

Development of a high sensitive simultaneous analysis method for eicosanoids using LC-MS/MS by derivatization of carboxylic group



尾崎博道、石田和也、山中秀徳、武吉正博（一般財団法人化学物質評価研究機構（CERI））

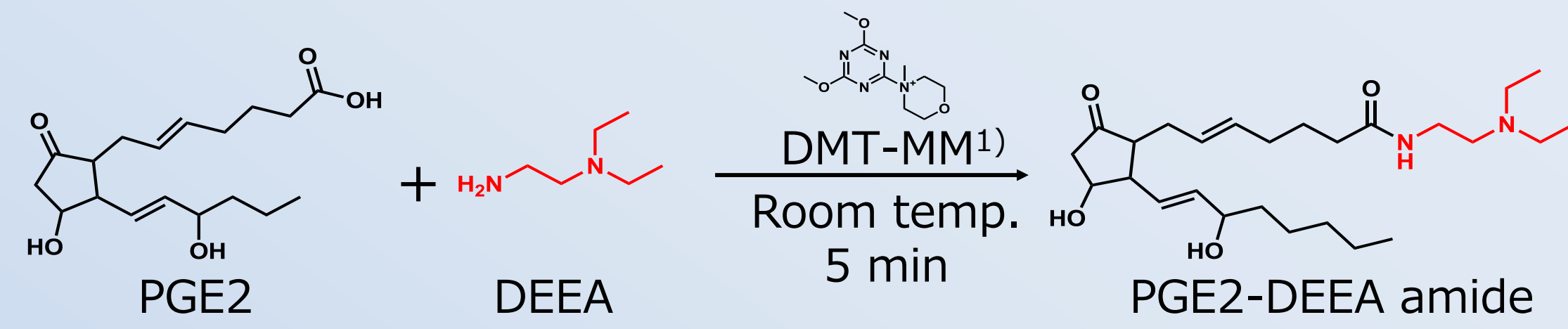
Hirromichi Ozaki, Kazuya Ishida, Hidenori Yamanaka and Masahiro Takeyoshi (Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan; CERI)

背景/目的

- エイコサノイドは炎症及び抗炎症作用にかかわる脂質メディエーターとして多彩且つ強力な生理活性を有し、疾患メカニズム解析や薬効、毒性評価のための測定対象とされている
- 構造中にカルボン酸を有するため、選択性が高いLC-MS/MSを使用する場合でも比較的感度が低いNegativeモードでの測定が一般的
- 少量サンプルからの高感度一斉分析手法の開発が重要な課題
- カルボン酸をアミドに誘導体化し、Positiveモードでの測定を可能にすることで高感度化を行い、少量サンプルでエイコサノイドを一斉分析する手法の開発を行った

方法

誘導体化反応



1) Kunishima, M., et al., Tetrahedron, 57, 1551(2001).

分析条件

LC条件: ACQUITY UPLC I-Class (Waters)

カラム	L-column2 ODS Metal-free (2×150 mm, 2 μm, CERI)
溶離液A	1 mM ぎ酸アンモニウム/ぎ酸 (5000/1 v/v)
溶離液B	アセトニトリル(ACN)
流量	0.4 mL/min
カラム温度	40℃
注入量	10 μL

MS条件: Xevo TQ-S (Waters)

イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI法)
測定モード	Scheduled MRM (Positive)

MRM条件 (47物質)

物質	Pre.	Pro.	物質	Pre.	Pro.	物質	Pre.	Pro.	物質	Pre.	Pro.
2,3-dinor-8-iso-PGF2α	425	334	LTD4	595	417	HXA3	435	344	12-HPETE	417	344
6-keto-PGF1α	469	154	LTC4	363	209	19-HETE	419	346	9-HETE	419	328
6-keto-PGE1	467	376	LTF4	334	209	20-HETE	419	346	12-oxoETE	417	344
20-OH-LTB4	451	105	LTE4	538	417	15-deoxy-δ-12,14-PGJ2	415	342	5-HETE	419	328
TXB2	469	334	PGA2/PGJ2	433	342	5,6-DHET	437	364	5-HPETE	435	86
PGF2α	453	318	δ-12-PGJ2	433	342	16-HETE	419	328	14,15-EET	419	346
PGE2	451	360	PGB2	433	342	15-HETE	419	328	5-oxoETE	417	344
11-dehydro-TXB2	467	394	LTB4	435	105	15-HPETE	435	347	11,12-EET	419	346
15-keto-PGF2α	451	378	12-keto-LTB4	433	342	11-HETE	419	328	8,9-EET	419	346
LXB4	451	397	14,15-DHET	437	364	15-oxoETE	417	344	5,6-EET	419	346
PGD2	451	342	11,12-DHET	437	364	12-HETE	419	328	15oxoPGE2	449	376
LXA4	451	126	8,9-DHET	437	346	8-HETE	419	328			

Pre.: Precursor ion (m/z), Pro.: Product ion (m/z)

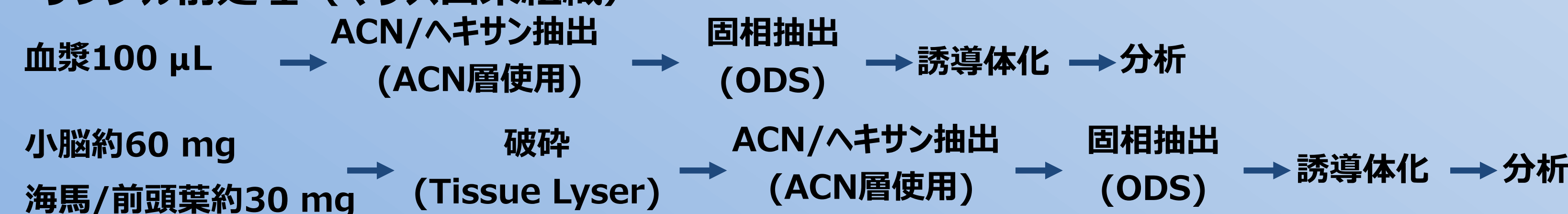
定量性確認

- ・ 使用物質: PGE2
- ・ 濃度: 5, 10, 100, 1,000 pg/mL

安定性確認

- ・ 使用物質: PGE2-d4 (250 pg/mL)
- ・ 確認方法: 誘導体化後100時間の間に同一サンプルを10回分析し、%RSDを算出

サンプル前処理 (マウス由来組織)



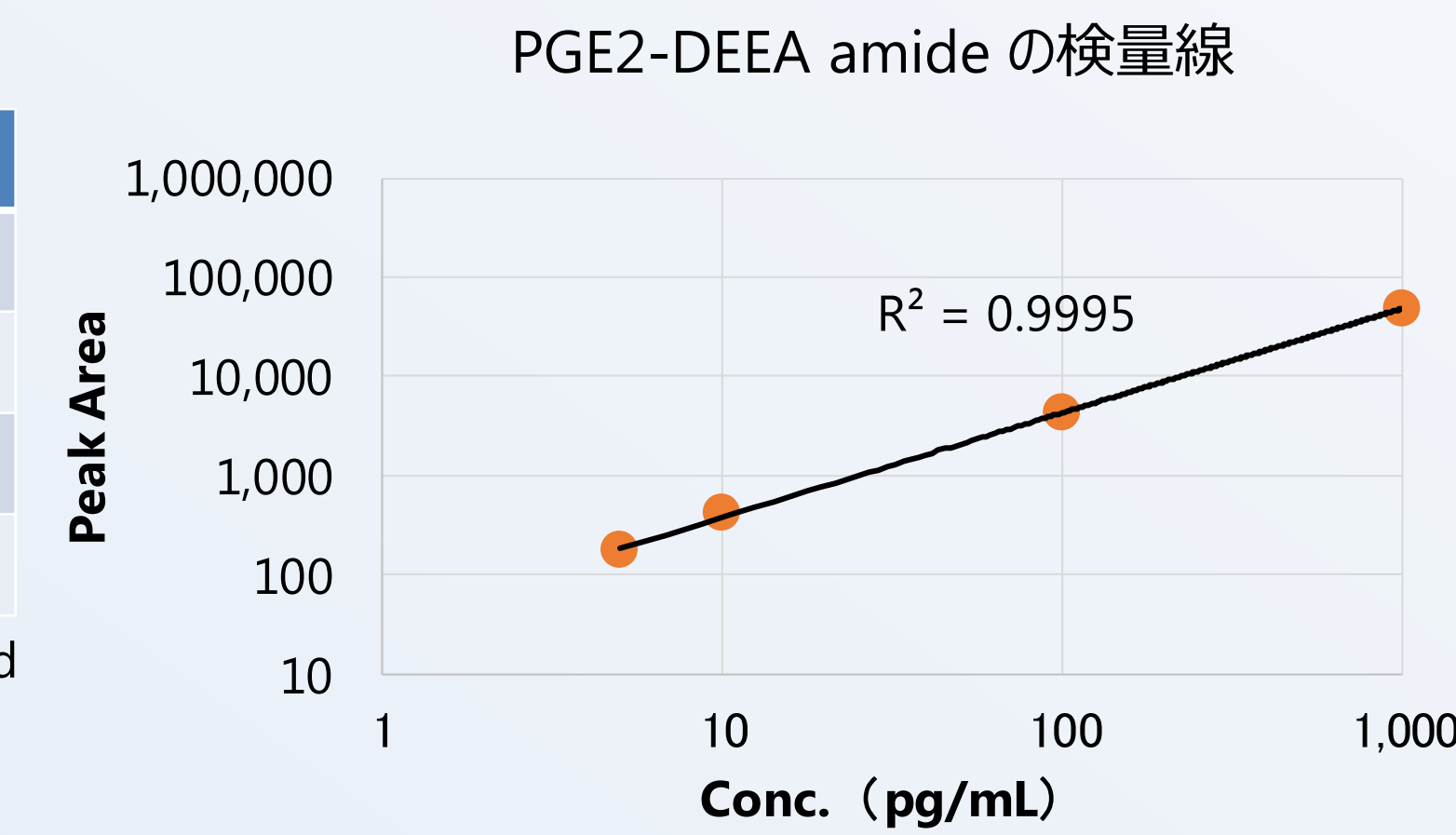
結果

定量性

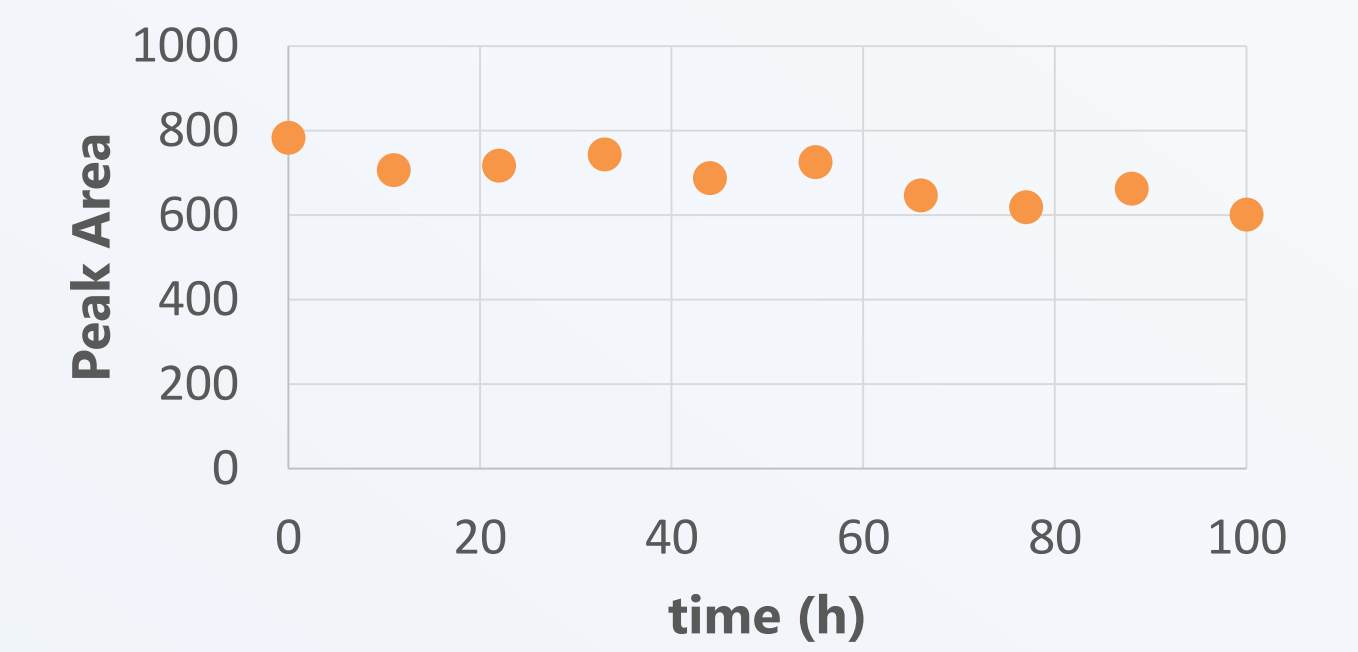
ピーク面積値

Conc. (pg/mL)	PGE2	PGE2-DEEA amide
5	n.d.	174
10	n.d.	411
100	54	4,259
1,000	522	48,666

n.d.: not detected



安定性



100時間までの10回分析再現性(%RSD): 8.3%

生体サンプルの分析 (例: マウス由来組織)

血漿: [pg/mL], 組織: [pg/mg]

物質	血漿	小脳	海馬	前頭葉	物質	血漿	小脳	海馬	前頭葉
2,3-dinor-8-iso-PGF2α	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	HXA3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6-keto-PGF1α	39.9	0.5	0.5	0.3	19-HETE	119.2	0.3	0.1	0.2
6-keto-PGE1	n.d.	0.02	0.04	0.02	20-HETE	66.0	0.4	0.2	0.4
20-OH-LTB4	22.9	n.d.	n.d.	n.d.	15-deoxy-δ-12,14-PGJ2	358.6	0.3	0.5	0.7
TXB2	n.d.	1.9	4.2	3.8	5,6-DHET	85.6	0.02	0.03	0.03
PGF2α	29.2	22.5	27.8	22.6	16-HETE	28.8	0.06	0.1	0.09
PGE2	112.8	8.2	5.9	6.8	15-HETE	38.7	3.6	6.6	5.7
11-dehydro-TXB2	n.d.	0.01	0.04	0.04	15-HPETE	23.3	4.7	16.6	20.6
15-keto-PGF2α	16.8	0.2	0.4	0.4	11-HETE	227.5	4.5	9.1	7.2
LXB4	12.4	0.005	n.d.	n.d.	15-oxoETE	11.2	0.2	0.2	0.3
PGD2	102.0	3.8	4.2	4.7	12-HETE	1289.7	25.2	23.9	23.4
LXA4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8-HETE	139.9	0.3	0.3	0.4
LTD4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12-HPETE	n.d.	0.7	0.7	0.8
LTC4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9-HETE	53.1	0.2	0.4	0.4
LTF4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12-oxoETE	287.6	0.6	0.5	0.6
LTE4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5-HETE	244.9	0.4	0.9	1.1
PGA2/PGJ2	n.d.	1.0	1.1	1.3	5-HPETE	28.1	3.6	11.1	15.2
δ-12-PGJ2	n.d.	0.4	0.6	0.8	14,15-EET	55.4	0.07	0.1	0.1
PGB2	n.d.	0.4	0.4	0.5	5-oxoETE	27.0	0.1	0.2	0.3
LTB4	n.d.	0.02	0.02	0.02	11,12-EET	73.9	0.7	0.6	0.8
12-keto-LTB4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8,9-EET	39.4	n.d.	n.d.	n.d.
14,15-DHET	86.7	0.1	0.08	0.1	5,6-EET	174.0	0.4	0.6	0.8
11,12-DHET	37.6	0.06	0.05	0.06	15oxoPGE2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8,9-DHET	42.5	0.03	0.04	0.04					

n.d.: not detected

まとめ

- 縮合剤としてDMT-MMを使用することで、サンプル中に水が残っている状態でもエイコサノイドのカルボン酸のアミド化が可能となった。
- エイコサノイドをアミド化することでPositiveイオンモードでの測定が可能となり、PGE2では検出感度が約100倍程度向上し、定量性、再現性も良好であることが確認された。
- マウス由来組織での実施例では血漿100 μL、脳組織30 mg程度の少量サンプルからエイコサノイドの多成分一斉分析が可能であった。
- 少量サンプルからのエイコサノイドの一斉分析が可能となったことで、今後血中エイコサノイドの経時的な一斉解析等への応用が期待される。