

オンライン固相脱水誘導体化-GC/MSを用いた生体試料中の遊離脂肪酸分析法の開発



Development of a Free Fatty Acid Analysis Method in Biological Samples Using Online Solid-Phase Dehydration Derivatization-GC/MS.

○佐々野僚一、丸山千明、新川翔也 (株) アイスティサイエンス

はじめに

一般に、遊離脂肪酸のGC/MS分析ではメチル化による誘導体化法が広く用いられている。しかし、不飽和脂肪酸等のメチルエステル誘導体化では、MS検出において高質量域のフラグメントイオンの強度が小さく、定量には中質量域のフラグメントイオンを選択する必要がある。そのため、生体試料中の夾雑成分との干渉を受けやすいという課題がある。また、メチル化法では抽出液に塩酸-MeOHを加えて60℃で約30分間反応させる必要があり、前処理操作が煩雑である。一方、tert-butylidimethylsilyl (TBDMS) 誘導体化では高質量域の特徴的なフラグメントイオンが得られるため、夾雑成分の影響を低減し、定性および定量精度の向上が期待できる。そこで本研究では、生体試料中の遊離脂肪酸を迅速かつ高精度に分析することを目的として、オンライン固相脱水誘導体化-GC/MSシステムを用いたTBDMS誘導体化による分析法の開発を行った。

結果と考察

除タンパクおよび液液分配を兼ねた抽出方法の検討

除タンパクと液液分配を同時に行うことを目的として、アセトニトリル (ACN) とトルエンの混合溶液を添加した。また、わずかなアセトンを加えることで、変性したタンパク質が水相と有機相の狭間に浮遊することで、分取がしやすくなった。分取後にアセトンを添加して、pH調整するためにアンモニア水を添加する時に分離しないような溶媒組成を検討した。

この液液分配により、脂肪酸は有機相に移行し、極性の成分は水相に移行していると考えられ、特に固相に負担のかかるイオン性の夾雑成分を取り除くことができたと思われる。

液液分配前のpH調整剤について

液液分配では、特に水に溶けやすい短鎖脂肪酸を有機相に移行させるために、水相のpHを下げて遊離脂肪酸を非乖離の状態にして疎水性を高める必要がある。pH調整剤としては塩酸や酢酸、酢酸などが考えられるが、酢酸や酢酸はそれそのものが固相(強イオン交換樹脂)に保持して、固相の機能を損なう恐れがある。そこで、今回は塩酸を用いることとした。



固相脱水誘導体化法条件

誘導体化試薬の希釈溶媒にはトルエンを用いて、MTBSTFA-トルエン (1/4)とした。MTBSTFAの濃度をできるだけ抑えて、GCへの負荷を抑えた。本法の抽出方法は油系も含んでいることが考えられるため、洗浄および脱水にはアセトンを選定した。誘導体化は誘導体化試薬を固相に含浸させて、室温で反応時間は1分で行った。

固相に負荷する前のpH調整剤について

遊離脂肪酸を強陰イオン交換の固相に保持させるためには、pHを上げて遊離脂肪酸を乖離させて、イオン性にする必要がある。pH調整剤にNaOH水溶液を用いると、特定の遊離脂肪酸のピーク強度が大幅に上がった。そこでNaOH水溶液のBlank試験を行ったところ、同じように特定の遊離脂肪酸が検出された。そこで、今回はpH調整しやすいNH₃水をpH調整剤として使用することとした。この件については再度、調査検討していく。

Blank対策

脂肪酸はいたるところにコンタミネーションしており、Blankとして検出される。溶媒やNaOH水溶液、実験室内の空気、固相、誘導体化試薬にも含まれており、大きな課題となった。そこで、本システムでは固相のコンディショニングでの洗浄を増加したり、固相に通ずる溶媒全てを配管の途中に設けたフィルターにより除去した。また、本システムは密閉系であり、接触する器具もほとんどなく、常に自動で洗浄できるため有効であった。

それでも、酢酸および酢酸については血漿中濃度より多く検出されており、今後の大きな課題となった。

抽出工程の添加回収試験

人血漿に遊離脂肪酸濃度が40μMになるように添加して、本法による添加回収試験を行った。Table 1.

なお、酢酸および酢酸については、Blankから高濃度で検出されたため、対象から外した。

●回収率について

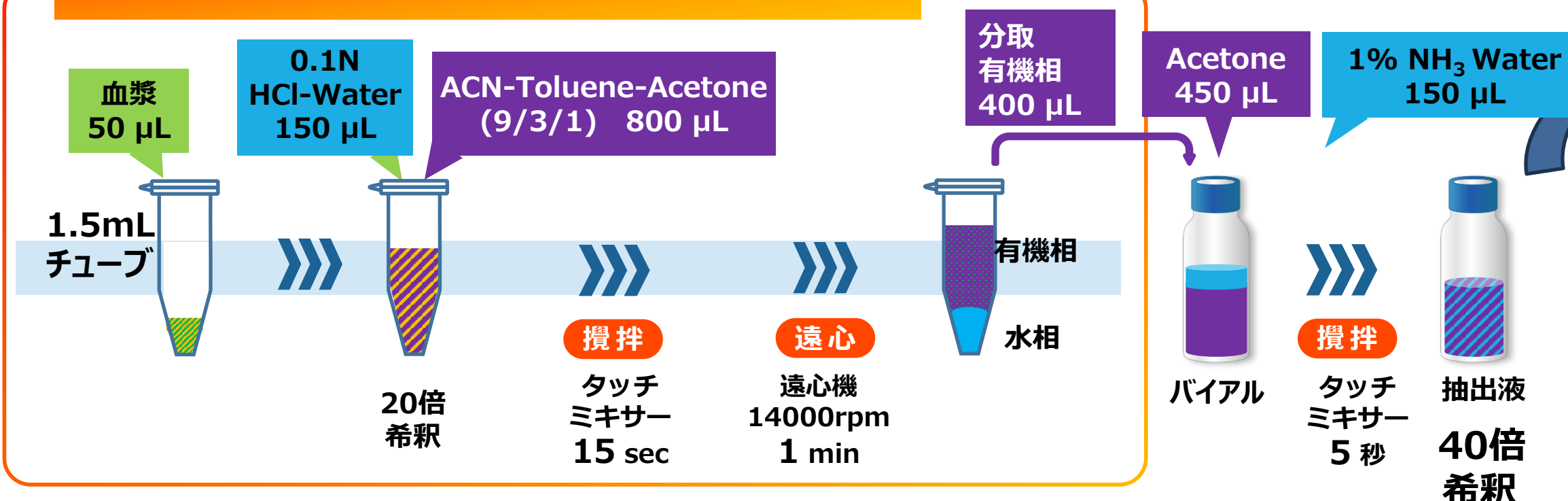
C24およびC26は下がる傾向があったが、それ以外は良好な回収率80~120%を得られ、しっかりと前処理(抽出工程)で抽出できていることが分かった。Oleic acid は異常回収率となったが、これは添加濃度よりも血漿濃度に多く含まれている成分であったため影響したと考えられる。

●再現性について

C26以外はRSD10%未満の良好な結果を得られた。本法での人による作業は簡単な抽出操作のみで、抽出後の固相誘導体化から測定までを全自動で行っていることが寄与していると思われる。

実験方法

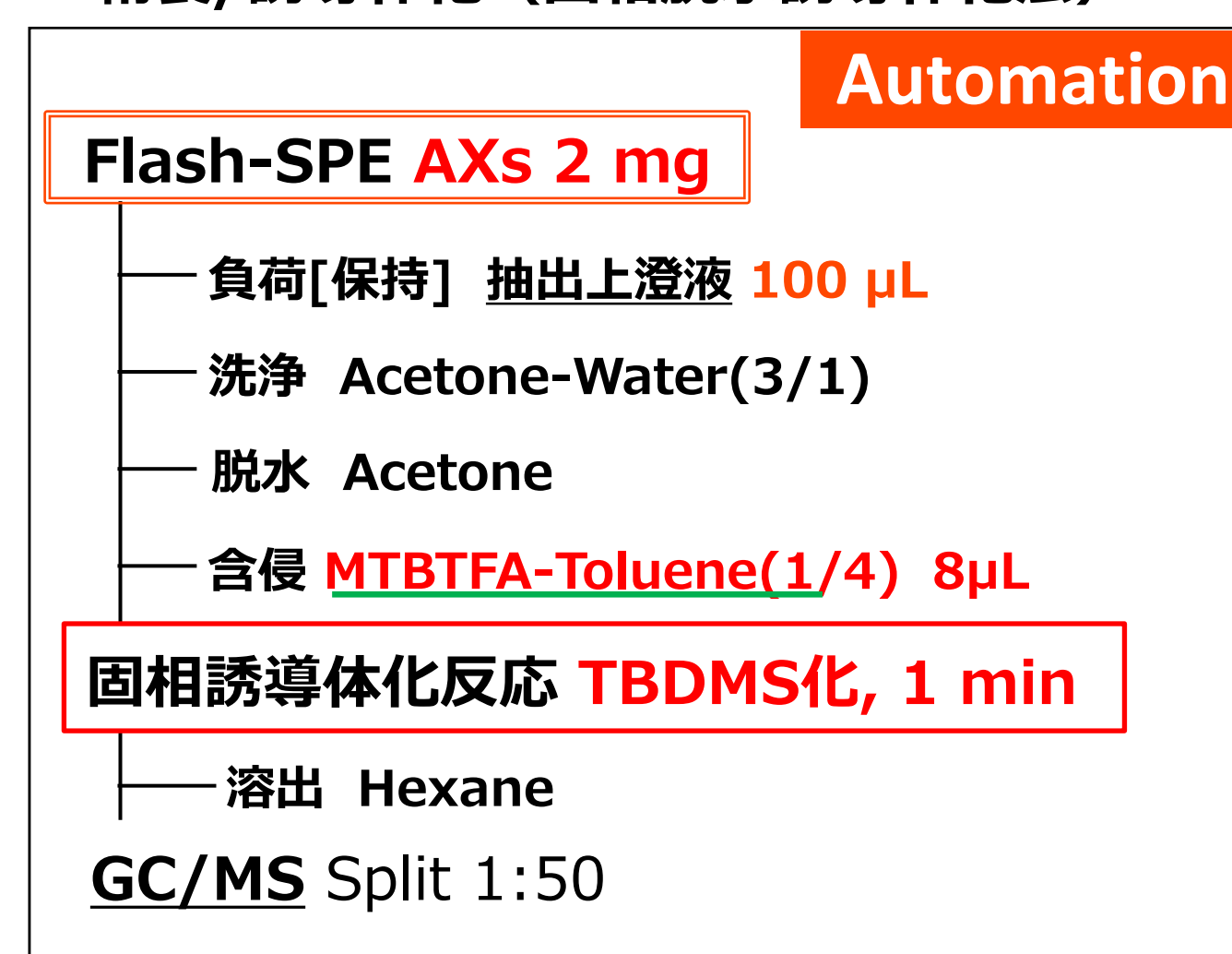
除タンパク・液液分配抽出



■ 除タンパク・液液分配抽出



■ 精製/誘導体化 (固相脱水誘導体化法)



GC/MSの条件について

●スプリット法の検討

注入口の初期温度を220℃として、スプリット比を1:50, 1:25, 1:10, 1:5で比較したところ、1:50および1:25が最適であった。1:10および1:5ではピークが崩れてしまう傾向があった。また、1:25でも酢酸および酢酸のピークが崩れることがあり、今回は1:50を採用した。

●大量注入-スプリット法 (LVI-SP) の検討

注入口の初期温度を90℃として、導入されて溶出液(30μL)をスパイラルインサート内で留めながら、スプリット比1:100で大部分の溶出溶媒を輩出し、その後、スプリット比1:10にして、注入口の温度を290℃まで上げて、目的物質をGC/MSに導入することができた。これにより、スプリット法1:50と比較して、5倍感度が上がることが分かった。

●GCオープン温度の条件

短鎖脂肪酸の酢酸-TBDMSや酢酸-TBDMSも測定するために、GCの初期温度を60℃として、320℃まで昇温した。

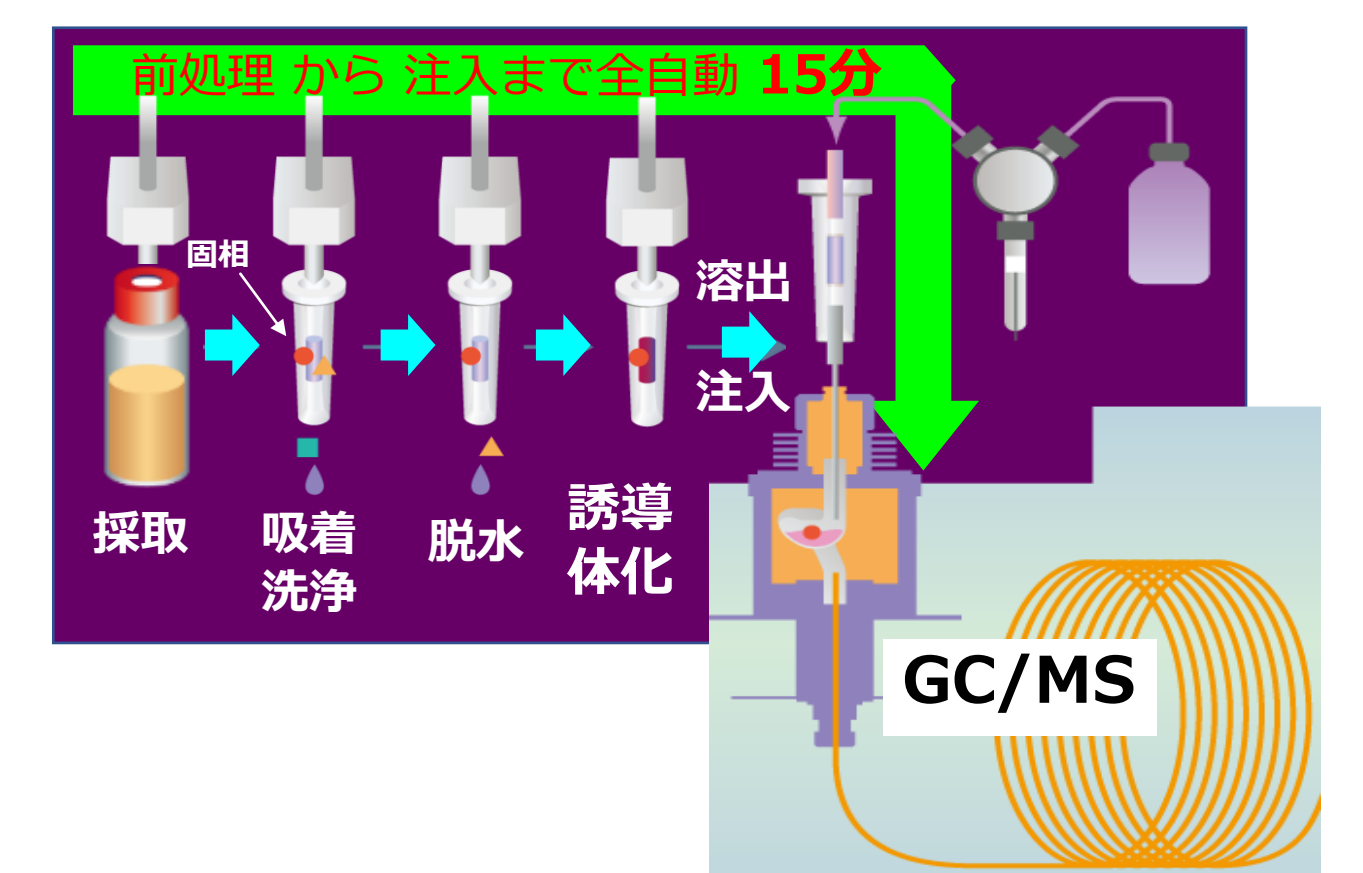
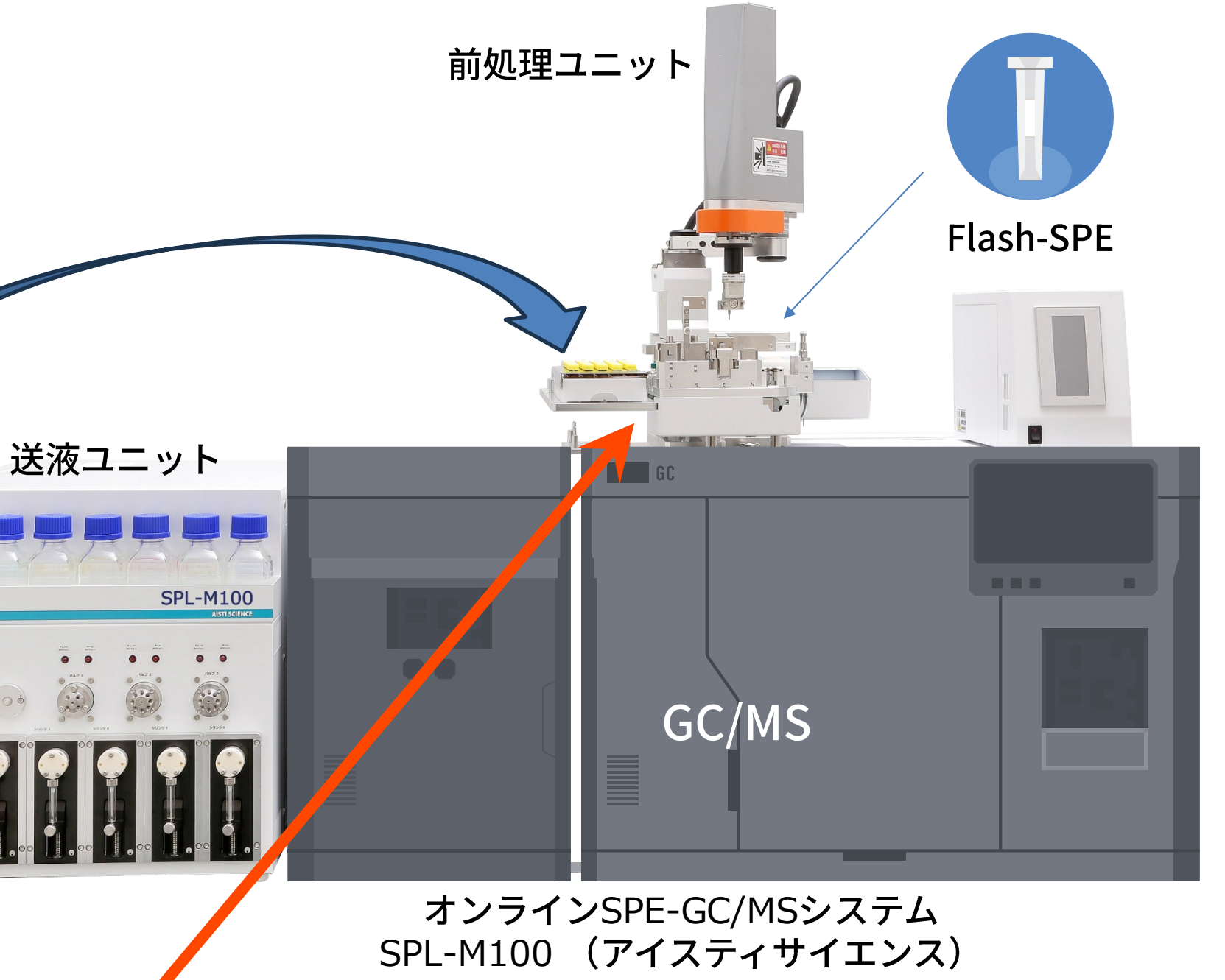
●MSの条件

未反応の誘導体化試薬TBDMSが検出されるリテンションタイム6.5~7.0 minはMSの測定をOFFとした。今回はSCAN測定を行ったが、測定対象成分が決まっている場合は、SIMやMRMを用いて高感度化もできる。

TBDMS誘導体化のスペクトル解析

今回、遊離脂肪酸のTBDMS誘導体のスペクトルを解析したところ、一定の規則性があることが分かった。

全ての遊離脂肪酸のTBDMS化で得られたフラグメントイオンは誘導体化分子量-57のフラグメントイオンを持つ。また、C6以上では $m/z=131$ をフラグメントイオンを持つ。これらにより、大部分の成分が判定できた。



オンラインSPE-GC/MS条件

SPE-GC Interface	SPL-M100 (AiSTI Science)
SPE Cartridge	Flash-Axs
Sampling Volume	100 μL
PTV Injector	LVI-S250 (AiSTI Science)
Insert Type	Spiral Insert
Injector Temp.	220°C(0.2min)-100°C/min-300°C(29min)
GC	
Inlet Mode	Split 50
Flow Mode	Constant Flow, 1 ml/min
Pre-Column	0.25mm i.d. x 1m
Column	5HT, 0.25mm i.d. x 30m, df;0.25μm
Oven Temp.	60°C(3min)-10°C/min-320°C(2min)
Trans. Line Temp.	320°C
MS	
MS Method	SCAN, m/z;70-600

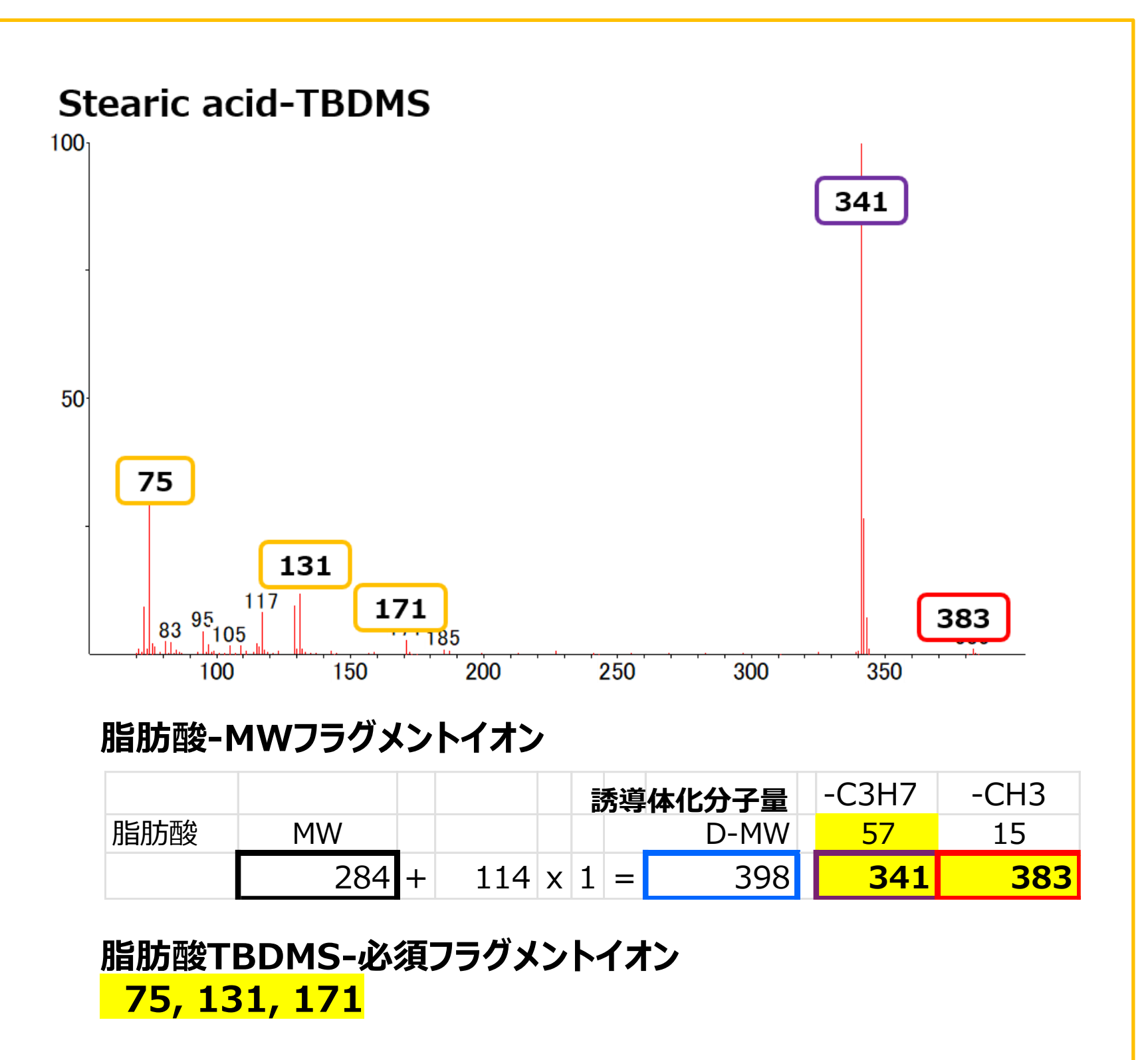


Table 1. 解析条件と添加回収試験の結果

No.	Compound Name	R.T., min	MW -TBDMS	Heparin Plasma			
				解析イオン 定量	RSD	Recovery	
1	Propionic acid (C3)_TBDMS	7.79	188.1	131.1	75	2.6	91
2	Isobutyric acid (C4)_TBDMS	8.38	202.1	145.1	115	1.9	99
3	Butyric acid (C4)_TBDMS	9.14	202.1	145.1	115	2.6	97
4	Isovaleric acid (C5)_TBDMS	9.93	216.1	159.1	115	2.6	103
5	Valeric acid (C5)_TBDMS	10.65	216.1	159.1	115	2.7	101
6	Caproic acid (C6)_TBDMS	12.09	230.2	173.2	131	3.0	101
7	Heptanoic acid (C7)_TBDMS	13.46	244.2	187.2	131	3.2	102
8	Caprylic acid (C8)_TBDMS	14.76	258.2	201.2	131	2.7	104
9	Nonanoic acid (C9)_TBDMS	16.00	272.2	215.2	131	4.1	99
10	Capric acid (C10)_TBDMS	17.18	286.3	229.3	131	3.7	99
11	Undecanoic acid (C11)_TBDMS	18.30	300.3	243.3	131	3.9	99
12	Lauric acid (C12)_TBDMS	19.37	314.3	257.3	131	3.5	98
13	Tridecanoic acid (C13)_TBDMS	20.39	328.3	271.3	131	3.6	97
14	Myristic acid (C14)_TBDMS	21.37	342.4	285.4	131	2.6	92
15	Pentadecanoic acid (C15)_TBDMS	22.31	356.4	299.4	131	1.3	88
16	Palmitoleic acid (C16:1n-7)_TBDMS	23.05	368.4	311.4	131	3.0	105
17	Palmitic acid (C16)_TBDMS	23.21	370.4	313.4	131	0.9	111
18	Margaric acid (C17)_TBDMS	24.07	384.5	327.5	131	3.7	86
19	gamma-Linolenic acid (C18:3n-6)_TBDMS	24.51	392.4	335.4	131	3.4	93
20	Linoleic acid (C18:2n-6)_TBDMS	24.67	394.4	337.4	131	3.4	145
21	Oleic acid (C18:1n-9)_TBDMS	24.71	396.5	339.5	131	4.1	182
22	alpha-Linolenic acid (C18:3n-3)_TBDMS	24.74	392.4	335.4	131	3.7	103
23	Elaidic acid (C18:1n-9, t)_TBDMS	24.76	396.5	339.5	131	2.6	96
24	Stearic acid (C18)_TBDMS	24.90	398.5	341.5	131	2.9	102
25	Nonadecanoic acid (C19)_TBDMS	25.70	412.5	355.5	131	5.1	91
26	Arachidonic acid (C20:4n-6)_TBDMS	25.93	418.5	361.5	131	3.7	99
27	Eicosapentaenoic acid (C20:5n-3)_TBDMS	26.00	416.5	361.5	131	3.4	101
28	Dihomo-γ-linolenic acid (C20:3n-6)_TBDMS	26.11	420.5	363.5	131	3.5	104
29	Arachidic acid (C20)_TBDMS	26.47	426.5	369.5	131	4.8	89
30	Heneicosanoic acid (C21)_TBDMS	27.21	440.6	383.6	131	5.4	81
31	Docosahexaenoic acid (C22:6n-3)_TBDMS	27.38	442.5	383.5	131	4.6	118
32	Clupanodonic acid (C22:5n-3)_TBDMS	27.52	444.5	385.5	131	1.2	113
33	Erucic acid (C22:1n-9)_TBDMS	27.78	452.6	395.6	131	3.9	94
34	Behenic acid (C22)_TBDMS	27.93	454.6	397.6	131	4.9	83
35	Lignoceric acid (C24)_TBDMS	29.30	482.6	425.6	131	8.3	79
36	Cerotic acid (C26)_TBDMS	30.86	511	453.7	131	17.5	72