

トリプル四重極型LC/MS/MSによる血液中の 主要脂質プロファイリング法の開発

山田 真希、久保はるみ

ユーザーベネフィット

- ◆ 血中の主要脂質のプロファイリング分析が可能です。
- ◆ LCMS-8060は、ポジ/ネガ同時分析でも高品質データが得られます（極性切り替え時間；5 msec）。
- ◆ 少量のヒト血液を用いた主要脂質の脂肪酸組成解析が可能です。

■はじめに

リン脂質（PL）、トリアシルグリセロール（TG）、コレステロールエステル（CE）は、血液中の主要脂質です（図1）。これらの主要脂質の微細構造は、各種疾患との関連や病態生理学の研究において注目されています。

筆者らは既にLCMS-8060を用いた多重反応モニタリング（MRM）に基づくリン脂質プロファイリング法を開発し、報告しました（アプリケーションニュース No. C137）。

本稿では、リン脂質だけではなくCE、TG、遊離脂肪酸、コレステロールを含む血液中の主要脂質にターゲットを拡げたプロファイリング法を開発したので紹介します。本法では約360MRMトランジションを用意しました。

ヒト血液中で約100種の脂質；51成分のPL、26成分のTG、11成分のCE、CE過酸化化物、遊離脂肪酸、遊離コレステロールが同定できました。本法は、血漿や血清にも適用可能であり、各クラスの脂質の脂肪酸組成も明らかになりました。

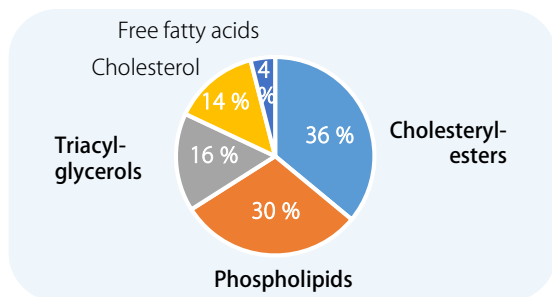


図1 血漿中の主要な脂質

■分析条件

測定機器は、Nexera UHPLCシステムとLCMS-8060（図2）を使用しました。LCMS-8060は、ポジティブ/ネガティブの極性切り替え時間5 msecの超高速四重極型質量分析計です。表1にHPLCおよびMSの分析条件を示します。

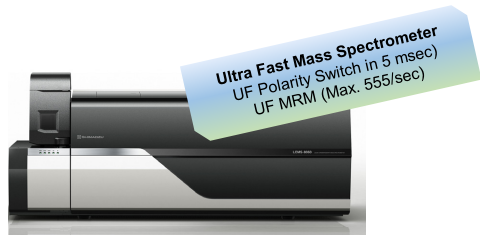


図2 LCMS-8060外観

表1 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™)	
Column	: Phenomenex Kinetex® C8 (150 mm × 2.1 mm I.D., 2.6 μm)
Column oven	: 50 °C
Solvent A	: 20 mM Ammonium formate - water
Solvent B	: Acetonitrile/2-Propanol (50/50, v/v)
Flow rate	: 0.4 mL/min
Injection volume	: 1 μL
[MS conditions] (LCMS-8060)	
Ionization	: ESI, Positive/Negative
Mode	: MRM
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250 °C
Block heater temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 150 °C
CID Gas Pressure	: 270 kPa
Dwell time/Pause time	: 3 msec./ 1 msec.

■試料の前処理

ヒト血液は、BioIVT (US) より購入しました。0.1 %ギ酸を含むメタノール500 μLを血液5 μLに加え、十分に攪拌しました。遠心分離後、上清1 μLをLC/MS/MS分析に供しました（図3）。図4にLPL（リゾリン脂質）、PL、CE、TGのMRMクロマトグラムを示します。

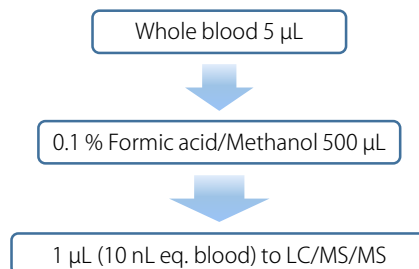


図3 試料の前処理

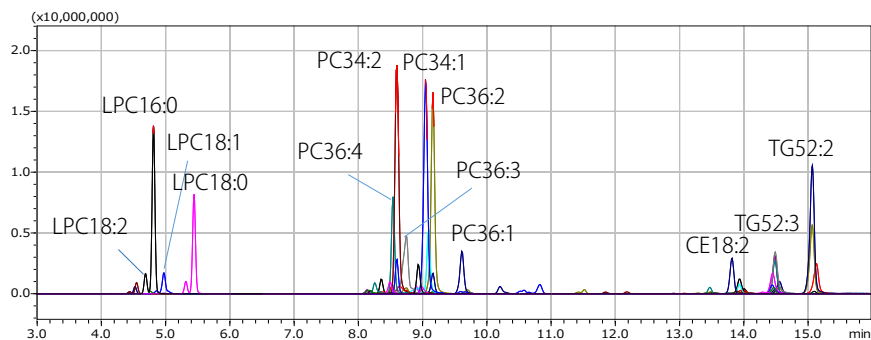


図4 LPL, PL, CE, TGのMRMクロマトグラム

■結果

筆者らが開発したMRMによるリン脂質プロファイリング法は、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) を対象とするリン脂質およびリソリン脂質に対する約2000のMRMトランジションを収載しています。PC、SM、PEおよびPSの極性基の脱離で生じるプロダクトイオンをポジティブモードで検出し、PI由来の極性基と脂肪酸由来のプロダクトイオンはネガティブモードで検出します。LCMS-8060では、ポジティブ/ネガティブの極性切り替え時間は、5 msecです。

今回開発した主要脂質プロファイリング法では、CEやTGを加え、ヒト血液で検出されるリン脂質やリソリン脂質にMRMトランジション数を絞り込みました。約360MRMトランジションが20分で検出できるように設定しました。ヒト血液抽出物を1 μL (血液10 nLに相当) 注入して分析したところ、100種以上の脂質が同定できました。そのうち51種のPLと26種のTGについては脂肪酸の組み合わせの解析が可能でした。

<リン脂質; PL>

51種のリン脂質が微量のヒト血液から検出されました。図5にPEのMRMクロマトグラムおよび帰属結果を示します。

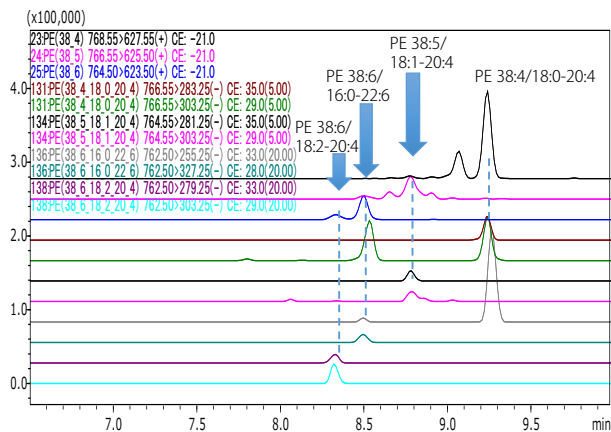


図5 PE38:4、PE38:5、PE38:6のMRMクロマトグラム

<コレステロールエステル; CE>

CEについては、ポジティブモードでm/z 369をプロダクトイオンに設定した12MRMトランジションで検出しました。CE過酸化化物もモニターしました。CEではCE18:2が最も強いピークとして検出され、CE過酸化化物はCE-OOH18:2が血液または血清サンプルで検出されました。

<トリアシルグリセロール; TG>

TGのモニタリングには、プリカーサイオンから中性分子が脱離 (ニュートラルロス) したプロダクトイオンによる90以上のMRMトランジションを設定しました。図6にTG 54:6のMRMクロマトグラムと帰属結果を示します。

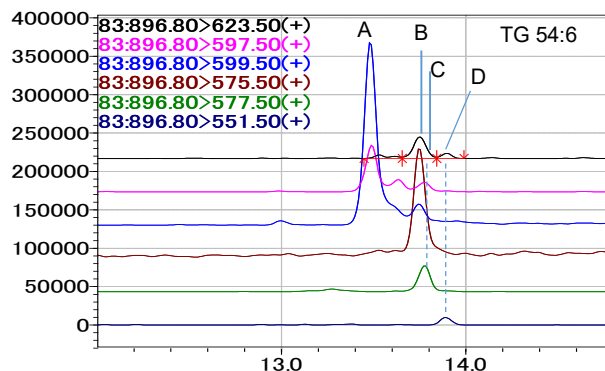


図6 TG 54:6のMRMクロマトグラム
(A)TG 18:2-18:2-18:2 (B)TG 16:0-18:2-20:4
(C)TG 16:0-18:1-20:5 (D)TG 16:0-18:0-22:6*1

*1 18:0ニュートラルロスのプロダクトイオンは未確認

■まとめ

ヒト血液中の主要な脂質のプロファイリングメソッドを開発しました。本法により、微量のヒト血液から100種以上の脂質が検出され、リン脂質およびトリアシルグリセロールの脂肪酸の組み合わせを決定することが可能でした。

Nexeraおよび LCMSは、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。KinetexはPhenomenex, Inc.の登録商標です。