

Application News

No. L505

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

Nexera-e と LCMS-IT-TOF 検出を組み合わせた ムール貝の脂質分子種の包括的二次元分離

Comprehensive 2D Separation of Lipid Species in Mussels with LCMS-IT-TOF Detection

メタボロミクスの中でも脂質を標的とした網羅的な解析をリピドミクスと呼びます。脂質は生物のエネルギー源であり、生体膜の主要な構成成分である他、生体内のシグナル伝達に関わるなど重要な役割を担っています。しかし、構成する脂肪酸の種類や不飽和度の組合せが多様であり、一斉分析による網羅的解析は困難と言われていました。

Fig. 1 にリピドミクスのワークフローを示します。生体試料から抽出した全脂質は、順相や HILIC（親水性相互作用クロマトグラフィー）などにより、いったん脂質のクラスに応じた分画を行い、それぞれの画分に対して LC/MS 分析を行うことが一般的ですが、時間がかかることが難点でした。一方、包括的二次元液体クロマトグラフィーでは、一次元目と二次元目に異なる分離モードを組み合わせ、その分離選択性の差異によってそれぞれの次元の単独分析では分離困難であった成分の分離を改善します。

本分析では、多数の脂質分子の包括的分離に効果的な Nexera-e を用いたムール貝中脂質の分離例をご紹介します。一次元目に HILIC カラムによるセミマイクロスケールの分離、二次元目には超高速の逆相分離を採用しました。検出器に、イオントラップ飛行時間質量分析計（LCMS-IT-TOF）を組み合わせ使用しました。分析条件を Table 1 に示します。

Y. Watabe T. Iida

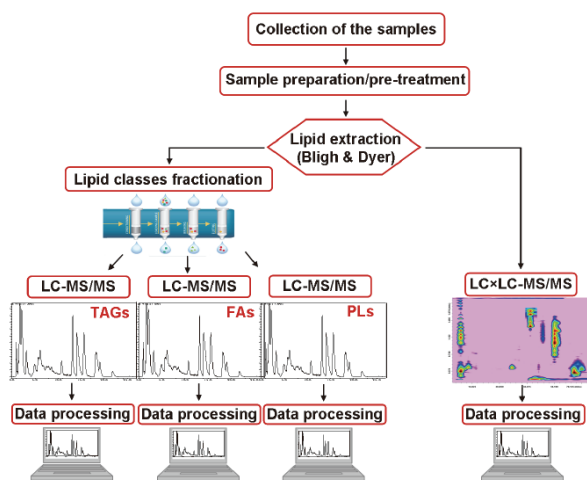


Fig. 1 リピドミクスのワークフロー
Workflow for Lipidomics

■ LCMS-IT-TOF によるムール貝中脂質分子種の包括的分離検出

Comprehensive Separation of Whole Lipids in Mussel with LCMS-IT-TOF Detection

ムール貝は定住型の二枚貝で世界中の海域に広く生息します。体内の脂質分子の存在量は、外的環境に応じて変動することが知られています。例えば、春と夏にはトリアシルグリセロールが、秋と冬にはリン脂質が増加する傾向がある一方、コレステロールは季節間で大きな変動を示しません。また、脂肪酸は、食餌の状況を確認するためバイオマーカーとして利用されています。

ムール貝の脂質プロファイルは重金属、多環芳香族炭化水素（PAH）ポリ塩化ビフェニル（PCB）等の環境汚染物質による酸化や加水分解により変化するため、環境汚染を判断するための指標生物としても期待されています。このように、脂質の全体像を簡便に把握することができる分析手法の開発は重要な意味を持ちます。

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

[Sample Preparation]	Mussels tissue were pooled, homogenized and treated with Bligh/Dyer method to extract the total lipids
[Column1]	: Ascentis Express HILIC column (Supelco, 150 × 2.1 mm; 2.7 μm fused core particles)
Mobile Phase	: A; Acetonitrile: 10 mM Ammonium formate = 98 : 2 (v/v) B; Acetonitrile: MeOH: 10 mM Ammonium formate = 55 : 35 : 10 (v/v/v)
Time Program	: B. Conc. 0 % (0-15 min) → 100 % (40-80 min)
Flow Rate	: 50 μL/min
Column Temp.	: 55 °C
Injection Volume	: 5 μL
Modulation Time	: 2.0 min
[Column2]	: Titan C18 column (Supelco, 50 × 4.6 mm; 1.9 μm)
Mobile Phase	: A; Acetonitrile: Methanol: 10 mM Ammonium formate = 70 : 25 : 5 B; 0.1 % Formic acid in Isopropanol
Time Program	: [0-40 min] B. Conc. 0 % (0-0.35 min) → 15 % (1 min) → 20 % (1.01 min) → 70 % (1.7 min) → 100 % (1.75-1.85 min) → 0 % (1.86-2 min) [40-62 min] B. Conc. 0 % (0-0.75 min) → 20 % (0.76-1.01 min) → 70 % (1.7 min) → 100 % (1.75-1.85 min) → 0 % (1.86-2 min) [62-80 min] B. Conc. 0 % (0-1.01 min) → 20 % (1.85 min) → 0 % (1.86-2 min)
Flow Rate	: 3 mL/min was splitted to 0.3 mL/min for MS
Detector	: LCMS-IT-TOF (ESI positive/negative mode) Scan range ESI (+); <i>m/z</i> 300-1000, ESI (-); <i>m/z</i> 200-1000, for MS/MS; <i>m/z</i> 50-1000
2D Data Processing	: ChromSquare 2.0 software was used to covert raw data into 2D plot

Fig. 2 上部にムール貝中脂質分子群の包括的二次元プロットを示します。PEとPI群はESI (-)による検出が良好で、ESI (+)の二次元プロットに対して、重ね描きを行いました。

先述のように、ムール貝から抽出した全脂質分子種は一次元目 HILIC カラムにより極性部分に応じた分離が達成され、溶出時間の早い時間から、トリアシルグリセロール (TAGs) + コレステロールエステル + ステロール + モノアシルグリセロール (MGs) + ジアシルグリセロール (DGs) → ホスファチジルイノシトール (PI) → ホスファチジルエタノールアミン (PE) → リゾホスファチジン酸 (LysoPA) → ホスファチジン酸 (PA) → ホスファチジルセリン (PS) → ホスファチジルコリン (PC) → リゾホスファチジルコリン (LysoPC) のグループの順番に溶出が確認されました。一方、二次元目逆相分離では Partition Number (PN) と言われる全炭素数から二重結合数 (DB) の2倍を減じた値の順に溶出が確認されました。

さらに二次元目の検出器として精密質量測定が可能な

LCMS-IT-TOF を用いることにより、多数の溶出成分の詳細な定性解析が可能です。Fig. 2 中の白色楕円に示してあるピーク部分には等しいPNを持つ2成分のトリアシルグリセロールが混在しますが、それぞれのMS/MSスペクトルをFig. 2 下部に示します。側鎖が1つ脱離したジグリセリドのピークから構造情報が得られ、これらの構造が

OOP,

OOO

であると、帰属されました。

P: Palmitic acid

O: Oleic acid

このように、外的環境の違いに応じた全脂質プロファイルを得ることが可能であり、海洋生物としてのバイオマーカーやその変動する脂質分子種を解析することが可能です。

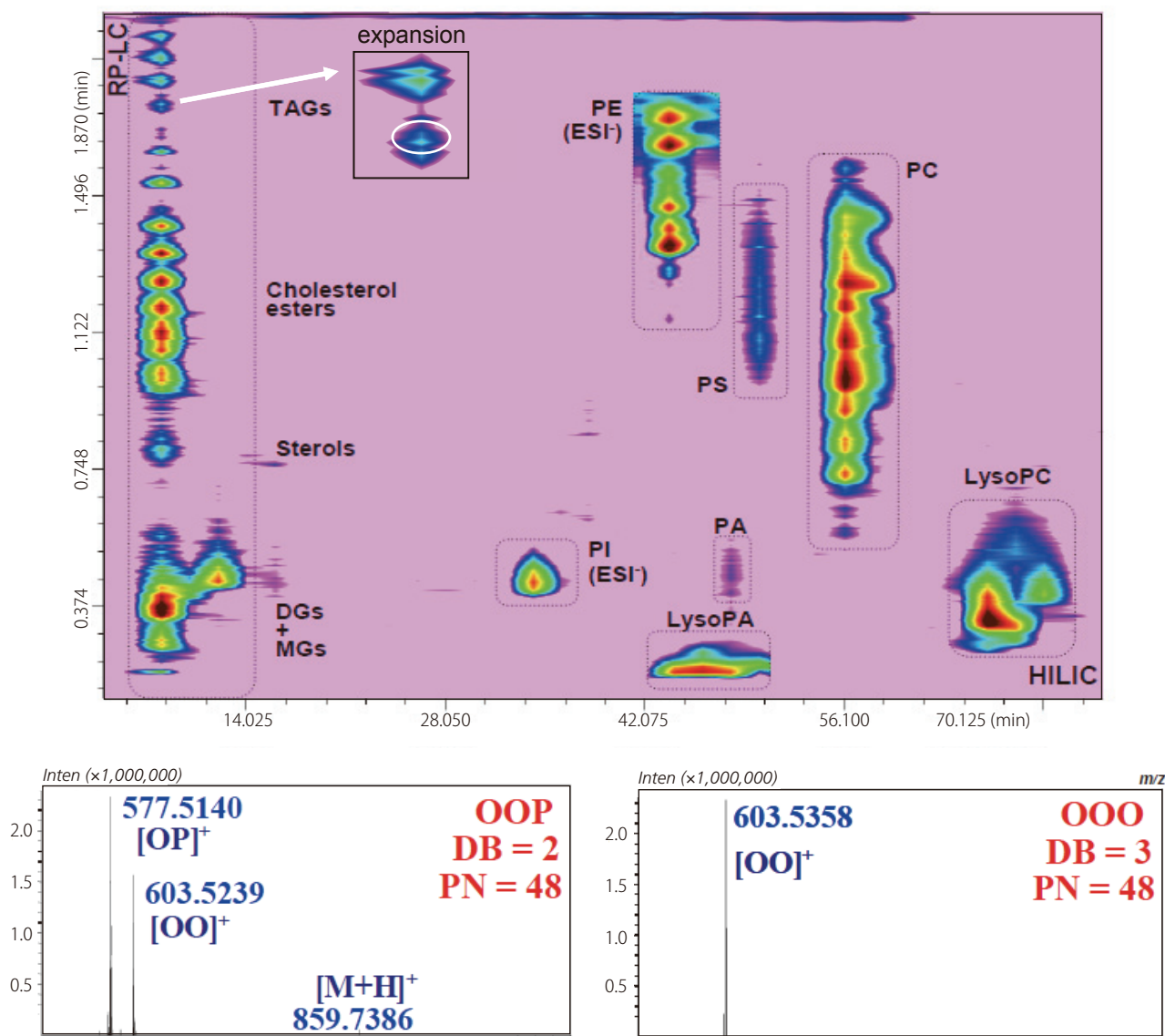


Fig. 2 ムール貝中脂質の LCMS-IT-TOF 質量分析計により得られた包括的二次元分離プロットと特定部分の MS/MS スペクトル
Comprehensive 2D Plot of Whole Lipids with LCMS-IT-TOF in Addition to the MS/MS-spectra of Each Assigned Blob

データ提供 University of Messina, Prof. Luigi Mondello and Chromaleont S.r.l

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：2016年3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。