

# Application News

## No. C137

LC/MS  
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

### トリプル四重極型 LC/MS/MS によるリン脂質プロファイリング法の開発

Development of a Profiling Method of Phospholipids by Triple Quadrupole LC/MS/MS

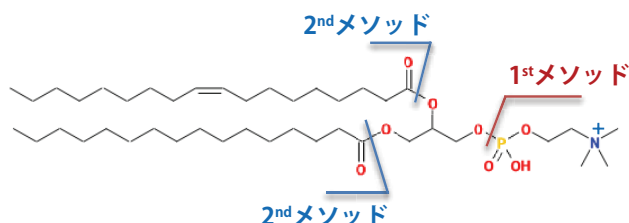
リン脂質は、細胞膜構成成分として脂肪酸を内側に、極性基を外側に配向させて脂質二重膜を形成しています。リン脂質に結合する脂肪酸には生理活性脂質の前駆体であるアラキドン酸のほか、EPA や DHA などの多価不飽和脂肪酸が含まれ、多様な膜構造の形成に寄与しています。近年、リン脂質組成の変異と各種疾患との因果関係が報告されていることから、リン脂質のプロファイリング手法は疾患マーカー探索や疾患メカニズム解明の重要な手法として注目されています。

そこで、生体試料のリン脂質プロファイリングを目的とした MRM ライブラリー「LC/MS/MS MRM ライブラリー【リン脂質】」を作成しました。リン脂質はグリセロリン脂質とスフィンゴリン脂質に分類されます。リン脂質の MS/MS による定性分析では、コリンやエタノールアミンなどの極性基の脱離で生じるプロダクトイオンを検出することでクラス分けを行い、分子イオンから構造を推定します (Fig. 1)。本 MRM ライブラリーでは、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、

ホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジルイノシトール (PI)、およびスフィンゴミエリン (SM) を対象とした 422 成分の MRM ライブラリー (1<sup>st</sup> メソッド) を用意しました。分析対象として考慮した脂肪酸の一覧を Fig. 1 右の表に示しました。1 回のクロマトグラフィーでリン脂質 422 成分のプロファイリングが可能です。さらに、脂肪酸の組み合わせを決めるために必要となる 867 の MRM ライブラリーを用意しました。まずは、1<sup>st</sup> メソッドによるリン脂質プロファイリングを行い、脂肪酸の組成解析が必要な場合は 2<sup>nd</sup> メソッドで分析して決定するというワークフローになります。また、867 の MRM ライブラリーを編集して 2<sup>nd</sup> メソッドを作成するために必要となる MRM 編集用ソフト「MRM Event Link Editor」を用意しました。

本 MRM ライブラリーを用いることで、トリプル四重極型質量分析計によるリン脂質プロファイリングを簡便に行うことができ、脂肪酸組成解析をストレスなく行えます。

M. Yamada



		二重結合数					
炭素数	C14:0	C14:1					
	C16:0	C16:1					
	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3			
	C20:0	C20:1	C20:2	C20:3	C20:4	C20:5	
	C22:0	C22:1	C22:6				

Fig. 1 PC (16 : 0/18 : 1) の構造とフラグメンテーション帰属 (左), および脂肪酸一覧表 (右)。ここでは、極性基の脱離で生じるプロダクトイオンをモニターする MRM を 1<sup>st</sup> メソッド、脂肪酸のプロダクトイオンをモニターする MRM を 2<sup>nd</sup> メソッドと呼びます。Chemical structure and annotations for fragment ions for PC (16 : 0/18 : 1). Here we call 1<sup>st</sup> method for the MRM to monitor the product ion of polar head group elimination and 2<sup>nd</sup> method for the MRM to monitor fatty acid as product ion.



Fig. 2 MRM によるリン脂質プロファイリングのワークフロー。1<sup>st</sup> メソッドで得られる構造情報は、極性基の種類と、脂肪酸の炭素数の合計および二重結合の数がわかります (例: PC (34 : 1))。1<sup>st</sup> メソッドで検出された成分について、例えば「PC (16 : 0/18 : 1)」というように脂肪酸組成を調べたい場合に 2<sup>nd</sup> メソッドで解析します。An MRM based phospholipid profiling workflow. The structural information obtained by 1<sup>st</sup> method are polar head group, sum of carbon number and double bonds including in fatty acids (Ex. PC (34 : 1)). 2<sup>nd</sup> method is required for determining fatty acid composition such as PC (16 : 0/18 : 1) as to the compounds that detected by 1<sup>st</sup> method.

HPLC 条件		MS 条件 (LCMS-8050)	
分析カラム	: Phenomenex Kinetex C8 (150 mm L. × 2.1 mm I.D., 2.6 μm)	イオン化法	: ESI (Positive/Negative)
移動相 A	: 20 mM ギ酸アンモニウム	ネプライズガス流量	: 3.0 L/min.
移動相 B	: アセトニトリル/イソプロパノール (1 : 1)	ドラインガス流量	: 10.0 L/min.
タイムプログラム (B %)	: 20% (0 min) → 20% (1 min) → 40% (2 min) → 92.5% (25 min) → 100% (26 min) → 100% (35 min)	ヒーティングガス	: 10.0 L/min.
流速	: 0.3 mL/min.	DL 温度	: 250 °C
注入量	: 3 μL	ヒートブロック温度	: 400 °C
カラムオープン温度	: 45 °C	インターフェース温度	: 300 °C
		CID ガス圧	: 230 kPa

マウス脳からの脂質抽出液について、LCMS-8050 システムによりリン脂質 MRM ライブラリーの 1<sup>st</sup> メソッド (リン脂質 422 成分の MRM) を用いてプロファイリングを行ったところ、130 成分のピークが検出されました。ピークの高さが 10,000 カウント以上の成分は 102 成分でした。

1<sup>st</sup> メソッドで検出されたピークについて、脂肪酸組成決定に必要な 2<sup>nd</sup> メソッドを MRM Event Link Editor により作成し、分析を行いました。MRM Event Link Editor は、例えば PC (38 : 4) から考えられる脂肪酸の組み合わせ、18 : 0/20 : 4、18 : 1/20 : 3、18 : 2/20 : 2、18 : 3/20 : 1 について、ESI ネガティブモード (ESI (-)) で予想される MRM トランジションを 867 の MRM ライブラリーから編集して作成します。また、2<sup>nd</sup> メソッドには脱離した極性基をモニターする MRM トランジション (1<sup>st</sup> メソッド) を含みます。脂肪酸組成が決まった 33 成分について、極性基

をモニターした MRM で得られたピーク面積を縦軸にとり、Fig. 3 に示しました。PC (38 : 4) について、2<sup>nd</sup> メソッドで得られた MRM クロマトグラムを Fig. 3 左下に示しました。上段の極性基 (コリン) をモニターした MRM クロマトグラムでは、15.5 分に主ピークが検出されました。下段は脂肪酸 18 : 0 (ステアリン酸) と 20 : 4 (アラキドン酸) をプロダクトイオンとする MRM クロマトグラムです。これ以外の脂肪酸の組み合わせに対応する MRM クロマトグラムでは 15.5 分にピークが検出されなかったことから、主な脂肪酸の組み合わせは 18 : 0/20 : 4 と決定することができました。

このように、LC/MS/MS MRM ライブラリー【リン脂質】を用いることで、リン脂質プロファイリングと脂肪酸組成決定を簡便に行うことができます。

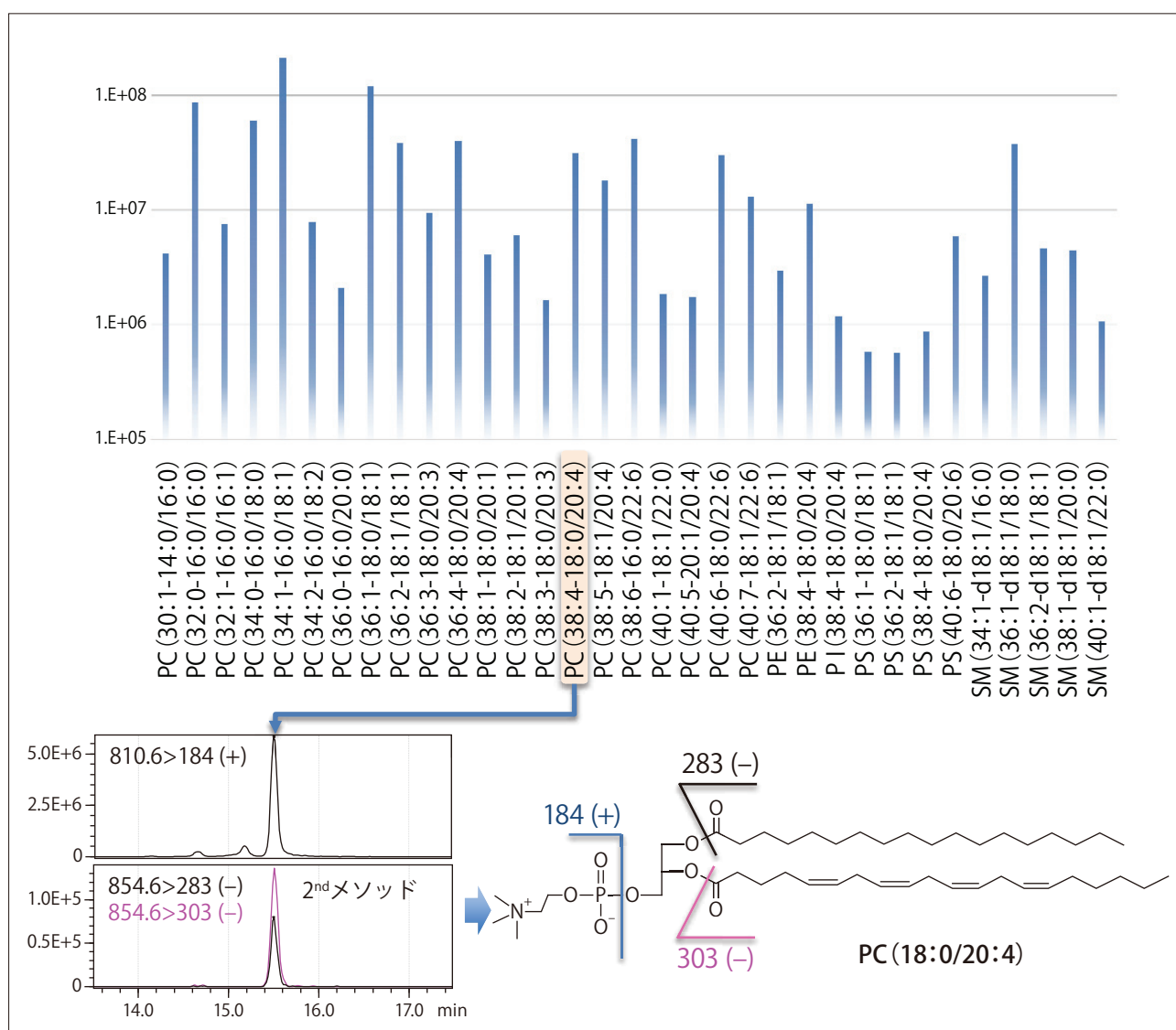


Fig. 3 マウス脳の PC のプロファイリング結果 (上図)。PC (38:4) の脂肪酸組成決定用 MRM クロマトグラム (左下) から、脂肪酸組成が 18 : 0/20 : 4 であることが明らかになった (右下)。  
A profiling result of PC for the lipid extract from a mouse brain (Upper). MRM chromatograms of PC (38 : 4) (lower, left) revealed the fatty acid composition of 18 : 0/20 : 4 (lower, right).