

Application News

No. L462

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

Nexera-e およびトリプル四重極型 LC/MS/MS を用いたグリセロリン脂質の分析

Glycerophospholipids Analysis by Comprehensive HPLC Coupled with a Triple Quadrupole Mass Spectrometer

グリセロリン脂質 (GPLs) はグリセリン骨格をもったリン脂質で、生体の細胞膜の重要な構成要素です。それらは細胞の外側の環境に対して細胞を保護する効果以外にも、細胞内外の物質移動や神経情報の伝達など、細胞の生物学的な活動に深くかかわっています。したがって、GPLs の分析はメタボロミクスの分野において重要な意味を持ちます。一方で、逆相 HPLC による分離と ESI-MS/MS による検出の組み合わせはリポドミクスでは有効な手段ではありますが、未だ改善の余地があります。この手法の欠点は共存成分による相互のマトリックス効果の影響により、定量性が失われることです。このため、信頼性の高い分析結果を得るためには、HPLC による分離が重要です。包括的 2 次元 (Comprehensive 2D) クロマトグラフ Nexera-e によれば、GPLs の高分離が可能となります。

Y. Watabe

■ Nexera-e の流路構成

Flow Diagram of Nexera-e

Fig. 1 に本分析に用いた Nexera-e システムの流路図を示します。システムは二つの流路により構成されます。一つは 1 次元目の順相カラムを用いた分析用で、もう一つは 2 次元目の逆相カラムを用いた超高速分析用の流路です。GPLs 混合試料は 1 次元目の順相モードで極性基の違いによって大まかに分離されます。そしてすべての溶出画分は 2 つのループによって交互に分画されます。片方のループに分画している間にもう一方のループに分画された画分は 2 次元目のカラムですべて逆相モードにより分析されます。結果として、すべての溶出画分は、順次 2 次元目のカラムに導入され、分析対象である GPLs は 1 次元目の分離とは異なる選択性を有する 2 次元目のカラムで分離され、ESI-MS/MS で定量的に検出されます。

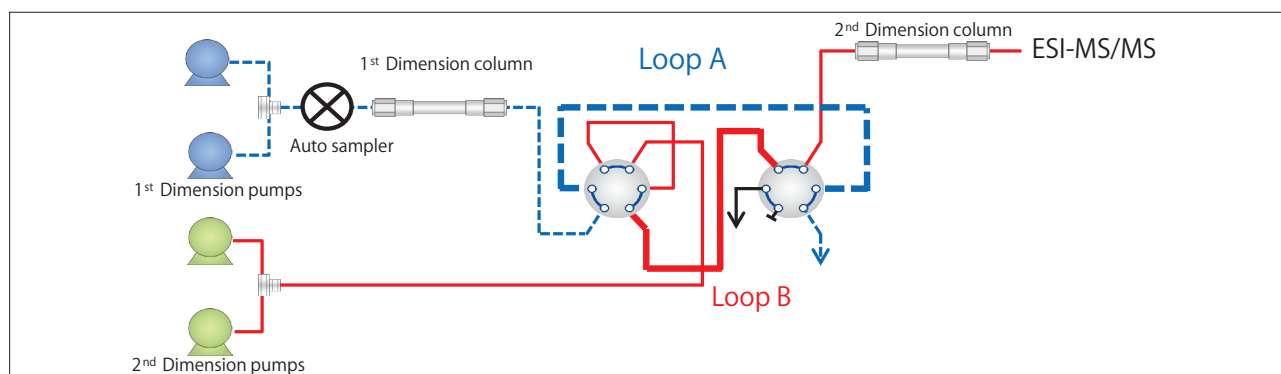


Fig. 1 包括的 2 次元 LC Nexera-e の流路構成
Flow Diagram of the Comprehensive 2D-LC Nexera-e

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

1D Column	: Nucleosil SIL (150 mm L. × 1.0 mm I.D., 3 μm)
Mobile Phase	: A; isooctane/acetone/ethyl acetate/acetic acid = 40/20/20/0.03 (v/v/v/v) B; isooctane/2-propanol/water/acetic acid/28 % ammonium hydroxide = 40/51/9/0.03/0.03 (v/v/v/v/v)
Flow Rate	: 0.02 mL/min
Time Program	: B Conc. 30 % (0 min) → 40 % (25 min) → 100 % (40 min) → 100 % (55 min) → 30 % (55.1 min) → STOP (70 min)
Column Temp.	: 40 °C
Injection Vol.	: 5 μL
Loop Vol.	: 20 μL
2D Column	: Phenomenex Kinetex C18 (50 mm L. × 4.6 mm I.D., 2.6 μm)
Mobile Phase	: A; methanol/water/acetic acid/28 % ammonium hydroxide = 90/10/0.05/0.05 (v/v/v/v) B; 2-propanol/acetic acid/28 % ammonium hydroxide = 100/0.05/0.05 (V/V/V)
Flow Rate	: 3.5 mL/min (50 % split to MS)
Time Program	: B Conc. 10 % (0 min) → 50 % (0.75 min) → 10 % (0.76 min) → STOP (1 min) The initial B conc. has been changed stepwisely
Detector	: Shimadzu LCMS-8050 (ESI positive, MRM mode)

■ グリセロリン脂質の包括的 2次元分離

Comprehensive 2D Separation of Glycerophospholipid

Fig. 2 に ESI ポジティブモードにおける MRM (Multiple Reaction Monitoring) 分析で取得した GPLs の Comprehensive 2D 分離を示します。専用ソフト ChromSquare により、解析も容易です。

試料は, Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserine (PS),

Phosphatidylcholine (PC) 各 500 µg/L の濃度で調製した標準品を用いました。ESI-positive mode MRM 分析では PG, PE, PI, PS および PC が分離検出され, Fig. 2 に示す PC 類のうち 3 種の成分については, 定量の基になる, 該当部分のピーク体積に相当する数値 (blob 面積) の 5 回繰り返し再現性と, それぞれの 50 - 5000 µg/L の範囲での 6 点の直線性を Table 2 に示しました。各成分の帰属は Fig. 2 に示してあります。

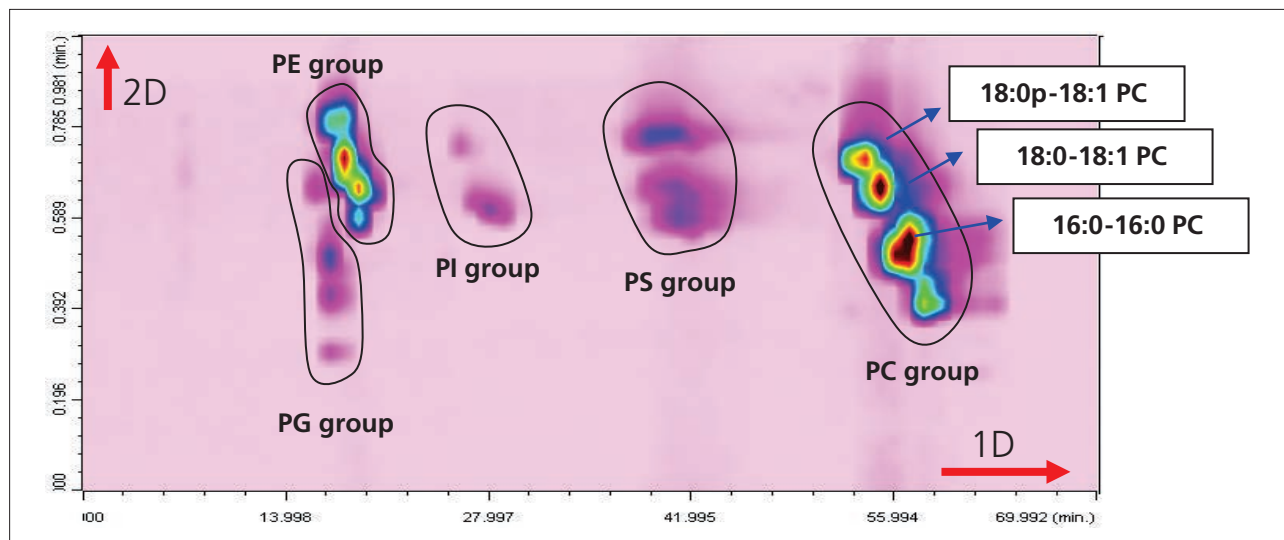


Fig. 2 リン脂質のポジティブ MRM による 2 次元分離の ChromSquare によるプロット
2D Plot of Whole Positive MRM Transitions of Phospholipids with ChromSquare Software

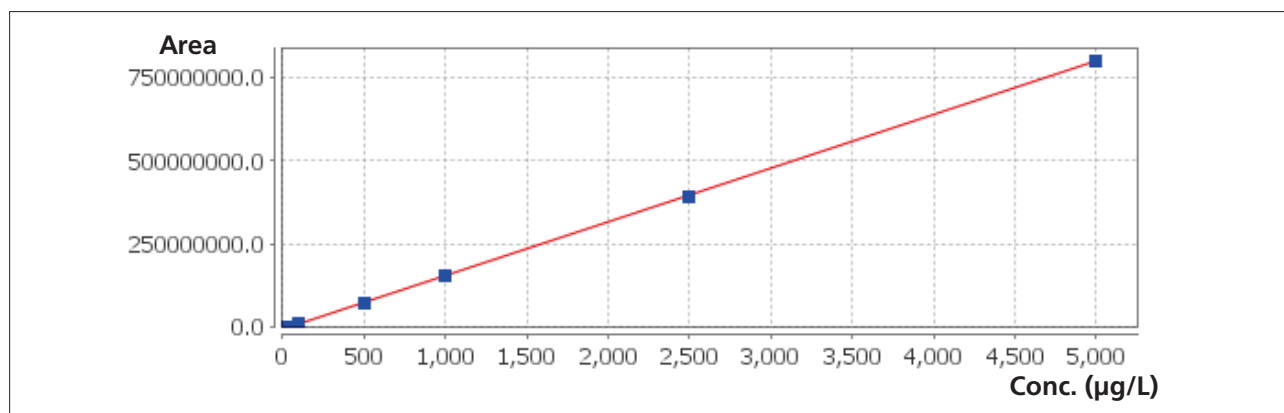


Fig. 3 18:0-18:1 フォスファチジルコリンの直線性
Regression Line of 18:0-18:1 PC

Table 2 PC 3 成分の 5 回繰り返し保持時間および面積の再現性と 50-5000 µg/L 範囲での直線性
Repeatability of 5 Analyses in %RSD and Linearity of 50-5000 µg/L for 3 Compounds of PCs

Compound	MRM transition	Total retention time	Retention time (2D)	Blob Area	R squared
16:0-16:0 PC	<i>m/z</i> 734.6 > 184.1	0.0072	0.9	6.8	0.9996
18:0-18:1 PC	<i>m/z</i> 788.6 > 184.1	0.013	1.1	8.9	0.9999
18:0p-18:1 PC	<i>m/z</i> 772.6 > 184.1	0.013	1.2	6.4	0.9993

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：2014年7月

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。

＞ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



＞ LCMS-8050
トリプル四重極質量分析計

関連分野

＞ ライフサイエンス

＞ 価格お問い合わせ

＞ 製品お問い合わせ

＞ 技術お問い合わせ

＞ その他お問い合わせ