アプリケーションノート

臨床研究

Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムによる血漿中のコレステロールと関連ステロールの LC/MS/MS 分離

著者

Rongjie Fu and Zhiming Zhang
Agilent Technologies (Shanghai) Co. Ltd.

Zhihui Lin, Winnie Hunag, and Jimmy Chan
Agilent Technologies (China) Co. Ltd.

Adam Bivens
Agilent Technologies, Inc.

概要

コレステロールとその代謝物、ならびに複数の植物ステロールを、Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムと LC/MS/MS を用いて分離します。このアプリケーションノートでは、12 種類のステロールの分離について、InfinityLab Poroshell 120 の EC-C18 と SB-C18 の 2 つの相を比較します。InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムの方が、これらのステロールで優れた選択性と分離能を得られます。また、InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 については、2 つの異なるサイズの粒子も比較します。小さい粒子サイズのものは分離能がより優れ、特にラトステロールやコレステロールなどの近接して溶出する異性体に適しています。APCI の LC/MS/MS では、高い分析感度が得られます。

はじめに

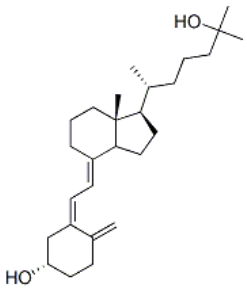
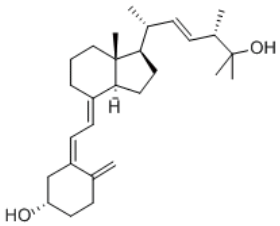
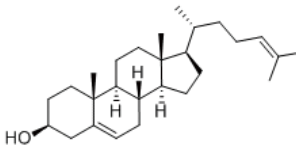
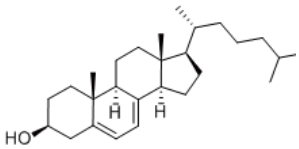
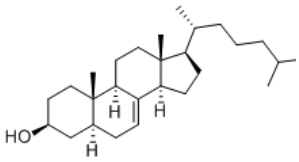
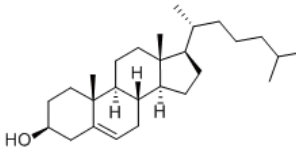
コレステロール、β-シトステロール、デスモステロール、ラトステロールなどのコレステロールと、これらに関連する化合物は、GC と LC によって分析できます。HPLC は、ステロールの分析に広く用いられており、定量分析用トリプル四重極質量分析装置と組み合わせることで、感度と選択性を強化できます。同様に、イオン化および質量分析システムへのイオン移送の向上により、生体マトリックス中の微量の代謝物を測定する能力を強化できます。

LC を用いたステロールの検出では、MS、UV、蒸発光散乱検出器 (ELSD) が使用されます。検出器は、分離に必要な感度に応じて選択します。LC/MS/MS では非常に高い感度を得られます。Agilent 6460A トリプル四重極 LC/MS による MS と、ポジティブイオンモードでの大気圧化学イオン化 (APCI) を用いて、表 1 のステロール類を分離するメソッドを開発しました。ステロール化合物はその性質上、非極性であり、APCI がイオン源の最適な選択肢となります。これは、ポジティブモードの APCI により、誘導体化を行わずにこれらの化合物で良好な感度を得られるためです。

多くのステロールは位置異性体であり、MS では同重体化合物間を識別することができないため、この分析ではクロマトグラフィー分離能が重要となります。ラトステロールとコレステロールは、クロマトグラフィー分離が困難で同重体であるという 2 つの理由から、最も分析困難な化合物です。血漿サンプルにおいてコレステロールはラトステロールよりもはるかに高い濃度で存在するため、分析がさらに困難となります。

このメソッドで用いた InfinityLab Poroshell 120 カラムは、全多孔質粒子よりも低い背圧で、より高い効率とスループットを実現します。1.9 µm InfinityLab Poroshell 120 カラムは、きわめて高い効率を提供します。2.7 µm InfinityLab Poroshell 120 カラムは、背圧が 600 bar を下回り、堅牢性に優れ、2 µm フリットによって、血漿などの汚れたサンプルが詰まりにくい設計となっています。

表 1. 分析対象化合物

No.	化合物	分子量 (g/mol)	CAS No.	構造
1	25-ヒドロキシビタミン D3 (カルシフェジオール)	400.64	63283-36-3	
2	25-ヒドロキシビタミン D2	412.65	21343-40-8	
3	デスモステロール	384.64	313-04-2	
4	7-デヒドロコレステロール (プロビタミン D3)	384.64	434-16-2	
5	ラトステロール	386.65	80-99-9	
6	コレステロール	386.65	57-88-5	

実験方法

試薬および調製

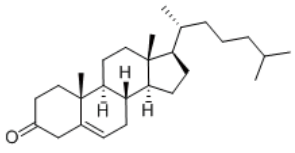
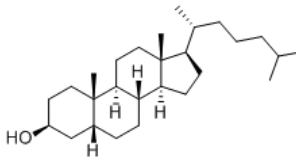
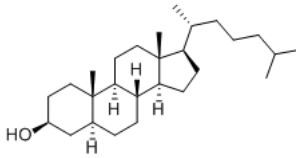
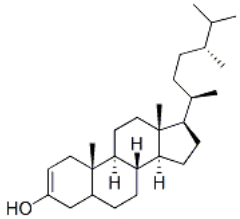
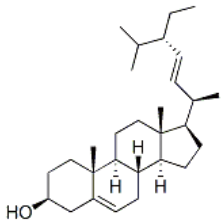
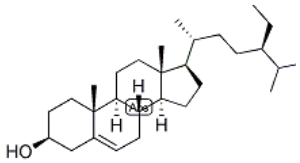
試薬はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。HPLC グレードのアセトニトリルとメタノールは J. T. Baker (センターバレー、ペンシルバニア州、米国) から購入しました。水は、ELGA PURELAB Chorus システム (ハイ・ウィカム、英国) を使用して精製しました。標準は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。

器具および消耗品

- カラム入口: Agilent InfinityLab クイックコネクト LC フィッティング (p/n 5067-5965)
- カラム出口: Agilent InfinityLab クイックターン LC フィッティング (p/n 5067-5966)
- Agilent Captiva エコノフィルタ、PTFE メンブレン、直径 13 mm、ポアサイズ 0.2 µm (p/n 5190-5265)
- バイアル、スクリュートップ、茶色、ラベル付、認定、2 mL (p/n 5182-0716)
- Agilent 圧着スクリューキャップ、圧着、青、PTFE/赤シリコンセプタム (p/n 5190–7024)
- Agilent InfinityLab 溶媒ボトル、茶色、1,000 mL (p/n 9301-6526)
- Agilent InfinityLab セーフティキャップ、GL45、3 ポート、ベントバルブ x 1 (p/n 5043-1219)
- エッペンドルフピペットおよびリピーター
- 超音波洗浄器 (VWR、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)

装置構成

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラ (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)

No.	化合物	分子量 (g/mol)	CAS No.	構造
7	5-コレステン-3-オン	384.64	601-54-7	
8	コプロスタノール	388.67	360-68-9	
9	コレスタノール	388.67	80-97-7	
10	カンペステロール	400.68	474-62-4	
11	スチグマステロール	412.69	83-48-7	
12	シトステロール	414.71	64997-52-0	

- Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS (G6460A)

ソフトウェア

- Agilent MassHunter LC/MS データ取り込みソフトウェア、バージョン B.08.00
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェア、バージョン B.07.00

HPLC	
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 100 mm、2.7 µm (p/n 695975-302) Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18、3.0 × 100 mm、2.7 µm (p/n 685975-302) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 100 mm、1.9 µm (p/n 695675-302)
移動相 A	水
移動相 B	メタノール
グラジエント	0 ～ 10 分: 92 ～ 96 % B 10 ～ 12 分: 96 % B 12 ～ 16 分: 96 ～ 100 % B、 ストップタイム: 20 分、 ポストタイム: 2 分
流量	0.60 mL/min
カラム温度	15 ° C
注入量	20 µL

MS 条件	
イオンモード	APCI、ポジティブ
ドライガス温度	325 ° C
ベーポライザ	350 ° C
ドライガス流量	4 L/min
ネブライザ圧力	30 psi
キャピラリー電圧 (+)	2,000 V
MRM 条件	ΔEMV、500

表 2. APCI 取り込みパラメータおよびトランジション

化合物	プリカーサイオン (*m/z*)	プロダクトイオン (*m/z*)	ドウェル	フラグメンタ電圧	コリジョンエネルギー	セル加速電圧	極性
プロビタミン D3	367.3	159.2	18	130	13	4	ポジティブ
プロビタミン D3	367.3	145.1	18	130	17	4	ポジティブ
デスモステロール	367.3	95	18	100	22	4	ポジティブ
デスモステロール	367.3	161.1	18	100	17	4	ポジティブ
コレステロール	369.4	161.2	18	166	10	4	ポジティブ
コレステロール	369.4	95.2	18	166	38	4	ポジティブ
ラトステロール	369.4	95.1	18	112	29	4	ポジティブ
ラトステロール	369.4	81.1	18	112	40	4	ポジティブ
コプロスタノール	371.4	221.2	18	140	21	4	ポジティブ
コプロスタノール	371.4	95.1	18	140	21	4	ポジティブ
コレスタノール	371.4	149	18	150	15	4	ポジティブ
コレスタノール	371.4	95	18	150	30	4	ポジティブ
カルシフェジオール	383.3	211.2	18	144	25	4	ポジティブ
カルシフェジオール	383.3	107.1	18	144	25	4	ポジティブ
カンペステロール	383.4	161.2	18	142	16	4	ポジティブ
カンペステロール	383.4	95	18	142	30	4	ポジティブ
5-コレステン-3-オン	385.4	109.1	18	128	40	4	ポジティブ
5-コレステン-3-オン	385.4	97	18	128	21	4	ポジティブ
25-ヒドロキシビタミン D2	395.3	377.4	18	166	9	4	ポジティブ
25-ヒドロキシビタミン D2	395.3	269.2	18	166	9	4	ポジティブ
スチグマステロール	395.4	83.1	18	148	17	4	ポジティブ
スチグマステロール	395.4	81.1	18	148	37	4	ポジティブ
シトステロール	397.4	161	18	125	18	4	ポジティブ
シトステロール	397.4	135.2	18	125	12	4	ポジティブ

結果と考察

合計 12 種類のステロールを、InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 および SB-C18 カラムで LC-MS/MS を用いて分離しました。より適切な分離能を得るために、分離には水/メタノールのグラジエント移動相を 15 °C という低温で使用しました。アセトニトリル移動相を用いた以前の実験では、重要なペアを容易に分離できましたが、APCI シグナルが大きく抑制されました。図 1 の上段と中段のクロマトグラムは、EC-C18 と SB-C18 の結合相で選択性が異なることを示しています。分離困難な同重体化合物のラトステロール (ピーク 5) とコレステロール (ピーク 6) は、InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムでは分離されましたが、InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 カラムでは分離されませんでした。下段のクロマトグラムは、1.9 µm InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムでの分析結果です。ラトステロールやコレステロールなど複数の異性体について、優れた分離能が得られました。

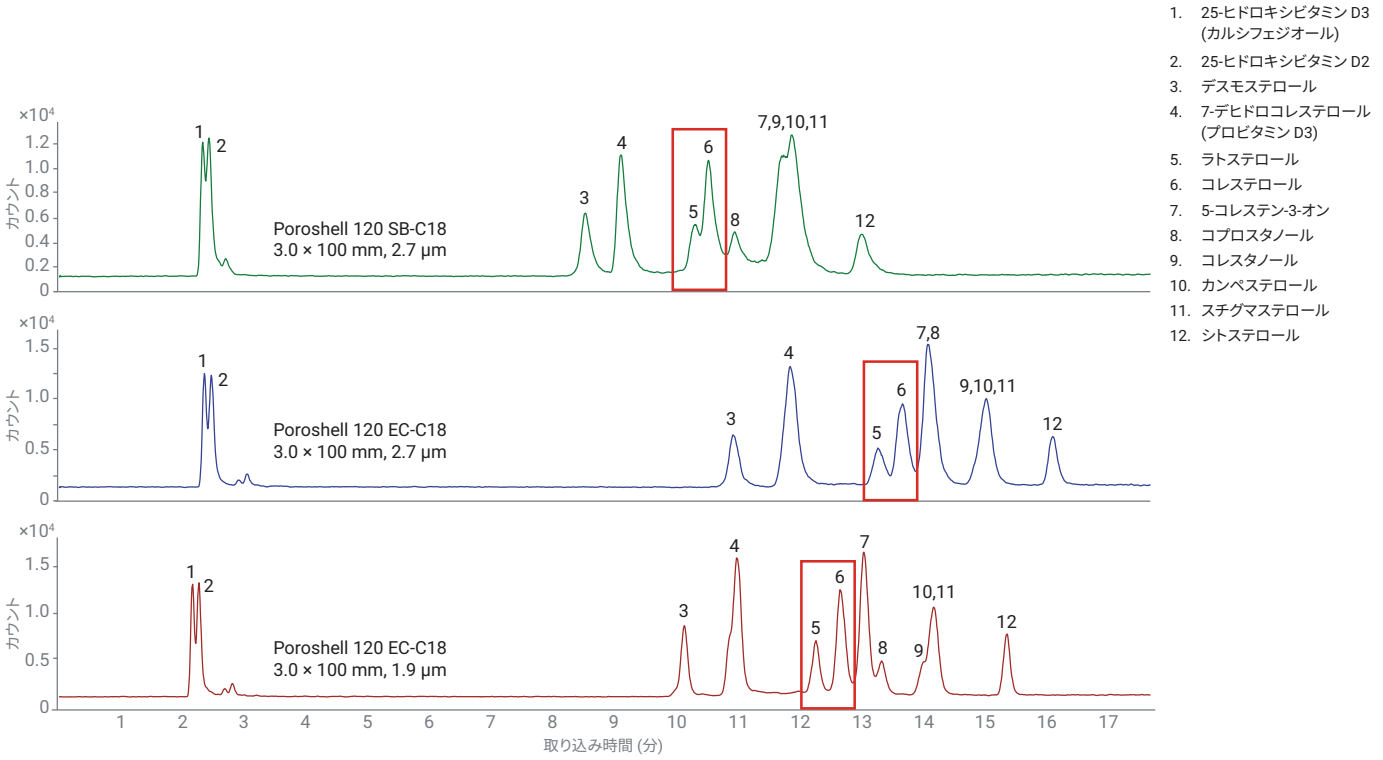


図 1. InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 および EC-C18 相での 12 種類のステロールの TIC クロマトグラム

分析感度をさらに高めるために、キャピラリー電圧、ガス流量、ネブライザなどの APCI パラメータを最適化しました。最適化されたメソッドでは、InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 100 mm、1.9 µm カラムを使用しました。図 2 の 12 種類のステロールの MRM クロマトグラムは、10 ppb レベルで完全な分離を示しています。

シグナルにはキャピラリー電圧が重要となることが分かりました。4,000 V などキャピラリー電圧が高くなるほど、APCI シグナルが大幅に低下し、不安定な信号となりました。このアプリケーションノートで最適化されたキャピラリー電圧は 2,000 V でした。100 ppb 標準の 10 回の注入の重ね表示によって、良好な再現性が示されています (図 3)。

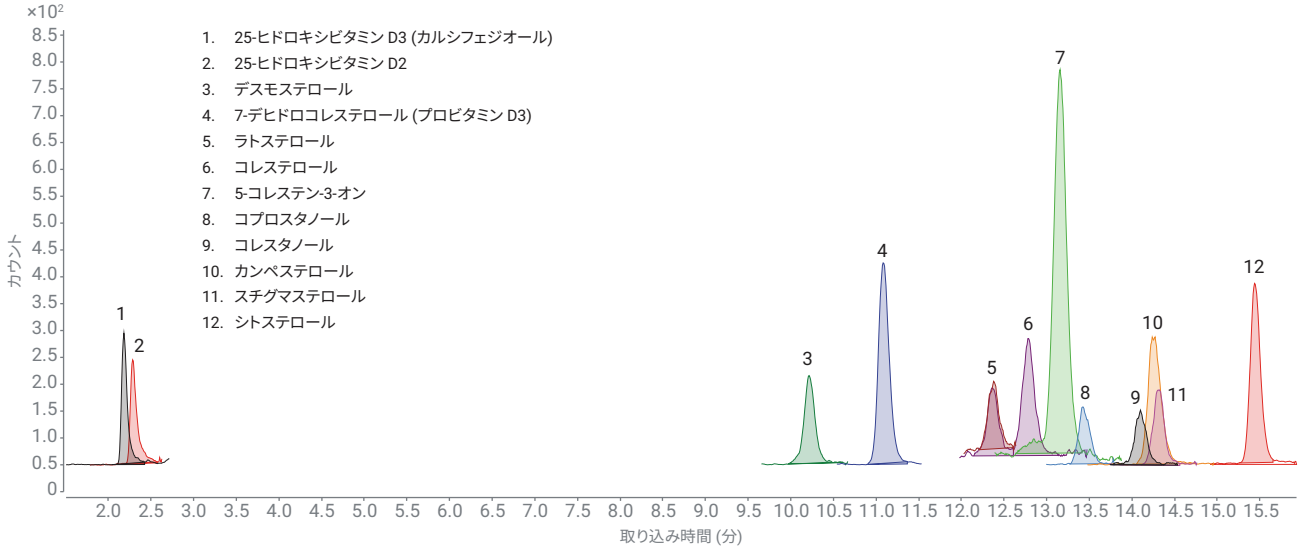


図 2. InfinityLab Poroshell EC-C18、3.0 × 100 mm、1.9 µm カラムでの 10 ppb レベルの 12 種類のステロールの MRM クロマトグラム

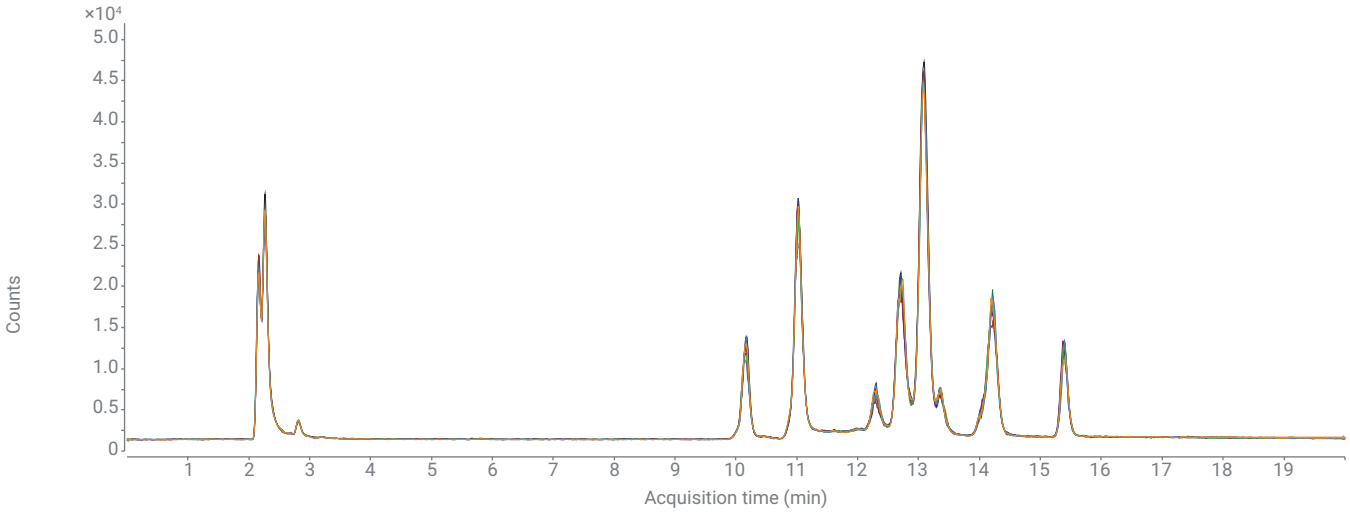


図 3. InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、3 × 100 mm、1.9 µm カラムでの 100 ppb 標準の 10 回の注入の重ね表示

実際の血漿サンプルでは、コレステロールは他のステロールよりもはるかに高い濃度で存在します。血漿サンプル中のコレステロールとラトステロールの比率は約 2,000:1 で、ラトステロールを高濃度のコレステロールから分離するのは非常に困難です。図 4 に、10 ppb の 12 種類のステロールをスパイクする前後の血漿サンプルのクロマトグラムを示します。

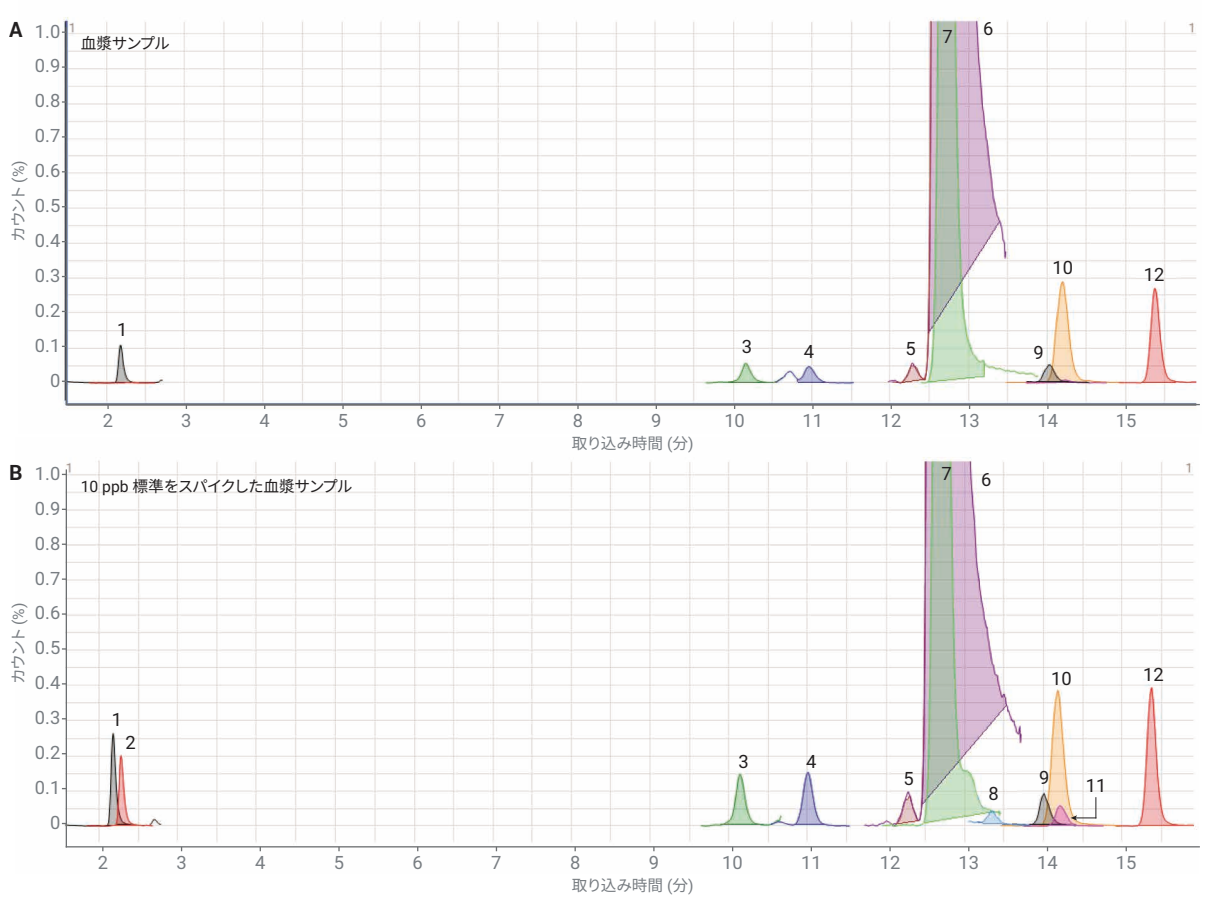


図 4. InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、3 × 100 mm、1.9 µm カラムで分離したブランク血漿サンプルと 10 ppb 標準スパイク済み血漿サンプルの MRM クロマトグラム

結論

コレステロール、複数の代謝物、その他の植物ステロールの分離は、6460A トリプル四重極 LC/MS において InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 100 mm、1.9 µm カラムと、ポジティブイオンモードの APCI 検出を用いることによって、最も効果的に実施することができました。このカラムは、コレステロールとラトステロールという重要なペアが 2,000:1 の比率で存在する場合でも、ベースライン分離を実現しました。コレステロールとラトステロールは分子量が同じで、効果的に定量するための分離能が必要であったため、このベースライン分離の実現は非常に重要な要素でした。

参考文献

1. McDonald, J. G.; *et al.*A comprehensive method for extraction and quantitative analysis of sterols and secosteroids from human plasma.*J. Lipid Res.***2012**, *53(7)*, 1399-1409.

ホームページ
www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ
0120-477-111
email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2019

Printed in Japan, March 7, 2019
5994-0793JAJP

Agilent
Trusted Answers