

探針エレクトロスプレーイオン化キット DPiMS™ QT
酸素付着解離MS/MSオプションキット OAD RADICAL SOURCE I
高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS™-9050

DPiMS QTとOAD-TOFによるバター中トリアシルグリセロールの二重結合位置解析

荒尾 洋平、鈴木 悠希、高橋 秀典

ユーザーベネフィット

- ◆ DPiMS QTによる定性スクリーニングは前処理時間約5分、測定時間約0.5分で実施できます。
- ◆ OAD RADICAL SOURCE Iの特異的なフラグメンテーションにより化合物の二重結合位置を特定することが可能です。
- ◆ 高い質量精度でフラグメントイオンを検出でき、高い確度で二重結合位置の同定が可能です。

■はじめに

脂質は脂肪酸を主要な構成要素としており、食品では炭水化物、たんぱく質、ビタミンやミネラルと並び重要な栄養素の一つで、生体機能に大きな影響を与えています。脂肪酸はグリセリンに3つの脂肪酸がエステル結合したトリアシルグリセロール(TG)と呼ばれる脂質の形で体内に蓄えられます。食品から摂取する脂質のほとんどはTGで、構成される脂肪酸の種類により生体に及ぼす影響が異なるため、食品中の脂質の量だけでなく、TGを構成する脂肪酸の種類にも注目が集まっています。

脂肪酸は構造の違いにより二重結合を持たない飽和脂肪酸と二重結合を持つ不飽和脂肪酸に分類され、不飽和脂肪酸については同じ組成を持つものでも二重結合位置の違いにより生体へ及ぼす機能が異なると考えられています。そのため、食品に含まれる脂質中の二重結合位置を知ることは、その食品が生体へ与える影響を知るために非常に重要となります。

■OADについて

脂質二重結合位置の同定は、生体への影響を研究するという観点から、リポミクスの新しい切り口として急速に発展してきています。島津製作所はOxygen Attachment Dissociation[®](OAD)という独自の新しいフラグメンテーション技術を搭載したOAD-TOFシステム*により、誘導体化などの前処理無しで二重結合位置特異的なフラグメントイオンを生成し、化合物の二重結合位置を同定する技術を開発しました。OADの原理を図1に示します。

今回は、Probe electrospray ionization (PESI)分析を実現する探針エレクトロスプレーイオン化キットDPiMS QTとOAD-TOFシステム*の組合せにより、クロマトグラフィーによる分離を伴わない直接イオン化法で保持時間情報を用いることなく、バターに含まれるTGの二重結合位置を含む構造の同定ができましたのでご紹介します。

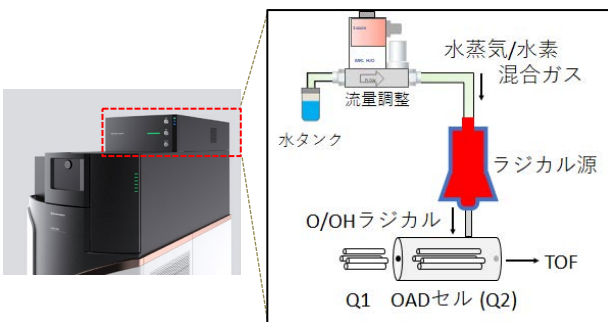


図1 OADの原理

* OAD-TOFシステム: OAD RADICAL SOURCE Iを搭載したLCMS-9050

OAD分析を可能にするOAD-TOFシステムはCID、OADいずれのモードでも分析することができ、ソフトウェア上で簡単に切り替えることが可能です。また、DPiMS QTの脱着もおおよそ15秒で完了します。

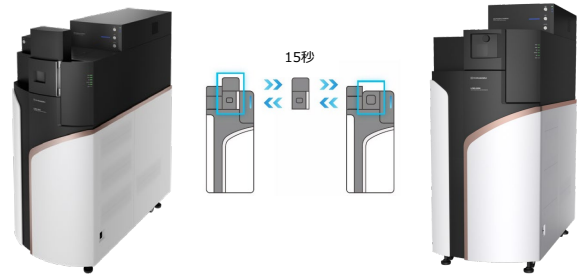


図2 DPiMS™ QT搭載OAD-TOFシステム (左) および OAD-TOFシステム (右)

■分析条件

DPiMS QTは探針によるサンプリングとイオン化を高速で繰り返し行いますが、1回あたりのサンプリング量が数pL程度と極微量であることから、装置汚染のリスクが低くLC-Q-TOF分析と比較して簡便な前処理で迅速に分析できることが大きな特長の一つです。

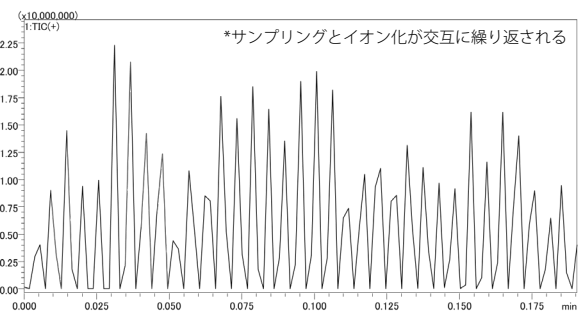


図3 DPiMS QTで取得したバター抽出物のMS1信号強度

今回の分析システムの分析条件を表1に示しました。DPiMS QTとOAD-TOFシステムを組み合わせることにより、簡便な前処理から分析時間0.5 minと短時間で迅速に分析を実行することができました。

表1 DPiMS QTとOAD-TOFシステムの分析条件

System	: DPiMS QT + LCMS-9050 + OAD RADICAL SOURCE I
Polarity	: Positive
DL temp	: 250 °C
Heat block temp	: 50 °C
Interface Voltage	: 3.0 kV
CE	: 20 V(CID), 5 V(OAD)
TOF-MS	: m/z 100-1000
Measurement Time	: 0.5 min

■ バターの前処理

今回、市販のバターに含まれるTGを分析するために行った前処理方法を図4に示しました。バター200 mgを量り取り1.5 mL マイクロチューブに移し、そこへ超純水/イソプロパノール = 20/80 (v/v)を1 mL加えて40°Cで5分間超音波による攪拌を行いました。遠心分離後、上清を10 µL採り、DPiMS専用の液体試料用プレートに滴下し分析に供しました。

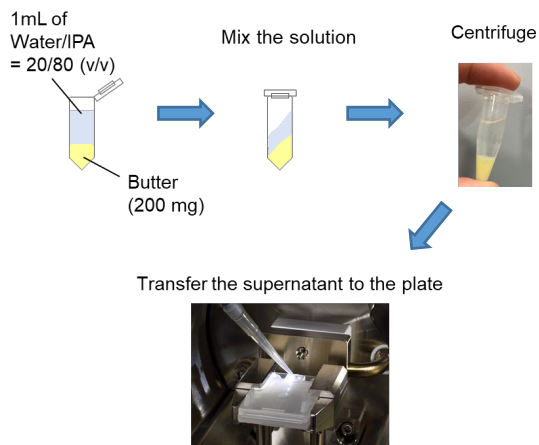


図4 バターの前処理フロー

■ バター中TG候補の抽出

バターの抽出液をDPiMS QTによりMS1分析した結果を図5に示します。得られたデータファイル(拡張子: .lcd)をMS-DIAL²⁾ (ver.5.1.230517)へ転送してプリカーサーイオンのm/z情報から脂質の帰属を行いました。MS-DIALにより得られたバター抽出液に含まれるTGの候補を表2に示し、解析時の設定項目を図6に示しました。表2から、今回は例としてTG 38:2およびTG 38:1を実行し、詳細な構造情報を解析するためCIDおよびOAD分析を実行し、得られたMS/MSスペクトルから同定を行いました。

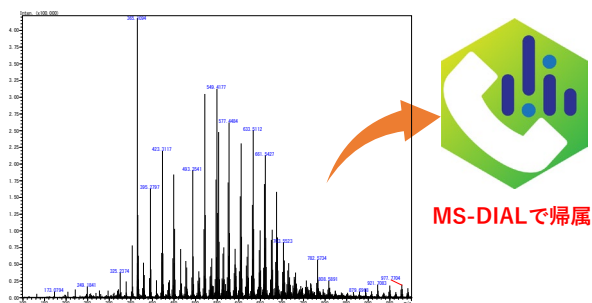


図5 DPiMS QTで取得したバター抽出液のMSスペクトル

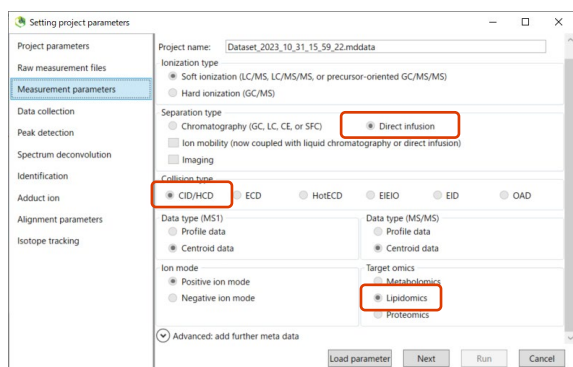


図6 MS-DIALによるPESIデータ解析時の設定項目

表2 MS-DIALにより得られたバター抽出液に含まれるTGの候補一覧

MS1 (m/z)	Adduct	Predicted Structure
493.3504	[M+Na] ⁺	TG 24:0
521.3825	[M+Na] ⁺	TG 26:0
535.3969	[M+Na] ⁺	TG 27:0
549.4146	[M+Na] ⁺	TG 28:0
563.4274	[M+Na] ⁺	TG 29:0
575.4286	[M+Na] ⁺	TG 30:1
577.4457	[M+Na] ⁺	TG 30:0
591.4584	[M+Na] ⁺	TG 31:0
603.4599	[M+Na] ⁺	TG 32:1
605.4765	[M+Na] ⁺	TG 32:0
631.4913	[M+Na] ⁺	TG 34:1
633.5084	[M+Na] ⁺	TG 34:0
657.507	[M+Na] ⁺	TG 36:2
659.5223	[M+Na] ⁺	TG 36:1
661.5384	[M+Na] ⁺	TG 36:0
673.5362	[M+Na] ⁺	TG 37:1
685.5381	[M+Na]⁺	TG 38:2
687.5538	[M+Na]⁺	TG 38:1
689.5681	[M+Na] ⁺	TG 38:0
713.5682	[M+Na] ⁺	TG 40:2
715.5845	[M+Na] ⁺	TG 40:1

■ CIDによる脂質サブクラスの決定

バター抽出液中のTG 38:1およびTG 38:2をDPiMS QTのCIDモードでMS/MS分析し、ニュートラルロスからTGを構成しているそれぞれの脂肪酸鎖長および二重結合数の同定を行いました。図7にそれぞれのMS/MSスペクトルを示し、図中に各脂肪酸を帰属したスペクトルピーク上に脂肪酸鎖長および二重結合数の情報を記しました。

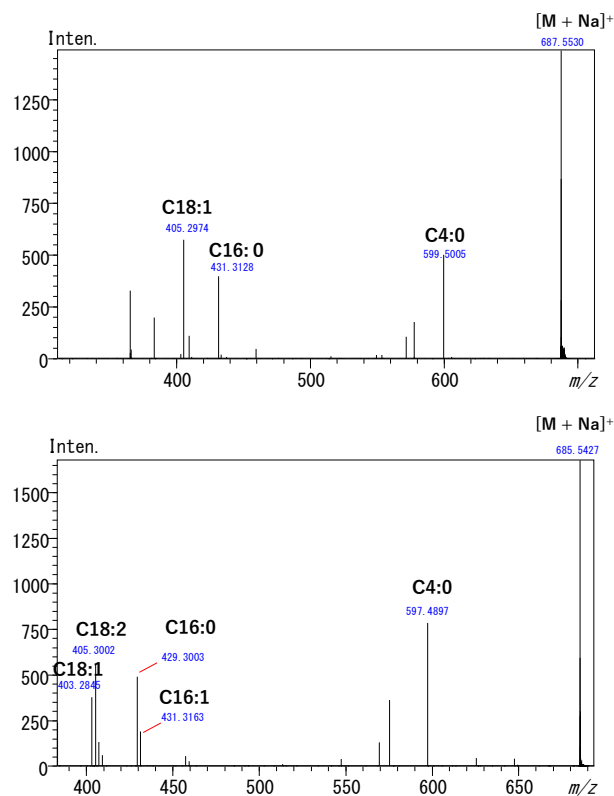


図7 CIDモードで取得したバター抽出液中のTG 38:1のMS/MSスペクトル(上)と TG 38:2のMS/MSスペクトル(下)

■ OADによる脂肪酸中の二重結合位置の同定

OADでは二重結合周辺で規則性をもったフラグメンテーションが起こることによって二重結合位置を同定することが可能です。バター抽出液中のTG 38:1およびTG 38:2をOADモードでMS/MS分析し、TGを構成しているそれぞれの脂肪酸の二重結合位置の同定を行いました。図8にOADによるイオン開裂の例を示しました。OADにより二重結合に隣接するC-C結合の開裂が起こることによって、二重結合位置を同定することが可能となります。実際に不飽和脂肪酸が含まれる脂質をOADで分析した際に得られる特異的なフラグメントイオンと二重結合位置の関係性を表3に示しました。分析で得られたTG38:1とTG38:2のMS/MSスペクトルをそれぞれ図9および図10に示しました。また、TG 38:2についてはCIDモードでのニュートラルロス(NL)の結果から、プリカーサーイオンが同じ2つの化合物が混在していると推定されたため、両化合物の二重結合位置の同定を行いました。

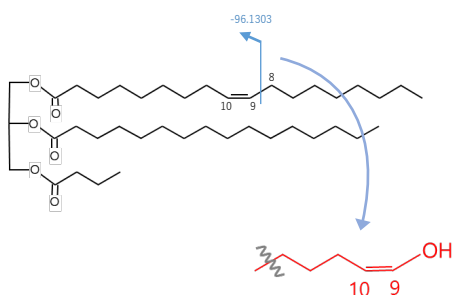


図8 OADによる脂質のフラグメンテーション例

表3 OADにより得られるNLの予測

First Double bond	n-	NL [Da]	First Double bond	n-	NL [Da]
n-6	6	-54.0833	n-9	9	-96.1303
	9	-94.1157		12	-136.1626
	12	-134.1481		15	-178.1951
n-7	7	-68.0990	-	-	-

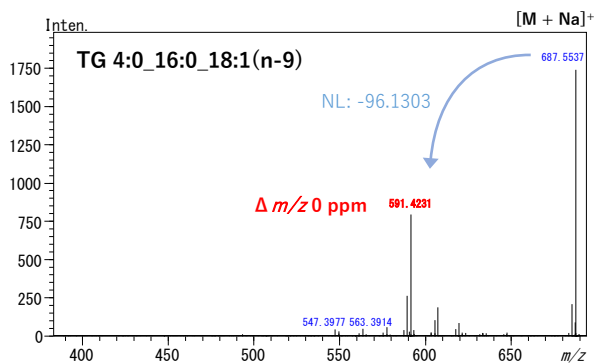


図9 OADモードで取得したバター中TG 38:1のMS/MSスペクトルと二重結合位置の同定

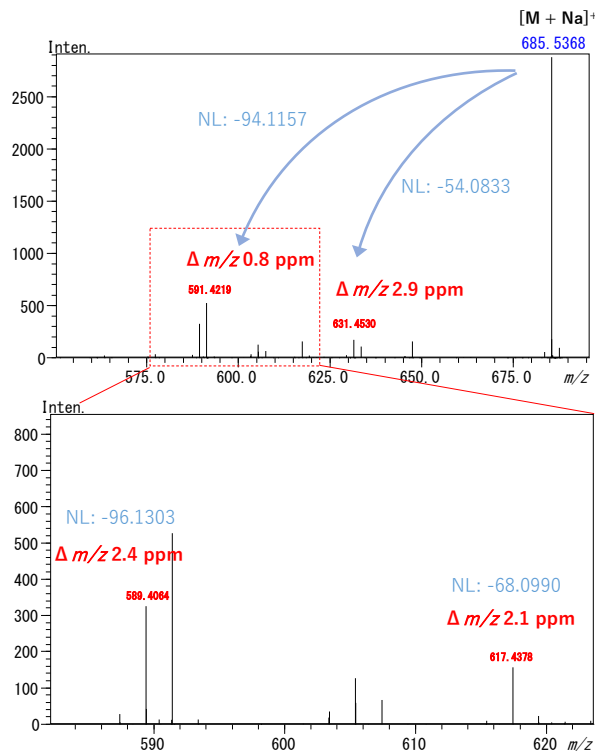


図10 OADモードで取得したバター中TG 38:2のMS/MSスペクトル

CIDとOADの分析結果より、TG 38:1およびTG38:2は図11に示した構造であることが同定できました。

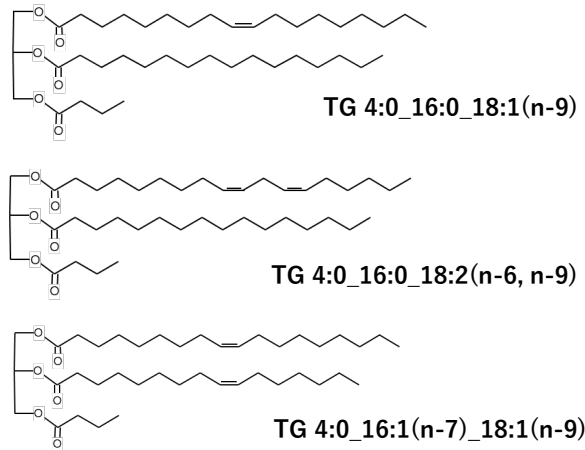


図11 CIDとOADにより同定されたバター中のTG38:1およびTG38:2

■ まとめ

DPIMS-QTとOAD-TOFシステムを組み合わせることにより、迅速にバターに含まれるTGの二重結合を含む構造の同定を行いました。LCMS-9050の質量精度の高さから、ニュートラルロスを容易に確認でき、確度の高い同定結果が得られました。

<参考文献>

- 1) H. Uchino, *et al.*, *Communications Chemistry*, **5**, 162 (2022)
- 2) H. Tsugawa, *et al.*, *Nature Methods*, **12**, 523-526 (2015)

DPIMS、LCMS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。

＞ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



＞ OAD-TOFシステム



＞ DPiMST™ QT

探針エレクトロスプレーイオン化キット



＞ LCMS-9050

四重極飛行時間型質量分析計

関連分野

＞ 食品・飲料

＞ 食品の栄養表示・機能性成分表示

＞ 価格お問い合わせ

＞ 製品お問い合わせ

＞ 技術お問い合わせ

＞ その他お問い合わせ