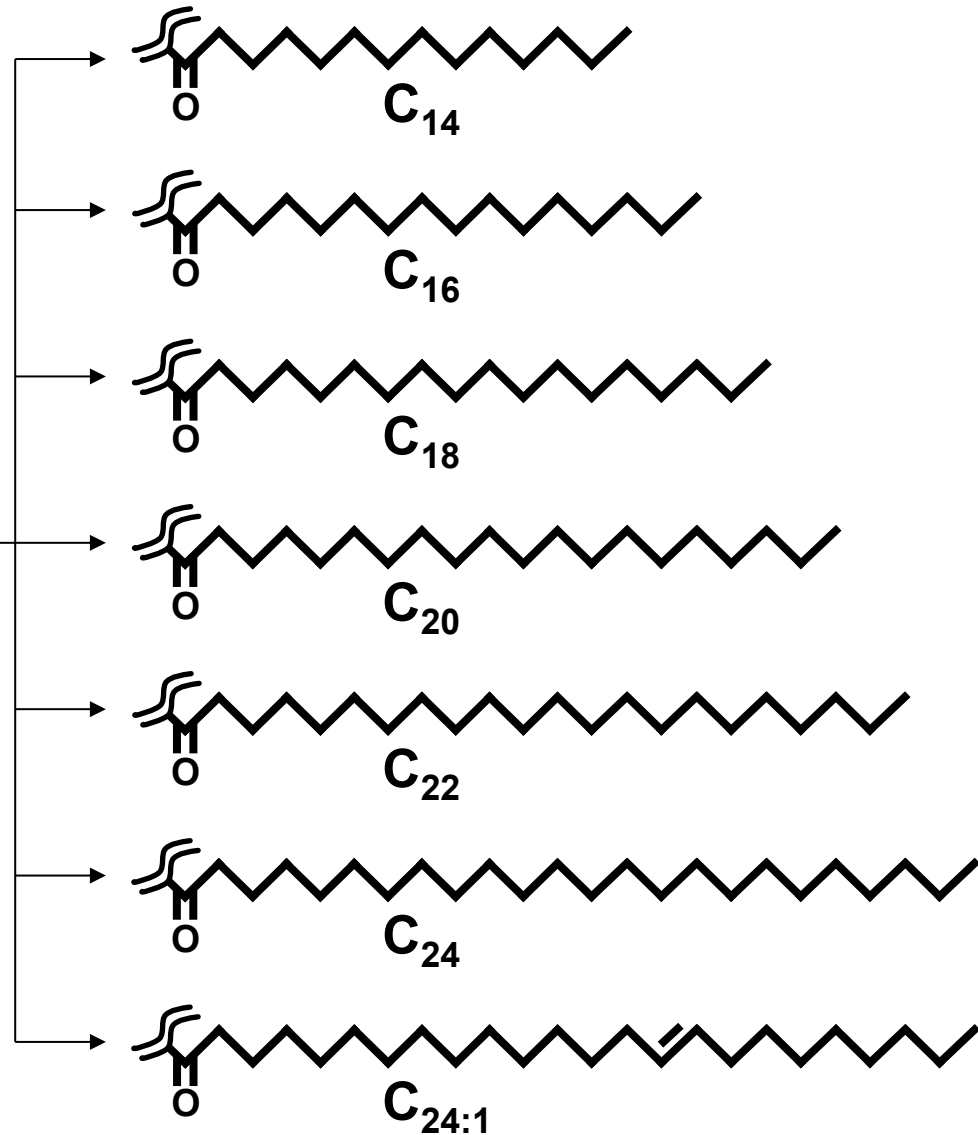
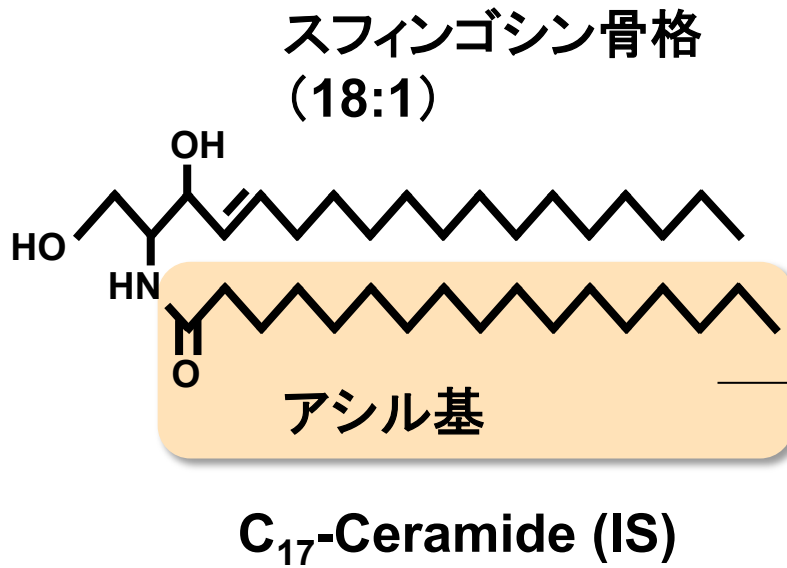


LCMS-IT-TOFによる スフィンゴ脂質測定系の開発

実践薬学大講座 医薬品情報学研究室

対象

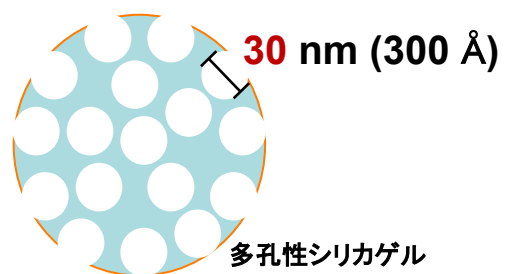
Ceramide



分析カラム

Cadenza CW-C18

ワイドポアシリカゲルを用いたC18カラム



立体障害少なく、比較的大きな分子の分析可能
固定相の表面の均一性、良好なピーク形状
同一条件で従来のC18より**高速**な分析可能

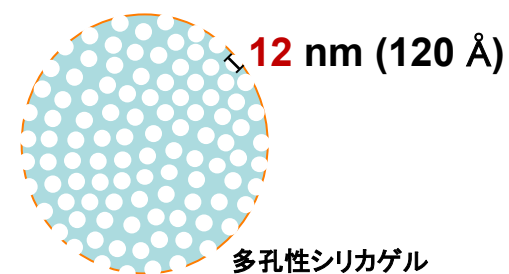


スフィンゴ脂質代謝物の分離に向いている*

* Rho J et al. Technical Information, No.T1487E, (株)インタクト

Cadenza CD-C18

従来のC18カラム



LC 条件

分析カラム Cadenza CW-C18 (250×2mm, 3μm, インタクト)

ガードカラム Cadenza CW-C18 (5×2mm, 3μm)

LC装置 Prominenceシステム (島津製作所)

流量 0.15 mL/min

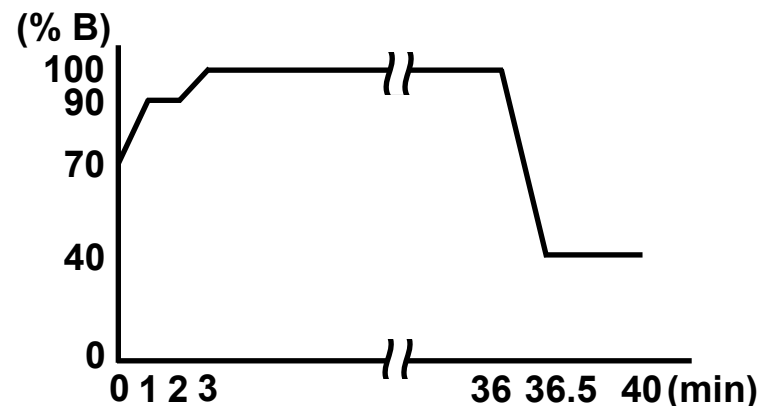
カラム温度 48°C

移動相 A: water/HCOOH(100:0.2v/v), 7mM ammonium formate

B: methanol/HCOOH(100:0.2v/v), 5mM ammonium formate

70% B を初期条件とするグラジエント溶出

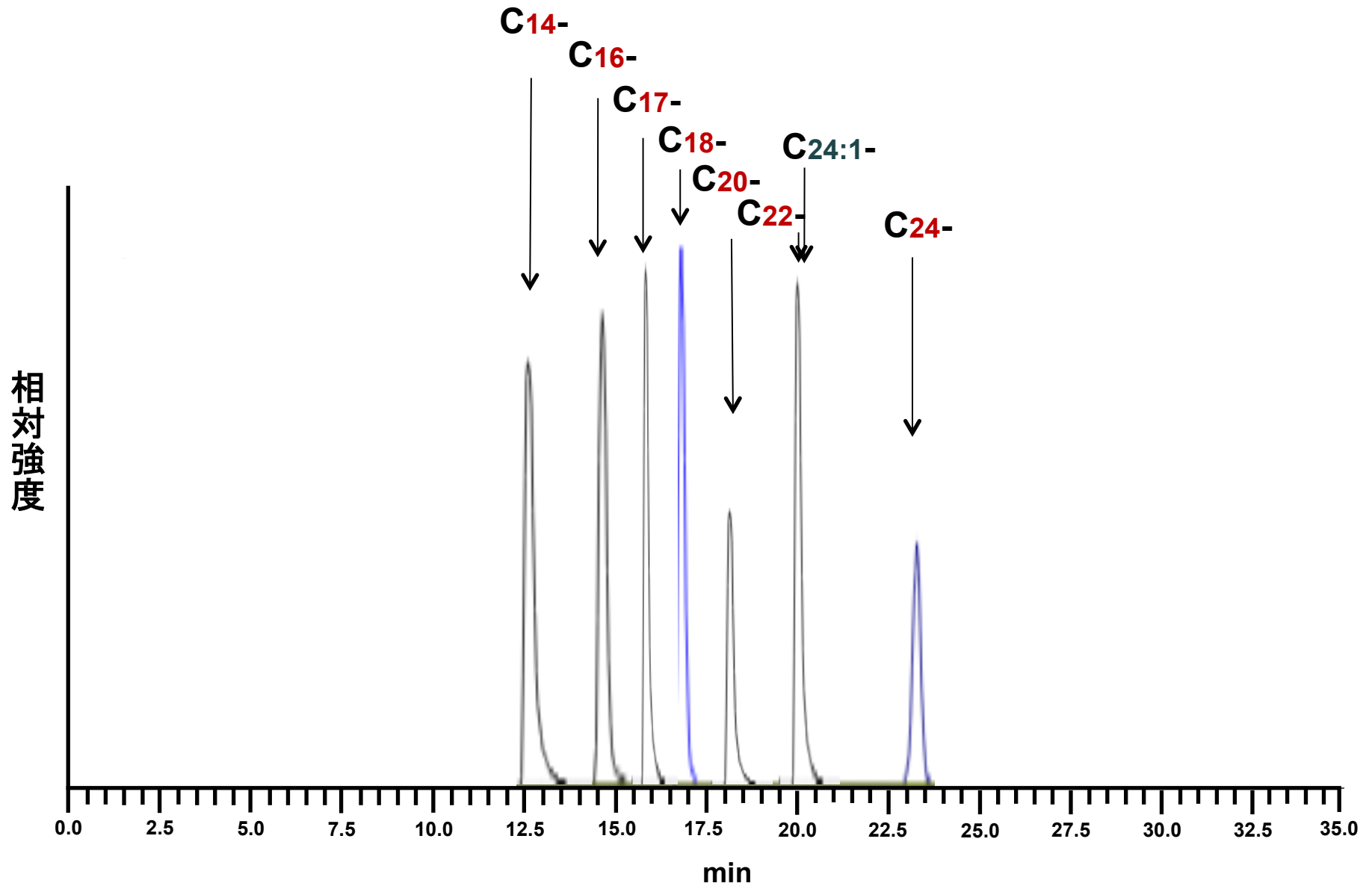
0-1 min	70-90% B
1-2 min	90% B
2-3 min	90-100% B
3-36 min	100% B
36-36.5 min	100-40% B
36.5-40 min	40% B



MS 条件

MS検出器	LCMS-IT-TOF (島津製作所)
イオン化モード	ESI(+)
N ₂ ガス流速	1.5 L/min
プローブ電圧	+4.5 kV
ブロック温度	200°C
CDL温度	200°C
検出器電圧	1.62 V
スキャン範囲	m/z 480-660
データ処理	LC solution (島津製作所)

LC クロマトグラム (標準液)



カラムパフォーマンス

Columns	Ceramides	t_R	k	α	Rs	N	H	Tf
Wide pore CW-C18	C ₁₆ -Cer	14.5	2.33	1.10	1.98	8645	2.89	1.56
	C ₁₇ -Cer	15.4	2.55	1.11	3.21	27654	0.90	1.53
	C ₁₈ -Cer	16.7	2.85	1.55	13.99	25579	0.98	1.53
	C ₂₄ -Cer	23.4	4.40	—	—	29321	0.85	1.16
Conventional CD-C18	C ₁₆ -Cer	20.3	3.47	1.11	4.03	36558	0.68	1.57
	C ₁₇ -Cer	22.0	3.85	1.17	5.92	42975	0.58	1.19
	C ₁₈ -Cer	25.0	4.51	1.91	25.60	28332	0.88	1.19
	C ₂₄ -Cer	43.7	8.64	—	—	40393	0.62	1.05

t_R : retention time (min)

k : retention factor [$k = (t_R - t_0)/t_0$]

α : separation factor [$\alpha = k_{n+1}/k_n$]

Rs : resolution [$Rs = 1.18(t_{R2} - t_{R1})/(W_{0.5h2} + W_{0.5h1})$, $Rs(n+1/n)$].

N : number of theoretical plates [$N = 5.55(t_R/W_{0.5h})^2$].

H : height equivalent of a theoretical plate [$H = \text{length of column}/N$].

Tf : tailing factor [$Tf = W_{0.05h}/2a_{0.05}$]

バリデーションデータ

Ceramides	m/z		Calibration range ($\mu\text{g/mL}$)	Regression line R^2
	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$		
C₁₄-Cer	510.4886	492.4781	0.1 - 5.0	0.990
C₁₆-Cer	538.5199	520.5094	0.05 - 5.0	0.995
C₁₇-Cer	552.5356	534.5250	0.5 - 10.0	0.941
C₁₈-Cer	566.5512	548.5407	0.5 - 5.0	0.992
C₂₄-Cer	650.6451	632.6346	0.5 - 10.0	0.992
C_{24:1}-Cer	648.6295	630.6189	0.2 - 7.8	0.886

R^2 : linear correlation coefficients for the calibration

バリデーションデータ

回収率

Ceramides	0.5 µg/mL			1 µg/mL			5 µg/mL		
	Mean ± S.D. (%)		C.V. (%)	Mean ± S.D. (%)		C.V. (%)	Mean ± S.D. (%)		C.V. (%)
C ₁₆ -Cer	95.5	± 9.5	9.9	97.4	± 9.8	10.0	91.7	± 15.2	16.6
C ₁₈ -Cer	103.2	± 10.1	9.8	95.6	± 5.7	5.9	91.0	± 12.7	13.9
C ₂₄ -Cer	96.8	± 5.6	5.8	103.4	± 10.6	10.3	93.1	± 6.1	6.5

C.V. : Coefficient of variation

日間変動

Ceramides	0.5 µg/mL				1 µg/mL			5 µg/mL				
	Mean ± S.D. (µg/ml)		C.V. (%)	Accuracy (%)	Mean ± S.D. (µg/ml)		C.V. (%)	Accuracy (%)	Mean ± S.D. (µg/ml)		C.V. (%)	Accuracy (%)
C ₁₆ -Cer	0.65	± 0.17	26.1	30.0	0.91	± 0.09	9.9	-9.0	5.09	± 0.76	15.0	1.8
C ₁₈ -Cer	0.76	± 0.23	30.3	50.2	1.17	± 0.25	21.4	17.1	4.50	± 0.79	19.1	-11.1
C ₂₄ -Cer	0.60	± 0.12	20.0	20.0	1.14	± 0.13	11.4	14.0	4.87	± 0.72	14.5	-2.6

C.V. : Coefficient of variation

結論

本測定系は、細胞内セラミドの測定において

- 十分な感度を有する
- ハイスループットな分析が可能

セラミドはADのバイオマーカーに有用