



ORIST

LC-Q-ToF-MS を活用した網羅的脂質分析

キーワード：脂質分析、LC-Q-ToF-MS、データベース作成

はじめに

脂質は食品や化粧品原料として利用されるだけでなく、病変によって生体内でその分泌・組成が変化することから生理学においても重要な役割を果たしています。一方で、脂質を分子レベルで見ると種々の脂質クラス・脂肪酸種から構成される非常に複雑な混合物であり、その網羅解析は途方もない労力が必要となります。当研究所森之宮センターでは、アジレント・テクノロジー株式会社製の超高感度 LC-Q-ToF-MS、製品開発・研究の助けとなる脂質の網羅解析、およびパーソナルデータベース作成を可能とするソフト Lipid Annotator を用いたサービスを提供しています。本テクニカルシートでは一例として、乳脂の分析と脂質クラス推定について紹介します。



図 1 装置の外観(アジレント・テクノロジーホームページ)。

試料調製

乳には脂質以外にも糖、タンパクなど様々な夾雑物が混在しており、これらを除去しなければ質の良い分析を行うことはできません。今回はアジレント・テクノロジー社の Bond Elut Lipid Extraction (カラム型) を用いて前処理を行いました。

乳脂 (1 μ L) にアセトニトリル/メタノール (99/1, 1 mL) を加え、タンパクを凝固させました。これに内部標準物質として EquiSPLASH (安定同位体で標識された脂質標準サンプルの混合物 10 μ L) を加え、氷冷下超音波処理しま

した。固形物を含む全量をカラムに負荷し、アセトニトリル/水 (9/1) で洗浄後、メタノール/クロロホルム (1/1) で脂質成分を溶出・回収しました。乾固後、メタノール/ブタノール (1/1, 100 μ L) に再溶解し、場合によって 100 倍希釈して LC-MS/MS 分析 (MRM 測定) に供しました。

また、リン脂質のようにピークのブロードニングが起りやすい脂質クラスでも精度よく分析が行われることを確認するため、EquiSPLASH のみの分析も行いました。

分析カラム

脂質は非常に複雑な混合物であるため、十分な分離性能を持つカラムの使用が重要です。本テクニカルシートではあらゆる脂質クラスで分離のよいクロマニックテクノロジー社製コアシェルカラム SunShell C30 (2.6 μ m, 3.0 mm i.d. x 150 mm) を用いました。

測定条件

HPLC: Agilent Technologies 1260 Infinity II
Eluent A: MeCN/water 6/4 (0.1% formic acid, 10 mM ammonium acetate, 10 nM EDTA)、
Eluent B: IPA (0.1% formic acid, 10 mM ammonium acetate, 10 nM EDTA)、
Gradient: 0%B (0 min) \rightarrow 0%B (1 min) \rightarrow 40%B (5 min) \rightarrow 64%B (7 min) \rightarrow 64%B (12 min) \rightarrow 82.5%B (12.5 min) \rightarrow 95%B (25 min) \rightarrow 95%B (27 min) \rightarrow 0%B (27.1 min) \rightarrow 0%B (35 min)、
Rate 0.6 mL/min、Column temp. 50°C、Injection volume 2 μ L

Mass: Agilent Technologies 6530 LC/Q-TOF

質量分析計の MRM パラメーターは対象化合物毎に適正に定める必要があり、容易に一般化できないため、ここでは割愛します。

リン脂質のピーク形状

EquiSPLASH を LCMS 分析し、例として LPC 18:1(d7) と PC 33:1(d7) の抽出マスクロマトグラムを描画しました (図 2)。

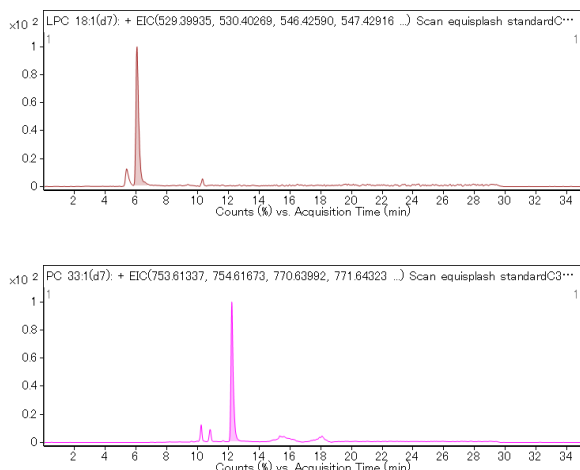


図 2 LPC 18:1(d7) (上) と PC 33:1(d7) (下) の抽出マクロマトグラム (EIC).

リゾリン脂質 (LPC) やフォスファチジルコリン (PC) はリン酸基の影響によりピークがブロードニングして HPLC 分析しにくい化合物であることが知られています。本分析では SunShell C30 カラムを使用することで、いずれのリン脂質も非常にシャープなピークとして観測されています。Lipid Annotator で自動解析するためにはこのような「よい形状」でピークデータを得ることが必要不可欠です。

乳脂質分析

同条件で乳脂サンプルを LC-MS/MS 分析しました。試料調製で得られたサンプルをそのままの濃度で分析した結果を図 3 に示します。

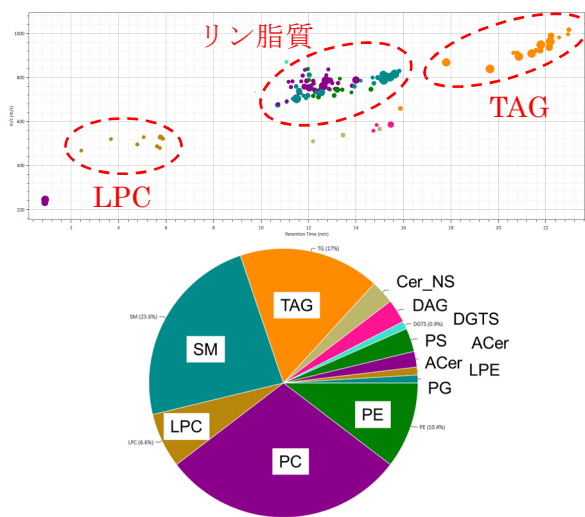


図 3 乳の脂質分析. 点グラフの縦軸: 質量電荷比 (m/z), 横軸: 保持時間 (min). 円グラフは各脂質クラスに同定された分子数の比

本クロマト条件により、脂肪酸が一つしかない極性脂質であるリゾリン脂質は 2~6 分、極性脂質であるリン脂質は 10~16 分、中性脂質である TAG は 18 分以降に溶離していることが分かります。図 3 のグラフの各点は基本的にひとつの分子種に相当しており、一回の分析で 100 を超える脂質分子を同定することができました。

試料濃度と同定される脂質

今回分析した乳脂質の主成分は脂肪酸トリグリセリド (TAG) です。しかし、先ほどの分析では TAG として同定された脂質分子の数は全体のわずか 17% でした。今回の前処理条件はリン脂質分析には最適な条件ですが、TAG には濃度が高すぎ、イオン化効率が低下したため同定数が低く見積もられました。そこで、試料濃度を 100 倍希釈して再度測定を行ったところ、約 80 種の TAG 分子 (紫) を観測できました (図 4)。適正なピーク形状が得られる濃度に試料を調製することは Lipid Annotator での自動解析に重要です。Lipid Annotator で作製したデータはパーソナル化合物データライブラリーとして活用することができ、脂質成分の差異を統計的に評価することもできます。

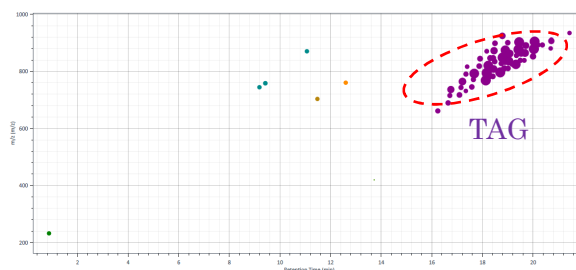


図 4 低試料濃度での乳脂分析. 点グラフの縦軸: 質量電荷比 (m/z), 横軸: 保持時間 (min). 紫: TAG

最後に

森之宮センターには、脂質を分析可能な LC-MS システムと、脂質分子の実測 MRM スペクトルおよびワークステーションが生成する in silico MS/MS データベースとを比較することで、その脂質クラス・構造を推定できる Lipid Annotator を搭載したデータ処理用 PC も保有しています。ぜひご活用ください。