

塩基性溶離液及びLC-FTMSを用いた脂肪酸の網羅的分析法の開発

○尾崎博道、坂牧 寛、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)

1. はじめに

脂肪酸の分析にはGCやGC-MSが広く用いられているが、一般的に試料の誘導体化が必要であることに加え、分析に長時間を要していた。また、LC-MSを用いた分析では、脂肪酸は開裂しにくい分子構造を有しているため、高選択的なSRM分析は困難であった。一方、フーリエ変換質量分析計(FTMS)は高い質量分解能を有し、脂肪酸の高選択的な検出が可能である¹⁾。しかしながら、LC-FTMSを用いてn-3/n-6 PUFAをはじめとする分子量の等しい二重結合位置異性体の分離も含めて網羅的に検出した例は報告されていない。

そこで本研究では、LC-FTMSを用い異性体を含む脂肪酸の網羅的一斉分析法の開発を試みた。

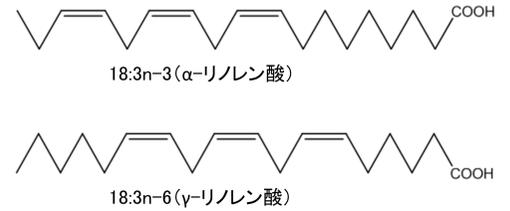


図1 脂肪酸二重結合位置異性体の構造例(18:3)

2. 実験方法

◆試料の調製

脂肪酸標準溶液: 市販品66種を100 ng/mLとなるようメタノールに溶解

精製マグロ油由来脂肪酸:

- 市販精製マグロ油50 mgを0.5 N KOH-EtOHでけん化
- ↓
- 1 N HClを滴下して反応終了
- ↓
- 超純水 2 mL、酢酸エチル1.5 mLを加えて攪拌後、上層を回収
- ↓
- 遠心濃縮により溶媒を除去後、ヘキサンを添加し攪拌
- ↓
- 遠心乾固後、メタノールに200 µg/mLとなるように溶解

◆分析条件

<LC>

Prominence XR (Shimadzu)
カラム: L-column2 ODS (2.1 × 10/50/150 mm, CERI)
流量: 0.3 mL/min
カラム温度: 40°C
注入量: 3 µL

<MS>

LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific)
イオン化法: Heated ESI-II
測定モード: MS scan (Negative)
検出イオン ([M-H]⁻, 質量誤差範囲10 ppm)

3. 結果及び考察

◆1.水系溶離液の検討

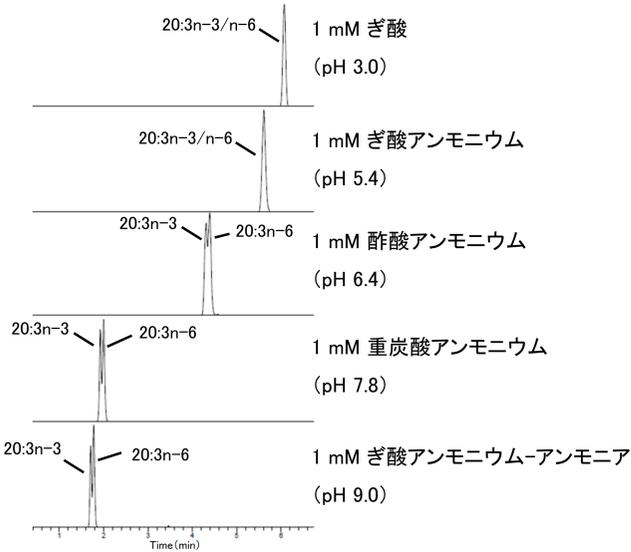


図2 異なる水系溶離液における20:3n-3/n-6の抽出イオンクロマトグラム

<カラム>
L-column2 ODS (2.1 × 50 mm)
<溶離液B>
アセトニトリル

<グラジエント条件>	
min	%B
0.0	60
9.0	95

表1 異なる水系溶離液における20:3n-3/n-6の分離度

溶離液 (1mM)	R _s
ぎ酸	共溶出
ぎ酸アンモニウム	共溶出
酢酸アンモニウム	0.57
重炭酸アンモニウム	0.87
ぎ酸アンモニウム-アンモニア	0.84

pHが高い溶離液ほど20:3n-3/n-6の溶出時間が短く、分離度が増加する傾向にあった。

◆2.グラジエント条件の検討

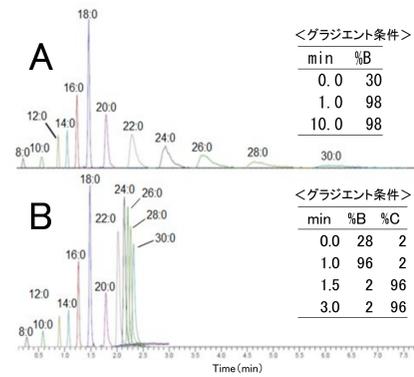


図3 異なるグラジエント条件における脂肪酸(C8:0~C30:0)の抽出イオンクロマトグラム

2液グラジエントでは22:0~30:0の溶出時間が長く、ピーク形状もブロードであった。アセトニトリルと溶出力の強いアセトンのグラジエントを加えた3液グラジエントにより、22:0~30:0を短時間かつシャープなピーク形状で溶出させることができた。

◆3.脂肪酸66種の一斉分析

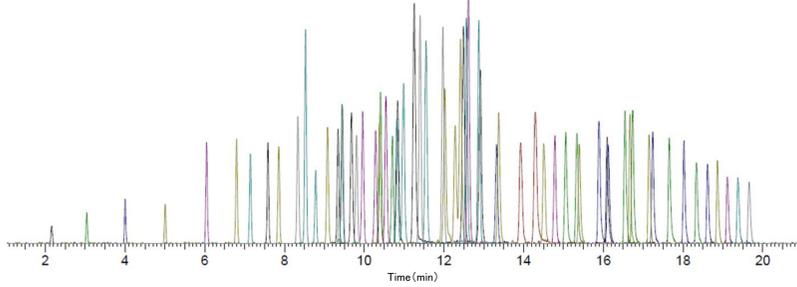


図4 脂肪酸66種の抽出イオンクロマトグラム

<カラム>
L-column2 ODS (2.1 × 150 mm)
<溶離液>
A: 0.5 mM酢酸アンモニウム-0.5 mM重炭酸アンモニウム (pH 7.6)
B: アセトニトリル
C: アセトン

<グラジエント条件>	
min	%B
0.0	28
12.0	93
17.0	2
22.0	93

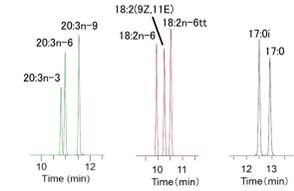


図5 脂肪酸異性体の分離(例)

表2 連続5回分析におけるピーク面積値及び溶出時間のC.V.(%)

No.	脂肪酸	ピーク面積値	溶出時間	No.	脂肪酸	ピーク面積値	溶出時間	No.	脂肪酸	ピーク面積値	溶出時間	No.	脂肪酸	ピーク面積値	溶出時間
1	8:0	8.4	0.16	15	15:0i	1.9	0.10	29	20:3n-6	3.2	0.11	43	19:1n-9	3.8	0.07
2	9:0	5.9	0.39	16	22:6n-3	3.4	0.13	30	16:0	4.2	0.10	44	18:0i	4.5	0.09
3	10:0	0.8	0.26	17	21:5n-3	2.9	0.10	31	24:6n-3	3.6	0.09	45	18:0	5.8	0.05
4	11:0	3.1	0.07	18	20:4n-3	2.1	0.10	32	20:3n-9	1.6	0.08	46	20:1n-9	4.7	0.06
5	12:0	1.3	0.06	19	15:0	2.3	0.09	33	22:4n-6	3.2	0.08	47	22:2n-6	4.4	0.08
6	14:1n-5	2.8	0.05	20	20:4n-6	2.9	0.12	34	18:1n-9	1.7	0.07	48	19:0i	2.0	0.07
7	13:0	5.2	0.06	21	18:2n-6	1.9	0.09	35	18:1n-7t	2.6	0.07	49	19:0	2.8	0.05
8	18:4n-3	2.8	0.06	22	18:2(9Z,11E)	3.8	0.10	36	18:1n-9t	2.4	0.10	50	21:1n-9	3.3	0.08
9	15:1n-5	1.6	0.07	23	17:1n-7	2.4	0.09	37	17:0i	2.5	0.10	51	20:0i	1.2	0.06
10	14:0	3.2	0.04	24	22:5n-3	2.5	0.09	38	24:5n-3	3.5	0.07	52	22:1n-9	2.2	0.06
11	20:5n-3	2.7	0.08	25	18:2n-6tt	1.6	0.12	39	20:2n-6	4.4	0.08	53	20:0	1.3	0.06
12	18:3n-3	0.6	0.11	26	22:5n-6	0.7	0.12	40	24:5n-6	2.2	0.09	54	21:0i	2.6	0.11
13	18:3n-6	4.7	0.08	27	20:3n-3	4.7	0.08	41	17:0	1.2	0.08	55	23:1n-9	4.3	0.10
14	16:1n-7	3.0	0.10	28	16:0i	4.5	0.12	42	22:3n-3	1.6	0.08	56	21:0	4.9	0.10

11種の2重結合位置異性体を良好な測定再現性で個別に検出できた。また、本法は分枝脂肪酸やトランス脂肪酸の個別検出も可能であった。

◆4.精製マグロ油脂肪酸の網羅的分析

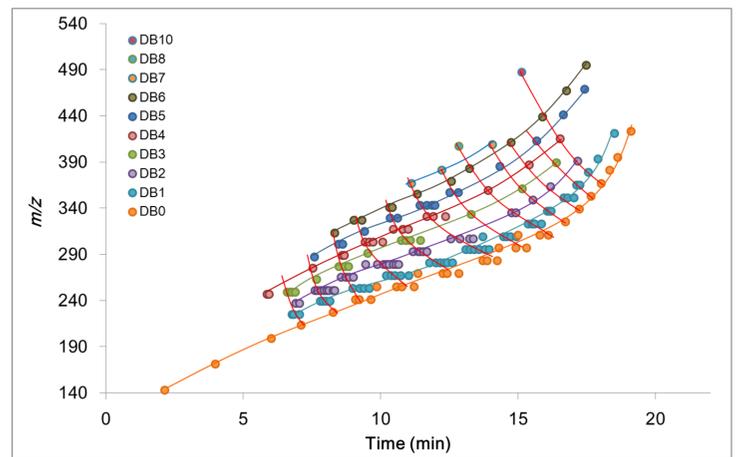


図6 精製マグロ油から検出された脂肪酸ピークの溶出時間-m/zプロット

<検出された脂肪酸>

8:0	17:0i	24:0	16:1	19:1n-9	22:1n-9	16:2	18:2	22:2n-6	20:3n-3	20:4n-6	21:5n-3	22:6	28:8
10:0	17:0	25:0	17:1	19:1	22:1	16:2	18:2	22:2	20:3n-6	20:4	22:5n-3	22:6n-3	34:10
12:0	18:0	26:0	17:1n-7	20:1	22:1	16:2	18:2	23:2	20:3	21:4	22:5n-6	23:6	
13:0	18:0i	28:0	17:1	19:1	23:1n-9	16:2	18:2n-6tt	24:2	20:3n-9	21:4	23:5	23:6	
14:0	18:0	14:1n-5	17:1	19:1	23:1	16:2	18:2	26:2	22:3n-3	21:4	23:5	24:6n-3	
15:0	19:0	14:1	17:1	20:1n-9	23:1	16:2	19:2	16:3	24:3	22:4	23:5	25:6	
15:0i	19:0i	14:1	18:1	20:1	24:1n-9	16:2	19:2	16:3	26:3	22:4n-6	23:5	26:6	
15:0	20:0	15:1n-5	18:1n-9	20:1	24:1	17:2	19:2	16:3	16:4	22:4	24:5n-3	28:6	
16:0	19:0	15:1	18:1	20:1	25:1	17:2	19:2	16:3	16:4	24:4	24:5n-6	30:6	
16:0	20:0i	15:1	18:1	21:1n-9	26:1	17:2	19:2	17:3	18:4n-3	26:4	26:5	32:6	
16:0i	20:0	15:1	18:1n-9t	21:1	28:1	17:2	20:2n-6	18:3n-3	19:4	28:4	28:5	34:6	
16:0	21:0	16:1n-7	18:1	21:1	15:2	18:2	20:2	18:3n-6	19:4	19:5	30:5	25:7	
17:0	22:0	16:1	19:1	21:1	15:2	18:2n-6	20:2	18:3	20:4n-3	20:5n-3	32:5	26:7	
17:0	23:0	16:1	19:1	21:1	16:2	18:2	20:2	19:3	20:4	20:5	21:6	28:7	

22分程度の分析時間で脂肪酸と考えられる184ピークが検出された。これらの中には、これまでに報告例が存在しない34:10と考えられるピークも含まれていた。

4. まとめ

塩基性溶離液及び3液グラジエントを用いたLC分離とFTMSを組み合わせた手法を適用することにより、22分程度の短時間で二重結合位置異性体や未知の分子種を含む多数の脂肪酸を網羅的に検出することができた。したがって、本法は生体中の脂肪酸分子種の分布を明らかにする上で有用な手法であると考えられた。

1) N Mori, et al. (2014), J Chromatogr A, 1347, 129-136.