



A high throughput and exhaustive analysis of diverse lipids by using supercritical fluid chromatography-mass spectrometry for metabolomics

超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析による多様な脂質のハイスループット網羅的分析

(JBB, Vol.105, No.5, 460-469, 2008)

馬場 健史^{1,2*}・下西 成人²・松原 惇起^{1,2}・平田 収正¹
中澤 慶久³・小林 昭雄²・福崎 英一郎²

メタボロミクスにおいては、一般的に各代謝経路の構成成分である親水性の低分子代謝物が解析のターゲットになっているが、近年の研究で脂質がシグナル伝達に関与していることが明らかにされ、脂質も解析の対象にされるようになってきた。脂質の化学構造は比較的単純であるが、含有脂肪酸の多様性や構造異性体などを考慮に入れると10の3乗オーダーの種類が存在する。また、一般的に疎水性化合物とされているが、リン酸、糖などの極性の高い分子種が結合することによって極性が増加し、結果として脂質全体としては幅広い極性を示すことになる。それぞれの脂質を分離同定するためには高度な分離分析技術を必要とする。そこで、著者らは、新たな脂質の分離系として超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析(SFC/MS)に注目しその適用を試みた。

SFC/MS分析系の構築で最も苦労したのが、質量分析計との接続であった。SFCから質量分析計へは、T型コネクターによりスプリットされた一部が導入されるが、その流量はSFCの操作圧力、流量、接続配管の内径、長さなどさまざまな因子によって変動するため、その調節は非常に難しい。安定したイオン化のための種々の条件検討にかなりの時間を要した。イオン化には、SFC/MSにおいて一般的に用いられる大気化学イオン化法の代わりに、極性化合物にも対応可能なエレクトロスプレーイオン化法(electrospray ionization, ESI)の適用を試みた。イオン化条件の最適化により、各種リン脂質、糖脂質、スフィンゴ脂質の良好なイオン化が観測され、グリセリドのような非極性脂質についても十分な感度が得られた。また、モディファイヤーにギ酸アンモニウムを添加することにより、メタノールのみでは検出されなかったホスファチジルイノシトール(phosphatidylinositol, PI)の検出に成功し、また、ホスファチジルコリン(phosphatidylcholine, PC)の感度も約390倍上昇した。その他、カラムや分離条件など種々の分析条件の検討を重ね、各種リン脂質、糖脂質、中性脂質、スフィンゴ脂質混合物の一斉分析系の構築に成功した。分離カラム

ムとしてシアノカラムを用いたときに、すべての脂質が検出され、LC/MS分析系と比べてクラスごとの分離が良好であった。また、分析時間が10分余りと短く、さらに次の分析に移るまでに必要な平衡化の時間も約1分程度と非常に短時間であった。ほとんどの脂質は、ポジティブイオンモードにおいてプロトン付加分子、または、アンモニウムイオン付加分子として検出された。特に、中性脂質(triacylglycerol, TG; diacylglycerol, DG)は正イオンのみ検出された。一方、ホスファチジン酸(phosphatidic acid, PA)とPIについては、脱プロトン分子やギ酸イオン付加分子が検出されるネガティブイオンモードのほうが強く検出された。また、ODSカラムを用いた場合には、シアノカラムに比べて分子種ごとの分離能が高く、当該条件においては特にTGにおいて構成脂肪酸の鎖長の違いによる分離が認められた。以上の結果から、全脂質の網羅的な解析にはシアノカラムを、構成脂肪酸などの分子種の詳細な解析が必要な場合にはODSカラムを使用するといったように、目的に応じてカラムを使い分けることによりSFCの特徴を生かした効果的な解析ができることがわかった。

当該研究ではシングル四重極型の質量分析計を用いたが、MS/MS分析が可能な質量分析計を接続することにより、プリカーサーイオンキャンやニュートラルロスキャンを用いたフラグメントイオン解析による詳細な構造解析も可能になる。さらに、超臨界流体抽出(supercritical fluid extraction, SFE)とSFCをオンラインで接続したシステムを構築することにより、一般的な溶媒抽出では酸化などの変性を受けやすい不安定な代謝物の解析にも対応することが可能である。今後、さらに超臨界流体の代謝物分析における適用技術の開発が進み、脂質以外の代謝物においてもその有用性が示されることにより、メタボロミクスにおけるキーテクノロジーとして医学、薬学、工学、生物学のなどあらゆる分野で利用されるようになることを期待する。

* 著者紹介 ¹ 大阪大学大学院薬学研究科、現：² 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻(准教授)
E-mail: bamba@bio.eng.osaka-u.ac.jp
³ 日人造船株式会社