

原著

LC/MS/MSを用いた柚子粕フリーセラミドの分析方法の検討

板垣成泰・飛石和夫

LC/MS/MSを用いてd18:1のスフィンゴイド塩基を持つフリーセラミド標準品の測定を行った結果、脂肪酸部分のアルキル鎖が一定数増えると一定の保持時間が長くなる分析条件を構築した。その条件で柚子粕由来のフリーセラミドを測定した結果、数多くのフリーセラミドを検出することができた。LC-QTOF-MSで組成を確認した後、LC/MS/MSの保持時間とプリカーサーイオンの m/z の関係を調べたところ、一定条件において相関係数 $r^2=0.9995$ 以上と強い正の相関関係を示した。また、水酸基及び不飽和結合を多く持つフリーセラミドほど、保持時間が短くなる傾向を示した。LC/MS/MSのSRM分析による標準品と保持時間の関係から、柚子粕由来のフリーセラミドの組成を説明することができた。

[キーワード：フリーセラミド、柚子粕セラミド、LC/MS/MS]

1 はじめに

セラミドは、スフィンゴイド塩基を含む複合脂質であるスフィンゴ脂質の一種である。植物性のセラミドは、セラミド骨格に糖鎖が結合したグリコシルセラミド (GlcCer) 及び糖鎖-イノシトール-リン酸が結合したグリコシル-イノシトールホスホセラミド (GIPC) などの構造をとっている¹⁾。このGlcCer及びGIPCなどからグルコース及びリン酸などを取り除いたセラミドの骨格は、フリーセラミドと呼ばれ (図1)、肌のバリア機能の役割を担っていることが報告されている²⁾⁻³⁾。

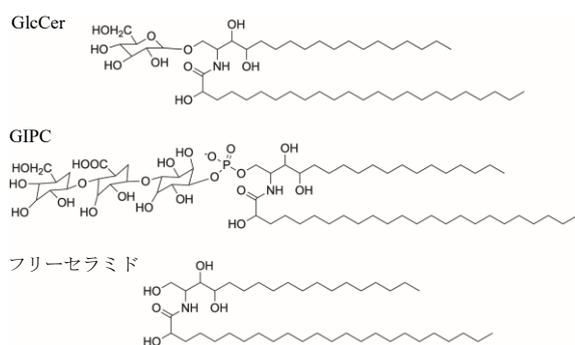


図1 GlcCer、GIPC 及びフリーセラミドの構造例

フリーセラミドは、スフィンゴイド塩基と呼ばれる長鎖塩基と脂肪酸がアミド結合した構造である。アルキル鎖の長さ、水酸基の個数及び不飽和結合の個数によって、多くの種類が存在する。植物由来のフリーセラミドにおいて、スフィンゴイド塩基は炭素数18個のもの及び脂肪酸は炭

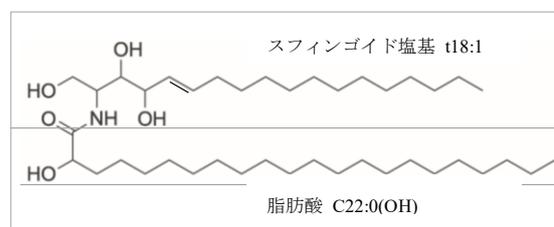


図2 フリーセラミド t18:1-C22:0(OH)の構造

素数16~26個のものについて報告がある⁴⁾。脂肪酸一例として、分子式t18:1-C22:0(OH)のフリーセラミドの構造を図2に示す。分子式の左側部分“t18:1”はスフィンゴイド塩基の構造を示し、“t”は水酸基が3つ、“18:1”は炭素が18個、且つ不飽和結合が1個であることを示している。なお、水酸基が2つの場合は“d”を用いる。分子式右側は脂肪酸の構造を示し、“C22:0”は、炭素が22個且つ不飽和結合が0個、“OH”は水酸基が1個であることを示している。t18:1-C22:0(OH)をLC/MS/MSで分析するとアミド結合部分で開裂し、前駆体であるスフィンゴイド塩基及び脂肪酸由来のプロダクトイオンがそれぞれ検出される。なお、スフィンゴイド塩基 t18:1の場合、水酸基の数だけ脱水し、水1分子が脱水した m/z : 298.3、水2分子が脱水した m/z : 280.3、水3分子が脱水した m/z : 262.3の3つの明瞭なマススペクトルが得られる。

真菌類において、GlcCerの分解酵素として、EGCrP1遺伝子が同定されており⁵⁾、また、真菌類と植物由来のGlcCerを反応させて、フリーセラミドを生成する報告がある⁶⁾。廃棄物の有効利用のため、様々な廃棄キノコとGlcCerを含む廃棄農産物からフリーセラミドを生成する共同研究を行い、廃棄ブナシメジと廃棄農産物である柚子の搾り粕

(以降、“柚子粕”と記述)から収率良く柚子粕由来のフリーセラミドを得た²⁾³⁾。この柚子粕フリーセラミドの構造解析を行うことはその機能性や物性の評価を行う上で重要である。しかし、標準品の種類が少なく、またフリーセラミドの種類が多いため定性分析が困難である。

標準品がない化学物質についてLC/MS/MSのSRM分析を用いて定性分析を行う場合、特徴的なプロダクトイオンの m/z を用いる手法がある。フリーセラミドの場合、フリーセラミドのプリカーサーイオン及びスフィンゴイド塩基由来の m/z を用いて構造解析した報告がある⁷⁾¹⁰⁾。一方で、脂肪酸の部分について、詳細に構造解析した報告例は少ない。これは、脂肪酸由来のプロダクトイオンのマススペクトルがカルボニル基由来であるため、ポジティブモードではスペクトルの強度が弱いこと、脂肪酸のアルキル鎖長によってはスフィンゴイド塩基のスペクトルと重なること及び異なる組成でプリカーサーイオンの m/z が近接しているものがあること等が要因として考えられる。一例として、 $t18:0-C22:0(OH)$ と $t18:0-C21:1(OH)_2$ の場合、脂肪酸の組成が異なるが、プリカーサーイオンの m/z はそれぞれ656.6193と656.5829であり、その差が0.0364と近接している。この m/z の差を区別するには質量分析計の分解能は少なくとも20,000以上必要であり、一般的なLC/MS/MSでは区別できない。

m/z 以外に組成の異なる2成分を区別する方法として、保持時間を利用する方法が考えられる。逆相C18カラムを使用したLC/MS/MSの分析において、スフィンゴ脂質はプリカーサーイオンの m/z 以外にアルキル鎖長、水酸基の数及び不飽和結合の数等の構造的特徴によって保持時間に差が生じ、分離されることが報告されている¹¹⁾。

本研究では、LC/MS/MSのマススペクトルによる解析及びフリーセラミドの m/z と保持時間の関係等を用いて、柚子粕フリーセラミドを定性する方法を検討したので報告する。

2 試験方法

2・1 試験対象

柚子粕フリーセラミドは、(株)ジェヌインR&Dから提供された粉末状(純度40%)のものを用いた。柚子粕セラミドをクロロホルム/メタノール(2:1)に溶解させ、250 mg/Lに調製後、カラム分析を行うため、孔径0.2 μm PTFE製ディスク型フィルターでろ過し、-30°Cの冷凍庫で保存した。分析時に、適宜、2-プロパノール/メタノール(4:1)で希釈した。

2・2 試験試薬

メタノール、2-プロパノール及びアセトニトリルは富士

フィルム和光純薬(株)製LC/MS用を用い、クロロホルム及びギ酸アンモニウムは和光純薬(株)製HPLC用を用いた。

フリーセラミドの標準品は、Toronto Research Chemicals Inc.製のセラミドC14 (d18:1-C14:0)、セラミドC16 (d18:1-C16:0)、セラミドC18 (d18:1-C18:0)、セラミドC20 (d18:1-C20:0)、セラミドC24 (d18:1-C24:0)、セラミドC26 (d18:1-C26:0)を用いた。標準品をクロロホルム/メタノール(2:1)で300 mg/Lに調製後、カラム分析を行うため、孔径0.2 μm PTFE製ディスク型フィルターでろ過し、-30°Cで保管した。分析時に、適宜、2-プロパノール/メタノール(4:1)で希釈した。

2・3 LC/MS/MSでの分析

2・3・1 LC/MS/MSの分析条件

Waters社製LC/MS/MS TQDを用い、表1の条件で分析した。分離をよくする目的で、SUPERIOREX ODSカラムを2本、全長50 cmを使用する報告がある¹²⁾。本分析も、保持時間の差を詳細に解析する必要があるため、SRM分析時に分離カラムを2本連結して用いた。なお、カラムにかかる圧力を下げるため、カラム温度を60°Cとした。また、プリカーサーイオンスキャンにおいて、短時間の分析に必要なスペクトル情報を取得するため、使用する分離カラムを1本とした。

表1 LC/MS/MSの分析条件

使用機種	ACQUITY UPLC (Waters製)
使用カラム	SUPERIOREX ODS S5 (大阪ソーダ製) 2.0 mm I.D. × 250 mm, 5 μm 、2本
移動相	A : 5 mM ギ酸アンモニウム、0.1 % ギ酸 アセトニトリル/水/メタノール (2:2:1) B : 5 mM ギ酸アンモニウム、0.1 % ギ酸 2-プロパノール/メタノール (4:1)
溶出条件	0 → 5 min A : 95 %, B : 5 % 5 → 18.5 min A : 95 → 0 %, B : 5 → 100 % 18.5 → 30 min A : 0 %, B : 100 %
カラム流量	0.18 mL/min
カラム温度	60 °C
試料注入量	10 μL
[MS条件]	
使用機種	XEVO TQD (Waters製)
イオン化法	ESI (+)
キャピラリー電圧	1.5 kV
Desolvation温度	350 °C
コーン電圧	26 V
コリジョン電圧	24 V

2・3・2 プリカーサーイオンの検索

柚子粕フリーセラミドのプリカーサーイオンを検索するため、プロダクトイオンであるスフィンゴイド塩基の

m/z を用いて、プリカーサーイオンスキャンを行った。

スキャンの範囲は m/z : 400~800で行い、得られたピークのうち、フリーセラミドのプリカーサーイオンの m/z を持つものを候補種とした。

2・3・3 LC/MS/MSによる組成分析

プリカーサーイオンスキャンで得られた柚子粕フリーセラミドの候補種について、SRM分析によりスフィンゴイド塩基の組成を確認した。確認には、スフィンゴイド塩基に特有なプロダクトイオンの m/z を用いた。

一例として、 m/z : 280.3を分析に用いた場合、スフィンゴイド塩基がt18:1又はd19:0である可能性が生じる。そこで、t18:1のみに特徴を持つ m/z : 262.3でSRM分析することで、スフィンゴイド塩基を確定できる。他の全てのフリーセラミド種についても、同様の方法でスフィンゴイド塩基を確定した。

2・4 LC-QTOF-MSによる脂肪酸の確認

LC/MS/MSの分析によりスフィンゴイド塩基を確定できたフリーセラミドについて、SCIEX社製X500R QTOFシステムで脂肪酸部分の組成を確認した。カラムの種類、

表2 スフィンゴイド塩基の分子式及び想定されるプロダクトイオンの m/z

	スフィンゴイド塩基	プロダクトイオンの m/z		
1	d16:0	256.3	238.3	
2	d16:1	254.3	236.3	
3	t16:0	272.3	254.3	236.3
4	t16:1	270.3	252.3	234.3
5	d17:0	270.3	252.3	
6	d17:1	268.3	250.3	
7	t17:0	286.3	268.3	250.3
8	t17:1	284.3	266.3	248.3
9	d18:0	284.3	266.3	
10	d18:1	282.3	264.3	
11	t18:0	300.3	282.3	264.3
12	t18:1	298.3	280.3	262.3
13	d19:0	298.3	280.3	
14	d19:1	296.3	278.3	
15	t19:0	314.3	296.3	278.3
16	t19:1	312.3	294.3	276.3
17	d20:0	312.3	294.3	
18	d20:1	310.3	292.3	
19	t20:0	328.3	310.3	292.3
20	t20:1	326.3	308.3	290.3

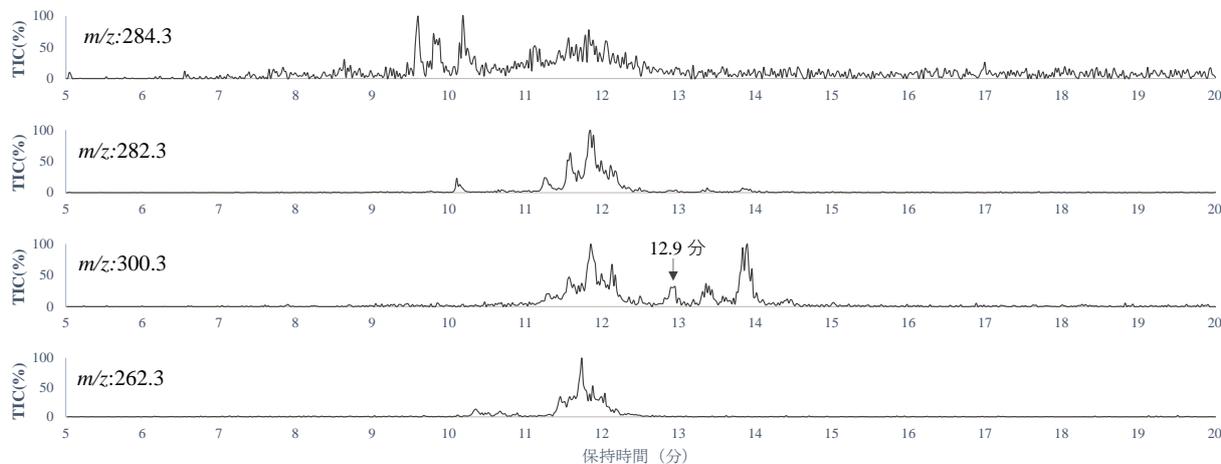


図3 m/z : 284.3、282.3、300.3 及び 262.3 のプリカーサーイオンスキャンのクロマトグラム

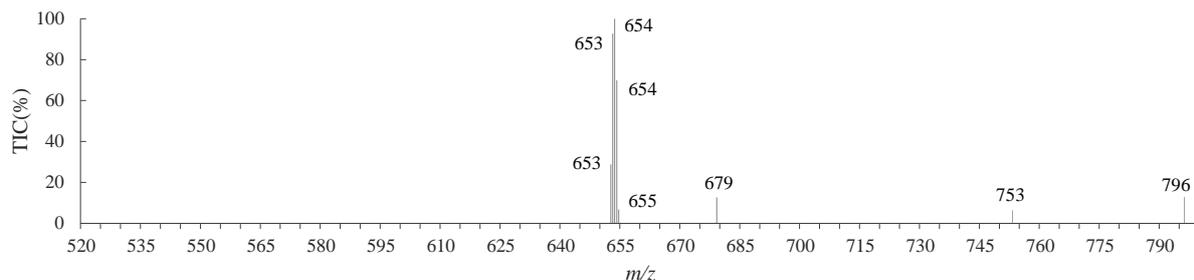


図4 12.9分にあるピークのマススペクトル

LCの分析条件及びイオン化条件は、LC/MS/MSと同じ条件(表1)に設定した。質量分析の条件は、スプレー電圧 4500 V、デクラスタリングポテンシャル電圧 40 V及びコリジョン電圧 30 Vに設定した。

3 結果及び考察

3・1 プリカーサーイオンの検索結果

スフィンゴイド塩基の分子式及びフリーセラミドの構造から想定されるプロダクトイオン[M+H]⁺について、*m/z*の理論値を算出した(表2)。スフィンゴイド塩基の炭素数は16~20個とした。また、スフィンガジエニン(d18:2)のようにスフィンゴイド塩基に不飽和結合が2つ以上ある植物性セラミドについて、米、こんにゃく、桃及び温州ミカ

ンから検出された報告があるが¹³⁾⁻¹⁵⁾、報告例が少ないため、今回、分析の対象外とした。

表2に示すスフィンゴイド塩基由来のプロダクトイオンの*m/z*を用いて、プリカーサーイオンスキャンを行った。例として、炭素数が18個のスフィンゴイド塩基であるd18:0、d18:1、t18:0及びt18:1由来のプロダクトイオンの*m/z*: 284.3、282.3、300.3及び262.3(表2の網掛け部分)をターゲットとして、プリカーサーイオンスキャンした結果を図3に示す。保持時間12分付近を中心に複数のピークが確認でき、得られたクロマトグラムの全てのピークについて、ピークを選択し、プリカーサーイオンのマススペクトルを読み取った。

図3の*m/z*: 300.3のクロマトグラムについて、一例として、保持時間12.9分にあるピークのマススペクトルを図4に示

表3 スフィンゴイド塩基 t18:0 に想定される
プリカーサーイオン *m/z* の早見表 (114 種)

分子式	化学式1		化学式2		化学式3	
	脂肪酸の 水酸基数0	<i>m/z</i>	脂肪酸の 水酸基数1	<i>m/z</i>	脂肪酸の 水酸基数2	<i>m/z</i>
t18:0-C12:0	C32H61NO4	500.5	C32H61NO5	516.5	C32H61NO6	532.5
t18:0-C12:1	C32H59NO4	498.5	C32H59NO5	514.5	C32H59NO6	530.5
t18:0-C13:0	C33H63NO4	514.5	C33H63NO5	530.5	C33H63NO6	546.5
t18:0-C13:1	C33H61NO4	512.5	C33H61NO5	528.5	C33H61NO6	544.5
t18:0-C14:0	C32H65NO4	528.5	C32H65NO5	544.5	C32H65NO6	560.5
t18:0-C14:1	C32H63NO4	526.5	C32H63NO5	542.5	C32H63NO6	558.5
t18:0-C15:0	C33H67NO4	542.5	C33H67NO5	558.5	C33H67NO6	574.5
t18:0-C15:1	C33H65NO4	540.5	C33H65NO5	556.5	C33H65NO6	572.5
t18:0-C16:0	C34H69NO4	556.5	C34H69NO5	572.5	C34H69NO6	588.5
t18:0-C16:1	C34H67NO4	554.5	C34H67NO5	570.5	C34H67NO6	586.5
t18:0-C17:0	C35H71NO4	570.5	C35H71NO5	586.5	C35H71NO6	602.5
t18:0-C17:1	C35H69NO4	568.5	C35H69NO5	584.5	C35H69NO6	600.5
t18:0-C18:0	C36H73NO4	584.5	C36H73NO5	600.5	C36H73NO6	616.5
t18:0-C18:1	C36H71NO4	582.5	C36H71NO5	598.5	C36H71NO6	614.5
t18:0-C19:0	C37H75NO4	598.5	C37H75NO5	614.5	C37H75NO6	630.5
t18:0-C19:1	C37H73NO4	596.5	C37H73NO5	612.5	C37H73NO6	628.5
t18:0-C20:0	C38H77NO4	612.5	C38H77NO5	628.5	C38H77NO6	644.5
t18:0-C20:1	C38H75NO4	610.5	C38H75NO5	626.5	C38H75NO6	642.5
t18:0-C21:0	C39H79NO4	626.5	C39H79NO5	642.5	C39H79NO6	658.5
t18:0-C21:1	C39H77NO4	624.5	C39H77NO5	640.5	C39H77NO6	656.5
t18:0-C22:0	C40H81NO4	640.5	C40H81NO5	656.5	C40H81NO6	672.5
t18:0-C22:1	C40H79NO4	638.5	C40H79NO5	654.5	C40H79NO6	670.5
t18:0-C23:0	C41H83NO4	654.5	C41H83NO5	670.5	C41H83NO6	686.5
t18:0-C23:1	C41H81NO4	652.5	C41H81NO5	668.5	C41H81NO6	684.5
t18:0-C24:0	C42H85NO4	668.5	C42H85NO5	684.5	C42H85NO6	700.5
t18:0-C24:1	C42H83NO4	666.5	C42H83NO5	682.5	C42H83NO6	698.5
t18:0-C25:0	C43H87NO4	682.5	C43H87NO5	698.5	C43H87NO6	714.5
t18:0-C25:1	C43H85NO4	680.5	C43H85NO5	696.5	C43H85NO6	712.5
t18:0-C26:0	C44H89NO4	696.5	C44H89NO5	712.5	C44H89NO6	728.5
t18:0-C26:1	C44H87NO4	694.5	C44H87NO5	710.5	C44H87NO6	726.5
t18:0-C27:0	C45H91NO4	710.5	C45H91NO5	726.5	C45H91NO6	742.5
t18:0-C27:1	C45H89NO4	708.5	C45H89NO5	724.5	C45H89NO6	740.5
t18:0-C28:0	C46H93NO4	724.5	C46H93NO5	740.5	C46H93NO6	756.5
t18:0-C28:1	C46H91NO4	722.5	C46H91NO5	738.5	C46H91NO6	754.5
t18:0-C29:0	C47H95NO4	738.5	C47H95NO5	754.5	C47H95NO6	770.5
t18:0-C29:1	C47H93NO4	736.5	C47H93NO5	752.5	C47H93NO6	768.5
t18:0-C30:0	C48H97NO4	752.5	C48H97NO5	768.5	C48H97NO6	784.5
t18:0-C30:1	C48H95NO4	750.5	C48H95NO5	766.5	C48H95NO6	782.5

表4 柚子粕由来のフリーセラミド候補

No.	分子式A	分子式B
1	t18:0-C16:0	t18:0-C15:1(OH)
2	t18:0-C20:0	t18:0-C19:1(OH)
3	t18:0-C22:0	t18:0-C21:1(OH)
4	t18:0-C23:0	t18:0-C22:1(OH)
5	t18:0-C24:0	t18:0-C23:1(OH)
6	t18:0-C25:0	t18:0-C24:1(OH)
7	t18:0-C24:1	t18:0-C23:2(OH)
8	t18:0-C25:1	t18:0-C24:2(OH)
9	t18:0-C26:1	t18:0-C25:2(OH)
10	t18:0-C16:0(OH)	t18:1-C15:1(OH) ₂
11	t18:0-C18:0(OH)	t18:1-C17:1(OH) ₂
12	t18:0-C20:0(OH)	t18:1-C19:1(OH) ₂
13	t18:0-C22:0(OH)	t18:1-C21:1(OH) ₂
14	t18:0-C23:0(OH)	t18:1-C22:1(OH) ₂
15	t18:0-C24:0(OH)	t18:1-C23:1(OH) ₂
16	t18:0-C25:0(OH)	t18:1-C24:1(OH) ₂
17	t18:0-C26:0(OH)	t18:1-C25:1(OH) ₂
18	t18:0-C24:0(OH) ₂	t18:0-C23:1(OH) ₃
19	t18:0-C25:0(OH) ₂	t18:0-C24:1(OH) ₃
20	t18:1-C22:0	t18:1-C21:1(OH)
21	t18:1-C23:0	t18:1-C22:1(OH)
22	t18:1-C24:0	t18:1-C23:1(OH)
23	t18:1-C26:0	t18:1-C25:1(OH)
24	t18:1-C22:1	t18:1-C21:2(OH)
25	t18:1-C24:1	t18:1-C23:2(OH)
26	t18:1-C25:1	t18:1-C24:2(OH)
27	t18:1-C26:1	t18:1-C25:2(OH)
28	t18:1-C16:0(OH)	t18:0-C15:1(OH) ₂
29	t18:1-C18:0(OH)	t18:0-C19:1(OH) ₂
30	t18:1-C21:0(OH)	t18:0-C20:1(OH) ₂
31	t18:1-C22:0(OH)	t18:0-C21:1(OH) ₂
32	t18:1-C23:0(OH)	t18:0-C22:1(OH) ₂
33	t18:1-C24:0(OH)	t18:0-C23:1(OH) ₂
34	t18:1-C25:0(OH)	t18:0-C24:1(OH) ₂
35	t18:1-C26:0(OH)	t18:0-C25:1(OH) ₂
36	t18:1-C24:0(OH) ₂	t18:1-C24:1(OH) ₃
37	t18:1-C26:0(OH) ₂	t18:1-C26:1(OH) ₃
38	t19:0-C26:0(OH)	t19:0-C25:1(OH) ₂

す。 m/z : 653~655のプリカーサーイオンが検出された。プリカーサーイオンが m/z : 653~655であり、プロダクトイオンが m/z : 300.3である組み合わせがフリーセラミド由来であるか確認するため、フリーセラミドの分子式、化学式及びプリカーサーイオンの m/z を記した早見表を作成した。一例として、スフィンゴイド塩基がt18:0 (m/z : 300.3、282.3、264.3) の場合に想定されるフリーセラミドのプリカーサーイオンの早見表を表3に示す。表3の化学式1~3は、それぞれの脂肪酸の水酸基の数が0~2個の組成であることを示す。なお、プリカーサーイオンは、1種のスフィンゴイド塩基につき、脂肪酸の炭素数が12~30個、不飽和結合の有無及び水酸基数 (0~2個) を組み合わせることで、合計114種のプリカーサーイオンを想定した。また、フリーセラミドの出発原料の一つであるGlcCerについて、前述のとおり炭素数16~26個の脂肪酸が報告されており⁴⁾、見落としを少なくするため、検索する脂肪酸の炭素数を12~30個にした。更に、植物性のフリーセラミドについて、脂肪酸に不飽和結合を2つ以上若しくは水酸基を3つ以上持つものは植物内で作られにくく、報告例もほとんどないため、分析の対象外とした。

スフィンゴイド塩基t18:0を持ち、プリカーサーイオンが m/z : 653~655であるフリーセラミドは、表3よりt18:0-C23:0及びt18:0-C22:1(OH)が候補として確認でき(表3の網掛け部分)、組成を2種に絞り込めた。

図3の全てのピーク及び表2の全てのスフィンゴイド塩基についても、近接するプリカーサーイオンの m/z を持つフリーセラミド2種に絞り込む解析を行い、その結果を表4に示す。表4の分子式A及びBはそれぞれ脂肪酸部分の組成が異なり、分子式Aは分子式Bと比べて不飽和及び水酸基の数が少ない組成を示す。なお、網掛け部分については、前述のとおり脂肪酸基に水酸基を3つ以上もしくは不飽和結合を2つ以上含むものは植物内で作られにくく報告例もほとんどないため候補から除外した。その結果、No.7~9、18~19、24~27及び36~37のフリーセラミドについては、分子式を1つ(分子式A)に絞り込んだ。

3・2 LC/MS/MSによるフリーセラミドのSRM分析

2種に絞り込んだフリーセラミドについて、LC/MS/MSによるSRM分析を行った。例として、表4のNo.4の分子式Aのt18:0-C23:0及び分子式Bのt18:0-C22:1(OH) について、 m/z : 654.6>300.3でSRM分析したクロマトグラムを図5に示す。その結果、保持時間26.1分にピークが見られた。上記2種のフリーセラミドは、プリカーサーイオンの m/z がそれぞれ654.6400及び654.6036と近接している特徴を持つ。しかし、それら2種は、脂肪酸の組成が異なるため同じ保持時間である可能性は低く、どちらかのフリーセラミドは存

在していないと推察された。

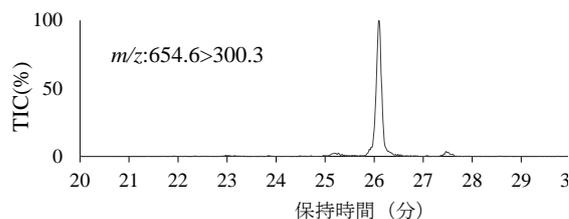


図5 m/z :654.6>300.3のクロマトグラム

同様に、脂肪酸の組成は異なるがプリカーサーイオンの m/z が近接する表4のNo.6 t18:0-C25:0 (m/z :682.6713)及びt18:0-C24:1(OH) (m/z :682.6349)について、 m/z : 682.6>300.3でSRM分析したクロマトグラムを図6に示す。その結果、保持時間25.6分及び26.5分にピークが認められ、両方のフリーセラミドの存在が推察された。

このように、LC/MS/MSではプリカーサーイオンの m/z が近接するフリーセラミドについて、脂肪酸の組成を特定することはできないものの、フリーセラミドの数を推測することができた。

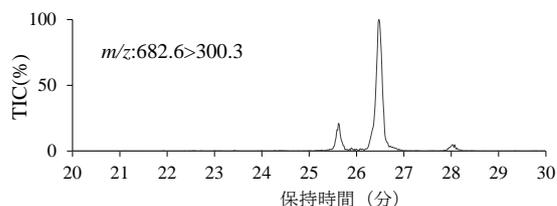


図6 m/z :682.6>300.3のクロマトグラム

3・3 LC-QTOF-MSでの分析結果

表4のフリーセラミド候補について、組成を確認するためLC-QTOF-MSを用いて精密質量分析した結果を表5に示す。スフィンゴイド塩基にt18:0、t18:1及びt19:0を持つ、39種のフリーセラミドが確認できた。

脂肪酸部分の炭素数が異なり、その他の組成が同じであるフリーセラミドを“グループ”と定義すると、39種のフリーセラミドは、10グループに分類することができた。柚子粕由来のフリーセラミドから、1つのグループに、1~8種の脂肪酸の炭素数が異なるフリーセラミドが検出された。

表5 LC-QTOF-MSで確認されたフリーセラミド

No.	分子式	グループ	No.	分子式	グループ
1	t18:0-C16:0	1	20	t18:1-C22:0	5
2	t18:0-C20:0		21	t18:1-C23:0	
3	t18:0-C22:0		22	t18:1-C24:0	
4	t18:0-C23:0		23	t18:1-C26:0	
5	t18:0-C24:0		24	t18:1-C22:1	
6	t18:0-C25:0	2	25	t18:1-C24:1	6
7	t18:0-C24:1		26	t18:1-C25:1	
8	t18:0-C25:1		27	t18:1-C26:1	
9	t18:0-C26:1	3	28	t18:1-C16:0(OH)	7
10	t18:0-C16:0(OH)		29	t18:1-C20:0(OH)	
11	t18:0-C18:0(OH)		30	t18:1-C21:0(OH)	
12	t18:0-C20:0(OH)		31	t18:1-C22:0(OH)	
13	t18:0-C22:0(OH)		32	t18:1-C23:0(OH)	
14	t18:0-C23:0(OH)		33	t18:1-C24:0(OH)	
15	t18:0-C24:0(OH)		34	t18:1-C25:0(OH)	
16	t18:0-C25:0(OH)	35	t18:1-C26:0(OH)	8	
17	t18:0-C26:0(OH)	36	t18:1-C24:0(OH) ₂		
18	t18:0-C24:0(OH) ₂	37	t18:1-C26:0(OH) ₂		
19	t18:0-C25:0(OH) ₂	4	38	t19:0-C26:0(OH)	9
			39	t18:0-C24:1(OH)	10

3・4 保持時間とm/zの関係

3・4・1 フリーセラミド標準品の保持時間とm/zの関係

同一グループであるフリーセラミドの標準品6種 (d18:1-C14:0、C16:0、C18:0、C20:0、C24:0及びC26:0) を10 µg/Lに調製し、LC/MS/MSのSRMモードで分析した結果を図7に示す。標準品のピークが保持時間 24.50分～26.92分の間

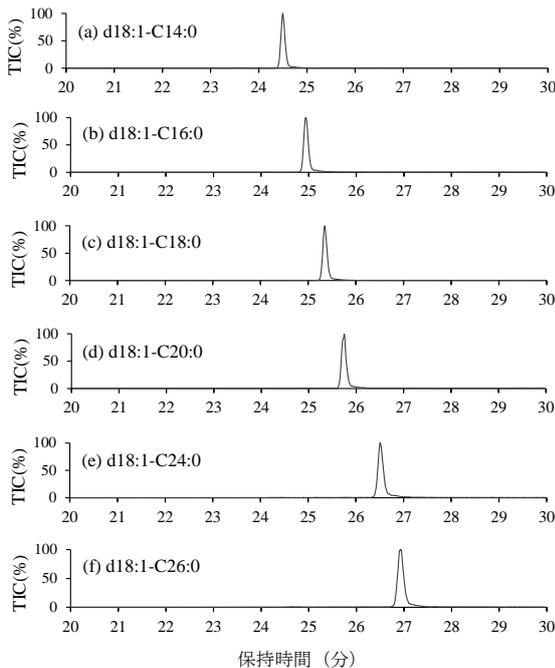


図7 d18:1グループ標準品のSRMクロマトグラム

に検出され、脂肪酸部分の炭素数が1つ増えると0.38～0.45分の間隔で保持時間が長くなった。

3・4・2 標準品及び柚子粕フリーセラミドの保持時間とm/zの関係

標準品及びLC-QTOF-MSで確認した柚子粕由来のフリーセラミドを用いて、m/zと保持時間の関係を解析した。解析にはグループ内にフリーセラミドを4種以上持つものを用いた。各グループについて、組成の特徴を表6に示す。表6における“R”は炭素数が14～26個の脂肪酸を示す。各グループの水酸基及び不飽和結合の合計数は、(a)d18:1-R:0(標準品)及び(b)t18:0-R:0が最も少なく3つ、また、(d)t18:1-R:1及び(f)t18:1-R:0(OH)が最も多く5つであった。

表6 各フリーセラミドの水酸基及び不飽和結合の数

フリーセラミドグループ	スフィンゴイド塩基		脂肪酸	
	水酸基(個)	不飽和結合(個)	水酸基(個)	不飽和結合(個)
(a) d18:1-R:0 (R=C14,16,18,20,24,26)	2	1	0	0
(b) t18:0-R:0 (R=C16,20,22,23,24,25)	3	0	0	0
(c) t18:1-R:0 (R=C22,23,24,26)	3	1	0	0
(d) t18:1-R:1 (R=C22,24,25,26)	3	1	0	1
(e) t18:0-R:0(OH) (R=C16,18,20,22,23,24,25,26)	3	0	1	0
(f) t18:1-R:0(OH) (R=C16,20,21,22,23,24,25,26)	3	1	1	0

標準品及び柚子粕由来フリーセラミドの各グループについて、プリカーサーイオンのm/zと保持時間の相関図を図8に示す。柚子粕由来のフリーセラミドは、m/z: 600～700付近に集中して検出され、いずれのグループの回帰曲線も、直線性が高いことが観察された。

プリカーサーイオンのm/zと保持時間から求めた回帰式を表7に示す。すべてのグループの回帰曲線は、r²=0.9995

表7 各フリーセラミドのプリカーサーイオンのm/z (x) 及び保持時間 (y) における回帰式

フリーセラミドグループ	y=ax+b		r ²
	a	b	
(a) d18:1-R:0	0.01424	17.261	0.9996
(b) t18:0-R:0	0.01413	16.825	0.9997
(c) t18:1-R:0	0.01361	17.018	0.9998
(d) t18:1-R:1	0.01332	17.148	0.9996
(e) t18:0-R:0(OH)	0.01336	16.834	0.9996
(f) t18:1-R:0(OH)	0.01257	17.223	0.9995

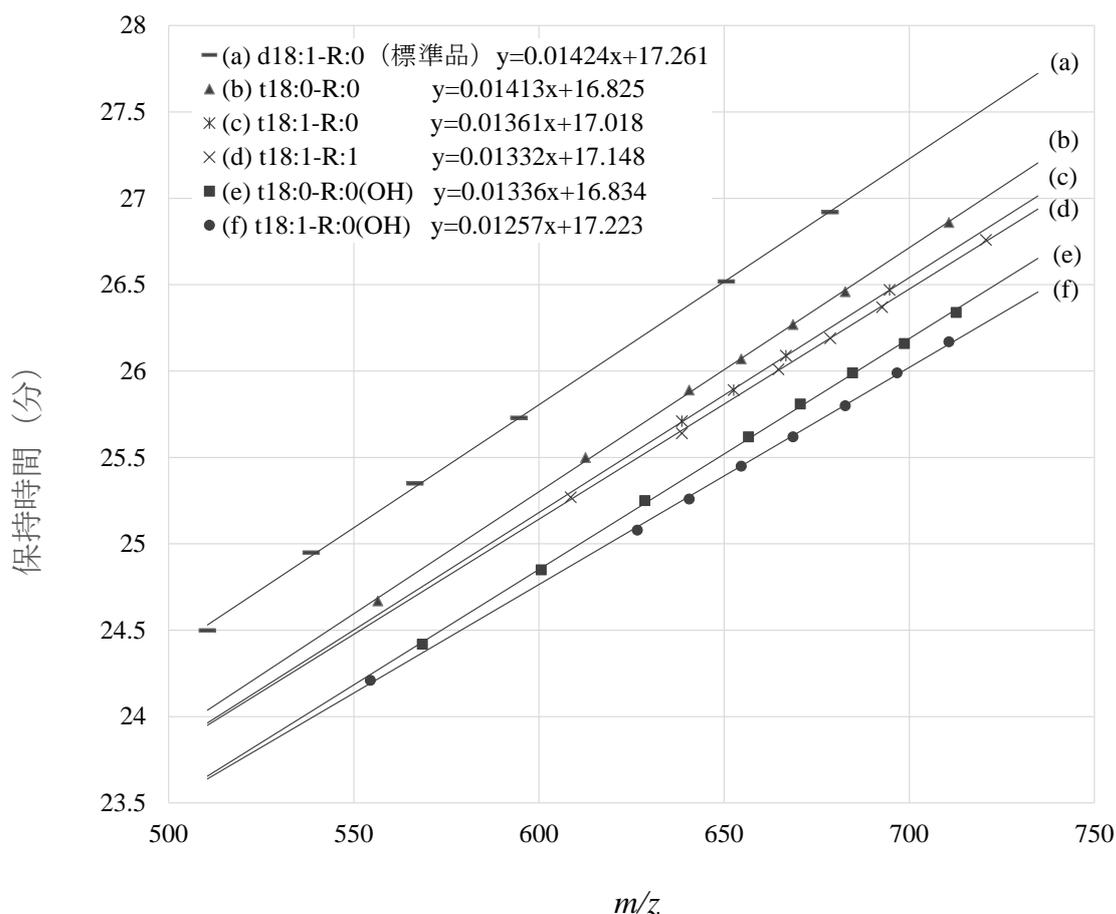


図8 各種フリーセラミドの m/z と保持時間の相関図

以上であり、柚子粕由来フリーセラミドのグループにおいても、 m/z と保持時間に強い正の相関関係を示した。また、各回帰曲線の傾きは、(a)d18:1-R:0が0.01424と最も大きく、(f)t18:1-R:0(OH)が0.01257と最も小さかった。フリーセラミド内の水酸基及び不飽和結合の数に応じて傾きは小さくなる傾向を示した。

フリーセラミドが集中した付近の m/z : 650を代表値として、表7の回帰式から各グループ m/z : 650 (x) に対する保持時間 (y) を算出し、各グループの保持時間を比較した。x =650に対して、水酸基を2つ持つ図8中のグループ(a)の保持時間は26.52分、水酸基を3つ持つグループ(b)、(c)、及び(d)は25.81~26.01分、水酸基を4つ持つグループ(e)及び(f)は25.39~25.52分であり、水酸基を多く配位するグループほど保持時間が早くなった。

なお、水酸基を3つ持つグループである(b)t18:0-R:0は不飽和結合が0、(c)t18:1-R:0は1つ及び(d)t18:1-R:1は2つ存在し、保持時間はそれぞれ26.01分、25.86分及び25.81分であり、不飽和結合が増えると保持時間が早くなる傾向にあっ

た。

また、水酸基を4つ持つグループである(e)t18:0-R:0(OH)は不飽和結合が0及び(f)t18:1-R:0(OH)は不飽和結合が1つ存在し、それぞれの保持時間は25.52分及び25.39分であり、不飽和結合が増えると保持時間が短くなる傾向にあった。

柚子粕由来のフリーセラミドについて、組成(炭素の数、水酸基の数及び不飽和結合の数)と保持時間の関係が明らかになり、標準品の保持時間を基準として、保持時間の差からフリーセラミドの組成を説明できた。

4 まとめ

d18:1グループのフリーセラミド標準品を用いて、脂肪酸の炭素数が一定数増えると一定の保持時間が長くなるLC分析条件を構築した。

上記のLC条件を用いて、標準品及び柚子粕由来のフリーセラミドについて、グループ毎に保持時間とプリカーサーイオンの m/z の関係を確認したところ、いずれのグループも強い正の相関関係にあった。また、水酸基及び不飽和

結合の数が多いグループほど、保持時間が短くなる傾向があった。柚子粕由来のフリーセラミドについて、プリカーサーイオンの m/z とLC/MS/MSのSRM分析による保持時間の関係から、フリーセラミドの組成を説明することができた。

今後、より多くのフリーセラミド標準品で m/z と保持時間の相関図を作成することで、特殊なプロファイリングデータ無しに、LC/MS/MSのみで定性が可能になると考えられる。

文献

- 1) 喜田 孝史ら：脂質栄養学, 25, 1, 75-85, 2016.
- 2) 「技術・テクノロジー」のプレスリリース (<https://www.atpress.ne.jp/news/222997>), 2020.8.20.
- 3) 宮鍋征克：FOOD Style 21, 26, 11, 45-49, 2022.
- 4) 今井博之, 柳川大樹：生化学, 88, 1, 94-104, 2016.
- 5) Yohei Ishibashi *et al.*：Journal of Biological Chemistry, 287, 368-381, 2021.
- 6) 特開 2021-10395, 2021.
- 7) J. E. Markham & J.G. Jaworski：Rapid Commun. Mass

Spectrom., 21, 1034-1314, 2007.

- 8) J. E. Markham J.Li, E.B.Cahoon & J.G. Jaworski：Journal of Biological Chemistry, 281, 2268422694, 2006.
- 9) Ishikawa T, Imai H & Maki：Lipids, 49, 295-304, 2014.
- 10) Kazushi Ohta *et al.*：Journal of Agricultural and Food Chemistry., 69, 9188-9198, 2021.
- 11) Emi Yumoto *et al.*：Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 85, 2, 205-210, 2021.
- 12) Toshiki Ishikawa *et al.*：Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques, S5, 7-11, 2014.
- 13) 向井克之, 大西正男：FOOD Style 21, 12, 1, 1-4, 2008.
- 14) 向井克之：FOOD Style 21, 26, 11, 29-33, 2022.
- 15) 下田博司, 森川敏生：FOOD Style 21, 26, 11, 50-55, 2022.

謝辞

本研究に際し、ご協力いただきました、京都大学の真鍋祐樹様及び菅原達也様並びに(株)ジェヌインR&Dに対して深く感謝いたします。また、この研究は(公財)福岡県リサイクル総合研究事業化センター共同研究プロジェクトによって実施されました。

(英文要旨)

Examination of an analytical method for ceramide derived from waste agricultural products using liquid chromatography – tandem mass spectrometry

Naruyasu ITAGAKI and Kazuhiro TOBIISHI

Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan

A positive correlation was detected between the alkyl chain length of the fatty acid and its retention time in measurements of free ceramide standards containing a d18:1 sphingoid base under the specific analytical conditions of liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). In measurements of free ceramides candidates derived from yuzu lees, some groups containing different compositions of hydroxyl groups and unsaturated bonds were detected by LC–MS/MS and determining the composition by LC–quadrupole time-of-flight MS (LC–QTOF–MS). In composition analyses by LC–MS/MS, the retention time and m/z of the precursor ion of each free ceramide group showed a strong positive correlation, with a correlation coefficient of $R^2 = 0.9995$ or higher. Free ceramide groups with more hydroxyl groups and unsaturated bonds had shorter retention times. This allowed us to determine the composition of free ceramides derived from yuzu lees based on the difference in retention time from that of the standard substance in selected reaction monitoring analysis by LC–MS/MS.

[Key words; free ceramide, yuzu lees ceramide, LC–MS/MS]