

超臨界流体クロマトグラフィーと トリプル四重極 MS 検出器を用いた 植物油の定性分析



Authors

安田 恭子
澤田 浩和

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

植物油の主成分であるトリアシルグリセロール（TAG）を超臨界クロマトグラフィー（SFC）で分離し、トリプル四重極 MS 検出器のニュートラルロス（NL）スキャンを使って定性分析しました。SFC を用いることで、同じパーティションナンバー（PN）をもつ TAG や、異性体 TAG も分離できることが示されました。また、NL スキャンを用いることで、TAG を構成する脂肪酸種を簡単に同定することができました。さらに NL スキャンデータから得られるプリカーサイオンの情報により、TAG のプロファイリングが可能でした。この手法は特別な前処理を必要としないため、TAG を定性分析する迅速かつ簡便な手法として利用できると考えられます。

目的

脂質はタンパク質、糖質と並んで、生体に含まれる 3 大主要成分の 1 つです。脂質は人体にとってエネルギー貯蔵物質として重要な栄養素であり、また食べ物をおいしくしたり、食べやすくしたりするなどの役割も担っています。天然型脂質の代表物質はトリアシルグリセロール (TAG) です。特に植物油の TAG は人が1日に取得するカロリーの 25 %にも上るといわれています。そのため植物油のTAGプロファイリングは、その分解機構や機能を考える上で重要であるといえます。植物油のTAGを構成する脂肪酸は、炭素数は14 ~ 22、二重結合数は 0 ~ 3 であることが知られています (表 1)。そのため、これら多様な脂肪酸が3つ結合して形成される TAG の定性分析は困難であり、簡便で正確な TAG 分析方法が必要とされています。

一方、超臨界クロマトグラフィー (SFC) は疎水性化合物の分離に威力を発揮しており、HPLC では不可能なユニークな分離を実現するテクノロジーとして注目を集める分離手法です。このアプリケーションノートでは植物油の TAG を SFC で分離し、トリプル四重極 MS のニュートラルロススキャンで検出することで、そのプロファイリングを行いました。

表 1 植物油TAGに含まれる脂肪酸の名称、略語、炭素数 (CN)、二重結合数 (DB) およびパーティションナンバー (PN*)の一覧

脂肪酸名	略語	CN	DB	PN
ミリスチン酸(C14:0)	M	14	0	14
パルミチン酸 (C16:0)	P	16	0	16
パルミトレイン酸(C16:1)	Po	16	1	17
ステアリン酸(C18:0)	S	18	0	18
オレイン酸(C18:1)	O	18	1	16
リノール酸(C18:2)	L	18	2	14
リノレン酸(C18:3)	Ln	18	3	12
アラキジン酸(C20:0)	A	20	0	20
ガドレイン酸(C20:1)	G	20	1	18
ベヘン酸(C22:0)	B	22	0	22
リグノセリン酸(C24:0)	Li	24	0	24

*PN=CN-2×DB

分析条件

装置は Agilent Infinity II SFC システムを用いました。TAG 検出には Agilent Jet Stream (AJS) イオン源を装着した Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS を使用しました。使用した機器一覧は表 2 に示しています。カラムから出た溶離液は、Agilent MS パッシブスプリッタキットを用い、イオン化促進用のメイクアップ溶液と混ぜてから背圧レギュレータ (BPR) および MS に分岐し測定しました。植物油は市販の亜麻仁油、オリーブ油、胡麻油の 3 種を用い、イソプロパノールで 1/100 に希釈して測定に用いました。その他の条件は表 3 に記載しています。

表 2 本アプリケーションノートで使用した装置一覧

型番	装置名
G4301A	Infinity II SFC コントロールモジュール
G4767A	1260 Infinity II SFC マルチサンブラ
G4782A	1260 Infinity II SFC バイナリポンプ
G7116B	1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット
G7111B	1260 Infinity II クォータリポンプ
G6470A	トリプル四重極LC/MS

表 3 測定条件一覧

パラメータ	値
ドライガス	325 °C, 10 L/min
ネブライザガス圧	25 psi
シースガス	400 °C, 12 L/min
キャピラリー電圧	3000 V
極性	Positive
ノズル電圧	500 V
スキャンスピード	100 amu/sec
スキャン範囲	50 - 1500 m/z
フラグメンタ電圧	135 V
コリジョンエネルギー	40 V (NL scan)
カラム	ZORBAX 300SB-C18 4.6×150 mm (3.5 μm)
移動相 A	二酸化炭素
移動相 B	メタノール
流速	2.5 mL/min
グラジェント	0.0min (3%B)->5.5min (3%B)->11 min (60%B)
背圧レギュレータ	120 Bar, 60 °C
メイクアップ溶媒	5 mM ギ酸アンモニウムメタノール溶液
メイクアップ溶媒流速	0.2 mL/min
注入量	2 μL
カラム温度	40 °C

結果および考察

MSスキャン

最初にそれぞれの植物油の MS スキャンデータを取得しました。得られたデータより EIC の重ね書きをしたものを図 1 に示しました。すべての植物油に含まれる TAG は 8 分以内に溶出しました。

亜麻仁油は m/z 890.7、オリーブ油と胡麻油では m/z 902.8 のピークが最も強く観測されました。一般的にオリーブオイルにはオレイン酸 (C18:1) が多く含まれており、TAG の側鎖すべてがオレイン酸である 000 の含有率が最も高いことが知られています。000 の化学式は $C_{57}H_{104}O_6$ であり、モノアイソトピック質量は 884.8 ですので、 m/z 902.8 は 000 のアンモニウム付加体であると考えられます。

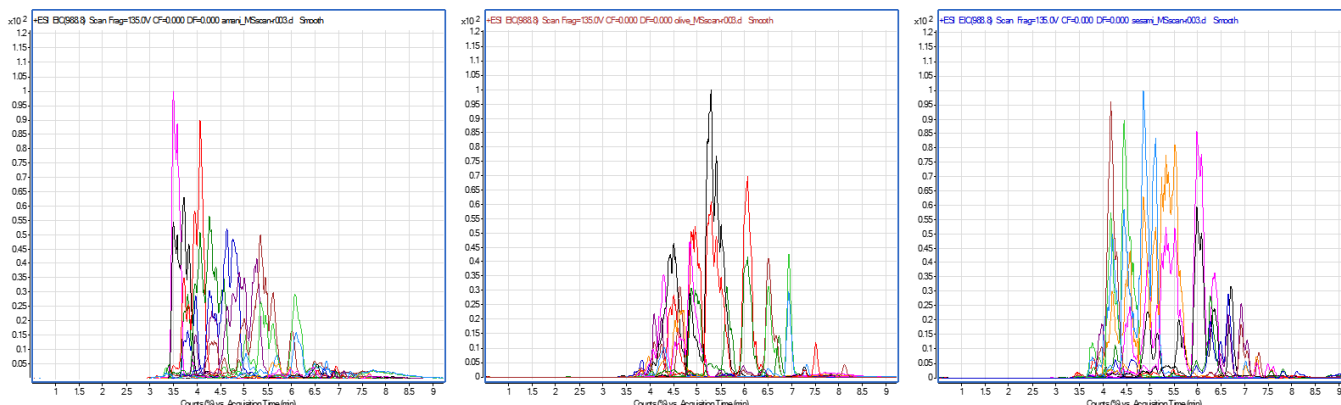


図1 a)亜麻仁油 b)オリーブ油 c)胡麻油のEICクロマトグラム(重ね書き)

同様に亜麻仁油で観測された m/z 890.7 は側鎖すべてがリノレン酸 (C18:3) である LnLnLn と推測されます。この TAG の化学式は $C_{57}H_{92}O_6$ でありモノアイソトピック質量は 872.7 ですので、観測された m/z 890.7 もアンモニウム付加体であると考えられます。

ニュートラルロススキャン

TAG の MS スキャンデータからは、TAG が複数の異性体をもつことが示されました。また TAG はほぼアンモニウム付加体として観測されましたが、ナトリウム付加体やプロトン付加体もわずかながら観測されました。そのため、そのため四重極の MS スキャンデータだけでは TAG の脂肪酸組成を推定することは困難でした。そこでニュートラルロス (NL) スキャンを使って TAG の測定を行いました。

NL スキャンは 2 つの四重極の質量差を一定に保ちながら四重極を走査する測定方法です。衝突誘起解離 (CID) で生成される特定のイオンを、高い選択性をもって検出することができます。TAG は CID でジアシルグリセロール (DAG) と脂肪酸のフラグメントを生成します。脂肪酸は中性分子として解離しますので、2 つの四

重極の質量差を目的とする脂肪酸の質量とした場合、側鎖に目的脂肪酸をもつ TAG だけが検出できます。例えば TAG (C18:1/C18:1/C18:1) は $[M+NH_4]^+$ である m/z 902.8 が観測されると予想できます。この TAG は CID により DAG (C18:1/C18:1) + H と C18:1 + NH_3 に解離します。中性分子である C18:1 + NH_3 を欠損 (ロス) する NL スキャン条件で測定すると、側鎖に C18:1 をもつ TAG が検出できます。標準品である TAG (C18:1/C18:1/C18:1) のプロダクトイオンスキャンデータを図2に示しました。DAG (C18:1/C18:1) のプロトン付加体と思われる m/z 603.6 のプロダクトイオンが確認されました。

P(C16:0)、Po(C16:1)、S(C18:0)、O(C18:1)、L(C18:2)、Ln(C18:3)、A(C20:0)、G(C20:1) および B(C22:0) について NL スキャンデータを取得しました。その中で特徴的であった O(C18:1)、L(C18:2)、Ln(C18:3)、A(C20:0) の TIC クロマトグラムを図3に示しました。亜麻仁油は他の 2 つと比べて Ln(C18:3) が多く観測されました。オリーブ油と胡麻油はよく類似した TIC を示しましたが、L(C18:2) は胡麻油に特異的に多いことがわかりました。また、A(C20:0) は亜麻仁油ではほとんど検出されず、オリーブ油と胡麻油に含まれることが示されました。このように、NL スキャン測定を行うことで TAG を構成する脂肪酸種を同定できることが示されました。

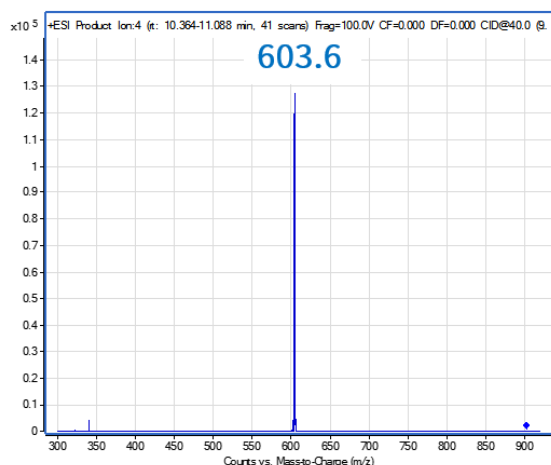


図2 市販のTAG (C18:1/C18:1/C18:1)を測定して得られたプロダクトイオンスペクトル

TAG プロファイリング

NL スキャンデータからはプリカーサイオンの情報も得ることができます。図4には胡麻油について、NL スキャンデータから m/z 904 を抽出した EIC を示しました。対象の脂肪酸は S(C18:0)、O(C18:1)、および L(C18:2) の 3 種です。保持時間 5.9 分に溶出したピークからは S(C18:0) と O(C18:1) のみ検出できました。S と O を側鎖にもつ TAG は SOO もしくは SSO です。SOO の化学式は $C_{57}H_{106}O_6$ ですので、プリカーサイオンのアンモニウム付加体は m/z 904.8 で観測されます。一方、SSO の化学式は $C_{57}H_{108}O_6$ ですので、プリカーサイオンのアンモニウム付加体は m/z 906.8 で観測されます。以

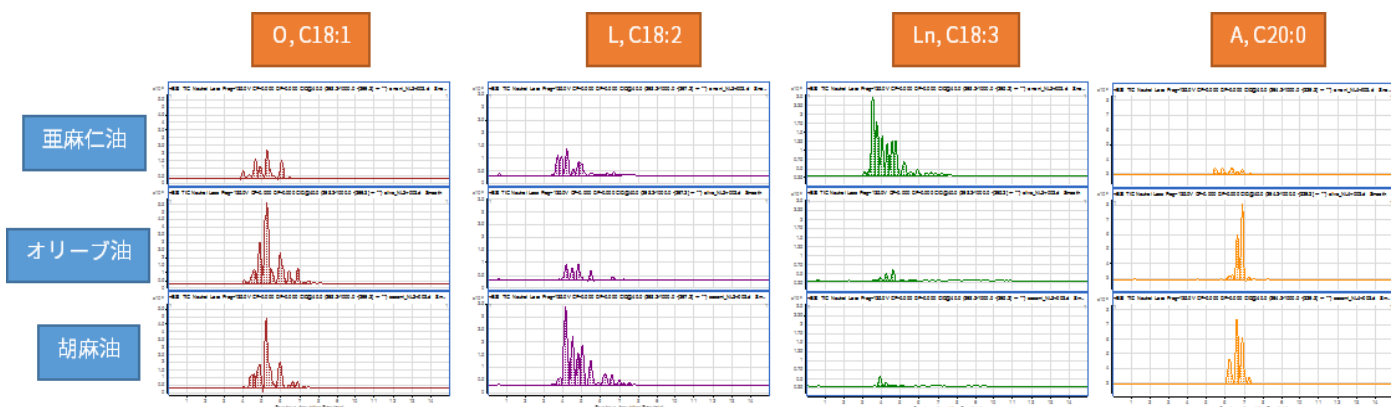


図3 NL スキャンデータから得られた各種植物油の TIC の比較

上より、この5.9分に溶出したTAGはSOO (C18:0/C18:1/C18:1)であると推定できました。同様に、保持時間 6.2分に溶出したピークからは S(C18:0)と L(C18:2)のみ検出できました。SとLを側鎖にもつTAGはSLLもしくはSSLです。SLLの化学式は $C_{57}H_{102}O_6$ ですので、プリカーサイオンのアンモニウム付加体は m/z 900.8で観測されます。一方SSLの化学式は $C_{57}H_{106}O_6$ ですので、プリカーサイオンのアンモニウム付加体は m/z 904.8で観測されます。以上より、この6.2分に溶出したTAGはSSL (C18:0/C18:0/C18:2)であると推定できました。

SOOとSSLは共に同じPNを持っていますが、SFCで分離できることがわかりました。またSOOとSSLは構造異性体ですが、NLスキャンを使うと標準品がなくても簡単に識別できることが示されました。

表4 胡麻油の TAG プロファイリング結果

名称	CN	DN	PN	化学式	質量	m/z
LLL	54	6	42	$C_{57}H_{98}O_6$	878.7	896.7
PLL	52	4	44	$C_{55}H_{98}O_6$	854.7	872.7
PPO	50	3	44	$C_{53}H_{100}O_6$	832.8	850.8
OLL	54	5	44	$C_{57}H_{100}O_6$	880.8	898.8
OOL	54	4	46	$C_{57}H_{102}O_6$	882.8	900.8
OOL	54	4	46	$C_{57}H_{102}O_6$	882.8	900.8
SPL	52	2	48	$C_{55}H_{102}O_6$	858.8	876.8
OOO	54	3	48	$C_{57}H_{104}O_6$	884.8	902.8
SOL	54	3	48	$C_{57}H_{104}O_6$	884.8	902.8
SOO	54	2	50	$C_{57}H_{106}O_6$	886.8	904.8
PLA	54	2	50	$C_{57}H_{106}O_6$	886.8	904.8
SSL	54	2	50	$C_{57}H_{106}O_6$	886.8	904.8
PLA	54	2	50	$C_{57}H_{106}O_6$	886.8	904.8
OOG	56	3	50	$C_{59}H_{108}O_6$	912.8	930.8
OLA	56	3	50	$C_{59}H_{108}O_6$	912.8	930.8
SSO	54	1	52	$C_{57}H_{108}O_6$	888.8	906.8
OOA	56	2	52	$C_{59}H_{110}O_6$	914.8	932.8
SOG	56	2	52	$C_{59}H_{110}O_6$	914.8	932.8
PLB	56	2	52	$C_{59}H_{110}O_6$	914.8	932.8
OLB	58	3	52	$C_{61}H_{112}O_6$	940.8	958.8

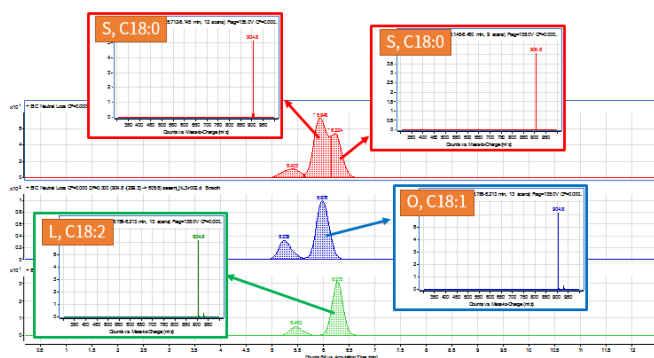


図4 m/z 904で抽出したS(C18:0)、O(C18:1)、およびL(C18:2)の比較。測定対象は胡麻油。

この手法を用いて、3種の植物油のTAGプロファイリングを行いました。PNは亜麻仁油で36-50、オリーブ油で44-54、胡麻油で42-52でした。亜麻仁油が他の食用油と比べてPNが小さいことが示されました。また、同じPNを持っていても、TAGを構成する脂肪酸種が異なるものも観測されました。例えばPNが50であるOPSはオリーブオイルでのみ観測されました。代表として胡麻油の結果を表4にまとめました。

まとめ

SFC とトリプル四重極の NL スキャンを用いて植物油に含まれる TAG を分析しました。SFC を用いることで TAG は 8 分以内で溶出し、同じ PN を持っている TAG も分離できました。また、TAG の異性体も分離できることが示されました。NL スキャンデータから簡単に TAG のプロファイリングができることがわかりました。この分析方法は、TAG の迅速な定性ツールとして期待できると思われま

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2018

Printed in Japan, June 28, 2018

LC-MS-201806YD-001

