

Application News

No. C102

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

トリプル四重極型 LC/MS/MS を用いた脂質メディエーター 158 成分の一斉分析法

Comprehensive Monitoring Method for Analyzing 158 Lipid Mediator Species by Triple Quadrupole LC/MS/MS

脂質メディエーターは生理活性をもつ脂質の総称であり、生体内で生産され様々な生理機能を担っています。糖尿病など生活習慣を起因とする各種疾患との因果関係が注目されるなか、近年、LCMS 分析システムの高速化と高感度化によって、100 成分以上の脂質メディエーター関連物質の一斉分析法が開発されてきました。脂質メディエーターは、分子量が同じで MS/MS スペクトルも同じ異性体が多いため、定性とプロファイリング取得には LC 分離と保持時間による同定が必須です。

そこで、高速トリプル四重極型質量分析計 LCMS-8050 に

よる脂質メディエーターの一斉分析システム「脂質メディエーターメソッドパッケージ ver. 2」を開発しました。本メソッドパッケージには、下記一覧に示しました 158 成分の最適化された MRM パラメーターと LC 条件、および保持時間情報が含まれます。ここでは、ターゲット成分一覧とその応用例を示しました。アラキドン酸代謝物（アラキドン酸を含む 87 成分）、EPA 代謝物（EPA を含む 18 成分）、DHA 代謝物（DHA を含む 16 成分）、エタノールアミド類 11 成分、その他の脂肪酸代謝物 23 成分と、Azelaoyl-PAF、PAF、Lyso-PAF が含まれています。

■化合物一覧 List of compounds (分類略号 LA: linoleic acid, ALA: α -linolenic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid, EA: ethanolamide 成分名略号 PG: prostaglandin, LT: leukotriene, DiHOME: dihydroxyoctadecadienoic acid, HODE: hydroxyoctadecadienoic acid, Hp: hydroperoxy, KODE: keto-octadecadienoic acid, HETE: hydroxyeicosatetraenoic acid, EET: epoxyeicosatrienoic acid)

No.	分類	成分名
1	LA	(\pm)12,13-DiHOME
2	LA	(\pm)9,10-DiHOME
3	LA	13(S)-HODE
4	LA	9(S)-HODE
5	LA	(\pm)9-HpODE
6	LA	13-KODE
7	LA	13(S)-HpODE
8	LA	9-KODE
9	LA	12(13)-EpOME
10	LA	9(10)-EpOME
11	ALA	9(S)-HOTrE
12	ALA	13(S)-HOTrE
13	EDA	(\pm)15-HEDE
14	EDA	15-KEDE
15	AA	tetranor-PGFM
16	AA	tetranor-PGEM
17	AA	tetranor-PGDM
18	AA	20-hydroxy-PGF _{2α}
19	AA	20-hydroxy-PGE ₂
20	AA	18-carboxy dinor-LTB ₄
21	AA	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGF _{1β}
22	AA	2,3-dinor-8-iso-Prostaglandin F _{2α}
23	AA	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGF _{1α}
24	AA	6-keto-Prostaglandin F _{1α}
25	AA	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGD ₂
26	AA	20-carboxy-LTB ₄
27	AA	20-hydroxy-LTB ₄
28	AA	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGE ₂
29	AA	6,15-diketo-13,14-dihydro-PGF _{1α}
30	AA	iPF _{2α} -IV
31	AA	8-iso-15(R)-PGF _{2α}
32	AA	8-iso-PGF _{2α}
33	AA	Thromboxane B ₂
34	AA	11 β -PGF _{2α}
35	AA	5-iPF _{2α} -VI
36	AA	8-iso-15-keto-PGF _{2α}
37	AA	PGF _{2α}
38	AA	8-iso-13,14-dihydro-15-keto-PGF _{2α}
39	AA	8-iso-PGE ₂
40	AA	PGE ₂
41	AA	11-dehydro Thromboxane B ₂
42	AA	15-keto PGF _{2α}
43	AA	5(S),14(R)-LXB ₄
44	AA	PGK ₂

No.	分類	成分名
45	AA	Prostaglandin D ₂
46	AA	11 β -13,14-dihydro-15-keto-PGF _{2α}
47	AA	15-keto Prostaglandin E ₂
48	AA	14,15-LTC ₄
49	AA	13,14-dihydro-15-keto PGF _{2α}
50	AA	5(S),6(R)-Lipoxin A ₄
51	AA	13,14-dihydro-15-keto PGE ₂
52	AA	LTD ₄
53	AA	5(S),6(S)-Lipoxin A ₄
54	AA	14,15-LTE ₄
55	AA	13,14-dihydro-15-keto-PGD ₂
56	AA	LTC ₄
57	AA	LTE ₄
58	AA	LTf ₄
59	AA	8-iso-PGA ₂
60	AA	PGA ₂
61	AA	11-trans-LTC ₄
62	AA	11-trans-LTE ₄
63	AA	PGJ ₂
64	AA	PGB ₂
65	AA	8,12-iso-iPF _{2α} -VI 1,5- lactone
66	AA	8(S),15(S)-DIHETE
67	AA	6-trans-LTB ₄
68	AA	5(S),15(S)-DIHETE
69	AA	LTB ₄
70	AA	13,14-dihydro-15-keto PGJ ₂
71	AA	12-keto-LTB ₄
72	AA	N-acetyl-LTE ₄
73	AA	(\pm)14,15-DHET
74	AA	12(S)-HHT
75	AA	(\pm)11,12-DHET
76	AA	(\pm)8,9-DHET
77	AA	20-carboxy arachidonic acid
78	AA	(\pm)5,6-DHET
79	AA	19(S)-HETE
80	AA	15-deoxy-delta12,14-PGJ ₂
81	AA	20-HETE
82	AA	(\pm)18-HETE
83	AA	(\pm)17-HETE
84	AA	(\pm)16-HETE
85	AA	15(S)-HETE
86	AA	11(S)-HETE
87	AA	8(S)-HETE
88	AA	15(S)-HpETE

No.	分類	成分名
89	AA	12(S)-HETE
90	AA	(\pm)9-HETE
91	AA	5(S)-HETE
92	AA	12(S)-HpETE
93	AA	12-KETE
94	AA	(\pm)5,6-DHET-lactone
95	AA	5(S)-HpETE
96	AA	(\pm)14(15)-EET
97	AA	5-KETE
98	AA	(\pm)11(12)-EET
99	AA	(\pm)8(9)-EET
100	AA	(\pm)5(6)-EET
101	AA	Arachidonic Acid (AA)
102	ADA	1 α ,1b-dihomo-PGF _{2α}
103	DGLA	Thromboxane B ₁
104	DGLA	8-iso-PGF _{1α}
105	DGLA	11-trans-PGE ₁
106	DGLA	PGE ₁
107	DGLA	PGD ₁
108	DGLA	8-iso-PGA ₁
109	DGLA	PGA ₁
110	DGLA	15(S)-HETRE
111	EPA	8-iso-PGF _{3α}
112	EPA	Thromboxane B ₃
113	EPA	PGF _{3α}
114	EPA	PGE ₃
115	EPA	PGD ₃
116	EPA	Lipoxin A ₃
117	EPA	(\pm)17,18-DIHETE
118	EPA	(\pm)14,15-DIHETE
119	EPA	5,6-DIHETE
120	EPA	18(S)-HEPE
121	EPA	15(S)-HEPE
122	EPA	12(S)-HEPE
123	EPA	5(S)-HEPE
124	EPA	15(S)-HpEPE
125	EPA	12(S)-HpEPE
126	EPA	5(S)-HpEPE
127	EPA	17(18)-EpETE
128	EPA	EPA
129	DHA	Resolvin D ₂
130	DHA	Resolvin D ₁
131	DHA	7(R)-Maresin 1
132	DHA	10(S),17(S)-DiHDoHE

No.	分類	成分名
133	DHA	7(S),17(S)-hydroxy-DPA
134	DHA	(\pm)20-HDoHE
135	DHA	(\pm)16-HDoHE
136	DHA	(\pm)17-HDoHE
137	DHA	(\pm)13-HDoHE
138	DHA	(\pm)10-HDoHE
139	DHA	(\pm)14-HDoHE
140	DHA	(\pm)11-HDoHE
141	DHA	(\pm)7-HDoHE
142	DHA	(\pm)8-HDoHE
143	DHA	(\pm)4-HDoHE
144	DHA	DHA
145	EA	PGF _{2α} Ethanolamide
146	EA	PGE ₂ Ethanolamide
147	EA	PGE ₁ ethanolamide
148	EA	PGD ₂ Ethanolamide
149	EA	LTB ₄ ethanolamide
150	EA	(\pm)14(15)-EET ethanolamide
151	EA	(\pm)11(12)-EET ethanolamide
152	EA	(\pm)8(9)-EET ethanolamide
153	EA	(\pm)5(6)-EET ethanolamide
154	EA	AEA(arachidonoyl ethanolamide)
155	EA	OEA(oleoyl ethanolamide)
156	Lyso-PAF	C-16
157	PAF	C-16
158	Azelaoyl-PAF	
159	IS	tetranor-PGEM-d ₈
160	IS	6-keto-PGF _{1α} -d ₄
161	IS	Thromboxane B ₂ -d ₄
162	IS	PGF _{2α} -d ₄
163	IS	PGE ₂ -d ₄
164	IS	PGD ₂ -d ₄
165	IS	LTC ₄ -d ₅
166	IS	LTB ₄ -d ₄
167	IS	5(S) HETE-d ₈
168	IS	12(S) HETE-d ₈
169	IS	15(S) HETE-d ₈
170	IS	PAF C-16-d ₄
171	IS	OEA-d ₄
172	IS	EPA-d ₅
173	IS	DHA-d ₅
174	IS	AA-d ₈

HPLC 条件, HPLC Conditions

分析カラム : Phenomenex Kinetex C8 (150 mmL. x 2.1 mm I.D., 2.6 μ m)
 移動相 A : 0.1 % ギ酸 / 水
 移動相 B : アセトニトリル
 タイムプログラム : 10 % B. (0 min) \rightarrow 25 % B. (5.0 min) \rightarrow 35 % B. (10.0 min) \rightarrow 75 % B. (20.0 min) \rightarrow 95 % B. (20.1-25.0 min)
 流速 : 0.4 mL/min.
 注入量 : 5 μ L
 カラムオープン温度 : 40 $^{\circ}$ C

MS 条件, MS Conditions (LCMS-8050)

イオン化法 : ESI(Positive/Negative)
 ネブライズガス流量 : 3.0 L/min.
 ドライングガス流量 : 10.0 L/min.
 ヒーティングガス : 10.0 L/min.
 DL 温度 : 250 $^{\circ}$ C
 ヒートブロック温度 : 400 $^{\circ}$ C
 インターフェース温度 : 300 $^{\circ}$ C
 CID ガス圧 : 230 kPa

脂質メディエーター類の標準試料 158 成分を内部標準 16 成分でグループ分けしました。保持時間の近い内部標準のピークで保持時間補正を行うことにより、精度の高いピーク同定が可能です。8-iso-PGF_{2α} と 8-iso-15(R)-PGF_{2α}, PGE₁ と PGD₁ をマウス脳組織から検出し、同定したクロマトグラム

を示しています。比較として標準試料混合溶液のクロマトグラムを上段に示しました。内部標準試料との保持時間差が生体試料中とほぼ同じであり、同定の確からしいことを示しています。

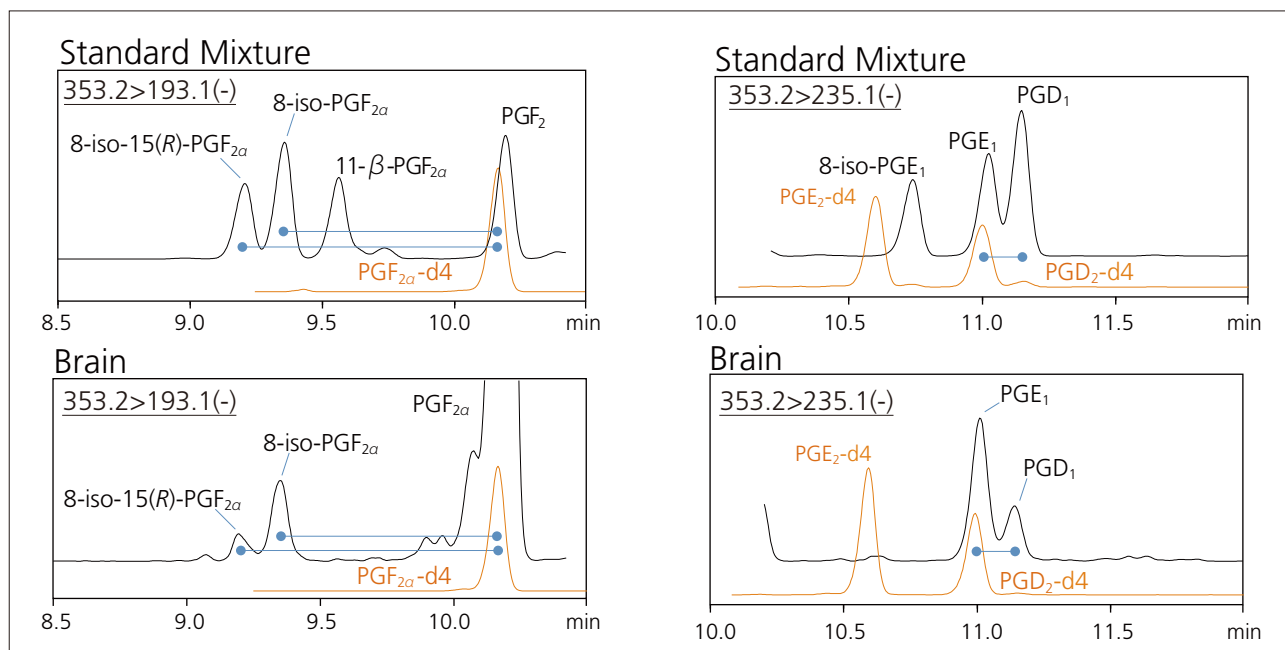


Fig. 1 標準試料混合溶液とマウス脳の脂質抽出溶液の 8-iso-PGF_{2α} (左) と PGD₁ (右) MRM クロマトグラム
MRM Chromatograms of 8-iso-PGF_{2α} (left) and PGD₁ (right) in the Analysis for Standard Mixture and Murine Brain Tissue Extracts

マウスの脳、肝臓、脾臓を摘出してすみやかに液体窒素で凍結した後、各凍結組織を秤量し、破碎した組織にメタノールと内部標準混合溶液を添加し、脂質抽出を行いました。抽出溶液をギ酸で希釈して固相抽出で精製・濃縮し、脂質メディエーター一斉分析を行いました。3 種の組織から定量的に検出された 78 成分のプロファイリング結果を Fig. 2 に示しました。全成分について検量線を作成し、得られた定量値

を縦軸に対数表記しています。縦軸の単位は組織重量当たりの含有量 (fg/mg tissue) です。肝臓の PGE₂ は 0.10 pg/mg tissue, 脳の PGD₂ は 143 pg/mg tissue でした。低濃度領域においてダイナミックレンジの広いプロファイリングが可能です。

M. Yamada

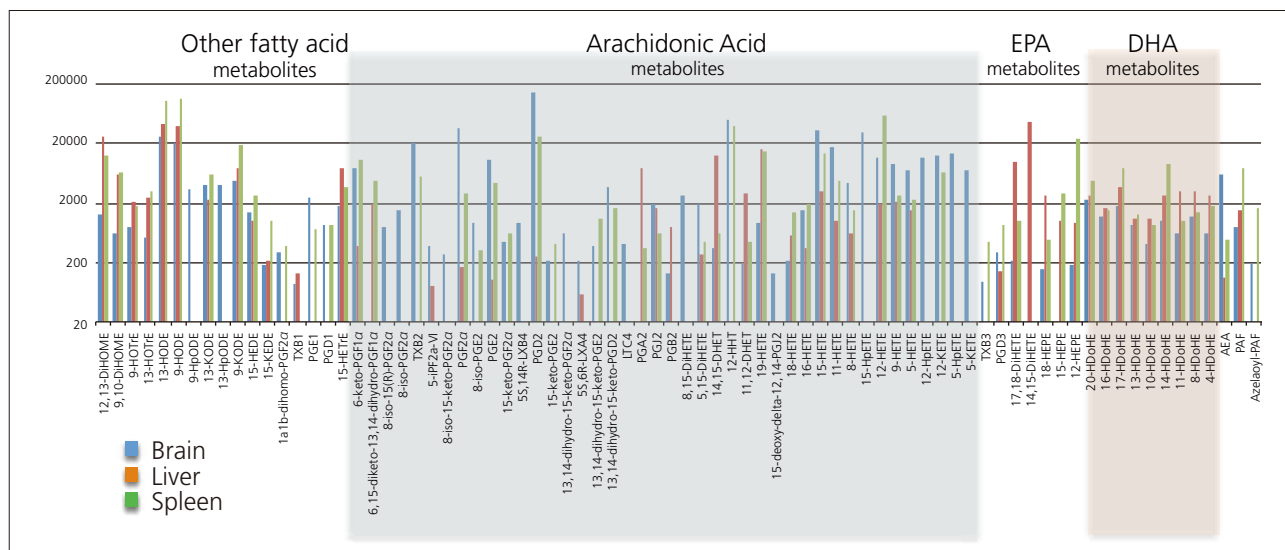


Fig. 2 マウスの脳、肝臓、脾臓の脂質メディエータープロファイリング
Lipid Mediator Profiling for a Brain, Liver and Spleen Tissue from a Mouse