

Technical Report

溶媒媒介化学イオン化 (SMCI)-GC-MS/MSを用いた不飽和脂肪酸メチルエステル (FAME) の二重結合位置解析

Double bond localization in unsaturated fatty acid methyl esters (FAME) by solvent mediated chemical ionization (SMCI) tandem mass spectrometry

J.T. Brenna¹, D. H. Wang¹

Abstract:

不飽和脂肪酸の特性解析は、異性体の構造類似性から化学的に困難である。そこで溶媒媒介化学イオン化 (SMCI) ユニットを用いることで、二重結合部の特性を利用した化学イオン化法が可能になり、不飽和脂肪酸メチルエステルの構造特有のイオンを解析することで構造情報を得ることができる。本手法は標準試料の無い化合物にも対応することができ、脂肪酸分析に最適であることが分かった。

Keywords: 脂肪酸メチルエステル、FAME、多価不飽和脂肪酸、共役結合付加化学イオン化、脂肪酸構造解析

1. 脂肪酸メチルエステルの構造解析

トリプル四重極型質量分析計は、開裂イオンの選択性の高さから、化合物の構造および定量分析に有用である。等質量化合物においても、コリジョンセル内で構造に依存した特異なイオンが生成され、複雑な天然試料内からでも単一の化合物を分離させることができる。ノミナル質量が同じであっても異なる元素、組成から成る化合物は、プロダクトイオンを用いた高い分離能と精密質量から分離させることができる。

脂肪酸メチルエステル (FAME) は、最も研究されてきた化合物群の一つであり、1950年代では第一オミックスとして分析されてきた^[1]。脂肪酸は通常、遊離体の状態から加水分解、メチル化処理を経て、分析に適した試料へと処理されていく。この脂肪酸メチルエステルは、化学的に不活性かつ揮発性の化合物であり、分析における物性として優れている。また、ガスクロマトグラフ (GC) で分析した場合には、綺麗なピーク形状とそれらの高い分離能を示すため、脂肪酸メチルエステルの分析に最適な技術とされている。

生化学において最も着目すべき脂肪酸メチルエステルは不飽和脂肪酸であり、哺乳類組織に見られる1から6カ所の二重結合を有するものと、海洋試料内の最大10カ所の二重結合を有するものである。これらの二重結合は炭素原子間で存在し得るものであり、cis (Z) と trans (E) に配位する。この二重結合の位置と配位構造は、炭素鎖の長さと共に脂肪酸の生物活性を決めるものである。例えば、リノール酸 (9Z,12Z-octadecadienoic acid) は、主要なエイコサノイドであるアラキドン酸の前駆体となる。一方、ルーメン酸 (9Z,11E-octadecadienoic acid) は、齧歯動物の抗発がん性の要素となり得たり、他の異性体である10E,12Z-octadecadienoic acid は、抗発がん要素は無いが脂質合成の抑制作用を有しているとされている。それ故に、脂肪酸メチルエステル内の二重結合の解析は極めて重要である。

しかしながら、タンデム型の質量分析計を用いた脂肪酸メチルエステル内の二重結合解析は難しいとされてきた。電子イオン化

(EI) 法では、得られたマスペクトルからの二重結合の再配位が困難であり、解析には向かないものであった。同様に、汎用的な正化学イオン化 (PCI) 法ではプロトン付加の分子イオンを得ることができるが、衝突誘起解離 (CID) において二重結合解析に有用なイオンが生成されることはなかった。

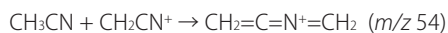
旧知の伝統的な手法では、化合物物性を利用した再誘導体化が使用されてきた。しかし、これらの手法には多くの欠点があり、特別な化学の必要性や誘導体中の二重結合の再配位可能性、クロマトグラム上での保持時間や溶出順の変動が挙げられる。これらの問題を回避するためには、脂肪酸メチルエステルの直接的な分析が必要となる。本テクニカルレポートでは、化学的に生成された標準試料ではなく、自然から抽出した混合試料から得られた結果を示す。

2. SMCIユニットを用いた共役結合付加化学イオン化

1999年に我々は、不飽和脂肪酸メチルエステルとアセトニトリルとの共役結合付加化学イオンを生成する分子反応から、CIDを経て二重結合位置を特定できる特徴的なイオンが生成できることを確認した^[2,3]。当時、この分析メソッドは、3次元イオントラップ質量分析計を用いて構築されてきた。3次元イオントラップ質量分析計は、四重極型質量分析計などの他の化学イオン化システムでは十分な蓄積が難しい揮発性の低い有機溶媒、アセトニトリル (CH₃CN) 由来の反応イオンを多くトラップできるため、本手法に適したシステムであった。しかしながら、3次元イオントラップ質量分析計は数年前に生産が終了している。

そこで島津製作所が、溶媒媒介化学イオン化 (Solvent Mediated Chemical Ionization; SMCI) ユニットを開発し、最新のトリプル四重極型質量分析計を用いて共役結合付加化学イオン化 (Covalent Adduct Chemical Ionization; CACI) が可能になった。有機溶媒が入った小さな容器内をアルゴン (Ar) ガスが加圧し、有機溶媒の気相部をCIガスバルブからCIイオン源部へと流し込むことで、化学イオン化反応を可能にする。

二重結合の位置解析には、アセトニトリル (CH₃CN) を使用する。CIイオン源内でアセトニトリル間の分子反応が起き、不飽和脂肪酸との反応イオンとなる *m/z* 54の(1-methylenimine)-1-ethenylum (MIE) が生成される。



このMIEイオンは二重結合と反応し、分子量に54付加されたイオン [M+54] が生成される。その [M+54] イオンをもってプロダクトイオンスキャンを実施することで、二重結合位置を推定できるフラグメンテーションパターンを得ることができる^[4]。逆方向からもMIEイオンが付加し、同様のCIDを経てフラグメントイオンを生成する。これらの特異な2イオンを確認することで、元の不飽和脂肪酸メチルエステル中の二重結合位置が解析可能となる^[5]。

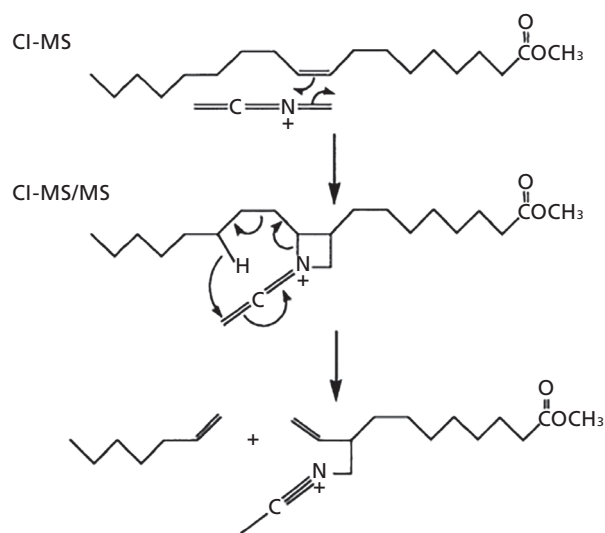


Fig. 1 monoeneとMIEイオンとの反応系

3. 分析条件

分析メソッドは、Table 1の条件を基にGCMS-TQ8050 NX (島津製作所) を用いて設定した。異性体間で違いが明瞭な例を、以下に示す。二重結合を一つ有する18:1n-9メチル化体と18:1n-7メチル化体は共に分子量が296であり、[M+54]イオンとして *m/z* 350を示す。そしてプロダクトイオンスキャンによって、それぞれ特異な2つのイオンが示されることで、これらの異性体を判別することが可能になる。二重結合解析に使用する2イオンを、エステル側とメチル基側をそれぞれ α 、 ω で示している。18:1n-9メチルでは α :252と ω :208、18:1n-7メチルでは α :280と ω :180になり、優位な違いを確認することができる。

Table 1 分析条件

GC-MS:	GCMS-TQ8050 NX
オートサンプラー:	AOC-20i+s
カラム:	BPX-70 (20 m × 0.22 mm I.D., df = 0.25 μm)
ガラスインサート:	Split-less Deactivated Liner w/ Low Wool
GC	
気化室温度:	250 °C
注入モード:	スプリットレス
カラムオープン温度:	80 °C → (25 °C/min) → 170 °C (4 min) → (7 °C/min) → 240 °C (10 min)
キャリアガス制御:	線速度一定 (47.2 cm/sec)
MS	
インターフェース温度:	240 °C
イオン源温度:	240 °C
イオン化法:	SMCI
測定モード:	プロダクトイオンスキャン
イベント時間:	0.3 sec

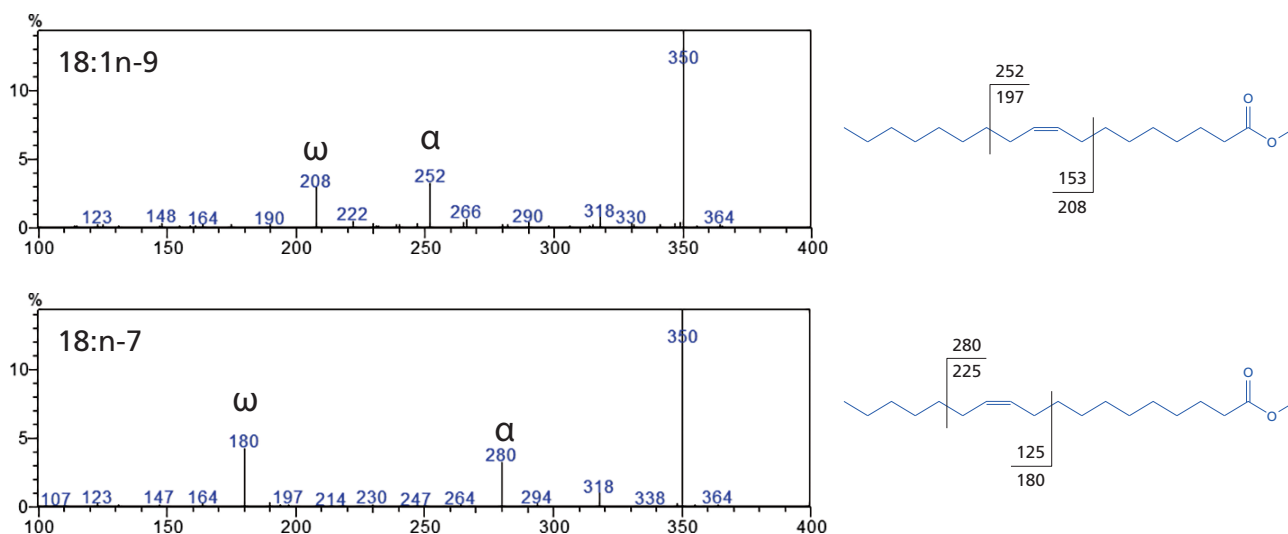


Fig. 2 不飽和脂肪酸メチルエステル (1価) のプロダクトイオンスキャンマススペクトル

4. 多価不飽和脂肪酸メチルエステル

多価不飽和脂肪酸メチルエステルのスキャンマススペクトルでは、一連の4、5イオンが確認でき、不飽和脂肪酸メチルエステルと他の化合物とを明確に区別することができる。リノール酸メチル (methyl 9Z,12Z-octadecaenoic acid) と、その共役異性体である 10E,12Z-オクタデカン酸メチル (methyl 10E,12Z-octadecaenoic acid) は共に、[MH-50]、[MH-32]、[MH]、[M+54-32]、[M+54] の5つのピークが得られる。これらのピークは化合物の信号強度が不十分な時にも有用であり、試料の前処理や注入時の不純物と区別することができる。これらの2価の不飽和脂肪酸メチルエステルで重要な点は、共役不飽和脂肪酸では[M+54]から32 (CH₃OH) 差し引いたピーク強度が大きくなる。つまり、[M+54]/[M+54-32] が1を超えると共役不飽和脂肪酸であると分かる^[3,6]。

ヒトや哺乳類の試料から最も測定された多価不飽和脂肪酸メチルエステルは、オメガ3とオメガ6脂肪酸である。主要な2つの異性体として、 α リノレン酸 (methyl 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoate (オメガ3)) と γ リノレン酸 (methyl 6Z,9Z,12Z-octadecatrienoate (オメガ6)) のプロダクトイオンスキャンマススペクトルを示す。両マススペクトル共に、強度の高い2つのイオン (α と ω) を確認することができる。

多価不飽和脂肪酸メチルエステルのプロダクトイオンスキャンマススペクトルにおいて、オメガ3脂肪酸はm/z 148が必ず ω イオンとして示されるため、判別に有用なものである。オメガ6脂肪酸では、m/z 190が特定の ω イオンとなる。これらの特性は、スキャンマススペクトルと同様に化合物の信号強度が不十分な時に有用である。

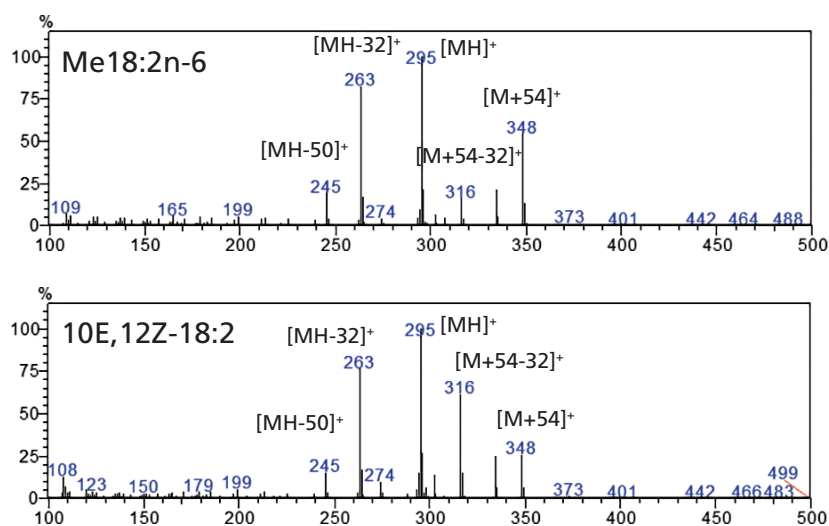


Fig. 3 多価不飽和脂肪酸メチルエステルのスキャンマススペクトル

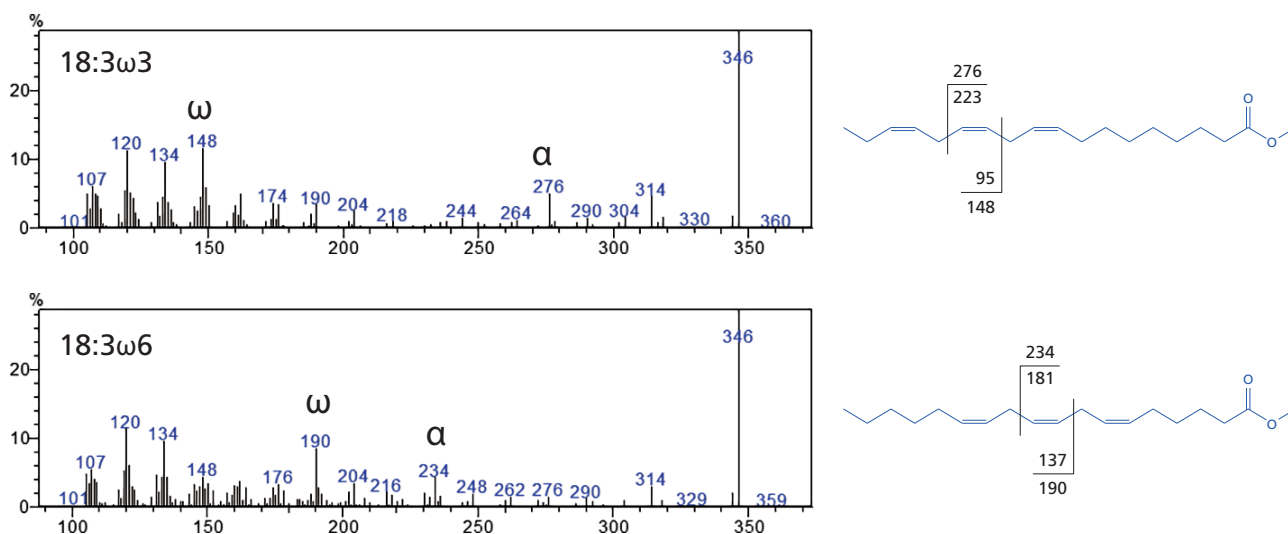


Fig. 4 α リノレン酸 (上) と γ リノレン酸 (下) のプロダクトイオンスキャンマススペクトル

5. 結論

SMCIユニットは、迅速かつ簡便に共役結合付加化学イオン化を実現し、スキャンおよびプロダクトイオンスキャンマススペクトルから不飽和脂肪酸メチルエステルの解析を可能にする。この手法を用いることで、標準試料が存在しない不飽和脂肪酸メチルエステルに対しても、明確に化学構造を解析することができる。

GCMS-NXシリーズ用オプション SMCIユニット

SMCI (Solvent Mediated Chemical Ionization) ユニットは、試薬ボトルに入れたメタノールなどの有機溶媒のヘッドスペースガスをGCMSイオン源に導入することでイオン化し、ターゲット成分へのプロトン付加による化学イオン化 (CI) を行います (特許出願中)。従来のCIは可燃性高圧ガスボンベを使用していましたが、SMCIはメタノールやアセトニトリルといった一般的な有機溶媒と窒素またはアルゴンガスを使用するため、安全性が高くランニングコストも低減できます。

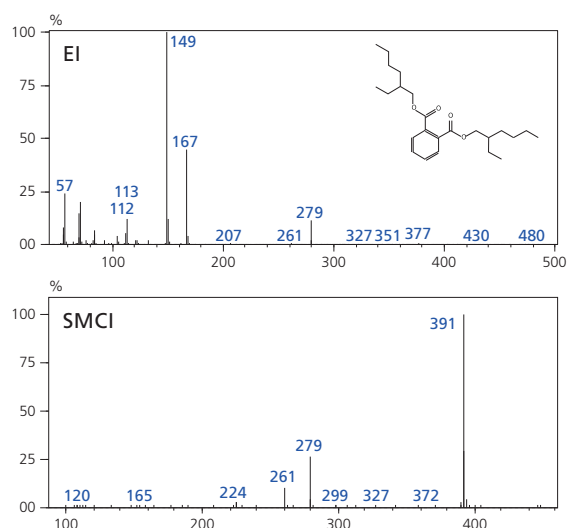


SMCI unit + GCMS-QP2020 NX

参考文献

- [1] Brenna, J.T., *Fatty acid analysis by high resolution gas chromatography and mass spectrometry for clinical and experimental applications*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2013. 16(5): p. 548-54.
- [2] Van Pelt, C.K. and J.T. Brenna, *Acetonitrile chemical ionization tandem mass spectrometry to locate double bonds in polyunsaturated fatty acid methyl esters*. *Anal Chem*, 1999. 71(10): p. 1981-9.
- [3] Michaud, A.L., et al., *Identification and characterization of conjugated fatty acid methyl esters of mixed double bond geometry by acetonitrile chemical ionization tandem mass spectrometry*. *Anal Chem*, 2003. 75(18): p. 4925-30.
- [4] Michaud, A.L., et al., *Double bond localization in minor homoallylic fatty acid methyl esters using acetonitrile chemical ionization tandem mass spectrometry*. *Anal Biochem*, 2002. 307(2): p. 348-60.
- [5] Van Pelt, C.K., B.K. Carpenter, and J.T. Brenna, *Studies of structure and mechanism in acetonitrile chemical ionization tandem mass spectrometry of polyunsaturated fatty acid methyl esters*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1999. 10(12): p. 1253-62.
- [6] Michaud, A.L., et al., *On the formation of conjugated linoleic acid diagnostic ions with acetonitrile chemical ionization tandem mass spectrometry*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005. 19(3): p. 363-8.

従来のCI代替法と比べて化合物依存性が低く、CIと同等の結果が得られます。例えば、フタル酸エステル類はEI法やCI代替法では分子量の確認が困難でしたが、SMCI法を用いることにより疑似分子イオンを確認できます。



各イオン化法を使用した場合の
Bis(2-ethylhexyl) phthalate のマススペクトル (MW:390)

GCMS、GCMS-TQは、株式会社島津製作所の商標です。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <https://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。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。

初版発行：2020年2月
© Shimadzu Corporation, 2020