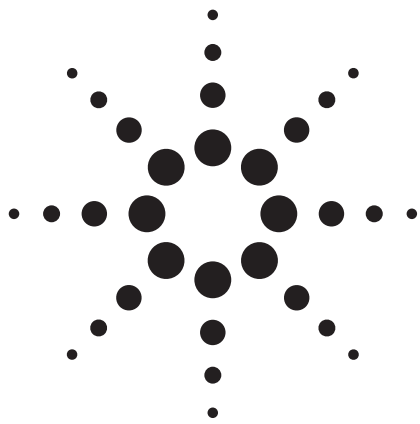




Agilent 1290 Infinity LC UHPLC システムを使用した逆相 HPLC による トリグリセリドの高分離能分析

アプリケーションノート

食品、バイオ燃料

著者

Michael Woodman
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

概要

ダイオードアレイ検出器 (DAD) を備えた Agilent 1290 Infinity LC システムを使用して、非水系逆相グラジエント条件で大豆油に含まれるトリグリセリドを分析しました。カラムには、600 bar (9000 psi) または 1200 bar (18,000 psi) で使用可能な 1.8 μm の充填剤を充填した種々の長さの内径 3.0 および 2.1 mm の ODS を使用しました。溶出力の強い溶媒としてイソプロピルアルコール (IPA) またはメチル *tert*-ブチルエーテル (MTBE) を、溶出力の弱い溶媒としてアセトニトリルを使用して長い高分離能カラムを用いた場合の Agilent 1290 Infinity LC システムの性能を示します。



Agilent Technologies

はじめに

動物または野菜を由来とする油脂中のトリグリセリドをそのまま分析することは、トリグリセリドの化学組成の解明、燃料としての可能性の評価、および生体システムにおける脂質代謝とその作用の解明などに役立ちます。高速液体クロマトグラフ (HPLC) でトリグリセリドを分析するには、一般的にグラジエント溶出と短波長での検出が必要です。トリグリセリドには発色基がほとんどないので、蒸発光散乱検出器 (ELSD) または質量分析計を使用することも有効です。

このアプリケーションノートの作成に先立ち、大豆、トウモロコシ、米糠、ペニバナ、ブドウの種、オリーブ、およびヤシなどさまざまな植物油を分析しましたが、米国では大豆油の生産量が非常に多くバイオ燃料の生産の重要性が高まっているので、このアプリケーションノートでは、大豆油に含まれるトリグリセリドの分離度が最大になる条件を検討しました。ただし、ここで紹介する条件は、動物性油脂を含むさまざまな油脂にも適用することができます。

一般に、トリグリセリドの水に対する溶解度は非常に小さいので、順相クロマトグラフィもしくは非水系逆相クロマトグラフィによって分離します。順相クロマトグラフィは、主に極性官能基の違いに基づいて試料を分離します。一方、逆相クロマトグラフィは、炭素鎖の長さまたは不飽和結合の数などの炭素骨格のわずかな性質の違いにより試料を分離します。

Perkins の著書によれば [1]、大豆油の場合、トリグリセリドの主要な構成脂肪酸は、ミリスチン酸 (14:0)、パルミチン酸 (16:0)、オレイン酸 (18:1)、リノール酸 (18:2)、およびリノレン酸 (18:3) です。その他にも少量の脂肪酸が多数存在しますが、それらの脂肪酸とグリセロールとの結合はランダムなので、トリグリセリドの構成脂肪酸の組み合わせは多岐にわたっている可能性があります。トリグリセリドの構成脂肪酸の主な差異は炭素鎖の長さや二重結合の数であるため、トリグリセリドの多様性のほとんどは非極性有機構造の特徴に起因していると見ることができます。したがって、逆相クロマトグラフィがこのアプリケーションに最適であると考えられます。トリグリセリドは水に対する溶解度が極めて小さいので、通常は有機溶媒比率の高い移動相か、またはこのアプリケーションノートのように非水系移動相を使用します。

トリグリセリドの典型的な構造を図 1 に示します。[2]

構成脂肪酸は上から順に、パルミチン酸 (C16:0)、オレイン酸 (C18:1)、 α リノレン酸 (C18:3) で、炭素鎖の長さや二重結合の数、位置が異なっています。組成式は $C_{55}H_{98}O_6$ です。

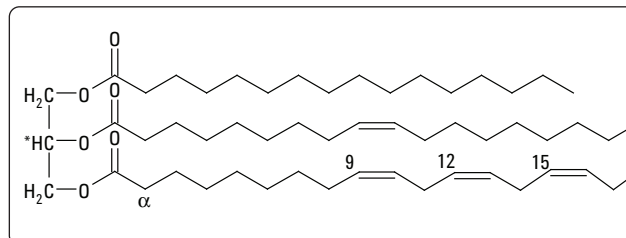


図 1. トリグリセリドの典型的な構造

実験

サンプル調製

IPA または 体積比 2:1 のメタノール/MTBE 中で濃度 10 mg/mL の溶液を作り、適宜希釈して使用しました。試料注入量は 0.2 ~ 2 μ L です。

LC メソッドの詳細

LC 条件

Agilent 1290 Infinity LC システム・バイナリポンプ G4220A、
Agilent 1290 Infinity LC システム・オートサンブラ G4226A
Agilent カラムコンパートメント G1316C (スイッチングバルブ搭載)
Agilent 1290 Infinity LC システム・ダイオードアレイ検出器 G4212A
(光路長 10 mm のファイバーオプティックフローセル搭載)

カラム: (具体的な使用方法是各クロマトグラムを参照してください)
Agilent ZORBAX SB-C18 RRHT, 3 mm x 150 mm, 1.8 μ m 600 bar, 部品番号 829975-302
Agilent ZORBAX SB-C18 RRHD, 2.1 mm x 100 mm, 1.8 μ m 1200 bar, 部品番号 858700-902
Agilent ZORBAX SB-C18 RRHD, 2.1 mm x 150 mm, 1.8 μ m 1200 bar, 部品番号 859700-902
場合によりカラムを直列につなぎ分離能を向上させました。

カラム温度: 20 °C または 30 °C

移動相: A = アセトニトリル
B = IPA または MTBE (クロマトグラムを参照)

流量: クロマトグラムを参照してください

グラジエント: IPA に比べ MTBE の溶出力は大きいので、グラジエント条件は、IPA の場合は 20 % ~ 60 %、MTBE の場合は 10 % ~ 40 % としました。グラジエントは、カラムボリュームあたりの増加を IPA グラジエントでは 2.6 %、MTBE では 2.0 % に保ち、それに応じてグラジエント時間および流量を変更しました。これは、Agilent メソッドトランスレータを使用して計算しました。[3]

DAD 条件

検出: 210、220、および 230 nm、バンド幅 4 nm、リファレンス: オフ

結果と考察

アセトニトリル/IPA グラジエントを使用したトリグリセリドの分離例を図 2 に示します。

図 2 のクロマトグラムとその条件について、次のような指摘があると思われます。溶出力の弱い有機溶媒として、より安価なメタノールを使用するのが理想的ですが、メタノールまたはメタノールを含む変性エタノールを使用すると、トリグリセリドの分離度が大きく低下します。アセトニトリル/IPA のグラジエ

ントを行う場合、システム圧の大幅な増大が起こり、システムの使用上限圧力が分離条件の制限となる可能性があります。また、クロマトグラフィの分離能は温度の上昇とともに低下するため、溶媒の粘性を低下させる手段としてカラム温度を上昇させることは一般的に好ましくありません。

しかし、最高使用圧の高いシステムとカラムを使用することで、これらの制限にとらわれずに最適な分離条件を検討することができます。

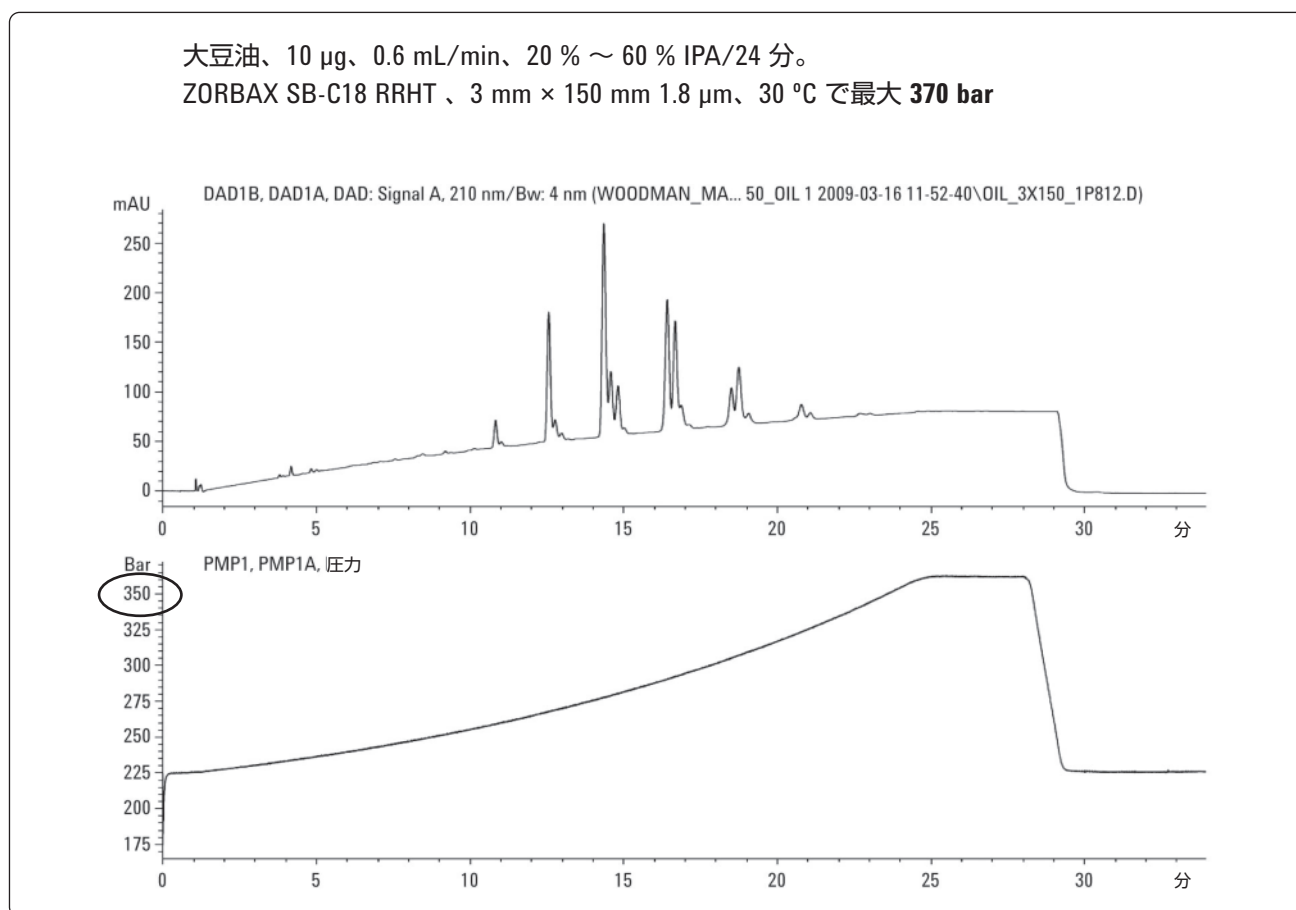


図 2. 3 mm $\times$ 150 mm の ZORBAX RRHT、1.8 μ m カラムにおける大豆油のクロマトグラム (UV 210-nm、上段)。システム圧のトレース (下段)。流量 0.6 mL/min、グラジエント時間 24 分。移動相、IPA/ACN。クロマトグラムは、トリグリセリドの分離で見られる典型的な難しさを示しており、クロマトグラフ的に類似しているトリグリセリドの小さなピーク群が見られます。これらのピーク群は、炭素数および不飽和度が同じ位置異性体ではなく、質量分析の結果からさまざまな鎖長および二重結合の数を持つトリグリセリドの混合物であることがわかっています。

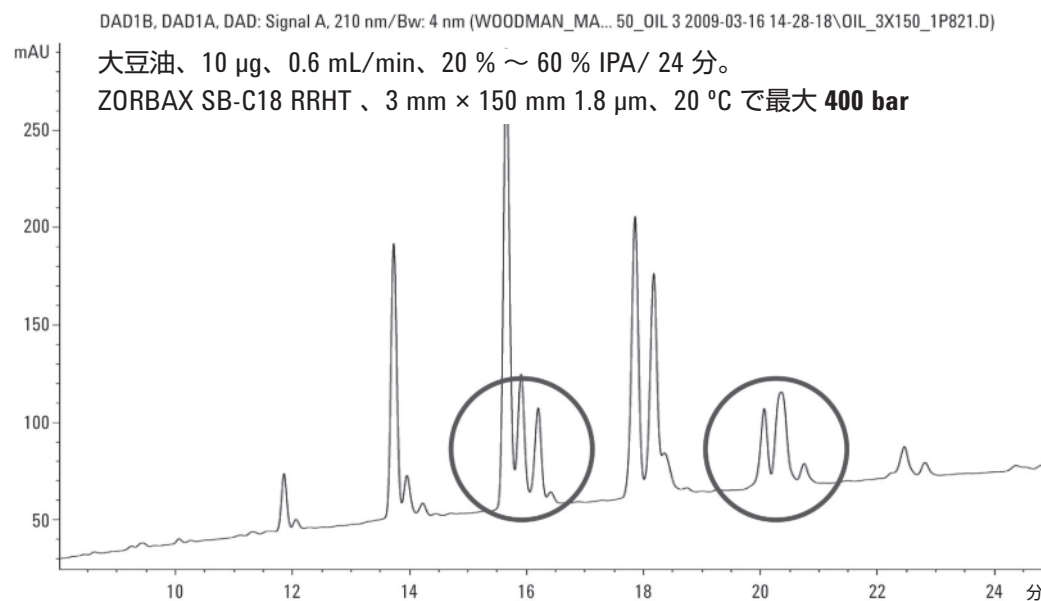
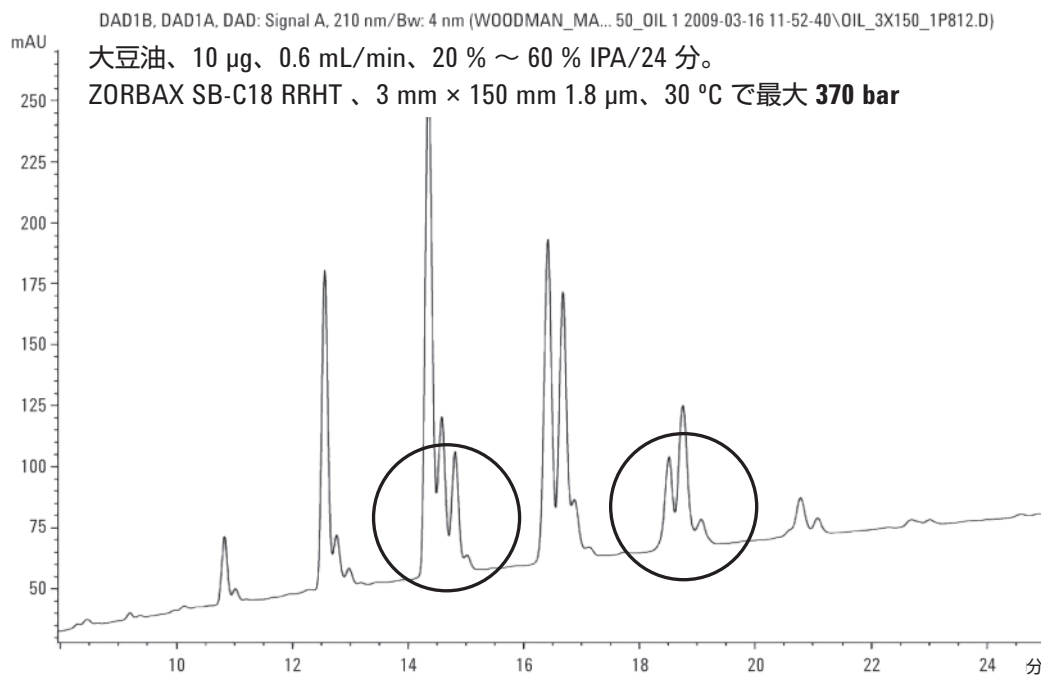


図 3. 図 2 の上段に示した 30 $^{\circ}$ C におけるクロマトグラムの拡大。図 2 とカラム温度以外は同条件でカラム温度 20 $^{\circ}$ C のクロマトグラム (下段)

図 3 では、30 $^{\circ}$ C で分離したときに比べ、20 $^{\circ}$ C では分離に改善が見られます。低い温度でのシステム圧の増加はおよそ 10 % です。分離とシステム圧の兼ね合いから、多くの場合、分離は

30 $^{\circ}$ C で行われてきましたが、Agilent 1290 Infinity LC システムの最高使用圧は 1200 bar なので 20 $^{\circ}$ C での分離も可能であり、分離の改善に有効であることが明らかになりました。

大豆油、10 µg、0.29 mL/min、20 % ~ 60 % IPA/ 27 分。
ZORBAX SB-C18 RRHD、2.1 mm × 250 mm 1.8 µm、20 °C で最大 **760 bar**

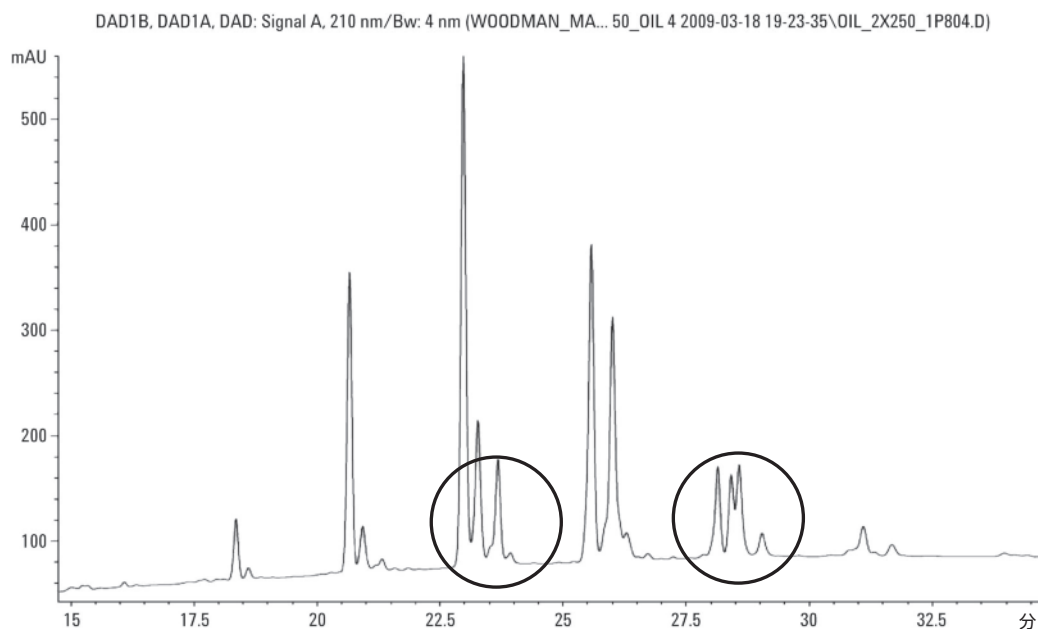


図 4. Agilent ZORBAX SB-C18 RRHD カラム (最高使用圧 1200 bar)、2.1 mm × 250 mm、1.8 µm、(150 mm と 100 mm を接続) による大豆油の分析。流量 0.29 mL/min、グラジエント時間 27 分。最大圧力 760 bar。

図 4 では、カラムを長くするとトリグリセリドの一部の分離度が著しく向上することがわかります。分離度をさらに改善するには、より長いカラムを試すか、別の移動相またはカラム (固定相) を試すことが現実的です。トリグリセリドの分析でもほとんどの高性能分離と同様に、システム圧や使用温度、最大流量などが分離条件の制限になる傾向があります。トリグリセリドの分子量が比較的大きいことや分子構造が柔軟なことなどの

理由により、高いカラム温度や高流量でのトリグリセリドの分離はうまくいきませんでした。有機溶媒の変化率が同じとなるように注意深くグラジエント条件を変換しても、高流量での分離ではクロマトグラム全体にわたって分離度の低下が見られました。IPA はかなり粘性が高く大きな圧損の原因となるので、IPA の代替として、アセトニトリルと混和性があり短波長での UV 検出に適した他の低極性溶媒を検討する必要があります。

大豆油、10 µg、0.29 mL/min、10 % ~ 40 % IPA/ 27 分。
ZORBAX SB-C18 RRHD、2.1 mm × 250 mm 1.8 µm、20 °C で最大 **440 bar**

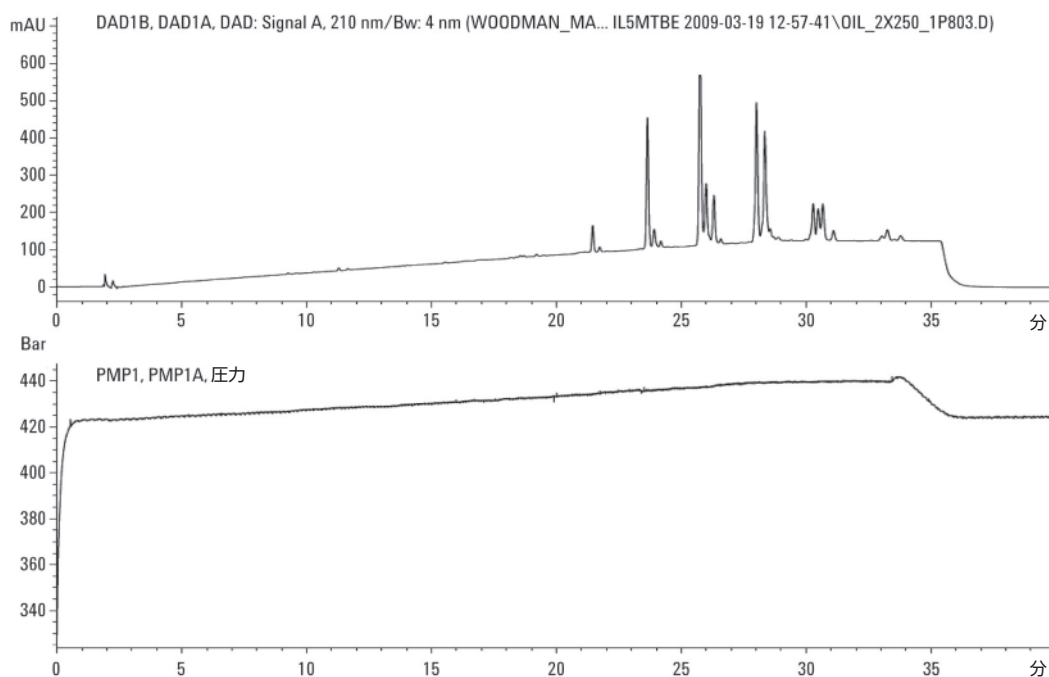


図 5. IPA の代わりに MTBE を使用する以外は図 4 と同条件とし、MTBE の溶出強度を考慮してグラジエントを最適化することにより、システム圧の変化が非常に小さい新しい分離条件が得られました。流量 0.29 mL/min、MTBE 10 % ~ 40 % / 27 分、最大圧力 440 bar。

図 5 では、MTBE への変更とグラジエント条件の最適化により、低いシステム圧で IPA での分離に匹敵する結果が得られました。トリグリセリドの分離では、高いカラム温度や高流量により分離度が低下することを考慮すると、Agilent 1290 Infinity

LC システムでトリグリセリドの分離を最適化するためには、高い最高使用圧 (1200 bar) を生かして長いカラムを使用するのが最適です。ZORBAX RRHT カラムも 1200 bar までの耐圧を有しています。

大豆油、30 µg、0.29 mL/min、10 % ~ 40 % MTBE/ 43 分
ZORBAX SB-C18 RRHD、2.1 mm × 400 mm、1.8 µm、20 °C で最大 **730 bar**

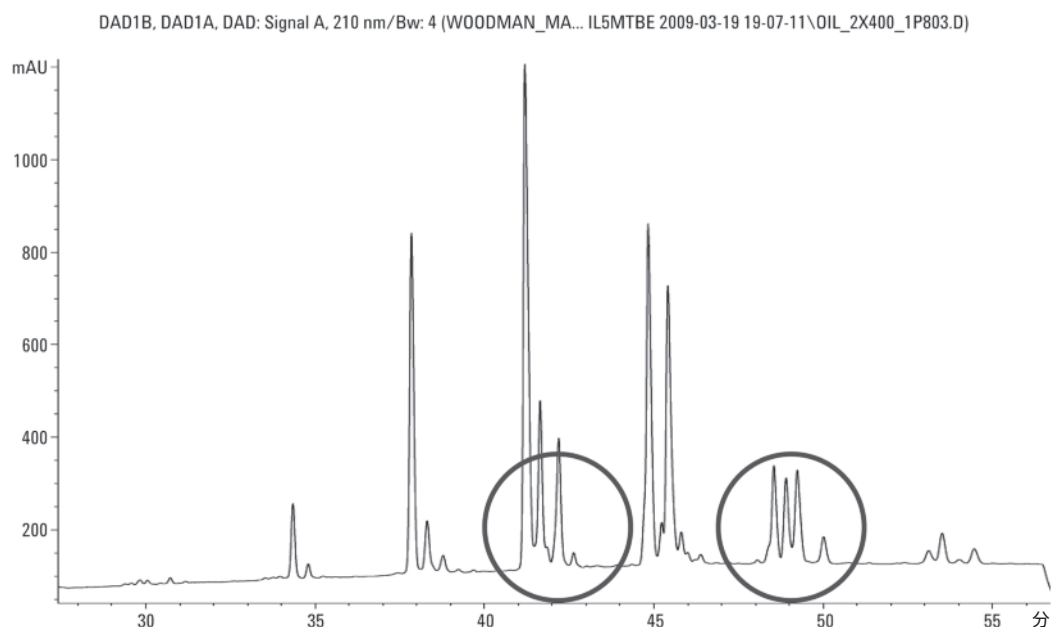


図 6. ZORBAX SB-C18 RRHD、1.8 µm 2.1 mm × 400 mm (150 mm + 150 mm + 100 mm 直列) における大豆油の分離。
流量 0.29 mL/min、グラジエント時間 43 分。20 °C で、最大圧力 730 bar。

初めに分離度と分析時間が妥当なバランスとなるようにカラム温度や流量、グラジエント条件を最適化した後、いくつかの有機溶媒の組み合わせを検討しました。その結果、図 6 に示すように、トリグリセリドの分離に理想的な条件下で、粒径 1.8 µm の非常に長いカラムセットを使用する最高の条件が得られました。システム圧が 730 bar (Agilent 1290 Infinity LC システムの最高使用圧 1200 bar の約 60%) であるので、Agilent 1290 Infinity LC システムでは、より長いカラムあるいはより低いカラム温度が使用可能で、分離度をさらに改善できる可能性があります。

MTBE または IPA を使用した分離は、検出器の 1 つとして質量分析計と共に使用できます。以前の研究で、質量分析計がこのサンプルおよびその他のサンプルに見られる多くのトリグリセリドの組成を迅速かつ正確に同定できることを示しました。非水系の緩衝液を含まない移動相でエレクトロスプレーの性能を最適化する場合、イオン化効率を向上させ分子イオンを確実に検出するため、メタノールとギ酸アンモニウム緩衝液の混合溶液質量分析計の前で添加する方法が有効でした。McIntyre [4] が示したように、ギ酸アンモニウムを含む移動相を使用すると、分子イオンの検出が著しく改善されます。

結論

Agilent 1290 Infinity LC システムを使用して、UHPLC の性能を示しました。室温より低いカラム温度で粒径 2 ミクロン以下の長いカラムを使用することにより得られた分離度の大きな改善は、今回使用したサンプルやその他の同種の物質の主成分および微量成分の解明に役立ちます。これにより、油脂組成の解明や代謝におけるトリグリセリドの役割の解明、さらに、LC/TOF-MS での分析に関心が集まっているリピドミックスの分野において液体クロマトグラフィーがより多く貢献できると期待されます。

参考文献

1. E. G. Perkins, "Analyses of Fats, Oils, and Derivatives," AOCS Press, 1993
2. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Fat_triglyceride_shorthand_formula.PNG
3. (<http://www.chem.agilent.com/en-US/products/instruments/lc/pages/gp60931.aspx>)
4. D. McIntyre, "The Analysis of Triglycerides in Edible Oils by APCI LC/MS", May, 2000 Agilent Technologies publication 5968-0878E

詳細情報

アジレントの製品およびサービスの詳細は、弊社ウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published in Japan
August 3, 2009
5990-4292JAJP



Agilent Technologies