

Application News

No.L472A

高速液体クロマトグラフィー
High Performance Liquid Chromatography

Nexera-e および Co-Sense for Impurities を用いた りん脂質分析におけるワークフローの改善

Improved Analytical Workflow for Phospholipids by Nexera-e and Co-Sense for Impurities

網羅的かつ多様な成分の分析が可能な包括的 2 次元クロマトグラフ Nexera-e と、特定の画分を濃縮、高分離が可能な Co-Sense シリーズを組み合わせて用いることにより、対象試料の持つ成分全体の存在パターン比較と併せて、注目している溶出画分の精密分離が可能になります。

この手法によれば、複雑なマトリックスを持つ試料のディファレンシャル解析と、その結果、差異が認められた部分を詳細に分析するという二つのワークフローを同時、迅速かつ簡便に実施できるようになります。ここでは、りん脂質を用いた模擬的な実施例をご紹介します。

Y. Watabe T. Iida

■ Nexera-e によるグリセロりん脂質の包括的分離 Comprehensive Separation of Glycerophospholipids by Nexera-e

メタボロミクス分野においてその役割が重要視されているグリセロりん脂質 (GPLs) はグリセリン骨格を持ったりん脂質で、生体の細胞膜の構成要素として知られています。グリセロりん脂質はりん酸基にエステル結合する親水部の種類によって、次に示すようなグループに分類されます。

Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserine (PS), Phosphatidylcholine (PC)

また、それぞれのグリセリン部にアルキル側鎖が結合しています。Nexera-e の分析では、1 次元目で極性基の種類を順相モードにより識別し、さらに 2 次元目で鎖長の違いを逆相モードで判別することが可能です。Fig. 1 に、これら、りん脂質の分離を通常の LC-MS/MS で分析した例を示します。分析条件は Table 1 をご覧ください。MRM モードで各成分のクロマトグラムは得られますが、試料の全体像は把握しにくく、成分によっては、目的成分以外のピークの重なりによるピーク形状の劣化や、ピークの強度不足、イオンサプレッションによる定量精度の低下が懸念されます。次に Fig. 2 には、これらグリセロりん脂質 (各 500 µg/L) の MS/MS 検出による包括的 2 次元分離を試み、得られた等高線プロットを示しています。全体の分離を包括的に把握し、各りん脂質の存在状態を視覚的にとらえることが可能です。PE, PC などは鎖長による分離も明確で、比較的感度も得られますが、他のりん脂質については鎖長の分離、感度の点で充分でないものもあります。これら分離や感度が充分ではない成分の中で、PG, PS に着目して、ハートカット機能による共存成分の除去、あるいは感度不足を補うために、Co-Sense for Impurities による分析を試みました。尚、Nexera-e での分析条件については、アプリケーションニュース L462 をご覧ください。

Table 1 分析条件 (1 次元分離)
Analytical Conditions for Phospholipids on 1D Separation

Column	: L-Column2 ODS (100mm L. × 1.5mm I.D., 3 µm)
Mobile Phase	: A: MeOH / Water / Acetic Acid / 28 % Ammonia = 80 / 20 / 0.05 / 0.05 (v/v/v/v) B: 2-Propanol / Acetic Acid / 28 % Ammonia = 100 / 0.05 / 0.05 (v/v/v)
Time Program	: B Conc. 0 % (0 - 5 min) → 55 % (20 min) → 90 % (22 - 25 min) → 100 % (25.1 - 30 min) → 0 % (30.1 - 35 min)
Flow Rate	: 0.15 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Detector	: Shimadzu LCMS-8050 (ESI positive, MRM)

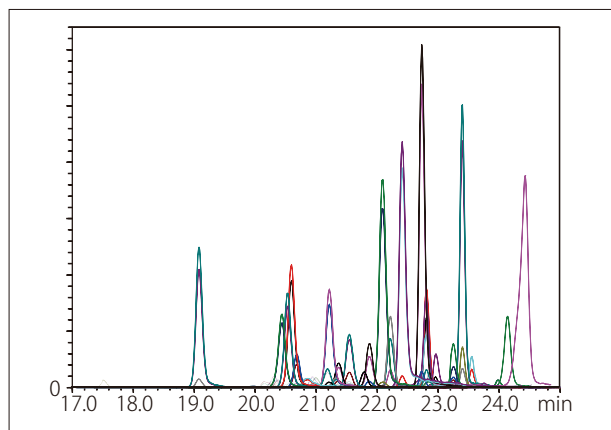


Fig. 1 りん脂質の逆相 1 次元分離
1D Reversed Phase Separation of Phospholipids

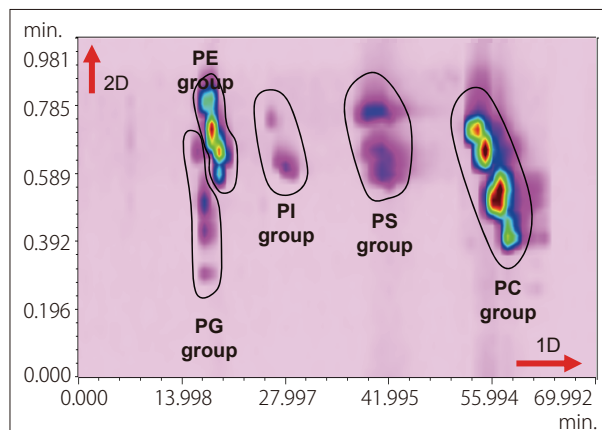


Fig. 2 りん脂質のポジティブ MRM による 2 次元分離プロット
2D Plot of Whole Positive MRM Transitions of Phospholipids

■ Co-Sense for Impurities によるグリセロリン脂質中 PG, PS 画分の精密分離

Fine Separation of PG and PS Fraction in Glycerophospholipids by Co-Sense for Impurities

一般的に質量分析法で複雑なマトリックス中の微量成分の分析を行う場合、Nexera-e による包括分離は特長のある結果を与えますが、個別の成分に着目した場合、異なる分離モードの組み合わせを行うことから、試料が希釈されてしまい、感度低下、あるいはピーク形状の劣化を招く場合もあります。1次元目の分離から対象ピーク近傍を分画した成分群を濃縮後、別モードで分離できる Co-Sense for Impurities は、不要な共存成分を除去できる点、あるいはトラップカラムにより一定の濃縮効果が期待でき、Nexera-e と相補的に使用すれば有効な分析手法となります。

Table 2 に Co-Sense for Impurities の分析条件を示します。1次元目、2次元目での移動相組成はカラムタイプも含めて Nexera-e での検討結果がほぼ流用できます。対象とする PG 類 8 種、PS 類 6 種（濃度 10 µg/L）以外にマトリックスとして、PG8 種、PC8 種、PE8 種、PI4 種、PA（フォスファチジル酸）5 種、TG（トリグリセライド）4 種、DG（ジグリセライド）5 種の混合成分を準備し、PG, PS に対して濃度比約 100 倍になるように調製した 2 種の試料を準備しました。Fig.3 に PG (16:0-18:1), PS (18:1-18:1) を 1次元分離のみの場合と、Co-Sense for Impurities で分離して得られたそれぞれの MRM トランジションのクロマトグラムの比較を示します。1次元分離の結果と比較して PG においては、濃縮による感度の向上、PS においてはハートカットによる共存成分の低減という効果が確認できます。このように Nexera-e での包括的分離検討結果に基づいて比較的容易かつ迅速に Co-Sense for Impurities での相補的分析が可能になります。

Table 2 分析条件 (Co-Sense for Impurities)
Analytical Conditions for Co-Sense for Impurities

[Column1]	: Shim-pack XR-SIL (100 mm L. × 3.0 mm I.D., 2.2 µm)
Mobile Phase	: A: Isooctane / Acetone / Ethyl Acetate / Acetic Acid = 40 / 40 / 20 / 0.03 (v/v/v/v) B: Isooctane / 2-Propanol / Water / Acetic Acid / Ethanolamine = 40 / 51 / 9 / 0.03 / 0.03 (v/v/v/v/v)
Time Program	: B Conc. 40 % (0 min) → 50 % (2.5 min) → 100 % (5 - 7.5 min) → 40 % (7.6 - 16.5 min)
Flow Rate	: 0.6 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Fraction Time	: PG (1.1 - 1.8 min) PS (16 - 20 min)
[Column2]	: COSMOSIL Guard Column HILIC (10 mm L. × 2 mm I.D., 5 µm)
Mobile Phase	: Acetonitrile
Flow Rate	: 5.4 mL/min
[Column3]	: L-Column2 ODS (100 mm L. × 1.5 mm I.D., 3 µm)
Mobile Phase	: A: Methanol / Water / Acetic Acid / 28 % Ammonium Hydroxide = 80 / 20 / 0.1 / 0.1 (v/v/v/v) B: 2-Propanol / Acetic Acid / 28 % Ammonium Hydroxide = 100 / 0.1 / 0.1 (v/v/v)
Time Program	: B Conc. 0 % → 60 % (2 min) → 90 % (4 - 8 min) → 0 % (8.1 min)
Flow Rate	: 0.15 mL/min
Detector	: Shimadzu LCMS-8050 (ESI negative, MRM)

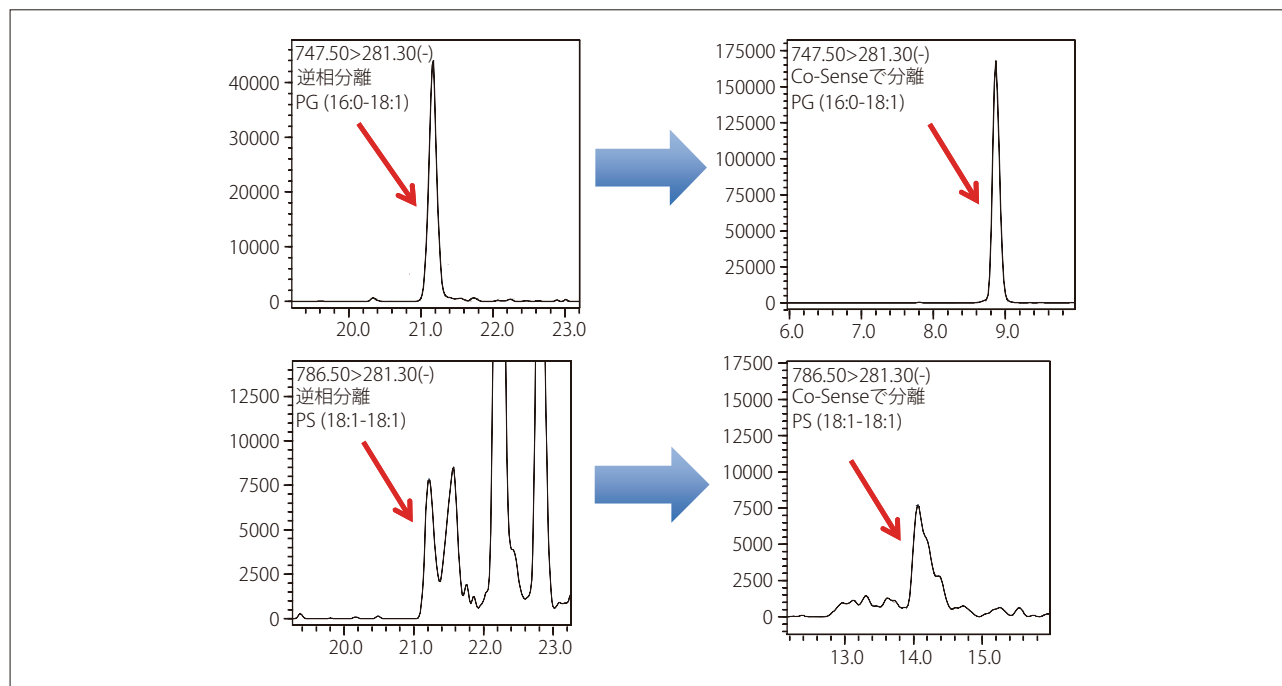


Fig. 3 PG (16:0 - 18:1) と PS (18:1 - 18:1) のネガティブ MRM による逆相分離と Co-Sense による 2次元分離の比較
Comparison of 1D Reversed Phase and Co-Sense MRM Separations of PG (16:0-18:1) and PS (18:1-18:1)

A改訂版発行：2014年12月

初版発行：2014年10月

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075)813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。