

## Smart EI/CIイオン源を用いた脂肪酸メチルエステル(FAMES)の定量分析

坂本 雄紀 川北 祥人

### ユーザーベネフィット

- ◆ PCI-MRMは不飽和脂肪酸に対してEI-MRMよりも感度が向上し、脂肪酸分析に最適です。
- ◆ Smart EI/CIイオン源は装置を止めずにEIとPCIのイオン化法を切り替えられます。
- ◆ Smart Metabolites Databaseと脂肪酸メチル化キットを利用することにより、食品中脂肪酸分析が簡単に行えます。

### ■はじめに

脂肪酸は脂質を構成する成分であり、生物にとってエネルギー代謝や栄養素として欠かせない成分です。脂肪酸分析は長い歴史があり、医学用途では、病気の予測や健康状態の把握の目的で、食品用途では、開発商品の高品質化・高機能化を目的として測定されています。

脂肪酸は、カルボキシル基を有することから、そのままGC-MS(/MS)で測定することは難しく、メチル誘導体化を行い脂肪酸メチルエステル(FAMES)にして測定を行います。

FAMESは、炭素鎖の長さの違いや二重結合の数および位置の違いなど多数の種類があります。EIはGC-MSで一般的に利用されるイオン化法ですが、FAMESにおいてはイオン化の際にフラグメンテーションしやすく、低質量の類似したイオンが多数検出されることから、感度と分離が要求されます。一方、PCI(正化学イオン化法)は試薬ガスを用いた間接的なイオン化法であることから、プロトン付加分子を検出しやすいため、分子量の異なる質量分離には有効ですが、異性体の分離はクロマトグラム上で行う必要があります。GC-MS(/MS)のCI-MRMは、イオン化したプロトン付加分子をCIDすることでフラグメンテーションするため、夾雑物やFAMES同士の質量分離が向上します。

本アプリケーションでは、EI-MRMとCI-MRMの感度及び定量精度について比較した結果を紹介します。

### ■ Smart Metabolites Database

Smart Metabolites Databaseは、メタボロミクス解析に必要な代謝成分の分析条件、SIMおよびMRMトランジションがあらかじめ最適化されたデータベースです。マーカー探索用途の代謝成分一斉分析用メソッドには、有機酸、アミノ酸、脂肪酸などの代謝成分が600成分以上登録されています。また、化合物別の定量用メソッドとして、脂肪酸メチルエステル(FAMES)の分析メソッドを用意しています。DB-5MS用のメソッドでは、50成分のFAMESが登録されており、EIおよびPCIの2種類のイオン化法で利用できます。

### ■ Smart EI/CIイオン源

Smart EI/CIイオン源は、EIの感度をなるべく低下させずに、PCIも測定可能なハイブリッドなイオン源です。これまでEIとCIの切り替えには、イオン源を交換するためにGC-MSの真空を解除する必要がありました。Smart EI/CIイオン源は、メソッドファイルを選択するだけで、イオン化法を切り替えることができるため、装置のダウンタイムを大幅に短縮することが可能です。

### ■実験

食品中の脂肪酸分析において、EI-MRMとPCI-MRMの感度および定量精度の比較を行いました。また、PCI専用イオン源とSmart EI/CIイオン源を用いたPCI-MRMの感度比較を行いました。

FAMESの標準溶液は、37成分のFAMESが含有されているFAME Reference Standard (AccuStandard Inc., cat.: FAMQ-005)を段階希釈して調製しました。

食品試料は、市販されている牛肉およびサバを準備しました。ホモジナイズおよび凍結乾燥後、50 mg量り取り、アセトン2 mLを添加して攪拌、遠心分離後に抽出溶液を回収しました。さらに残渣にヘキサン2 mLを添加し、攪拌、遠心分離後に抽出溶液を回収しました。その後、アセトンおよびヘキサン抽出液を混ぜ合わせ、イオン交換水2 mL添加後、攪拌および遠心分離を行い、上相を回収して乾固しました。乾固した試料はナカライテスク社の脂肪酸メチル化キットを用いて前処理を行いました。抽出試料はヘキサンで100倍希釈して測定を行いました。分析条件は表1に示します。

表1. 装置構成および分析条件

GC-MS	: GCMS-TQ8050 NX
オートインジェクタ	: AOC-30i / 20s U
カラム	: DB-5MS (30 m, 0.25 mm I.D., 0.25 μm)
[GC]	
気化室温度	: 250°C
カラムオープン温度	: 40°C (2 min) → (6°C/min) → 320°C (1 min)
注入モード	: スプリットレス
サンプリング時間	: 1 min
キャリアガス	: He
キャリアガス制御	: 線速度一定 (50.0 cm/sec)
注入量	: 1 μL
[MS]	
イオン源温度	: 200°C
インターフェイス温度	: 280°C
データ採取モード	: MRM
イベント時間	: 0.5 sec
イオン化法(PCIイオン源)	
イオン化	: PCI
試薬ガスおよび圧力	: イソブタン (80 kPa)
イオン化法(Smart EI/CIイオン源)	
イオン化	: PCI
試薬ガスおよび圧力	: イソブタン (200 kPa)

## ■ PCI-MRMの感度比較

PCI専用イオン源とSmart EI/CIイオン源においてPCI-MRMの感度について比較を行いました。代表的な成分として、0.01  $\mu\text{g/mL}$ の濃度の標準試料を測定したカプリル酸メチルエステル(C8)とパルミチン酸メチルエステル(C16)のMRMクロマトグラムを図1に示します。S/NはPeak-to-Peak法で算出しました。対象成分によって多少の差はありますが、Smart EI/CIイオン源におけるPCIの感度は、PCI専用イオン源とほぼ同等に近い感度を有していると言えます。

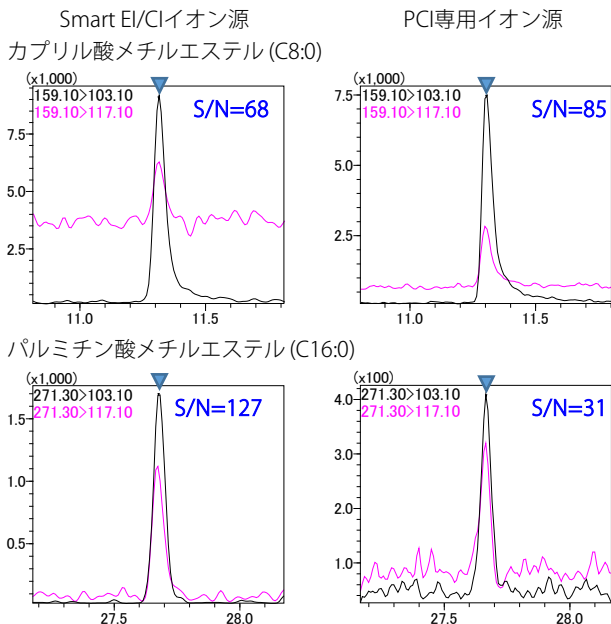


図1. PCI専用イオン源およびSmart EI/CIイオン源で採取したMRMクロマトグラム

## ■ EI-MRMとPCI-MRMの感度比較

続いてSmart EI/CIイオン源のPCI-MRMとEI-MRMの感度について比較を行いました。図2に代表的なMRMクロマトグラムの比較結果を示します。S/NはPeak-to-Peak法で算出し、S/N=10の濃度を定量限界(LOQ)としました。表2に37成分のFAMESにおけるPCIおよびEIのLOQを示します。飽和脂肪酸に関しては、EI-MRMの方が若干感度が良い結果となりましたが、不飽和脂肪酸に関しては、PCI-MRMの方が良い結果となり、特に二重結合を1つ含むFAMESでは、10倍以上感度が良くなる化合物もありました。

表2. 37成分のFAMESにおけるPCI-MRMおよびEI-MRMのLOQ

	Compound Name	CI MRM LOQ (pg)	EI MRM LOQ (pg)
1	Methyl butanoate (C4:0)	0.7	0.4
2	Methyl caproate (C6:0)	0.4	0.7
3	Methyl caprylate (C8:0)	2.9	1.4
4	Methyl caprate (C10:0)	2.5	2.0
5	Methyl undecanoate (C11:0)	2.5	2.0
6	Methyl laurate (C12:0)	6.9	3.9
7	Methyl tridecanoate (C13:0)	4.5	5.6
8	Methyl myristate (C14:0)	2.8	0.9
9	Methyl myristoleate (Z) (C14:1n-5)	0.2	4.8
10	Methyl pentadecanoate (C15:0)	2.8	0.9
11	Methyl cis-10-pentadecanoate (Z) (C15:1n-5)	0.2	5.9
12	Methyl palmitate (C16:0)	2.6	0.8
13	Methyl palmitoleate (Z) (C16:1n-7)	1.4	4.8
14	Methyl margarate (C17:0)	3.2	1.1
15	Methyl cis-10-heptadecanoate (Z) (C17:1n-7)	0.9	7.7
16	Methyl stearate (C18:0)	4.8	1.3
17	Methyl elaidate (E) (C18:1n-9)	0.6	9.7
18	Methyl oleate (Z) (C18:1n-9)	0.4	6.5
19	Methyl linoleaidate (E) (C18:2n-6)	1.5	8.9
20	Methyl linoleate (Z) (C18:2n-6)	2.6	16.9
21	Methyl arachisate (C20:0)	1.4	2.3
22	Methyl gamma-linolenate (Z) (C18:3n-6)	5.7	5.6
23	Methyl cis-11-icosenoate (Z) (C20:1n-9)	0.7	6.3
24	Methyl linolenate (Z) (C18:3n-3)	13.2	47.6
25	Methyl heneicosanoate (C21:0)	0.8	2.1
26	Methyl cis-11,14-icosadienoate (Z) (C20:2n-6)	6.3	22.2
27	Methyl behenate (C22:0)	2.2	4.4
28	Methyl eicosa-8,11,14-trienoate (C20:3n-6)	14.7	16.9
29	Methyl erucate (C22:1n-9)	0.5	35.7
30	Methyl cis-11,14,17-icosatrienoate (Z) (C20:3n-3)	24.4	31.3
31	Methyl tricosanoate (C23:0)	5.0	6.3
32	Methyl arachidonate (Z) (C20:4n-6)	20.4	34.5
33	Methyl cis-13,16-Docosadienoate (Z) (C22:2n-6)	4.6	41.7
34	Methyl lignocerate (C24:0)	6.5	9.1
35	Methyl cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoate (Z) (C20:5n-3)	42.0	138.9
36	Methyl nervonate (Z) (C24:1n-9)	2.1	50.0
37	Methyl cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoate (Z) (C22:6n-3)	59.5	68.5

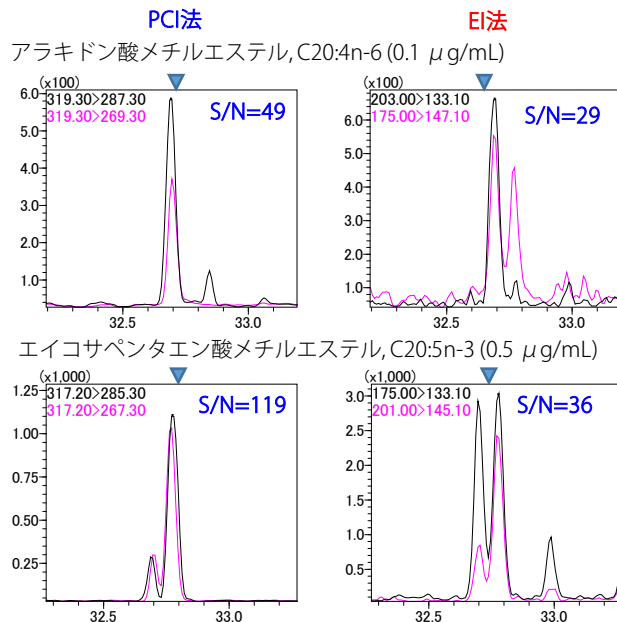
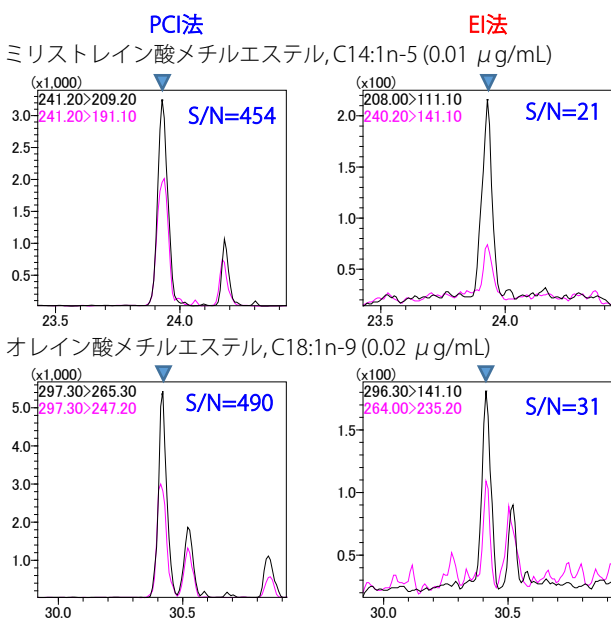


図2. PCIおよびEI法で採取したMRMクロマトグラム

## ■ 検量線の直線性

Smart EI/CIイオン源のPCI-MRMとEI-MRMの検量線の直線性について比較を行いました。PCI-MRMで採取した代表的な検量線としてパルミチン酸メチルエステル(C16:0)およびドコサヘキサエン酸メチルエステル(C22:6n-3)の検量線を図3に、37成分のFAMESにおけるPCI-MRMとEI-MRMの寄与率(R<sup>2</sup>)および検量線範囲の比較結果を表3にそれぞれ示します。

PCI-MRMで採取した検量線の寄与率は0.995以上であり、EI-MRMで採取した検量線とほぼ同等の結果が得られました。

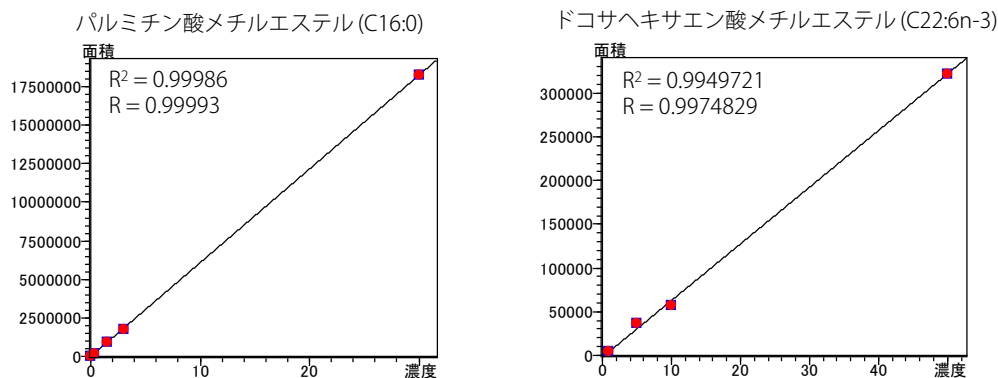


図3. PCI法で採取したパルミチン酸メチルエステルとドコサヘキサエン酸メチルエステルの検量線

表3. 37成分のFAMESにおけるCI-MRMおよびEI-MRMのLOQ

ID	Compound Name	CI		EI	
		R <sup>2</sup>	Calibration Range	R <sup>2</sup>	Calibration Range
1	Methyl butanoate (C4:0)	0.9989	0.02~10	0.9998	0.02~10
2	Methyl caproate (C6:0)	0.9992	0.02~10	0.9995	0.02~2
3	Methyl caprylate (C8:0)	0.9998	0.02~10	0.9997	0.02~20
4	Methyl caprate (C10:0)	0.9999	0.02~10	0.9991	0.02~100
5	Methyl undecanoate (C11:0)	0.9995	0.01~10	0.9996	0.01~50
6	Methyl laurate (C12:0)	0.9982	0.02~10	0.9999	0.02~100
7	Methyl tridecanoate (C13:0)	0.9997	0.01~10	0.9997	0.01~50
8	Methyl myristate (C14:0)	0.9997	0.02~20	0.9999	0.02~20
9	Methyl myristoleate (Z) (C14:1n-5)	0.9990	0.01~10	0.9996	0.01~50
10	Methyl pentadecanoate (C15:0)	0.9998	0.01~10	0.9995	0.01~50
11	Methyl cis-10-pentadecanoate (Z) (C15:1n-5)	0.9995	0.01~10	0.9995	0.01~50
12	Methyl palmitate (C16:0)	0.9999	0.03~30	0.9999	0.03~30
13	Methyl palmitoleate (Z) (C16:1n-7)	0.9997	0.01~10	0.9993	0.01~50
14	Methyl margarate (C17:0)	0.9992	0.01~10	0.9992	0.01~50
15	Methyl cis-10-heptadecanoate (Z) (C17:1n-7)	0.9999	0.01~10	0.9990	0.01~50
16	Methyl stearate (C18:0)	0.9993	0.02~20	0.9990	0.02~100
17	Methyl elaidate (E) (C18:1n-9)	0.9999	0.01~10	0.9997	0.01~50
18	Methyl oleate (Z) (C18:1n-9)	0.9999	0.02~20	0.9989	0.02~20
19	Methyl linolelaidate (E) (C18:2n-6)	0.9991	0.1~50	0.9989	0.1~50
20	Methyl linoleate (Z) (C18:2n-6)	0.9988	0.01~50	0.9994	0.1~50
21	Methyl arachisate (C20:0)	0.9984	0.02~20	0.9992	0.02~100
22	Methyl gamma-linolenate (Z) (C18:3n-6)	0.9995	0.1~50	0.9973	0.01~50
23	Methyl cis-11-icosenoate (Z) (C20:1n-9)	0.9982	0.01~10	0.9996	0.1~50
24	Methyl linolenate (Z) (C18:3n-3)	0.9996	0.1~50	0.9996	0.1~50
25	Methyl heneicosanoate (C21:0)	0.9981	0.01~50	0.9976	0.01~50
26	Methyl cis-11,14-Icosadienoate (Z) (C20:2n-6)	0.9984	0.1~50	0.9990	0.1~50
27	Methyl behenate (C22:0)	0.9989	0.02~100	0.9986	0.02~100
28	Methyl eicosa-8,11,14-trienoate (C20:3n-6)	0.9995	0.1~50	0.9996	0.1~50
29	Methyl erucate (C22:1n-9)	0.9988	0.01~50	0.9970	0.1~50
30	Methyl cis-11,14,17-Icosatrienoate (Z) (C20:3n-3)	0.9990	0.1~50	0.9995	0.1~50
31	Methyl tricosanoate (C23:0)	0.9979	0.1~50	0.9980	0.1~50
32	Methyl arachidonate (Z) (C20:4n-6)	0.9989	0.1~50	0.9992	0.1~50
33	Methyl cis-13,16-Docosadienoate (Z) (C22:2n-6)	0.9983	0.1~50	0.9989	0.1~50
34	Methyl lignocerate (C24:0)	0.9995	0.2~100	0.9977	0.2~100
35	Methyl cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoate (Z) (C20:5n-3)	0.9971	0.5~50	0.9988	0.1~50
36	Methyl nervonate (Z) (C24:1n-9)	0.9993	0.1~50	0.9998	0.5~50
37	Methyl cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoate (Z) (C22:6n-3)	0.9950	0.5~50	0.9986	0.5~50

## ■ 食品試料での適応例

食品試料として牛肉およびサバを脂肪酸メチル化キットを用いて処理し、EI-MRMとPCI-MRMで測定しました。EI-MRMおよびCI-MRMでそれぞれ作成した検量線から食品試料中濃度を算出しました。牛肉試料の定量結果およびPCI/EI濃度比率を表4に、サバ試料の定量結果およびPCI/EI濃度比率を表5にそれぞれ示します。PCI法による定量結果は、EI-MRMの定量結果を基準とすると、±30%以内に収まり、定量精度はほとんど変わらないと言えます。また、牛肉試料において、リノレン酸メチルエステル(C18:3n-3)のPCI/EI濃度比率が146.9%でしたが、EIの結果において抽出液中の濃度が定量限界付近であったことが原因として考えられます。

表4. 牛肉試料のFAMES定量結果

化合物名	PCI濃度 (ug/mg)	EI濃度 (ug/mg)	PCI/EI濃度比率 (%)
Methyl caprate (C10:0)	0.06	0.06	100.0
Methyl laurate (C12:0)	0.14	0.13	107.7
Methyl tridecanoate (C13:0)	0.02	0.02	100.0
Methyl myristoleate (Z) (C14:1n-5)	4.00	3.65	109.6
Methyl myristate (C14:0)	5.91	6.05	97.7
Methyl cis-10-pentadecanoate (Z) (C15:1n-5)	0.07	0.07	100.0
Methyl pentadecanoate (C15:0)	0.69	0.58	119.0
Methyl palmitoleate (Z) (C16:1n-7)	12.67	12.77	99.2
Methyl palmitate (C16:0)	51.48	52.49	98.1
Methyl cis-10-heptadecanoate (Z) (C17:1n-7)	2.49	2.22	112.2
Methyl margarate (C17:0)	1.55	1.36	114.0
Methyl linoleate (Z) (C18:2n-6)	7.22	6.43	112.3
Methyl linolenate (Z) (C18:3n-3)	0.47	0.32	146.9
Methyl oleate (Z) (C18:1n-9)	77.76	84.57	91.9
Methyl elaidate (E) (C18:1n-9)	7.40	7.19	102.9
Methyl stearate (C18:0)	17.16	17.18	99.9
Methyl eicosa-8,11,14-trienoate (C20:3n-6)	0.30	0.29	103.4
Methyl cis-11,14-icosadienoate (Z) (C20:2n-6)	0.13	0.16	81.3
Methyl cis-11-icosenoate (Z) (C20:1n-9)	0.89	0.87	102.3
Methyl arachisate (C20:0)	0.11	0.11	100.0

表5. サバ試料のFAMES定量結果

	PCI濃度 (ug/mg)	EI濃度 (ug/mg)	PCI/EI濃度比率 (%)
Methyl caprate (C10:0)	0.01	0.01	100.0
Methyl laurate (C12:0)	0.07	0.07	100.0
Methyl tridecanoate (C13:0)	0.05	0.05	100.0
Methyl myristoleate (Z) (C14:1n-5)	0.04	0.05	80.0
Methyl myristate (C14:0)	6.02	6.32	95.3
Methyl cis-10-pentadecanoate (Z) (C15:1n-5)	0.05	0.04	125.0
Methyl pentadecanoate (C15:0)	0.74	0.65	113.8
Methyl palmitoleate (Z) (C16:1n-7)	4.98	4.88	102.0
Methyl palmitate (C16:0)	36.77	38.16	96.4
Methyl cis-10-heptadecanoate (Z) (C17:1n-7)	0.63	0.56	112.5
Methyl margarate (C17:0)	1.11	0.95	116.8
Methyl gamma-linolenate (Z) (C18:3n-6)	0.27	0.21	128.6
Methyl linoleate (Z) (C18:2n-6)	2.43	2.50	97.2
Methyl linolenate (Z) (C18:3n-3)	1.15	1.21	95.0
Methyl oleate (Z) (C18:1n-9)	42.43	41.62	101.9
Methyl elaidate (E) (C18:1n-9)	5.98	5.59	107.0
Methyl stearate (C18:0)	10.26	10.54	97.3
Methyl arachidonate (Z) (C20:4n-6)	1.19	1.31	90.8
Methyl cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoate (Z) (C20:5n-3)	11.46	13.45	85.2
Methyl eicosa-8,11,14-trienoate (C20:3n-6)	0.30	0.30	100.0
Methyl cis-11,14-icosadienoate (Z) (C20:2n-6)	0.46	0.46	100.0
Methyl cis-11,14-icosatrienoate (Z) (C20:3n-3)	0.30	0.35	85.7
Methyl cis-11-icosenoate (Z) (C20:1n-9)	4.74	4.96	95.6
Methyl arachisate (C20:0)	0.38	0.37	102.7
Methyl heneicosanoate (C21:0)	0.07	0.07	100.0
Methyl cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoate (Z) (C22:6n-3)	32.85	31.96	102.8
Methyl erucate (C22:1n-9)	0.80	0.92	87.0
Methyl behenate (C22:0)	0.17	0.18	94.4
Methyl nervonate (Z) (C24:1n-9)	1.38	1.42	97.2
Methyl lignocerate (C24:0)	0.38	0.45	84.4

## ■ まとめ

食品中の脂肪酸の定量分析において、PCI-MRMはEI-MRMよりも高感度で検出可能であり、定量精度もEI-MRMと遜色ないイオン化法です。PCIはこれまで専用イオン源に交換する必要があることが大きなデメリットでしたが、Smart EI/CIイオン源を用いることにより、装置を止めずにEIとPCIを切り替えることができます。

GCMS-TQおよびSmart Metabolites Databaseは、株式会社島津製作所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

01-00343-JP 初版発行：2022年 3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

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>

会員情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただきますと、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, 2022