

10 min LC-MSMS analysis of fatty acids in triacylglycerols to compare human serum and food.

ASMS2020

Toinon Doriane¹, Masaki Yamada¹

¹ Shimadzu Corporation. 1, Nishinokyo-Kuwabaracho Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511, Japan

10 min LC-MSMS analysis of fatty acids in triacylglycerols to compare human serum and food.

1. 緒言

トリアシルグリセロール (TAG) は脂肪組織で最も多く見られる脂肪の一種で、一部は血中を循環します。TAGは体の主要なエネルギー源ですが、過剰な摂取によりアテローム性動脈硬化症、心臓病、脳卒中を発症するリスクが高まる可能性があります。

TAGは、3つの脂肪酸に結合したエステル化グリセロールで構成されています。異なる構造の脂肪酸が複数存在するため、TAGには多くの種類が存在します。飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸の機能に関しては生命維持に不可欠なものもあれば健康への影響を与えるものもあります。

そこで、ヒト血清および食品中のさまざまなTAGとその脂肪酸分布をスクリーニングするために、複数反応モニタリング (MRM) による分析法を開発しました。

10 min LC-MSMS analysis of fatty acids in triacylglycerols to compare human serum and food.

2. 実験方法

2-1. 分析条件

使用する分析条件は、高速液体クロマトグラフ：Nexera LC-40とトリプル四重極質量分析計：LCMS-8060で構成されるLC-MS/MSシステムで検討しました。この分析条件では、dwell timeが1~3ミリ秒で、約150成分のTAGsのスクリーニングを10分で実行できます。Figure1に使用した分析条件を示します。

Chromatographic conditions (LC-40)

Column	: Shim-pack Velox C18
Temperature	: 50 °C
Mobile Phase A	: Water + 20 mM ammonium formate
Mobile Phase B	: 80/20 2-Propanol / Acetonitrile
Flow Rate	: 400 µL / min.
Analysis time	: 10 min.
Rinse and injection Solvent	: 80/20 2-Propanol / Acetonitrile
Injection Volume	: 3 µL

MS conditions (LCMS-8060)

Ionization	: ESI, Positive/Negative
Nebulizing Gas Flow	: 3.0 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	: 270 kPa

Figure 1 分析条件



10 min LC-MSMS analysis of fatty acids in triacylglycerols to compare human serum and food.

2. 実験方法

2-2. 前処理

Figure 2に前処理のプロトコルを示します。

ヒト血清 (Kojin Bio Japan) 20 μ Lと市販のサバ50 mgをそれぞれクロロホルムとメタノールで抽出しました。

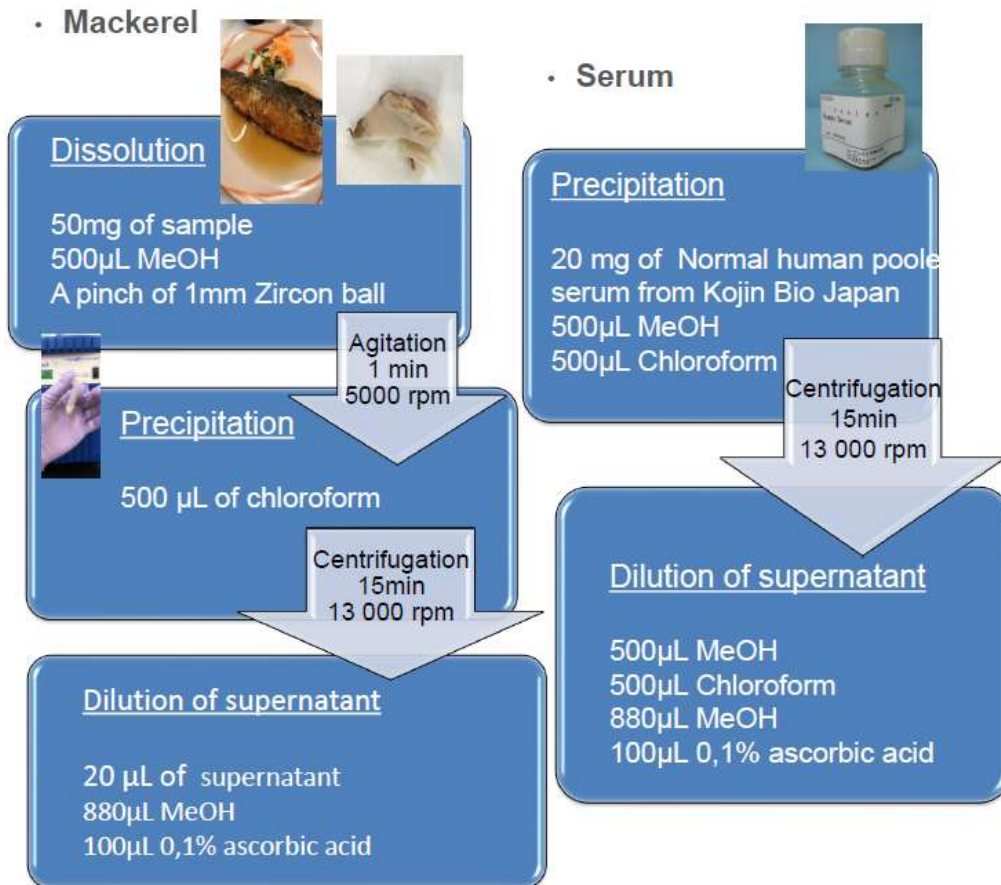


Figure 2 前処理プロトコル

10 min LC-MSMS analysis of fatty acids in triacylglycerols to compare human serum and food.

3. 結果

3-1. クロマトグラフィック・プロファイル

ヒト血清とサバに含まれるTAGの脂肪酸分布をスクリーニングしました。使用した分析条件について、TAGの基本骨格になる脂肪酸を明確にすることを目的にMRMトランジションを設定しました。各MRMトランジションにはターゲットとなるTAGのm/zに対応するプリカーサーイオンからニュートラルロスしたプロダクトイオンのm/zを用いました。1種類のTAGにつき3MRMトランジションの同一保持時間ピークの結果を用いました。

Figure3にヒト血清とサバを分析した結果を示します。この分析条件では安定同位体標識の内部標準を含む450トランジションを10分で検出できるように設定しました。また、本分析法におけるキャリーオーバーは1%以下でした。

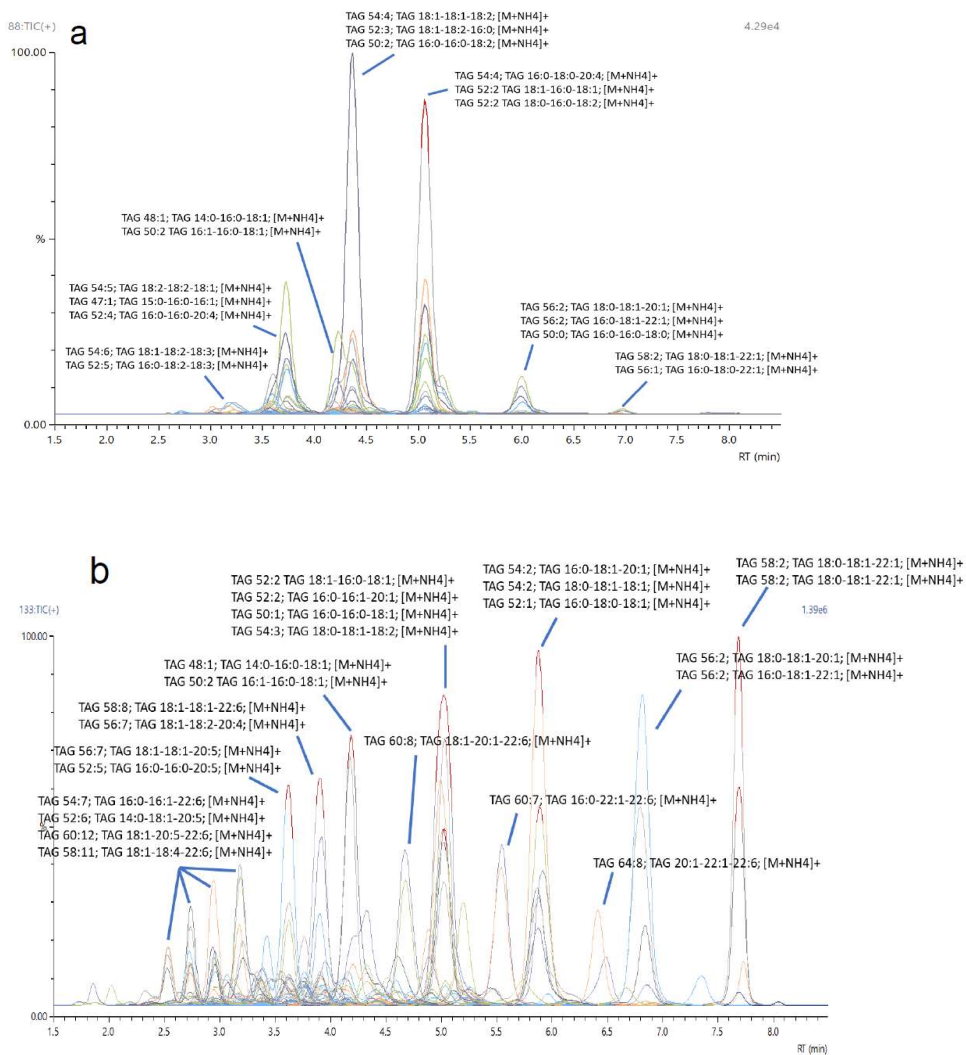


Figure 3 クロマトグラムの比較 (a : ヒト血清、b : サバ)

10 min LC-MS/MS analysis of fatty acids in triacylglycerols to compare human serum and food.

3. 結果

3-2. ヒト血清とサバの定性プロファイルの比較

Figure4に分析から得られた結果より作成した脂肪酸分布を示します。この結果よりヒト血清とサバでは含有されているTAG・脂肪酸に違いがあることがわかります。両方のサンプルについて検出された全成分は104成分で、35成分がヒト血清とサバで共通して検出されました。サバのみで検出された成分は35成分、ヒト血清では18成分でした (Figure5)。

ヒト血清には主にオメガ6と飽和脂肪酸が、サバはオメガ3とオメガ9が含まれており、ヒト血清からは主にアラキドン酸(20:4)、リノレン酸 (18:2)、ステアリン酸 (18:0) で、サバからはドコサヘキサエン酸 (22:6)、エイコサペンタエン酸 (20:5)、ステアリドン酸 (18:4)、エルカ酸 (22:1)、イコセン酸 (20:1) が検出されました。

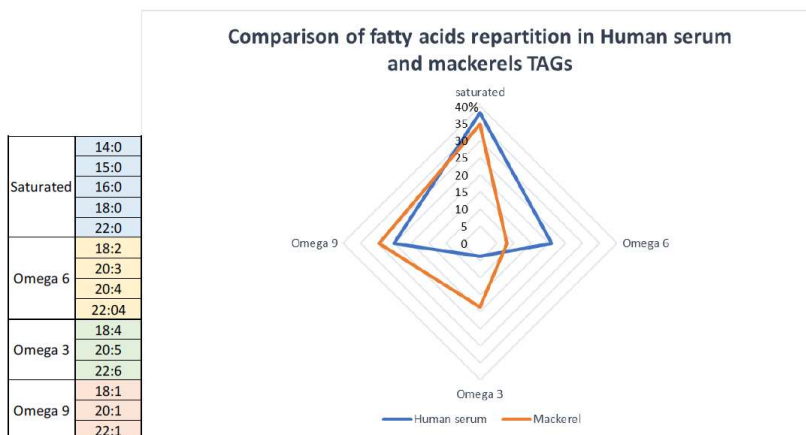
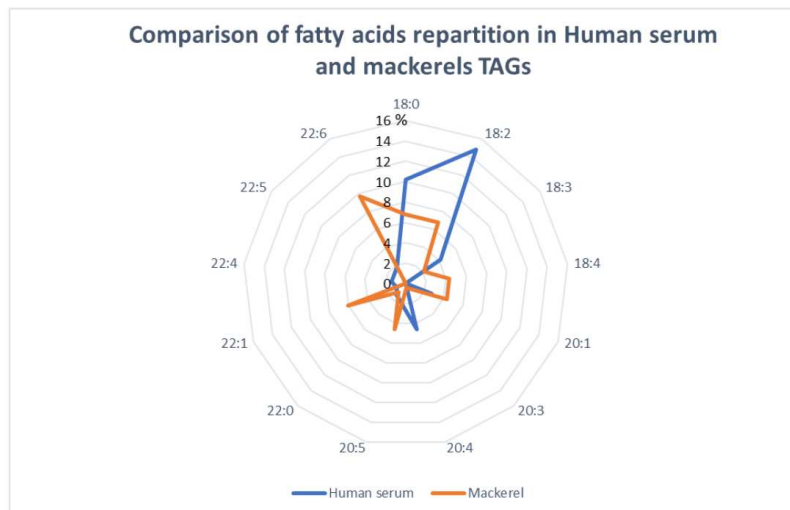


Figure 4 ヒト血清とサバの脂肪酸分布

10 min LC-MSMS analysis of fatty acids in triacylglycerols to compare human serum and food.

4. 結論

本分析条件を用いて150成分のTAGをスクリーニングすることにより、ヒト血清および食品中の脂肪酸組成を把握することができました。ヒト血清とサバの結果を比較すると、35成分が共通して検出されました。ヒト血清のみで検出されたのが18成分、サバのみで検出されたのが51成分です。また、脂肪酸分布の結果から、ヒト血清ではオメガ6と飽和脂肪酸が多く含まれており、一方、サバについてはオメガ3とオメガ9が多く含まれていることがわかりました。

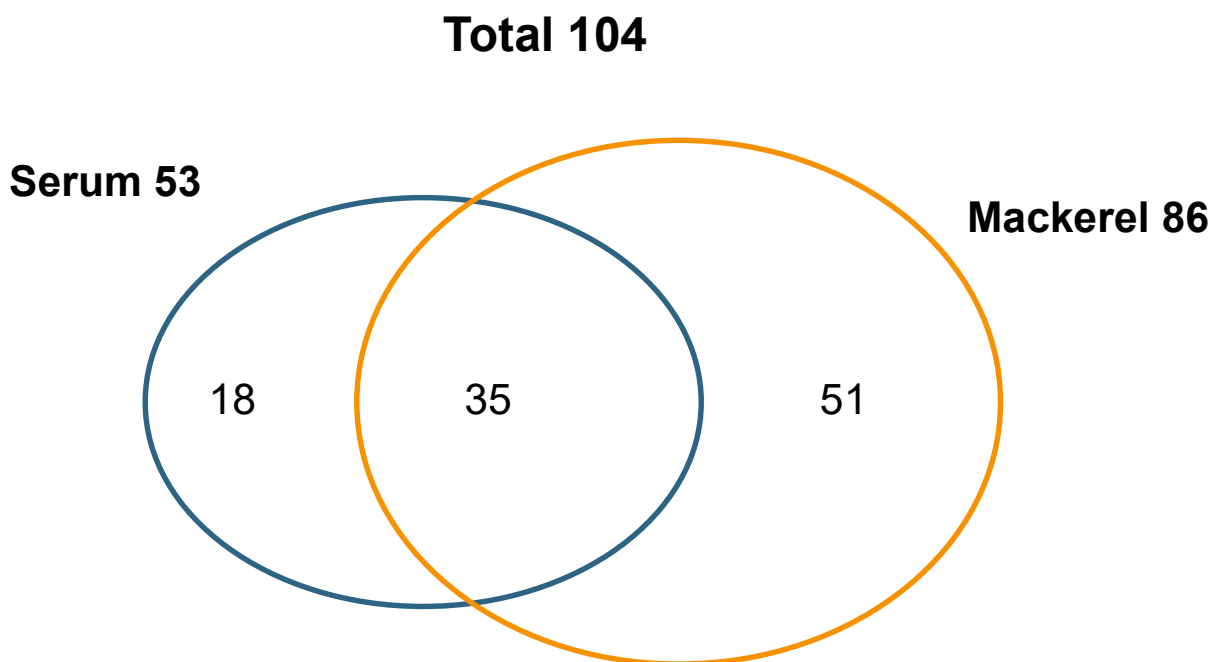


Figure 5 ヒト血清とサバに含まれるTAGおよび脂肪酸のベン図