SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No. L519

超臨界流体クロマトグラフィー

Nexera UC-MS/MS システムを用いたラット髄液試料中のコリンおよびアセチルコリンの分析

細胞膜の構成要素であるコリンと神経伝達物質として知られるアセチルコリンは生体分析の分野では、よく知られた化合物です。アセチルコリンは生体内でコリンを原材料にして生合成されるため、両化合物をモニターすることで、体内活動の良否をモニターすることも可能です。本アプリケーションニュースでは、ラット髄液試料中のこれらの成分の SFC 分析について、髄液試料を直接注入した事例を中心にご紹介します。また保存、移送などの利便性、耐久性を考えて、ろ紙に含浸させた髄液試料を作成して NexeraUC オンライン SFE-SFC-MS/MS システムで自動抽出分析を行った例も併せてご紹介します。

Y. Watabe, T. Iida

■SFC-MS/MS による分析

コリンおよびアセチルコリン標準品の混合試料を用いて SFC-MS/MS 分析を行った所、CN カラムによる両者の良好な分離が確認されました。10、100、1000 μg/L の 3 濃度、6 回繰り返し分析よりピーク面積値から検量線を作成しました。良好な直線性が得られ、定量限界（LOQ、ASTM 法）はコリン：30 μg/L、アセチルコリン：10 μg/L でした。表 1 に SFC-MS/MS による分析条件を示します。また、図 1 にコリン及びアセチルコリンの構造式、図 2 に得られた検量線を示します。

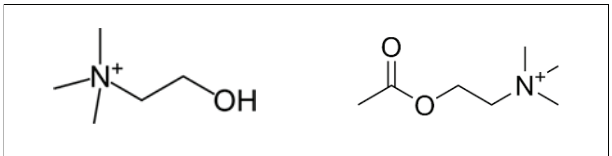

図 1　コリン（左）およびアセチルコリン（右）の構造

表 1　SFC-MS/MS 分析条件

Column	: Inertsil CN-3　250 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 μm
Mobile phase	: A; Supercritical fluid of CO_2 B; Modifier: Methanol containing 20 mmol/L ammonium formate / water =95/5 (v/v)
Time program	: B Conc. 10 % (0 min) → 25 % (10 min) → 50 % (10.1-12 min) → 10 % (12.1-15 min)
Flow rate	: 2.5 mL/min
Column temp.	: 40 ℃
Injection volume	: 1 μL
BPR pressure	: 10 Mpa
BPR temp.	: 50 ℃
Detector	: LCMS-8050 (ESI, MRM mode)
Make-up	: Methanol
Make-up flow rate	: 0.2 mL/min
MRM transitions	: (+) *m/z* 104.1>60.1 (for choline) (+) *m/z* 146. 1>87.1 (for acetylcholine)

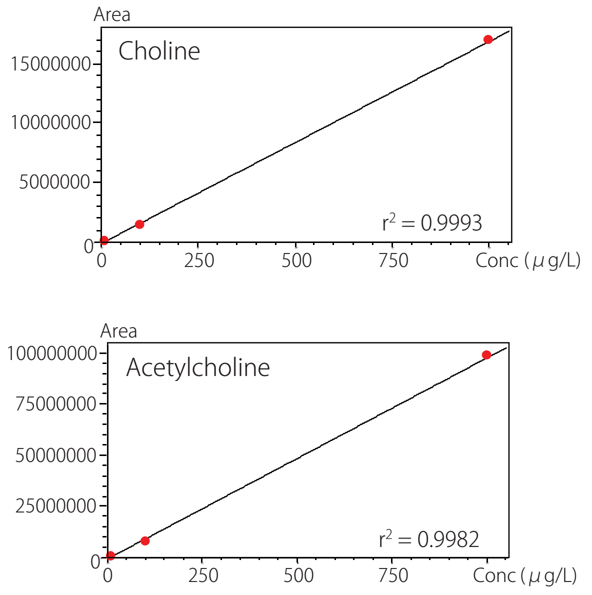

図 2　コリンおよびアセチルコリンの検量線

検量線の作成時に、10、100、1000 μg/L の各濃度での保持時間および面積の 6 回繰り返し再現を確認して結果を表 2 にまとめました。直線性（r^2）はコリンで 0.9993、アセチルコリンでは 0.9982 となりました。図 3 に 100 μg/L の場合の MRM クロマトグラムを示します。

表 2　コリンおよびアセチルコリン標準品での再現性（n=6）

		Retention time (%RSD)	Peak area (%RSD)
Choline	10 μg/L	0.22	7.5
Choline	100 μg/L	0.05	1.7
Choline	1000 μg/L	0.07	2.2
Acetylcholine	10 μg/L	0.07	5.7
Acetylcholine	100 μg/L	0.06	4.2
Acetylcholine	1000 μg/L	0.07	6.0

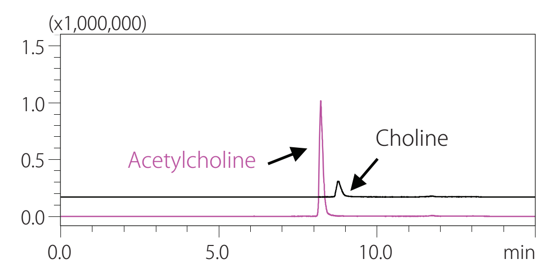

図 3　コリンおよびアセチルコリン標準品（100 μg/L）

次にポンプに接続した微小透析プローブの半透膜より覚醒動物等から連続的に生体成分を回収するマイクロダイアリシス法により、ラットから採取した髄液試料を直接 SFC 分析に供しました。SFC 分析で使用される移動相の主成分である超臨界状態の二酸化炭素は極性が低く、水系試料との相溶性の懸念から注入量を 1 μL としました。アセチルコリンに関しては ASTM 法による LOQ は 10 μg/L 程度で、定量計算値はそれ以下の濃度でしたので定量値の計算は行わず、ピーク同定のみを実施しました。コリンの 6 回の繰り返し注入における保持時間およびピーク面積の再現性は表 3 に示すように良好でした。図 4 に髄液試料を SFC 分析したクロマトグラムを示します。

表 3　ラット髄液試料中のコリン定量値と再現性（n=6）

	Retention time (%RSD)	Peak area (%RSD)
Choline（Concentration 229.6 μg/L）	0.10	3.1

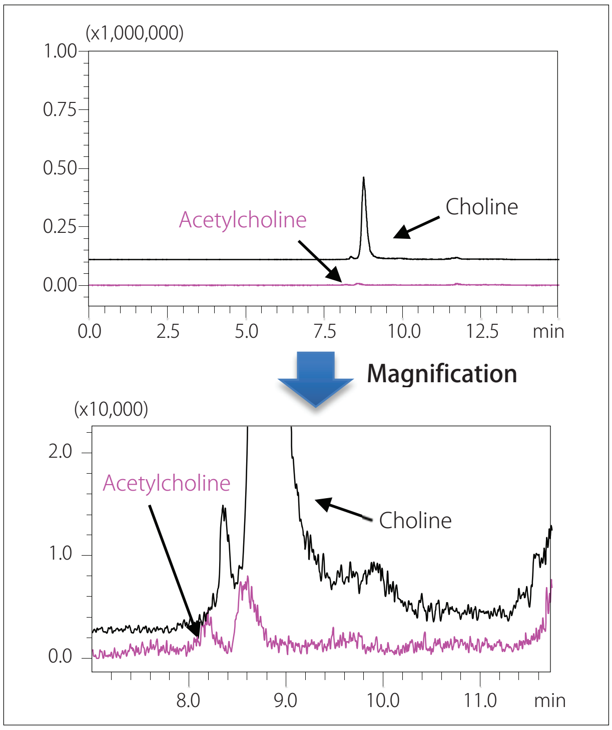

図 4　髄液試料中コリンおよびアセチルコリンの SFC 分析

■オンライン SFE-SFC-MS/MS による分析

次に髄液試料をろ紙に含浸させ、乾燥させた試料を作成し、オンライン SFE-SFC-MS/MS による分析を試みました。同試料を作成することにより、試料の取り扱いが容易になるばかりでなく、本来、生体試料を含む水系の試料溶媒と低極性の超臨界状態の二酸化炭素移動相との相溶性の問題も小さくなるため、その利便性が注目されています。表 4 にオンライン SFE-SFC-MS/MS 分析に用いた分析条件を示します。

*ラット髄液試料は同志社女子大学薬学部　喜里山　暁子先生よりご提供いただきました。

表 4　オンライン SFE-SFC-MS/MS 条件

Vessel	:	0.2 mL (1 μL sample was added to filter paper)
Extractant	:	A: Supercritical fluid of CO_2 B: Methanol containing 20 mmol/L ammonium formate / water = 95/5 (v/v) A/B = 9/1 (v/v)
Flow rate	:	2.5 mL/min
Extraction time	:	Static (0-3 min) – Dynamic (3-6 min) – Static (6-8 min) - Dynamic (8-11 min) – Static (11-13 min) – Dynamic (13-16 min)
BPR pressure	:	10 Mpa
Extraction temp.	:	60 ℃
Time program	:	B Conc. 10 % (16 min) → 25 % (26 min) → 50 % (26.1-28 min) → 10 % (28.1-31 min)

＊ タイムプログラム以外の SFC-MS/MS 条件は表 1 に同じ

図 5 に 100 μg/L の標準溶液 1 μL をろ紙（ADVANTEC 社 GA-200）に滴下して作成した試料をオンライン SFE-SFC-MS/MS 分析して得られた結果を示します。また、図 6 にラット髄液試料を同様に処理して得られた結果を示します。得られたアセチルコリンのピークは SFC 分析の結果と同様に小さなものでしたが、SFC 単独の分析に比べ、ベースラインノイズレベルが改善されたため、LOQ 付近の状態は改善されました。ASTM 法による測定ノイズを基準にした場合、S/N=15 以上のレスポンスを示していましたので、濃度の大きなコリン同様に 100 μg/L の標準品データを元に簡便な定量計算を行いました。コリン濃度は 297 μg/L と、SFC の場合とほぼ近い結果が得られ、オンライン SFE での抽出が効率よく行われていることが示唆されました。アセチルコリンについてはピーク面積からの定量では 1.7 μg/L という結果が得られました。

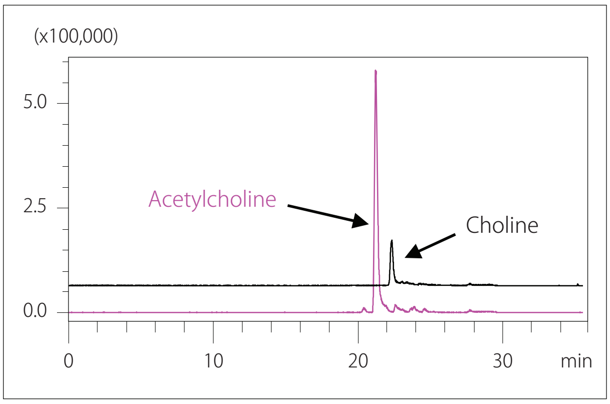

図 5　コリンおよびアセチルコリン標準品のオンライン SFE-SFC 分析

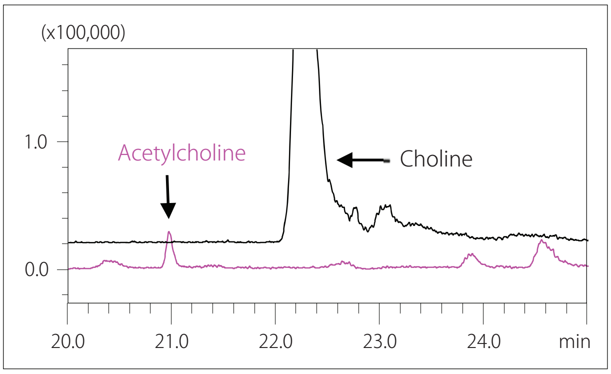

図 6　髄液試料中コリンおよびアセチルコリンの
オンライン SFE-SFC 分析

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

初版発行：2017 年 3 月

島津コールセンター　0120-131691
(075) 813-1691