

## トリプル四重極型LC/MS/MSによる 血中トリグリセリド分析法の開発

馬越 泰、Toinon Doriane、山田 真希

### ユーザーベネフィット

- ◆ 血中のトリグリセリド47種類の分析を1サイクル11分（130分析/日）で行うことが可能です。
- ◆ トリグリセリド中の脂肪酸組み合わせ推定が可能です。
- ◆ ハイスループットスクリーニングによるバイオマーカー探索に有用です。

### ■はじめに

トリグリセリド (TG) は、動物の重要なエネルギー貯蔵物質です。血液中ではエネルギー輸送という重要な役割を担いますが、過剰なトリグリセリドは、動脈硬化を促進させると考えられています。通常の血液検査ではトリグリセリドの総量が見積られています、トリグリセリドに結合する多様な脂肪酸についての定量的知見は得られません。

本稿では、トリプル四重極型LC/MS/MSを用いた血中トリグリセリドの分析法を【LC/MS/MS MRMライブラリ トリグリセリド】として開発しました<sup>1)</sup>ので、ご紹介いたします。構築した分析法は、分子量の異なる47種類の血中トリグリセリドを1分析11分（130分析/日）で測定することができます。また、195個のMRMデータの取得により、同一保持時間に溶出する脂肪酸由来のピークの組み合わせから、トリグリセリドの異性を推定できます。本分析法を用いて市販のヒト血漿および血清サンプル3種を分析し、多変量解析によりトリグリセリドの微細なサンプル間差を捉えることができました。

### ■トリグリセリドの分析

トリグリセリドはグリセロールに脂肪酸3分子がエステル結合した構造を持ちます (図1)。

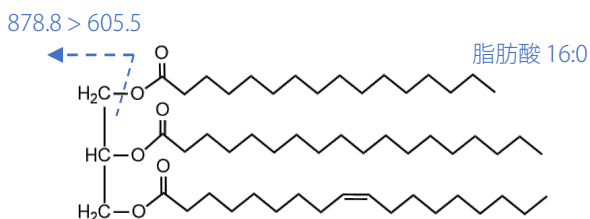


図1 トリグリセリドの構造  
(TG 16:0/18:0/18:1)

トリグリセリドのMRMは、 $[M+NH_4]^+$ をプリカーサーイオンとして、脂肪酸のニュートラルロス (NL) により検出されるイオンをプロダクトイオンとして設定しました。例えば図1の化合物の場合、878.8 > 605.5というMRMトランジションにより、TG 52:1から脂肪酸16:0がニュートラルロスした、TG 16:0\_36:1が測定できます。(化合物の表記法については、文献1に従い、トリグリセリド中で検出された脂肪酸をアンダーバーの前に、残りの脂肪酸の炭素数と二重結合の数の合計を後ろに示しています。2))

本メソッドでは、C14~C22を炭素骨格にもち、0から6までの不飽和度を有する脂肪酸を考慮しています。血中の47種のトリグリセリドをターゲットにした195個のMRMトランジションに加え、内部標準物質として、Glyceryl trilinolenate (TG 54:9) のMRMトランジションを用意しました。

### ■分析条件

測定機器はNexera™ UHPLCシステムとLCMS-8060を使用しました。1分析11分で測定を行いました。

表1 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera)	
Column	: Shim-pack Velox™, C18* (50 mm × 2.1 mm I.D., 2.7 μm)
Column oven	: 45 °C
Solvent A	: 20 mM Ammonium formate – water
Solvent B	: 2-Propanol/Acetonitrile (80/20, v/v)
Flow rate	: 0.4 mL/min
Injection volume	: 3 μL
[MS conditions] (LCMS-8060)	
Ionization	: ESI, Positive
Mode	: MRM
Nebulizing gas flow	: 2.5 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250 °C
Block heater temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 150 °C
CID Gas Pressure	: 230 kPa

\* P/N : 227-32009-02

### ■試料の前処理

2種類のヒト血漿 (Plasma 1、2) 及び血清 (Serum) は、コージンバイオ株式会社より購入しました。これらを下記の通り、前処理しました (図2)。内部標準物質には Glyceryl trilinolenate (SIGMA-ALDRICH) を使用しました。抽出後、同一サンプルを3回ずつ測定しました。

1. 血漿または血清 20 μL  
+  
メタノール/ブタノール (1/1) 960 μL  
+  
内部標準物質 (5 μg/mL) 20 μL in メタノール  
↓
2. 攪拌 (3分)  
↓
3. 遠心分離 (15分)  
↓
4. 上清をメタノール/ブタノール (1/1) で10倍希釈  
↓
5. LC/MS/MS分析 3 μL

図2 試料の前処理

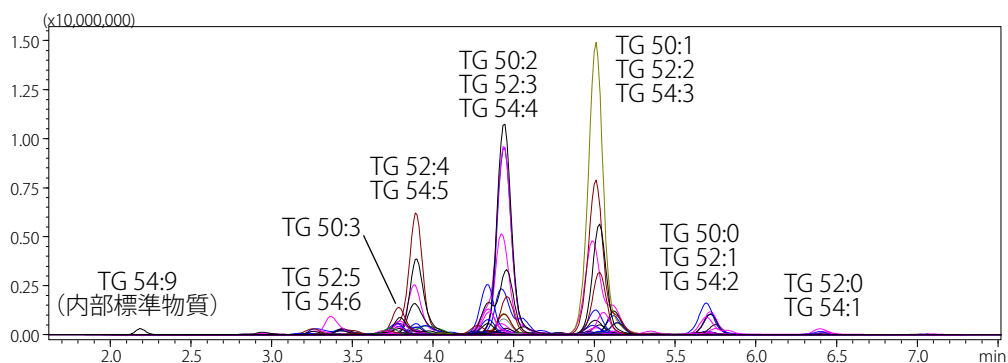


図3 血漿トリグリセリドの分析で得られた196個のMRMクロマトグラム(重ね書き)面積値の大きいトリグリセリドを一部図中に示しました。

### ■ 代表的なMRMクロマトグラム

血漿の分析により得られたMRMクロマトグラムを図3に示します。TG 52:2が最も強いピークとして検出されました。

TG 50:2のMRMクロマトグラムを図4に示します。脂肪酸16:0、16:1、18:1、18:2のニュートラルロスモニターするMRMクロマトグラムにおいてピークが検出されました。

保持時間 4.33 minに脂肪酸16:0、16:1、18:1のニュートラルロス由来のピークが検出されたことから、脂肪酸の組み合わせが① TG 16:0\_16:1\_18:1と推定できました。同様に保持時間 4.46 minに脂肪酸16:0、18:2のニュートラルロス由来のピークが検出されたことから、脂肪酸の組み合わせが② TG 16:0\_16:0\_18:2と推定できました。(脂肪酸とグリセロールの結合位置については考慮していません。)

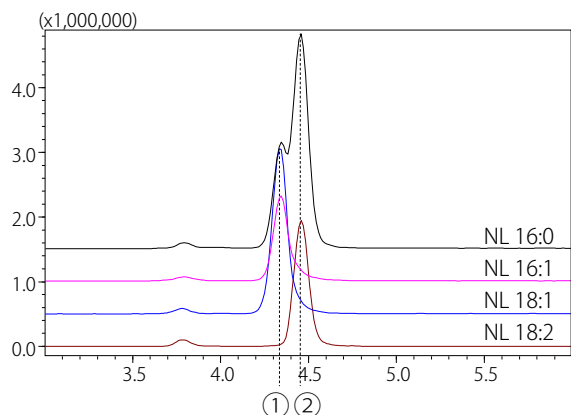


図4 TG 50:2のMRMクロマトグラム

TG 53:3のMRMクロマトグラムを図5に示します。脂肪酸17:0、17:1、18:1、18:2のニュートラルロスモニターするMRMクロマトグラムにおいてピークが検出されました。17:0や17:1といった奇数鎖の脂肪酸も血漿中から検出されました。

TG 50:2と同様に保持時間から脂肪酸の組み合わせが、① TG 17:0\_18:1\_18:2、② TG 17:1\_18:1\_18:1と推定できました。①に関して、2つのピークが検出されたのは、脂肪酸の結合位置の異なる異性体もしくは幾何異性体が含まれているためと考えられます。

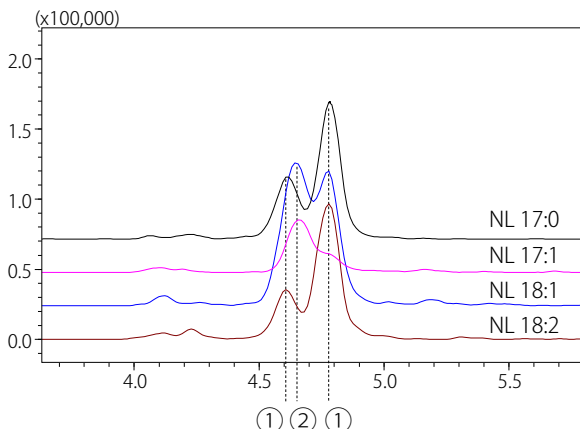


図5 TG 53:3のMRMクロマトグラム

TG 54:6のMRMクロマトグラムを図6に示します。脂肪酸18:1、18:2、18:3、16:0、20:4、20:5、22:6のニュートラルロスモニターするMRMクロマトグラムにおいてピークが検出されました。18:2、18:3、20:4、20:5、22:6といった多価不飽和脂肪酸も血漿中から検出されました。

TG 50:2と同様に保持時間から脂肪酸の組み合わせが、① TG 18:2\_18:2\_18:2、② TG 18:1\_18:2\_18:3、③ TG 16:0\_18:2\_20:4、④ TG 16:0\_18:1\_20:5、⑤ TG 16:0\_16:0\_22:6と推定できました。

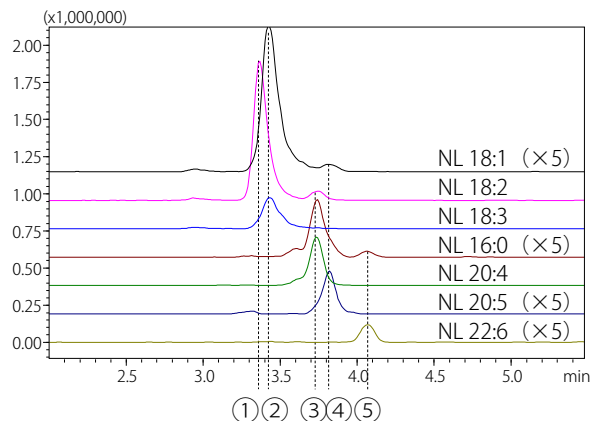


図6 TG 54:6のMRMクロマトグラム  
脂肪酸18:1、16:0、20:5、22:6由来のMRMクロマトグラムについては、縦軸を5倍に拡大して表示しました。

上記のように47種類のトリグリセリドについて、脂肪酸の組み合わせ違いによる異性体を107種類推定できました。

### ■ データ解析

195個のMRMクロマトグラムにおいて得られたピークの面積値をデータ解析に用いました。ピークトップが2つ以上に分かっている場合は、複数ピークを一括で波形処理し、面積値の合計を解析に用いました。内部標準物質の面積値(表2)で各面積値を除し、補正を行いました。

表2 内部標準物質の面積値

	Area
Plasma 1	$(1.30 \pm 0.02) \times 10^6$
Plasma 2	$(1.21 \pm 0.07) \times 10^6$
Serum	$(1.18 \pm 0.07) \times 10^6$

(n = 3、平均±標準偏差)

各サンプルを3回分析し、補正後の面積値のRSDが15%以内であった181個(以下、181成分と言う)をデータ解析に用いました。データ解析にはPython 3.8を用いました。

2種類の血漿及び血清の主成分分析を行いました。結果として、これらはスコアプロット上で3群に分かれました(図7,a)。

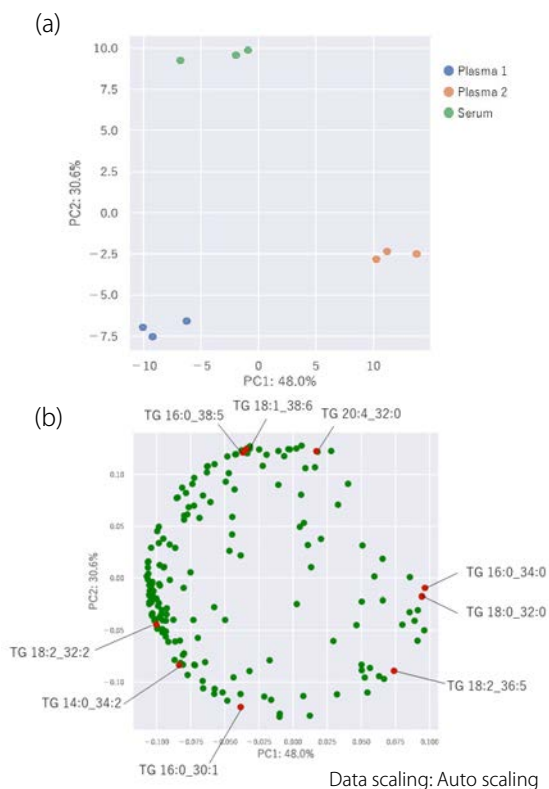


図7 主成分分析結果  
(a)スコアプロット、(b)ローディングプロット

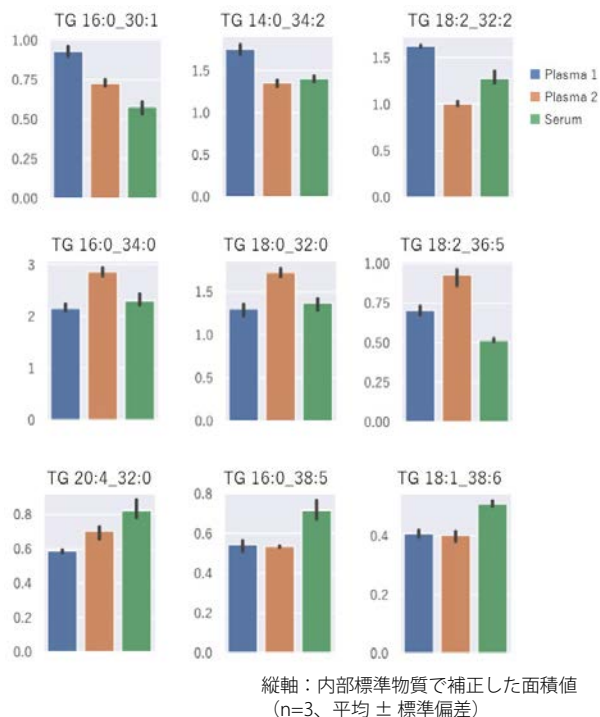


図8 サンプル中のトリグリセリド

一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行ったところ、181成分のうち109成分に関して有意差 ( $p < 0.01$ ) が見られました。三群間で違いがみられた一部の成分 (9成分) をローディングプロット (図7,b) に示します。

図8にはその9成分の棒グラフを示します。TG 16:0\_30:1、TG 14:0\_34:2、TG 18:2\_32:2はPlasma 1に多く、TG 16:0\_34:0、TG 18:0\_32:0、TG 18:2\_36:5はPlasma 2に多く、TG 20:4\_32:0、TG 16:0\_38:5、TG 18:1\_38:6はSerumに多いことがわかりました。

## ■まとめ

ヒト血中のトリグリセリド分析法を開発しました。1サイクル11分で、分子量の異なる47種類の血中トリグリセリドを分析できます。また、トリグリセリドに結合する脂肪酸を定量的に解析することが可能です。本分析法により市販のヒト血漿及び血清サンプル3種を分析し、トリグリセリドの微細なサンプル間差を捉えることができました。

本分析法は血中トリグリセリドの微細な差をハイスループット (130分析/日) に捉えられることから、疾患バイオマーカー探索に有用であると考えられます。

## <参考文献>

- 1) 馬越 泰, Toinon Doriane, 山田 真希, トリプル四重極型質量分析計による血中トリグリセリド分析法の開発, 島津評論 2021, 78 (1・2) 131-137
- 2) Liebisch G, Fahy E, Aoki J, et al. Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. J Lipid Res. 2020;61(12):1539-1555. doi:10.1194/jlr.S120001025

LCMS、Nexera、およびShim-pack Veloxは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

**株式会社 島津製作所** 分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

01-00205-JP 初版発行：2021年10月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2021