

Application News

No. C182

LC-MS

トリプル四重極型 LC/MS/MS を用いた 脂質メディエーター関連物質 196 成分の 一斉分析法

はじめに

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、生体内で生産され様々な生理機能を担っています。近年の LC/MS の高速化・高感度化にともない、脂質メディエーターとその代謝物の網羅的分析手法が開発され、アレルギー性疾患や血栓症など各種疾患との因果関係が明らかにされています。

本稿では、新規開発しました高速トリプル四重極型質量分析計による脂質メディエーターとその関連物質一斉分析システム「脂質メディエーターメソッドパッケージ ver.3」と応用例について紹介します。

M. Yamada

214 成分の MRM と保持時間情報

本メソッドパッケージには、ターゲット 196 成分と内部標準 18 成分、総計 214 成分の最適化された MRM パラメータ

ーと保持時間情報が含まれます。成分の内訳を下記一覧に示しました。アラキドン酸代謝物 100 成分 (アラキドン酸を含む)、EPA 代謝物 26 成分 (EPA を含む)、DHA 代謝物 23 成分 (DHA を含む)、エタノールアミド類 11 成分、その他の脂肪酸代謝物 33 成分と、血小板活性化因子 PAF、Azelaoyl-PAF、Lyso-PAF になります。グレーで示した成分は、本メソッドパッケージ ver.3 で新たに追加した成分です。Ver.3 では確度の高いピーク同定をサポートするために、214 成分のうち 112 成分について確認用 MRM トランジション (Ch. 2) を設定しました。

保持時間補正ツールを新開発

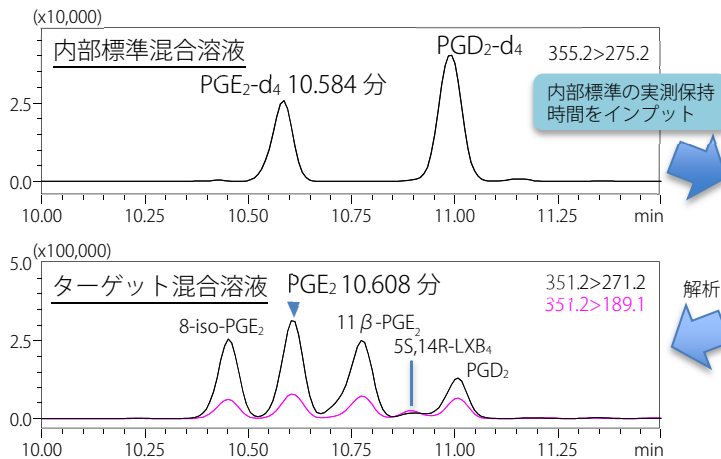
MRM で区別できない異性体は、保持時間の違いによるピーク帰属が必須です。そこで ver.3 では、予想保持時間と実測値との微細なズレを補正する「保持時間補正ツール」を用意しました。

表 1 化合物一覧 (分類略号 LA: linoleic acid, ALA: α -linolenic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid, EA: ethanolamide, ISTD: internal standard)
成分名略号 DiHOME: dihydroxyoctadecenoic acid, HODE: hydroxyoctadecadienoic acid, Hp: hydroperoxy,
KODE: keto-octadecadienoic acid, HETE: hydroxyeicosatetraenoic acid, EET: epoxyeicosatrienoic acid)

No	品名	分類	No	品名	分類	No	品名	分類			
1	(±)12,13-DiHOME	LA	55	11 β -13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin F _{2α}	AA	109	(±)5,6-DHET-lactone	AA	163	Resolvin D ₂	DHA
2	(±)9,10-DiHOME	LA	56	15-keto Prostaglandin E ₂	AA	110	5(S)-HpETE	AA	164	7(R)-Maresin 1	DHA
3	13(S)-HODE	LA	57	13,14-dihydro Prostaglandin F _{1α}	AA	111	(±)14(15)-EET	AA	165	10(S),17(S)-DiHDHA	DHA
4	9(S)-HODE	LA	58	14,15-LTC ₄ , Eoxin C ₄ , EXC ₄	AA	112	5-OxoETE	AA	166	Resolvin D ₃	DHA
5	(±)9-HpODE	LA	59	13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin F _{2α}	AA	113	(±)11(12)-EET	AA	167	7(S),17(S)-hydro-docosapentaenoic acid	DHA
6	13-OxoODE	LA	60	5(S),6(R)-Lipoxin A ₄	AA	114	(±)8(9)-EET	AA	168	(±)19(20)-DiHDPA	DHA
7	13(S)-HpODE	LA	61	13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin E ₂	AA	115	(±)5(6)-EET	AA	169	(±)20-HDHA	DHA
8	9-OxoODE	LA	62	5(S),6(S)-Lipoxin A ₄	AA	116	Arachidonic Acid (AA)	AA	170	(±)17-HDHA	DHA
9	(±)12(13)-EpOME	LA	63	14,15-LTE ₄ , Eoxin E ₄	AA	117	1 α ,1 β -dihomo-Prostaglandin F _{2α}	ADA	171	(±)13-HDHA	DHA
10	(±)9(10)-EpOME	LA	64	13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin D ₂	AA	118	2,3-dinor Thromboxane B ₂	DGLA	172	(±)13-HDHA	DHA
11	9(S)-HOTfE	ALA	65	Leukotriene C ₄	AA	119	6-keto Prostaglandin E ₁	DGLA	173	(±)10-HDHA	DHA
12	13(S)-HOTfE	ALA	66	11-trans LTC ₄	AA	120	2,3-dinor Prostaglandin E ₁	DGLA	174	(±)14-HDHA	DHA
13	13(S)-HpOTfE	ALA	67	Leukotriene D ₄	AA	121	Thromboxane B ₂	DGLA	175	(±)11-HDHA	DHA
14	11(S)-HEDE	EDA	68	Leukotriene E ₄	AA	122	8-iso Prostaglandin F _{1α}	DGLA	176	(±)7-HDHA	DHA
15	(±)15-HEDE	EDA	69	Leukotriene F ₄	AA	123	Prostaglandin F _{1α}	DGLA	177	(±)8-HDHA	DHA
16	15-OxoEDE	EDA	70	8-iso Prostaglandin A ₂	AA	124	8-iso Prostaglandin E ₁	DGLA	178	17(S)-HpDHA	DHA
17	tetranor-PGFM	AA	71	11-trans LTD ₄	AA	125	Prostaglandin E ₁	DGLA	179	(±)4-HDHA	DHA
18	tetranor-PGEM	AA	72	Prostaglandin A ₂	AA	126	Prostaglandin D ₂	DGLA	180	(±)19(20)-EpDPA	DHA
19	tetranor-PGDM	AA	73	Prostaglandin J ₂	AA	127	13,14-dihydro Prostaglandin E ₁	DGLA	181	(±)16(17)-EpDPA	DHA
20	tetranor-PGJM	AA	74	11-trans LTE ₄	AA	128	13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin D ₂	DGLA	182	Docosahexaenoic Acid (DHA)	DHA
21	tetranor-PGAM	AA	75	Prostaglandin B ₂	AA	129	8-iso Prostaglandin A ₁	DGLA	183	Prostaglandin F _{2α} , Ethanolamide	EA
22	20-hydroxy Prostaglandin F _{2α}	AA	76	8,12-iso-IPF _{2α} -VI 1,5- lactone	AA	130	Prostaglandin A ₁	DGLA	184	Prostaglandin E ₂ , Ethanolamide	EA
23	20-hydroxy Prostaglandin E ₂	AA	77	8(S),15(S)-DIHETE	AA	131	15(S)-HETE	DGLA	185	Prostaglandin E ₂ , Ethanolamide	EA
24	18-carboxy dinor LTb ₄	AA	78	6-trans LTb ₄	AA	132	8(S)-HETE	DGLA	186	Prostaglandin D ₂ , Ethanolamide	EA
25	13,14-dihydro-15-keto-tetranor Prostaglandin F _{1β}	AA	79	5(S),15(S)-DIHETE	AA	133	5(S)-HETE	DGLA	187	LTb ₄ , ethanolamide	EA
26	2,3-dinor-8-iso Prostaglandin F _{2α}	AA	80	13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin A ₂	AA	134	Δ 17-6-keto Prostaglandin F _{1α}	EPA	188	(±)14(15)-EET ethanolamide	EA
27	2,3-dinor Thromboxane B ₂	AA	81	Leukotriene B ₄	AA	135	Resolvin E ₁	EPA	189	(±)11(12)-EET ethanolamide	EA
28	13,14-dihydro-15-keto-tetranor Prostaglandin F _{1α}	AA	82	13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin J ₂	AA	136	8-iso Prostaglandin F _{1α}	EPA	190	(±)8(9)-EET ethanolamide	EA
29	2,3-dinor-11 β -Prostaglandin F _{2α}	AA	83	12-oxo LTb ₄	AA	137	Thromboxane B ₂	EPA	191	(±)5(6)-EET ethanolamide	EA
30	6-keto-Prostaglandin F _{1α}	AA	84	tetranor-12(S)-HETE	AA	138	Prostaglandin F _{1α}	EPA	192	Arachidonoyl ethanolamide	EA
31	13,14-dihydro-15-keto-tetranor Prostaglandin D ₂	AA	85	N-acetyl LTE ₄	AA	139	11-dehydro Thromboxane B ₂	EPA	193	OEA (oleoyl ethanolamide)	EA
32	20-carboxy leukotriene B ₄	AA	86	Leukotriene B ₄	AA	140	Prostaglandin E ₃	EPA	194	Lyso-PAF C-16	EA
33	20-hydroxy leukotriene B ₄	AA	87	(±)14(15)-DIHET	AA	141	Prostaglandin D ₂	EPA	195	PAF C-16	EA
34	11-dehydro-2,3-dinor Thromboxane B ₂	AA	88	12(S)-HHTrE	AA	142	Lipoxin A ₃	EPA	196	Azelaoyl PAF	EA
35	13,14-dihydro-15-keto-tetranor Prostaglandin E ₂	AA	89	(±)11(12)-DIHET	AA	143	Leukotriene B ₅	EPA	197	tetranor-PGEM-d ₄	ISTD
36	6,15-diketo-13,14-dihydro Prostaglandin F _{1α}	AA	90	(±)8(9)-DIHET	AA	144	(±)17,18-DIHETE	EPA	198	6-keto-Prostaglandin F _{1α} -d ₄	ISTD
37	iPF _{2α} -IV	AA	91	20-carboxy arachidonic acid	AA	145	(±)14(15)-DIHETE	EPA	199	Thromboxane B ₂ -d ₄	ISTD
38	8-iso-15(R)-Prostaglandin F _{2α}	AA	92	(±)5(6)-DIHET	AA	146	(±)5(6)-DIHETE	EPA	200	Prostaglandin F _{2α} -d ₄	ISTD
39	8-iso Prostaglandin F _{2α}	AA	93	19(S)-HETE	AA	147	(±)18-HEPE	EPA	201	Prostaglandin E ₂ -d ₄	ISTD
40	Thromboxane B ₂	AA	94	15-deoxy-delta12,14-PGJ ₂	AA	148	15(S)-HEPE	EPA	202	Prostaglandin D ₂ -d ₄	ISTD
41	11 β -Prostaglandin F _{2α}	AA	95	20-HETE	AA	149	11(S)-HEPE	EPA	203	Leukotriene C ₄ -d ₄	ISTD
42	(±)5-IPF _{2α} -VI	AA	96	(±)18-HETE	AA	150	8(S)-HEPE	EPA	204	Leukotriene D ₄ -d ₄	ISTD
43	8-iso-15-keto Prostaglandin F _{2α}	AA	97	(±)17-HETE	AA	151	9(S)-HEPE	EPA	205	Prostaglandin A ₂ -d ₄	ISTD
44	Prostaglandin F _{2α}	AA	98	(±)16-HETE	AA	152	12(S)-HEPE	EPA	206	Leukotriene B ₄ -d ₄	ISTD
45	8-iso-13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin F _{2α}	AA	99	15(S)-HETE	AA	153	5(S)-HEPE	EPA	207	(±)14(15)-DIHET-d ₁₁	ISTD
46	8-iso Prostaglandin E ₂	AA	100	11(S)-HETE	AA	154	15(S)-HpEPE	EPA	208	15(S)-HETE-d ₄	ISTD
47	Prostaglandin E ₂	AA	101	8(S)-HETE	AA	155	12(S)-HpEPE	EPA	209	12(S)-HETE-d ₄	ISTD
48	11-dehydro Thromboxane B ₂	AA	102	15-OxoETE	AA	156	5(S)-HpEPE	EPA	210	5(S)-HETE-d ₄	ISTD
49	15-keto Prostaglandin F _{2α}	AA	103	15(S)-HpETE	AA	157	(±)17(18)-EpETE	EPA	211	PAF C-16-d ₄	ISTD
50	11 β -Prostaglandin E ₂	AA	104	12(S)-HETE	AA	158	(±)14(15)-EpETE	EPA	212	(±)11(12)-EET-d ₁₁	ISTD
51	5(S),14(R)-LXB ₄	AA	105	(±)9-HETE	AA	159	Eicosapentaenoic Acid(EPA)	EPA	213	Oleoyl ethanolamide-d ₄	ISTD
52	Prostaglandin K ₂	AA	106	5(S)-HETE	AA	160	Resolvin D ₃	DHA	214	AA-d ₄	ISTD
53	Prostaglandin D ₂	AA	107	12(S)-HpETE	AA	161	Resolvin D ₂	DHA			
54	15-keto Prostaglandin F _{1α}	AA	108	12-OxoETE	AA	162	Resolvin D ₁	DHA			

■新開発ツールによる予想保持時間の補正

本パッケージでは、ターゲット 196 成分を内部標準 18 成分でグループ分けしました。内部標準混合溶液を実際に分析し、保持時間の実測値を保持時間補正ツールにインプットすることで、全 214 成分の予想保持時間の補正値が算出されます。内部標準混合溶液を分析した際の PGE₂-d₄ の MRM クロマトグラムを図 1 左上に示しました。PGE₂ の予想保持時間は 10.700 分（登録情報）としていますが、PGE₂-d₄ の実測値 10.584 分を保持時間補正ツールにインプットしますと、10.613 分に補正されました。同じバッチ分析内で取得したターゲット成分混合溶液における PGE₂ の MRM クロマトグラムを図 1 左下に示しました。PGE₂ の実測の保持時間は 10.608 分であり、保持時間補正ツールでの補正値に対して僅か 0.005 分=0.3 秒の誤差でした。このように、内部標準混合溶



液の分析と保持時間補正ツールを使うことでターゲット 196 成分の精度の高いピーク帰属が可能となります。

■ヒト血しょう分析例

上記で示した例と同じバッチ分析内で、血しょう試料を分析しました。市販のヒト血しょう 30 μL を固相抽出により精製し、5 μL 相当を LCMS-8060 で分析しました。同定された 66 成分のピーク強度を図 2 に示しました。ピーク同定における予想保持時間からの誤差許容幅は 0.05 分（3 秒）としました。Lyso-PAF はピーク強度が飽和したので図から除外しました。このように、微量の血しょう・血清試料から多くの脂質メディエーター代謝物を精密に同定し、定量的に解析できました。

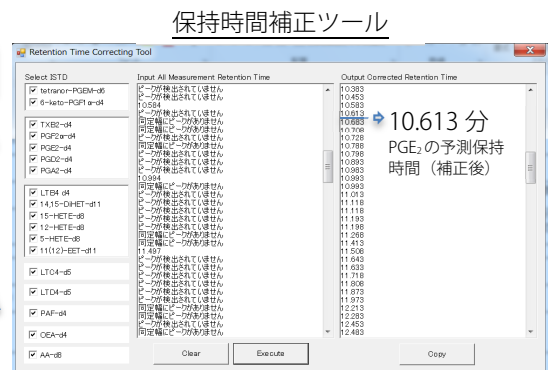


図 1 内部標準混合溶液の分析した際の PGE₂-d₄ の MRM クロマトグラム（左上）と保持時間補正ツールで予想保持時間を補正した際の GUI（右）、および、ターゲット混合溶液の分析で得られた PGE₂ の MRM クロマトグラム（左下）。

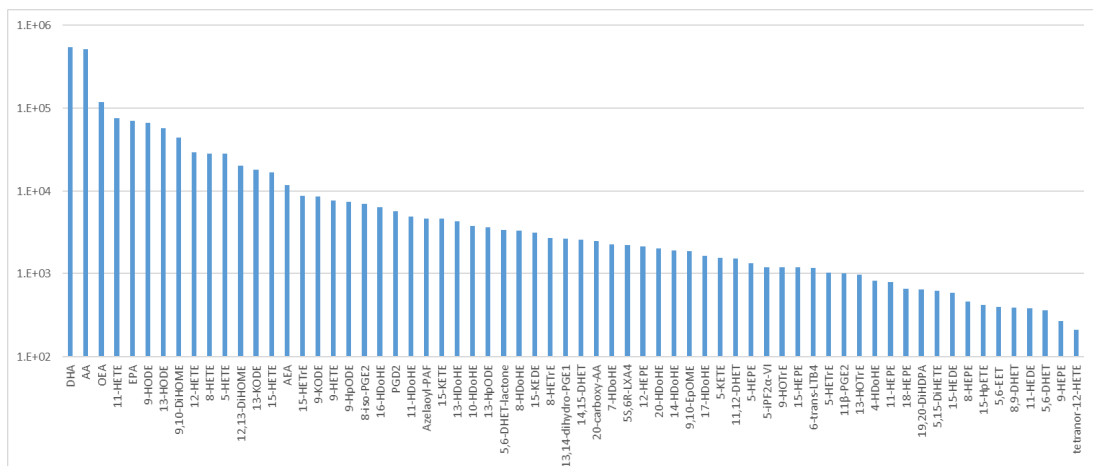


図 2 市販ヒト血しょうから LCMS-8060 による分析で得られたターゲット 66 成分のピーク強度（高さ）

HPLC 条件

分析カラム : Phenomenex Kinetex® C8 (2.1 mmI.D.×150 mmL, 2.6 μm)
 移動相 A : 0.1 % 酢酸 / 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 μL
 カラムオープン温度 : 40 °C

MS 条件 (LCMS™-8060)

イオン化法 : ESI (Positive/Negative)
 ネブライズガス流量 : 2.5 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 : 270 °C
 CID ガス圧 : 230 kPa

謝辞 脂質メディエーターメソッドパッケージ Ver.3 の開発には、小野薬品工業株式会社様にご協力頂きました。

注) 本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認を受けておりません。研究用途としてのみご利用頂けます。

LCMS は、株式会社 島津製作所の商標です。
 Kinetex は、Phenomenex, Inc. の登録商標です。

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：2019年2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。