

トリプル四重極質量分析計を用いた ヒト血中の遊離脂肪酸プロファイリング

鈴木 悠希、長野 直子、山田 真希

ユーザーベネフィット

- ◆ 簡便な前処理で、血中の遊離脂肪酸19成分の一斉分析が可能です。
- ◆ ディレイカラムによりシステム中の夾雑成分を分離できます。
- ◆ CoreSpray技術を搭載し、安定性・信頼性の高いLCMS-8060RXを使用することで、微量な定量分析が可能です。

■はじめに

遊離脂肪酸は、生体中の総脂肪酸の5%程度ですが、インスリン分泌などの機能調節に働く重要なシグナル伝達物質であることが知られています¹⁾。また、様々な内分泌疾患のバイオマーカーとしても注目されています。

遊離脂肪酸の分析は、一般に、分析前にメチルエステル化などの前処理を施したガスクロマトグラフィー (GC) やガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) で行われますが、長鎖脂肪酸や多価不飽和脂肪酸は誘導体化をしないとそのままでは検出できません。LC/MSを用いた多重反応モニタリング (MRM) では、誘導体化することなく脂肪酸を高感度に定量分析することが可能です。しかし、パルミチン酸やステアリン酸など環境中に多く含まれる脂肪酸は、HPLCの移動相や配管などの分析システムに夾雑成分として混入するため、これら脂肪酸の実試料中の正確な定量が難しいことが報告されています²⁾。

本稿では、安定性の高いイオン化技術を搭載したLCMS-8060RXを用いて、簡便な前処理でヒト血漿およびヒト血清に含まれる遊離脂肪酸を定量分析した例をご紹介します。ディレイカラムを用いてシステム中の夾雑成分を除外することで、血中の遊離脂肪酸の正確な定量が可能となりました。



図1 LCMS™-8060RXおよびCoreSpray

■ サンプルおよび前処理

標準試料は、CaymanChemical社から入手しました。ヒト血漿とヒト血清は、コージンバイオ株式会社から入手しました。ヒト血漿は、EDTA血漿 (EDTA Plasma) とヘパリン血漿 (Heparin Plasma) の2種類を用いました。

血漿および血清100 μLに1%ギ酸を含むアセトニトリル295 μLと内部標準物質5 μLを添加し、約1分間攪拌しました。遠心分離後、上清をそのまま分析試料としました (図2)。これらを適宜1%ギ酸を含むアセトニトリルで希釈したのちLC/MS/MS分析に供しました。添加した内部標準物質は希釈倍率に合わせて最終濃度が25 μg/Lになるように調製しました。

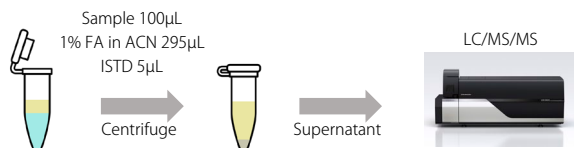


図2 前処理フロー

■ 分析条件

測定機器は、LC-40シリーズNexera™ UHPLCシステムと超高速トリプル四重極質量分析計LCMS-8060RXを使用しました (図1)。LCMS-8060RXは、新たにCoreSpray技術を搭載し、従来機よりもネブライザーフローの均一性が向上しました。連続分析において、より長期的に安定した信頼性の高い測定が可能になります。

HPLCおよびMSの分析条件を表1に示します。目的成分と夾雑成分の分離を向上させるため、ミキサーとオートサンプラーの間にディレイカラムを取り付けました。

表1 分析条件

HPLC (Nexera X3 system)	
Column	Shim-pack Scepter™ Claris C18-120 ^{*1} (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm)
Delay column	Shim-pack™ XR-ODS II ^{*2} (50 mm × 2.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile phase A	Acetonitrile/Water = 20/80
Mobile phase B	Acetonitrile/2-propanol = 20/80
Flow rate	0.2 ml/min
Gradient program	B. conc. 55 % (0-0.5 min) → 65 % (7 min) → 100 % (14-17.5 min) → 50 % (17.6-20 min)
Column temp.	55 °C
Injection volume	1 μL

*1 P/N : 227-31210-02 *2 P/N : 228-41623-94

MS (LCMS-8060RX)	
Ionization	ESI (Negative mode)
Mode	MRM
Nebulizing gas flow	5.0 L/min
Drying gas flow	10.0 L/min
Heating gas flow	10.0 L/min
DL temp.	250 °C
Heat block temp	400 °C
Interface temp	150 °C

■ ディレイカラムによる夾雑成分分離

本稿では、Lauric Acid、Stearidonic Acid、Eicosapentaenoic Acid (EPA)、 α -Linolenic Acid、 γ -Linolenic Acid、Myristic Acid、Docosahexaenoic Acid (DHA)、Palmitoleic Acid、Arachidonic Acid (AA)、Linoleic Acid、Docosapentaenoic Acid (DPA)、Dihomo- γ -Linolenic Acid (DGLA)、Palmitic Acid、Adrenic Acid、Oleic Acid、Stearic Acid、Arachidic Acid、Nervonic Acid、Lignoceric Acidを対象とした一斉分析法を開発しました。標準試料500 μg/LにおけるMRMクロマトグラムを図3に示します。

ミキサーとオートサンプラーの間にディレイカラムを設置することで、試料由来のターゲット成分と移動相由来の夾雑成分を分離することができます。血中の遊離脂肪酸においては特に、Palmitic acid C16:0、Stearic acid C18:0、Oleic acid C18:1において、それぞれの溶出時間よりも遅い時間帯に移動相由来と考えられるブロードなピークが検出されました (図3)。ディレイカラムを設置しない場合には、血液成分由来のピークと移動相由来のブロードなピークが重なってしまい、正確なピーク面積が得られませんでした。

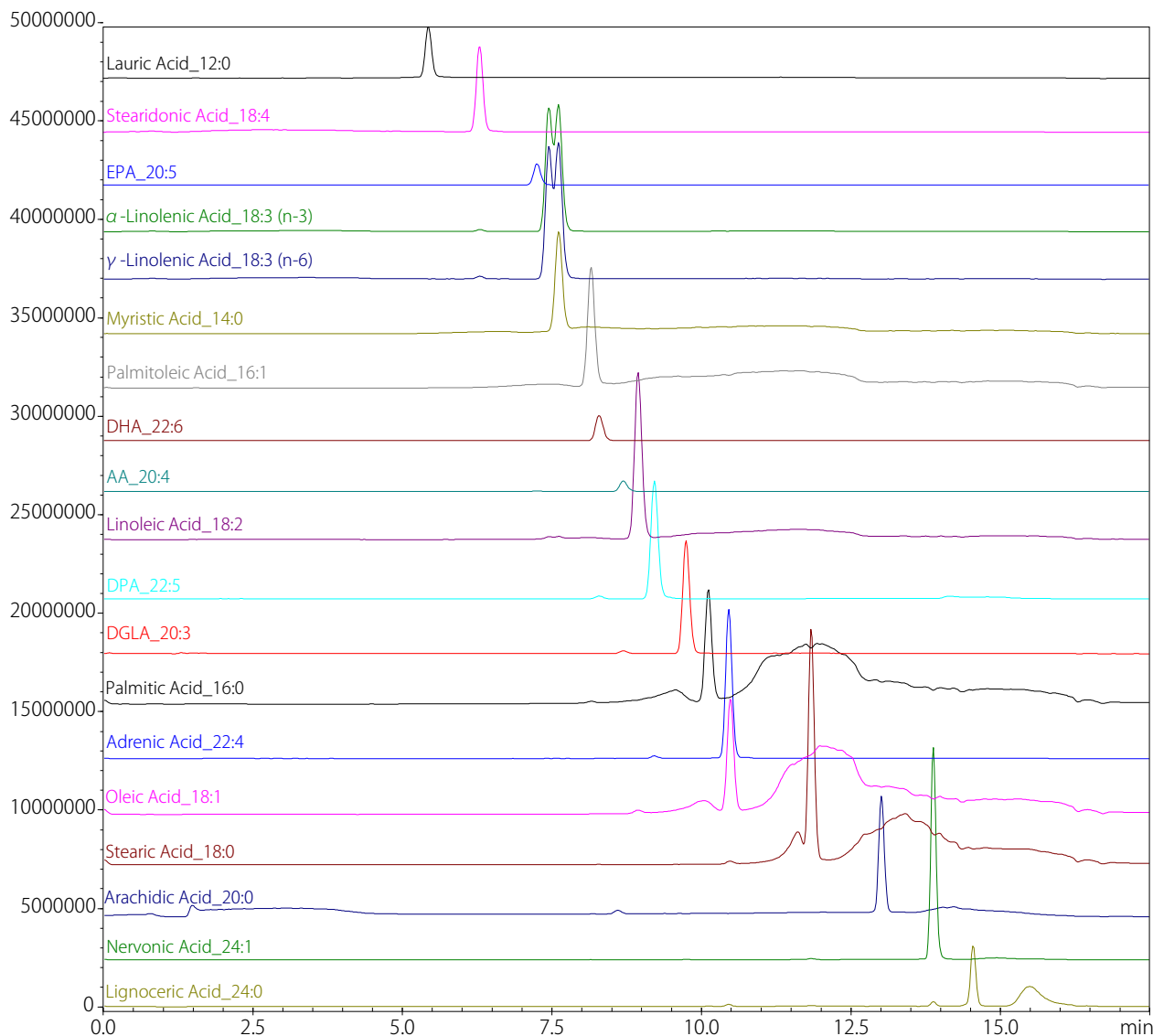


図3 遊離脂肪酸19成分のMRMクロマトグラム

表2 遊離脂肪酸19成分の検量線と再現性

Compound	Transition	Quantification Range (μg/L)	Coefficient of Determination (R ²)	Repeatability (%RSD)
Lauric Acid_12:0	199.20>199.20	10 - 1000	0.997	4.35
Stearidonic Acid_18:4	275.20>275.20	1 - 1000	0.997	4.27
EPA_20:5	301.20>257.10	1 - 1000	0.998	4.77
α-Linolenic Acid_18:3 (n-3)	277.20>277.20	1 - 1000	0.997	8.34
γ-Linolenic Acid_18:3 (n-6)	277.20>277.20	1 - 1000	0.998	7.63
Myristic Acid_14:0	227.20>227.20	10 - 1000	0.999	4.48
Palmitoleic Acid_16:1	253.20>253.20	10 - 1000	0.997	7.10
DHA_22:6	327.20>283.15	10 - 1000	0.998	6.07
AA_20:4	303.20>259.15	10 - 1000	0.998	3.94
Linoleic Acid_18:2	279.20>279.20	1 - 500	0.998	2.75
DPA_22:5	329.30>329.30	1 - 1000	0.998	6.84
DGLA_20:3	305.20>305.20	1 - 1000	0.998	4.67
Palmitic Acid_16:0	255.20>255.20	1 - 1000	0.997	1.11
Adrenic Acid_22:4	331.30>331.30	1 - 1000	0.998	8.59
Oleic Acid_18:1	281.20>281.20	10 - 1000	0.998	6.53
Stearic Acid_18:0	283.30>283.30	10 - 500	0.997	1.67
Arachidic Acid_20:0	311.30>311.30	10 - 1000	0.998	4.15
Nervonic Acid_24:1	365.30>365.30	1 - 500	0.997	1.68
Lignoceric Acid_24:0	367.30>367.30	10 - 1000	0.999	2.40
AA-d8 (ISTD)	311.20>267.20	-	-	-

■ 検量線と再現性

対象とした遊離脂肪酸19成分の標準品を1%ギ酸を含むアセトニトリル溶液で希釈し、検量線を作成しました。1~1000 μg/Lの濃度範囲において4点以上の検量点で内部標準法による検量線 (n=5) を作成しました (図4)。

各検量線の寄与率 (R²) は、全成分でR²>0.99となり、各検量線において良好な直線性が確認できました。

また、いずれの化合物も検量線の最下点における平均濃度の真度70~130%、併行精度 (面積値%RSD) <10%を満たす良好な結果でした (表2)。

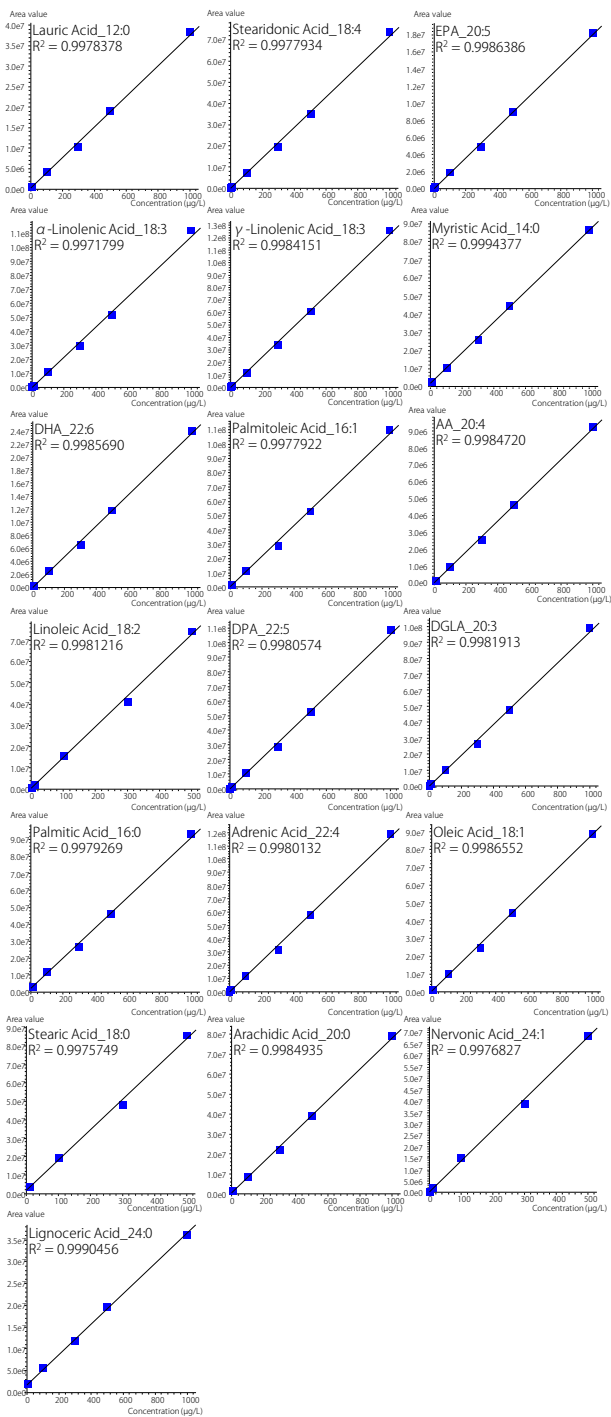


図4 遊離脂肪酸19成分の1%ギ酸を含むアセトニトリル溶液の検量線

■ヒト血漿およびヒト血清における定量分析

前処理したヒト血漿およびヒト血清を含有量に応じて1%ギ酸を含むアセトニトリルで希釈し、定量分析を行いました。原液中の濃度に換算した結果を表3にまとめました。本稿にて対象とした19成分すべてが検出され、併行精度（濃度%RSD）<10%を満たす良好な結果が得られました。

表3 遊離脂肪酸の血漿および血清中の濃度

Compound	EDTA Plasma		Heparin Plasma		Serum	
	Concentration (µg/L)	%RSD	Concentration (µg/L)	%RSD	Concentration (µg/L)	%RSD
Lauric Acid_12:0	374.32	2.52	460.04	4.90	503.16	1.60
Stearidonic Acid_18:4	30.68	3.84	16.6	2.81	23.8	5.66
EPA_20:5	354.12	1.28	97.84	6.61	307.4	2.14
α-Linolenic Acid_18:3 (n-3)	1439.92	2.13	1349.04	3.19	1601.92	1.11
γ-Linolenic Acid_18:3 (n-6)	400.56	7.61	79.28	9.36	118.88	3.39
Myristic Acid_14:0	3363.48	1.25	1915.6	3.27	1683.84	0.89
Palmitoleic Acid_16:1	3368.56	0.88	3708.12	1.88	3313	1.56
DHA_22:6	807.2	0.97	495	3.14	698.6	1.92
AA_20:4	4275.2	2.59	1326.12	1.95	3321.68	0.87
Linoleic Acid_18:2	23459.44	2.43	17523.04	1.32	24026.8	2.69
DPA_22:5	441.28	1.12	196.68	3.61	289.72	2.00
DGLA_20:3	1074.52	0.95	439.6	2.33	785.32	2.03
Palmitic Acid_16:0	42375.52	2.69	29640.64	3.05	35220.72	2.54
Adrenic Acid_22:4	222.84	1.66	170.16	3.27	151.8	2.41
Oleic Acid_18:1	65049.12	1.90	57857.36	0.94	62891.44	1.48
Stearic Acid_18:0	12185.4	0.47	8733.88	2.00	10819.2	1.01
Arachidic Acid_20:0	70.76	5.30	77.8	8.01	113.64	3.14
Nervonic Acid_24:1	23.72	1.84	20.84	2.72	25.44	2.43
Lignoceric Acid_24:0	64.52	6.72	125.76	8.58	57.2	5.86

■まとめ

高速液体クロマトグラフ質量分析計LCMS-8060RXを用いてヒト血漿およびヒト血清中の遊離脂肪酸19成分の一斉分析を行いました。全ての成分において1-1000 µg/Lの任意の範囲で直線性が得られ、定量下限濃度の再現性も%RSD<10と良好な結果が得られました。

ディレイカラムを用いることで、移動相由来の夾雑成分を除外することができました。本方法では、簡便な前処理で安定した血中遊離脂肪酸の定量分析が可能です。

<参考文献>

- 1) Takahashi H., *et al.*, "Long-Chain Free Fatty Acid Profiling Analysis by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry in Mouse Treated with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Agonist", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 2288–2293 (2013).
- 2) Okada H., *et al.*, "Development of a liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the simultaneous analysis of free fatty acids", *J. Biochem.*, 170(3):389–397 (2021).

LCMS、Nexera、Shim-pack ScepterおよびShim-pack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。