

長鎖飽和脂肪酸のC₁₈カラムによる分離と APCIイオン化法を用いた精密質量分析

分析の特徴

- ▶ HPLCのポンプシールやPEEKチューブにダメージを与えるヘキサンやクロロホルム等の溶媒を使わずに分析が可能。
- ▶ C₁₈カラムとアセトニトリルを用いた逆相クロマトグラフで、長鎖飽和脂肪酸 (C₂₀ ~ C₇₀) を分離した。
- ▶ 極性が低くイオン化しにくい標的物質を APCI 法で効率的にイオン化。それをMS及びMS/MS測定した。

協力

名古屋大学生命農学研究科

邊見久教授

岡戸真亜子さん (大学院生)

参考文献

1. Arch Microbiol (1986) 144:324-333.
2. Arch Microbiol (2007) 188:629-641.
3. J Biosci Bioeng (2019) 127:52-58.

問い合わせ先

物質・分析技術支援室

担当職員 小川直也、河合ゆかり

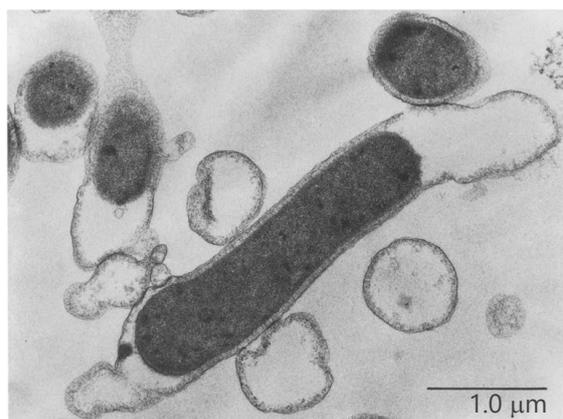
Email: ms-support@agr.nagoya-u.ac.jp

概要

超好熱菌サーモトガマリチマ¹の細胞膜を構成する主要成分の一つ架橋長鎖不飽和脂肪酸の精密質量を測定し、分子種を同定した。測定試料は菌体を有機溶媒抽出、分画、アルカリ加水分解等を行うことで調製し、Orbitrap Exploris 240 LC-MSシステムで分析を行った。

長鎖不飽和脂肪酸は極性が低いため、ヘキサンを移動相とした順相液体クロマトグラフで分離して質量測定を行うことが主流であり、金属製専用ラインを装備した装置を使うことが多い²。

本件では、遊離脂肪酸メタボロミクス解析例³を参考に、C₁₈カラムを用い、アセトニトリルとイソプロパノールを移動相とした逆相クロマトグラフで分離し、APCI法でイオン化してMS、MS/MS測定を行った。



Thermotoga maritima 参考文献1, Fig. 6

長鎖飽和脂肪酸のC₁₈カラムによる分離とAPCIイオン化法を用いた精密質量分析

試料調製

- Thermotoga maritima 菌体
- | Bligh-Dyer 法で脂質を抽出
- | メタノール / クロロホルムで二相分配
- | 水酸化アルカリと加熱で加水分解
- | メチルエステル化
- | クロロホルム抽出
- | 0.22 μm PTEFフィルターろ過
- | 室温、遮光保存
- | 1回の測定につき試料原液 1 μL 使用

LC分析

- Vanquish #27101-102130 C₁₈カラム
(粒径1.5 μm, 2.1 mm x 100 mm)
- カラムオープン : 50°C
- 流速 : 400 μL / min
- 移動相 A :
水 / アセトニトリル / ギ酸 (4 : 6 : 0.1)
- 移動相 B :
アセトニトリル / イソプロパノール / ギ酸
(1 : 9 : 0.1)
- 濃度勾配 0 → 100 % B × 24 min

MS条件

- イオン化法 : APCI 法
- 測定モード : ポジティブ
- スプレー電流 : + 4 μA
- 脱溶媒温度 350°C
- MSフルスキャン分解能 60,000
- フルスキャン範囲 400 - 1200 m/z
- MS/MS分解能 15,000

* Branched Glycerol Dialkyl Glycerol Tetraethers

結果

標的分子の長鎖不飽和脂肪酸 (C₃₄, C₇₁) は、低極性でイオン化しにくい物質であるが、左の条件の逆相クロマトグラフにより、それぞれ保持時間19.5分と23.9分のピークに分離された。APCI 法でイオンし、MS、MS/MS 測定を行ったところ、架橋脂肪酸 Branched GDGT* (B)とBの前駆体の加水分解産物 Diabolic acid (A) が検出され、精密質量測定値により分子式が決定された。

