

Application News

No. C113

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

トリプル四重極型 LC/MS/MS によるヒト血清の脂質メディエータープロファイリング

Quantitative Profiling of Lipid Mediator Species in Human Serum Using 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、生体内で様々な生理機能を担っています。近年の質量分析装置の高感度化と高速化により、極微量の脂質メディエータープロファイリングが可能になってきました。ここでは、高感度トリプル四重極型質量分析計 LCMS-8060 による脂質メディエーターおよび代謝物の高感度一斉分析例をご紹介します。一斉分析メソッドは、「脂質メディエーターメソッドパッケージ ver.2」を用いました。Fig. 1 に、標準試料混合溶液

の一斉分析クロマトグラムを示しました。高極性代謝物からアラキドン酸のような比較的疎水性の高い成分まで広範囲な脂質メディエーター関連物質をモニターできます。LCMS-8060 と従来機である LCMS-8050 システムで得られた各成分のピーク面積を比較しました (Fig. 2)。評価した成分のうち、アラキドン酸 (AA) およびその代謝物 79 成分を表記しました。LCMS-8060 システムのほうが LCMS-8050 より平均して 3.0 倍高感度でした。 M. Yamada

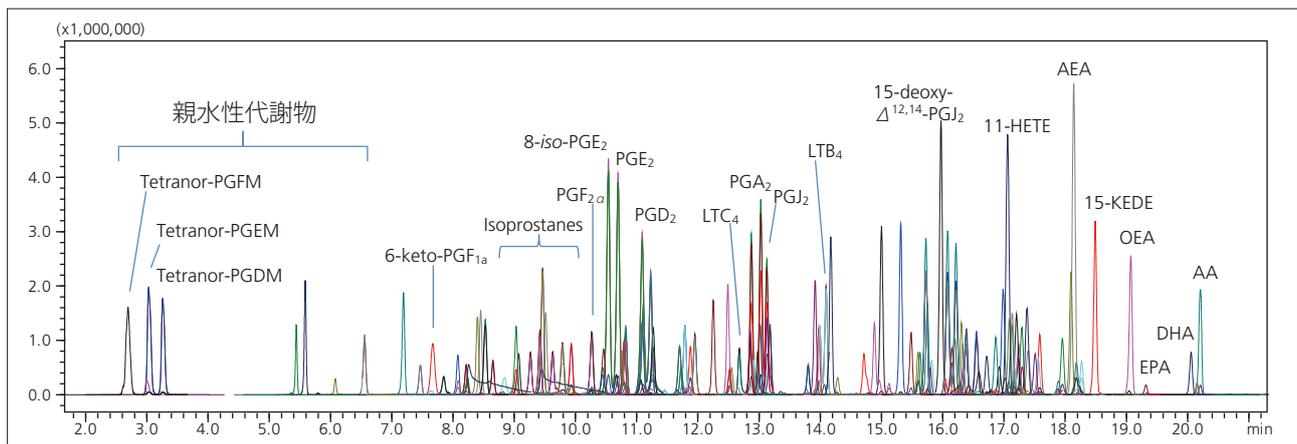


Fig. 1 標準品混合溶液の一斉分析クロマトグラム
MRM Chromatograms of Standard Mixture

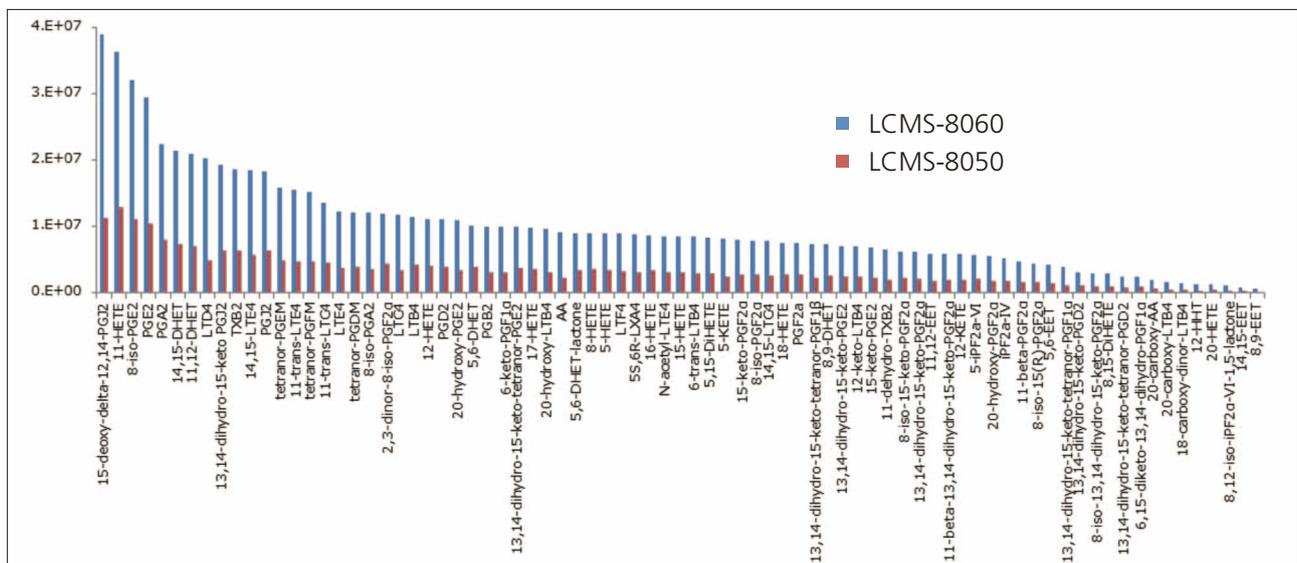


Fig. 2 LCMS-8060 と LCMS-8050 のピーク面積比較
Peak Area Comparison of Standards in LCMS-8060 and LCMS-8050

■略号 AA: arachidonic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid, AEA: arachidonylethanolamide, OEA: oleoylethanolamide, PG: prostaglandin, LT: leukotrien, TX: thromboxane, keto-eicosadienoic acid, DHET: dihydroxyeicosatrienoic acid, DiHETE: dihydroxyeicosatetraenoic acid, HETE: hydroxyeicosatetraenoic acid, EET: epoxyeicosatrienoic acid, HHT: heptadecatrienoic acid, EDE: eicosadienoic acid.

LCMS-8060 システムにより、市販のヒト血清試料中の脂質メディエーターの定量プロファイリングを行いました。血清試料約 200 μ L に内部標準試料を添加してから、メタノール抽出および固相抽出 (STARAT-X, Phenomenex) を行い、溶出液を濃縮して LCMS 分析に供しました。モニターした 158 成分のうち、85 成分検出しました。ピーク検出条件は、標準試料の保持時間と差が 1 秒以内、Signal noise 比 (S/N) が 10 以上としました。

内部標準法で定量を行った結果、アラキドン酸代謝物で最も高濃度であった 5-HETE は血清中に換算して 1 μ M であり、最も低濃度であった 12-HHT は 0.5 nM でした。また酸化ストレスマーカーと言われている 8-iso-PGF_{2 α} は 0.1 nM で

した。Fig. 3 には、5-HETE, 12-HHT および 8-iso-PGF_{2 α} の MRM クロマトグラムと、5 回繰り返し分析時の再現性 (CV) を示しました。このように、サブ nM から μ M まで幅広いダイナミックレンジの微量脂肪酸代謝物プロファイリングが得られました。20-carboxy AA のクロマトグラムを Fig. 4 に示しました。定量には S/N 比の優れる 333>297 (黒) を用い、さらに 333>289 (ピンク) を同定の確認用として用いました。標準品とヒト血清での 333>297 と 333>289 の面積比はともに約 1 : 3 と一致しました。

高速 MRM システムでは、複数の確認用 MRM をセッティングすることで確度の高い同定が行えます。

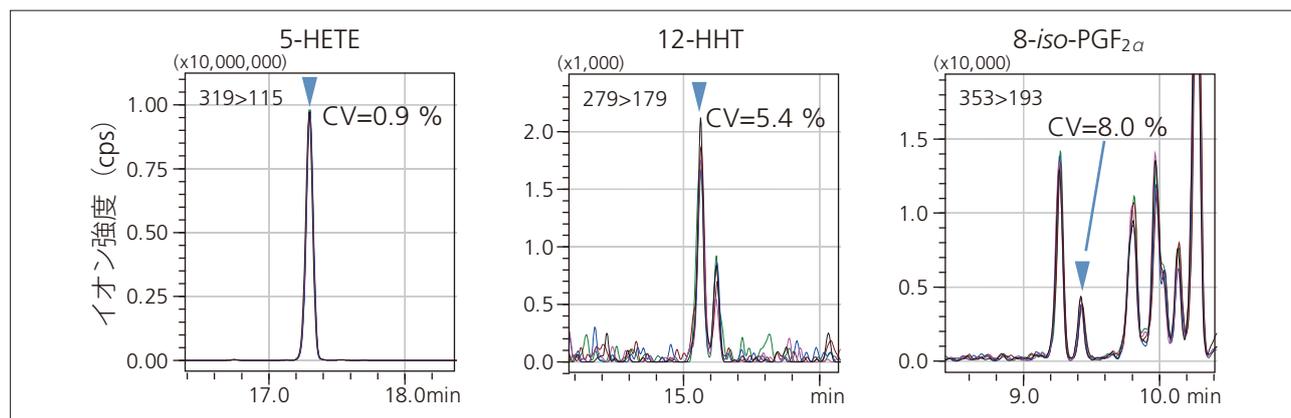


Fig. 3 5-HETE, 12-HHT と 8-iso-PGF_{2 α} の MRM クロマトグラム。▼: 帰属されたピーク。Replicate MRMs of 5-HETE, 12-HHT and 8-iso-PGF_{2 α} ▼: assigned peak

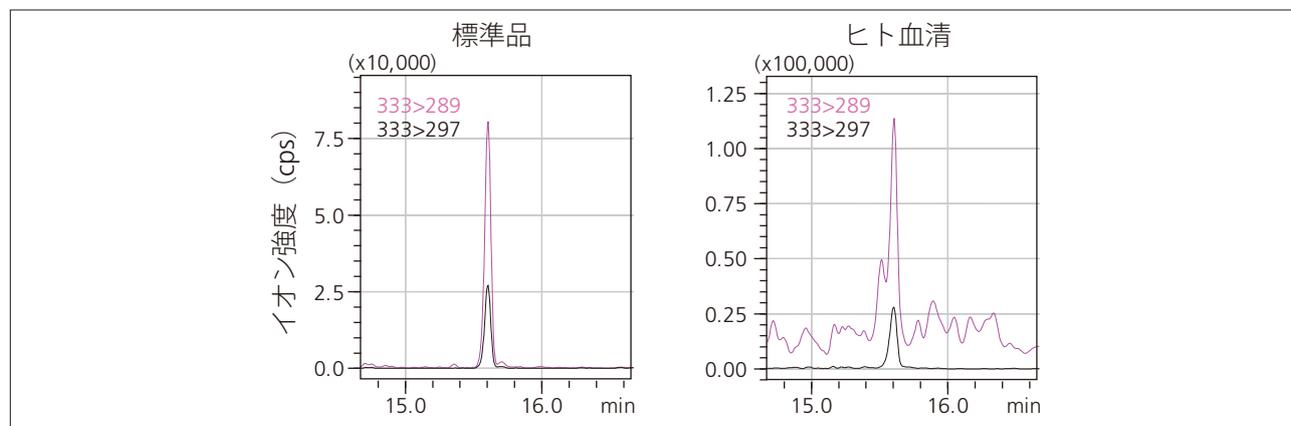


Fig. 4 20-Carboxy Arachidonic Acid の標準品とヒト血清の MRM クロマトグラム
Comparison of MRM Chromatograms of 20-Carboxy Arachidonic Acid in Standard and Human Serum

HPLC 条件

分析カラム : Phenomenex Kinetex C8 (2.1 mm I.D. × 150 mm L., 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) → 25 % B. (5.0 min) → 35 % B. (10.0 min) → 75 % B. (20.0 min)
 → 95 % B. (20.1-25.0 min)
 流速 : 0.4 mL/min.
 注入量 : 5 μ L (15 μ L 水供注入)
 カラムオープン温度 : 40 °C

MS 条件

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 °C
 ヒートブロック温度 : 400 °C
 インターフェース温度 : 300 °C
 CID ガス圧 : 230 kPa

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 : 2015年6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。