 (KODE)、プロスタグランジン (PG)、トロンボキサン (TX)。

	化合物名	M1	M2	保持時間	I.S.	プリカーサー	カテゴリー	反応経路
1	Tetranor-PGFM	329.2	311.2	0.48	(d4) PGF2α	AA	Prostanoid	COX
2	Tetranor-PGEM	327.1	309.2	0.53	(d4) PGE2	AA	Prostanoid	COX
3	20-hydroxy PGE2	367.2	287.2	1.01	(d4) PGE2	AA	Prostanoid	COX
4	Δ17-6-keto PGF1α	367.2	163.1	1.76	(d4) 6-keto PGF1α	AA	Prostanoid	COX
5	6-keto PGF1α	369.2	163.1	2.27	(d4) 6-keto PGF1α	AA	Prostanoid	COX
6	2,3-dinor-11b PGF2α	325.2	145.1	2.27	(d4) PGF2α	AA	Prostanoid	COX
7	(d4) 6-keto PGF1α	373.2	167.2	2.28	ISTD			
8	20-carboxy LTB4	365.2	347.2	2.35	(d4) LTB4	AA	Leukotriene	LOX
9	6-keto PGE1	367.2	143.1	2.37	(d4) PGE2	AA	Prostanoid	COX
10	20-hydroxy LTB4	351.2	195.1	2.46	(d4) LTB4	AA	Leukotriene	LOX
11	TXB3	367.2	169.1	2.48	(d4) TXB2	EPA	Thromboxane	COX
12	PGF3α	351.2	193.2	2.75	(d4) PGF2α	EPA	Prostanoid	COX
13	TXB1	371.2	171.1	2.79	(d4) TXB2	DGLA	Thromboxane	COX
14	PGE3	349.2	269.2	2.83	(d4) PGE2	EPA	Prostanoid	COX
15	(d4) TXB2	373.2	173.1	2.86	ISTD			
16	8-iso PGF2α	353.2	193.2	2.87	(d4) PGF2α	AA	Isoprostane	non enzymatic
17	TXB2	369.2	169.1	2.88	(d4) TXB2	AA	Thromboxane	COX
18	PGD3	349.2	269.2	2.92	(d4) PGD2	EPA	Prostanoid	COX
19	11β-PGF2α	353.2	193.2	2.93	(d4) PGF2α	AA	Prostanoid	COX
20	(+/-) 5-iPF2α-VI	353.2	115.1	3.04	(d4) PGF2α	AA	Isoprostane	non enzymatic
21	9,12,13-TriHOME	329.2	211.2	3.07	(d4) 9(S)-HODE	LA	Triol	LOX
22	9,10,13-TriHOME	329.2	171.1	3.12	(d4) 9(S)-HODE	LA	Triol	LOX
23	(d4) PGF2α	357.3	197.2	3.12	ISTD			
24	PGF2α	353.2	193.2	3.14	(d4) PGF2α	AA	Prostanoid	COX
25	PGF1α	355.2	293.2	3.14	(d4) PGF2α	DGLA	Prostanoid	COX
26	(d4) PGE2	355.2	275.2	3.19	ISTD			
27	PGE2	351.2	271.2	3.2	(d4) PGE2	AA	Prostanoid	COX
28	11β-PGE2	351.2	271.2	3.25	(d4) PGE2	AA	Prostanoid	COX
29	PGK2	349.2	205.1	3.28	(d4) PGE2	AA	Prostanoid	COX
30	15-keto PGF2α	351.2	219.1	3.28	(d4) PGF2α	AA	Prostanoid	COX
31	5(S),14(R)-Lipoxin B4	351.2	221.2	3.29	(d4) LTB4	AA	Lipoxin	LOX
32	PGE1	353.2	273.2	3.29	(d4) PGE2	DGLA	Prostanoid	COX
33	(d4) PGD2	355.2	275.2	3.31	ISTD			
34	PGD2	351.2	271.2	3.32	(d4) PGD2	AA	Prostanoid	COX
35	PGD1	353.2	273.2	3.32	(d4) PGD2	DGLA	Prostanoid	COX
36	11β-13,14-dihydro-15-keto PGF2α	353.2	113.2	3.35	(d4) PGF2α	AA	Prostanoid	COX
37	15-keto PGF1α	353.2	221.1	3.37	(d4) 6-keto PGF1α	DGLA	Prostanoid	COX
38	13,14-dihydro PGF2α	355.2	275.2	3.39	(d4) PGF2α	AA	Prostanoid	COX
39	13,14-dihydro-15-keto PGE2	351.2	175.2	3.54	(d4) PGE2	AA	Prostanoid	COX
40	13,14-dihydro-15-keto PGF2α	353.2	183.1	3.56	(d4) PGF2α	AA	Prostanoid	COX
41	5(S),6(R)-Lipoxin A4	351.2	115.1	3.58	(d4) LTB4	AA	Lipoxin	LOX
42	5(S),6(S)-Lipoxin A4	351.2	115.1	3.68	(d4) LTB4	AA	Lipoxin	LOX
43	13,14-dihydro-15-keto PGF1α	355.2	193.2	3.72	(d4) PGF2α	AA	Prostanoid	COX
44	13,14-dihydro-15-keto PGD2	351.2	175.2	3.77	(d4) PGD2	AA	Prostanoid	COX

	化合物名	M1	M2	保持時間	I.S.	プリカーサー	カテゴリー	反応経路
45	1α,1b-dihomo PGF2α	381.3	337.2	3.77	(d4) PGF2α	ADA	Prostanoid	COX
46	14,15-LTE4	438.2	333.2	3.78	(d3) LTE4	AA	Leukotriene	LOX
47	LTD4	495.2	177.1	3.9	(d3) LTE4	AA	Leukotriene	LOX
48	Resolvin D1	375.2	141	3.9	(d11) 14,15-DiHETrE	DHA	rRsolving	LOX
49	Resolvin E1	349.2	195	3.9	(d11) 14,15-DiHETrE	EPA	Resolving	LOX
50	13,14-dihydro-15-keto PGD1	353.2	209.1	3.91	(d4) PGD2	AA	Prostanoid	COX
51	PGA2	333.2	271.2	3.91	(d4) PGE2	AA	Prostanoid	COX
52	Δ12-PGJ2	333.2	233.1	3.97	(d4) 15-deoxy-Δ12,14-PGJ2	AA	Prostanoid	COX
53	PGJ2	333.2	233.1	3.97	(d4) PGD2	AA	Prostanoid	COX
54	LTB5	333.2	195.1	4.03	(d4) LTB4	EPA	Leukotriene	LOX
55	11-trans LTD4	495.2	177.1	4.05	(d3) LTE4	AA	Leukotriene	LOX
56	(d3) LTE4	441.2	336.2	4.12	ISTD			
57	LTE4	438.2	333.2	4.13	(d3) LTE4	AA	Leukotriene	LOX
58	8(S),15(S)-DiHETE	335.2	235.2	4.23	(d4) LTB4	AA	Diol	CYP450
59	12,13-DiHODE	311.2	293	4.23	(d4) 9,10-DiHOME	ALA	Diol	CYP450
60	bicyclo-PGE2	333.2	113.2	4.25	(d4) PGE2	AA	Prostanoid	CYP450
61	11-trans LTE4	438.2	333.2	4.26	(d3) LTE4	AA	Leukotriene	LOX
62	10(S),17(S)-DiHDoHE	359.2	153.2	4.34	(d8) 12(S)-HETE	DHA	Protectin	LOX
63	Neuroprotectin D1	359.2	206	4.34	(d8) 12(S)-HETE	DHA	Protectin	LOX
64	17,18-DiHETE	335.2	247.2	4.34	(d11) 14,15-DiHETrE	EPA	Diol	CYP450
65	5(S),15(S)-DiHETE	335.2	115.2	4.37	(d4) LTB4	AA	Diol	CYP450
66	6-trans-LTB4	335.2	195.1	4.4	(d4) LTB4	AA	Leukotriene	LOX
67	14,15-DiHETE	335.2	207.1	4.46	(d11) 14,15-DiHETrE	EPA	Diol	CYP450
68	(d4) LTB4	339.2	197.1	4.48	ISTD			
69	15-deoxy-Δ12,14-PGD2	333.2	271.2	4.49	(d4) 15-deoxy-Δ12,14-PGJ2	AA	Prostanoid	COX
70	Hepoxilin A3	335.2	273.2	4.5	(d8) 12(S)-HETE	AA	Hepoxilin	LOX
71	LTB4	335.2	195.1	4.5	(d4) LTB4	AA	Leukotriene	LOX
72	(d4)(±)12,13-DiHOME	317.3	185.2	4.56	ISTD			
73	12,13-DiHOME	313.2	183.2	4.58	(d4) 12,13-DiHOME	LA	Diol	CYP450
74	(d4)-(±)9,10-DiHOME	317.3	203.2	4.69	ISTD			
75	9,10-DiHOME	313.2	201.1	4.71	(d4) 9,10-DiHOME	LA	Diol	CYP450
76	(d11) 14,15-DiHETrE	348.3	207.1	4.77	ISTD			
77	19,20-DiHDPA	361.2	273.3	4.79	(d11) 14,15-DiHETrE	DHA	Diol	CYP450
78	14,15-DiHETrE	337.2	207.2	4.8	(d11) 14,15-DiHETrE	AA	Diol	CYP450
79	12S-HHTrE	279.2	179.2	4.84	(d8) 12(S)-HETE	AA	Alcohol	COX
80	11,12-DiHETrE	337.2	167.2	4.98	(d11) 14,15-DiHETrE	AA	Diol	CYP450
81	5,6-DiHETrE	337.2	145.1	4.99	(d11) 14,15-DiHETrE	AA	Diol	CYP450
82	9-HOTrE	293.2	171.1	5.07	(d4) 9(S)-HODE	ALA	Alcohol	LOX
83	17(18)-EpETE	317.2	259.2	5.16	(d11) 14,15-DiHETrE	EPA	Epoxide	CYP450
84	(d4) 15-deoxy-Δ12,14-PGJ2	319.2	275.3	5.2	ISTD			
85	(d6) 20-HETE	325.3	279.2	5.24	ISTD			
86	20-HETE	319.2	289.2	5.25	d6-20-HETE	AA	Alcohol	CYP450
87	15(S)-HEPE	317.2	219.2	5.25	(d8) 5(S)-HETE	EPA	Alcohol	LOX
88	12(S)-HpETE	317.1	153.0	5.34	(d8) 12(S)-HETE	AA	Hydroxyperoxide	LOX

	化合物名	M1	M2	保持時間	I.S.	プリカーサー	カテゴリー	反応経路
89	8,9-DiHETrE	337.2	127	5.35	(d11) 14,15-DiHETrE	AA	Diol	CYP450
90	5(S),6(S)-DiHETE	335.2	115.1	5.35	(d4) LTB4	AA	Diol	CYP450
91	12(S)-HEPE	317.2	179.1	5.35	(d8) 12(S)-HETE	EPA	Alcohol	LOX
92	13-HODE	295.2	195.2	5.5	(d4) 9(S)-HODE	LA	Alcohol	LOX
93	5(S)-HEPE	317.2	115.1	5.51	(d8) 5(S)-HETE	EPA	Alcohol	LOX
94	(d4) 9(S)-HODE	299.2	172.1	5.53	ISTD			
95	9-HODE	295.2	171.1	5.56	(d4) 9(S)-HODE	LA	Alcohol	LOX
96	15-HETE	319.2	219.2	5.62	(d8) 5(S)-HETE	AA	Alcohol	LOX
97	16(17)-EpDPE	343.2	233.2	5.62	(d11) 14,15-DiHETrE	DHA	Epoxide	CYP450
98	13-HpODE	293.1	113.0	5.63	(d4) 9(S)-HODE	LA	Hydroxyperoxide	LOX
99	13-KODE	293.2	113.1	5.64	(d4) 9(S)-HODE	LA	Ketone	LOX
100	17-HDoHE	343.2	281.3	5.67	(d8) 5(S)-HETE	DHA	Alcohol	LOX
101	9-HpODE	293.1	185.0	5.68	(d4) 9(S)-HODE	LA	Hydroxyperoxide	LOX
102	15-HpETE	317.	113.0	5.71	(d8) 5(S)-HETE	AA	Hydroxyperoxide	LOX
103	15-KETE	317.2	113.2	5.72	(d8) 5(S)-HETE	AA	Ketone	LOX
104	11-HETE	319.2	167.1	5.74	(d8) 12(S)-HETE	AA	Alcohol	COX
105	14(15)-EpETE	317.2	207.1	5.74	(d11) 14,15-DiHETrE	EPA	Epoxide	CYP450
106	9-KODE	293.2	185.2	5.77	(d4) 9(S)-HODE	LA	Ketone	LOX
107	(d8) 12(S)-HETE	327.3	184.2	5.78	ISTD			
108	12-HETE	319.2	179.2	5.81	(d8) 12(S)-HETE	AA	Alcohol	LOX
109	8-HETE	319.2	155.1	5.85	(d8) 5(S)-HETE	AA	Alcohol	LOX
110	15(S)-HETrE	321.2	221.2	5.88	(d8) 5(S)-HETE	DGLA	Alcohol	LOX
111	9-HETE	319.2	167.1	5.91	(d8) 12(S)-HETE	AA	Alcohol	non-enzymatic
112	(d8) 5(S)-HETE	327.3	116.1	5.97	ISTD			
113	5-HETE	319.2	115.1	6.00	(d8) 5(S)-HETE	AA	Alcohol	LOX
114	19(20)-EpDPE	343.2	281.3	6.09	(d11) 14,15-DiHETrE	DHA	Epoxide	CYP450
115	12(13)-EpOME	295.2	195.2	6.09	(d4) 12,13-DiHOME	LA	Epoxide	CYP450
116	14(15)-EpETrE	319.2	219.2	6.11	(d11) 14,15-DiHETrE	AA	Epoxide	CYP450
117	5(S)-HpETE	317.1	203.1	6.11	(d8) 5(S)-HETE	AA	Hydroxyperoxide	LOX
118	9(10)-EpOME	295.2	171.2	6.15	(d4) 9,10-DiHOME	LA	Epoxide	CYP450
119	12-KETE	317.2	273.3	6.25	(d8) 12(S)-HETE	AA	Ketone	LOX
120	5-KETE	317.2	203.2	6.26	(d8) 5(S)-HETE	AA	Ketone	LOX
121	11(12)-EpETrE	319.2	167.1	6.27	(d11) 14,15-DiHETrE	AA	Epoxide	CYP450
122	8(9)-EpETrE	319.2	155.1	6.33	(d11) 14,15-DiHETrE	AA	Epoxide	CYP450
123	5(6)-EpETrE	319.2	191.2	6.42	(d11) 14,15-DiHETrE	AA	Epoxide	CYP450

表 2. オキシリピン類の MRM トランジッション（M1 ＝プリカーサー ; M2 ＝プロダクト）と保持時間のリスト

オキシリピン類は、生体試料中に極微量に存在するため、分析を成功させる為にもサンプル調製の質が重要な要因となります。脂質以外の夾雑物やリン脂質のような非常に含量の多い成分を除くため、UPLC-MS 分析の前にミックスモードの固相抽出（SPE）を行いました。

抽出効率のノーマライズは、抽出工程の前に安定同位体ラベル化した化合物（内部標準試料）を添加することで可能となっています（表 1 および 2、図 2）。

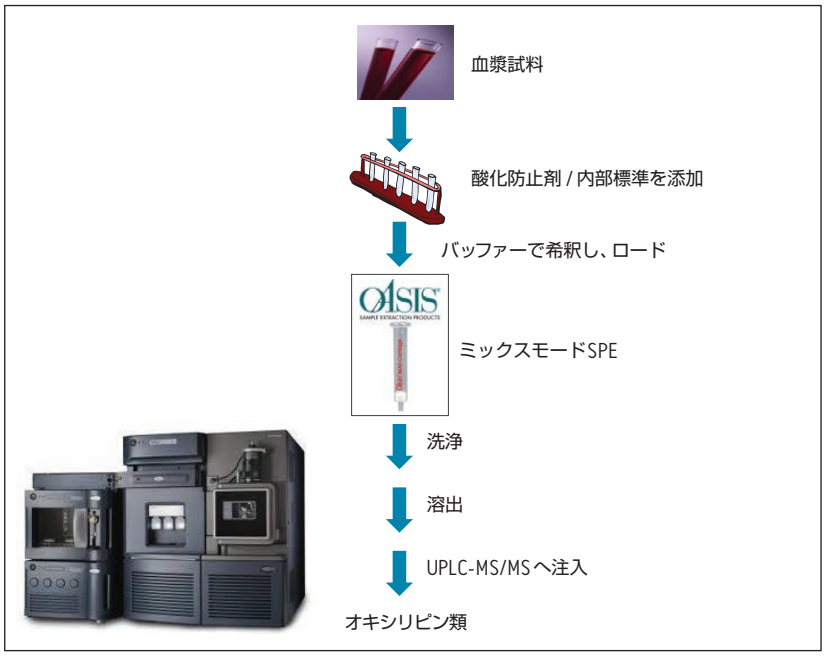

図 2. 血漿中オキシリピン類の分析におけるサンプル前処理のワークフロー

対象成分のクロマトグラフィー分離を最適化するため、市販されている幅広い種類のオキシリピンの混合物を使用しました。逆相 UPLC（測定条件参照）では、オキシリピン類は、極性や二重結合数の減少する順、またアシル鎖が長くなる順に溶出しますが、10 分以内で多くの構造異性体種（例えば、PGE2 と PGD2）が分離されることを考慮しました（図 3）。Xevo TQ-S の ESI ネガティブモードを使用して、保持時間や最適な MRM トランジッション（化合物固有の選択的なプリカーサー⇒プロダクトイオンのトランジッション）を、全ての個々のオキシリピン類に対して確認しました（表 2）。これらの MRM トランジッションを、保持時間ごとに決定した取り込み幅にすることでトランジッションの重なりを削減し、十分なデータポイント数を確保することで定量性を改善しました。同時溶出している代謝物の場合には、化合物固有のプリカーサーイオンとプロダクトイオンによって、その化合物の選択性をもったプロファイルを可能にしました。大多数の対象成分の検量線において、相関係数（R^2）は 0.99 以上でした（図 4）。この UPLC-MS/MS 試験法を使用して、ヒト血漿試料中の 107 のオキシリピン類を迅速にプロファイリングしました（図 5）。サンプル前処理プロトコールにおける僅かな改良で、この試験法は、他の生体マトリックス中のオキシリピン類の測定にも拡大適用することが可能となっています。

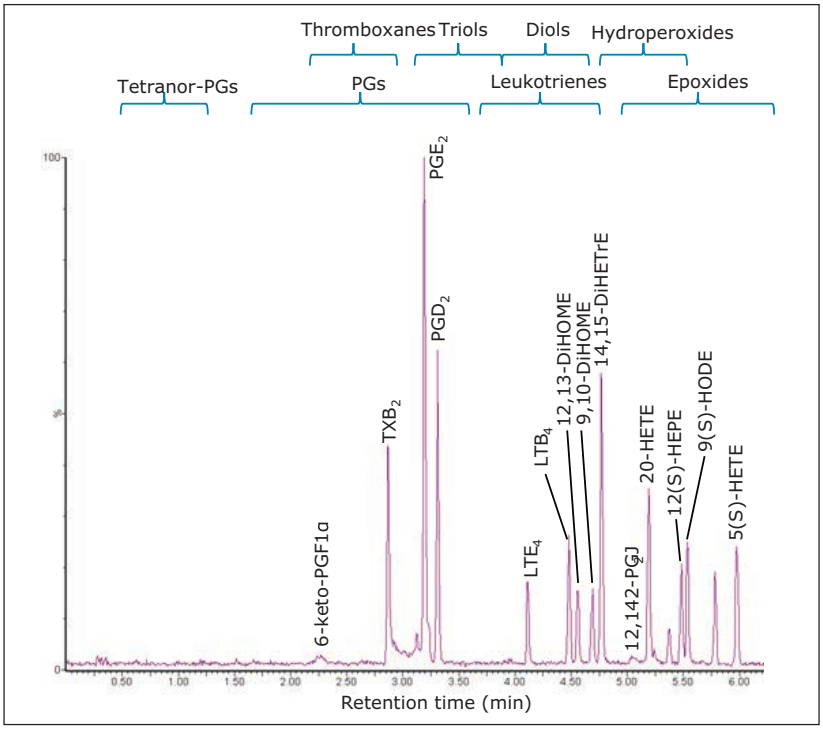

図 3. 広範囲にわたるオキシリピン種の UPLC-MS/MS クロマトグラムの代表例

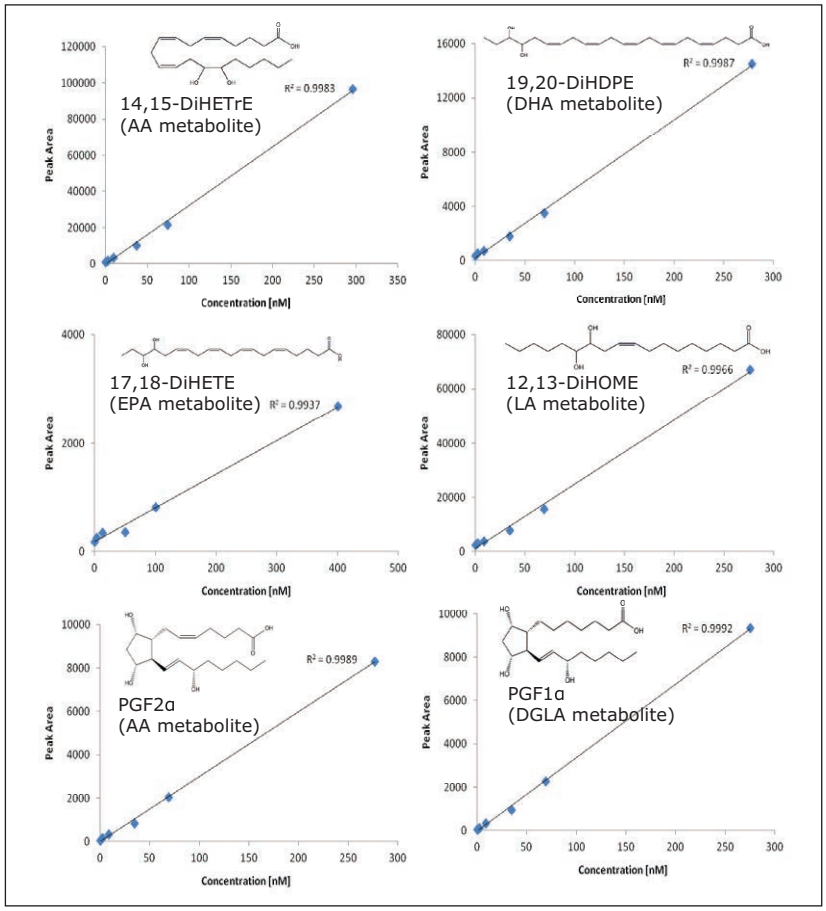

図 4. 血漿サンプル中の代表的なオキシリピン種のレスポンスの直線性

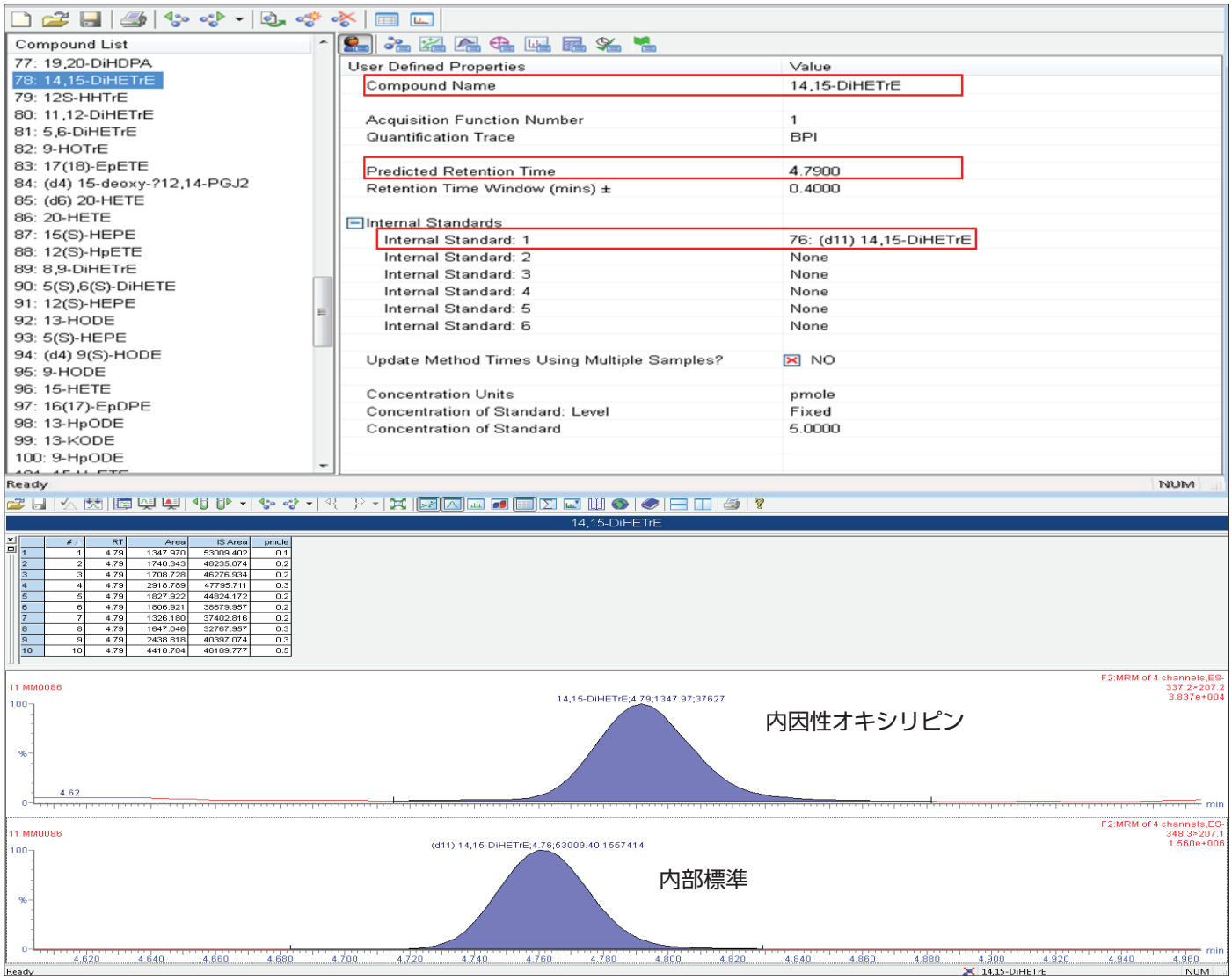

図 5. TargetLynx を用いた血漿中オキシリピンの定量画面の一例
選択されたオキシリピンの同定と定量において、指定された保持時間、MRMトランジッションや内部標準の使用例

結論

血漿中の 100 以上のオキシリピン類をルーチンワークとして検出するためのハイスループット MRM メソッドについてご紹介しました。これらの対象物は、Pro- および抗炎症性脂質メディエーターの両方を幅広く含むものです。この SPE-UPLC-MRM 分析法は、健康あるいは疾患状態における、栄養学的研究、臨床研究、医薬品探索や開発において、これら脂質メディエーターの役割の理解を助ける基礎研究に応用することも可能と考えられます。

参考資料

1. Lundstrom SL, Saluja R, Adner M, Haeggstrom JZ, Nilsson GP, Wheelock CE. Lipid mediator metabolic profiling demonstrates differences in eicosanoid patterns in Two phenotypically distinct mast cell populations. *J Lipid Res.* 2012 Oct 3. [Epub ahead of print].
2. Strassburg K, Huijbrechts AM, Kortekaas KA, Lindeman JH, Pedersen TL, Dane A,Berger R, Brenkman A, Hankemeier T, van Duynhoven J, Kalkhoven E, Newman JW, Vreeken RJ. Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive LC-MS/MS analysis: application in cardiac surgery. *Anal Bioanal Chem.* 2012 Sep;404(5):1413–26.
3. Sterz K, Scherer G, Ecker J. A simple and robust UPLC-SRM/MS method to quantify urinary eicosanoids. *J Lipid Res.* 2012 May;53(5):1026–36.
4. Nicolaou A, Masoodi M, Mir A. Lipidomic analysis of prostanoids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2009;579:271–86.
5. Astarita G, Kendall AC, Dennis EA, Nicolaou A. Targeted lipidomics strategies for oxygenated metabolites of polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Dec 5. pii: S1388-1981(14)00251–0.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

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 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、UPLC、ACQUITY UPLC、Xevo、Oasis および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
TruView および TargetLynx 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。

©2015 Waters Corporation. Produced in Japan. 2015年6月 720004664JA PDF