

Application News

No. L492A

高速液体クロマトグラフィー
High Performance Liquid Chromatography

Nexera-e と ELSD/LCMS-IT-TOF 検出を組み合わせた植物油中トリグリセリドの包括的 2 次元分離

Comprehensive 2D Separation of Triglycerides in Vegetable Oil with ELSD/LCMS-IT-TOF Detection

トリグリセリドはグリセロール骨格に 3 つの脂肪酸がエステル結合した分子で、動物油、植物油いずれの場合でも重要な機能性成分と考えられています。トリグリセリドは水系溶媒への溶解性が低く、その分離には銀イオン担体を用いた順相分析もしくは有機溶媒を用いた逆相分析が多く行われてきました。しかしながら、脂肪酸の組み合わせによって非常に多くの分子種が存在し、天然油脂中トリグリセリドの相互分離を単一の分離条件で行うことは困難です。このような複雑な成分の相互分離を達成するためには、包括的 2 次元液体クロマトグラフ Nexera-e の利用が有効です。

一般に、包括的 2 次元液体クロマトグラフィーでは、1 次元目と 2 次元目に異なる分離モードを選択して、その分離選択性の差異によってそれぞれの次元の単独分析では分離困難であった成分の分離を改善します。ここでは、多数のトリグリセリドが含まれるボラージ油を試料として、1 次元目に銀カラム（順相条件）によるマイクロスケールの分離、2 次元目には水系溶媒を用いない有機溶媒の 2 液グラジエントによる逆相分離を採用しました。検出器としては、蒸発光散乱検出器（ELSD）およびイオントラップ飛行時間型質量分析計（LCMS-IT-TOF）を組み合わせて使用しました。分析条件を Table 1 に示します。

Y. Watabe T. Iida

■ ELSD によるボラージ油中トリグリセリドの包括的分離検出

Comprehensive Separation of Triglycerides in Borage Oil with ELSD Detection

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

[Column1]	: Ag custom column (150 × 1.0 mm; 5.0 μm)
Mobile Phase	A; 1.5 % v/v of Butyronitrile in n-Hexane B; 2.4 % v/v of Butyronitrile in n-Hexane
Time Program	: B Conc. 0 % (0 min) → 100 % (40 min) → 100 % (150 min)
Flow Rate	: 0.007 mL/min (split)
Column Temp.	: 30 °C
Injection Volume	: 2 μL
Modulation Time	: 1.5 min
[Column2]	: Ascentis Express C18 column (Supelco, 50 × 4.6 mm; 2.7 μm)
Mobile Phase	A; Acetonitrile B; Isopropanol
Time Program	: B Conc. 30 % (0 min) → 30 % (0.08 min) → 40 % (0.1 min) → 70 % (1.2 min) → 30 % (1.21 min) → 30 % (1.5min)
Detector	: Shimadzu ELSD LT- II
Flow Rate	: 4 mL/min
Evaporative Temperature	: 58 °C
Nebulizing Gas Pressure	: 260 kPa
Detector	: LCMS-IT-TOF
Flow Rate	: 2 mL/min from the 2D pump was split to 0.8 mL/min prior entering the APCI probe.
[MS Conditions]	
Ionization Mode	: APCI positive
Nebulizer Gas Flow	: 2.0 L/min
Interface Temperature	: 400 °C
Block Heater Temperature	: 230 °C
CDL Temperature	: 230 °C
Scan	: m/z 300-1200

一般に、天然油脂中のトリグリセリドは、その 3 つのアルキル鎖の長さや二重結合の位置や数によって特徴づけられます。特に、二重結合を保有するトリグリセリドは抗酸化作用があると言われ、二重結合の有無でこれらトリグリセリドを分離したいという要望は多くあります。アルキル鎖の二重結合は銀イオンと錯体を形成することで強い相互作用を示すことが知られており、この性質を利用して銀を含浸させた固定相を用いて二重結合のある化合物を選択的に保持させる試みは HPLC で比較的多くみられる手法です。ここでは多成分の包括的分離に効果を発揮する Nexera-e において、二重結合に対して保持の強い銀カラム（順相条件）を 1 次元目分離に、逆相分析超高速カラムを 2 次元目に採用し、ELSD による検出を試みました。

蒸発光散乱検出（ELSD）は、カラムから溶出した溶離液を蒸発させることにより目的化合物を微粒子化し、その散乱光を測定する手法で、有効な UV 吸収を持たないトリグリセリドの検出に効果的です。Fig. 1 に専用解析ソフトウェア ChromSquare によるボラージ油の包括的 2 次元分離パターン（横軸：1 次元目 銀カラムによる分離 × 縦軸：2 次元目 逆相分離）を示します。包括的 2 次元分離により、単一分離条件では困難な高分離が達成され、37 個の溶離ピークが確認されました。

ボラージ油はルリジザ（*Borago officinalis*）という種子から採取される植物油です。リノール酸、γ-リノレン酸、オレイン酸、パルミチン酸などの脂肪酸鎖を持つトリグリセリドも多く含まれ、保湿作用、しわの予防など様々な効果が期待されています。他の植物油と比べると γ-リノレン酸の含有率が高く、女性ホルモンのバランスをとる効果もあると言われています。

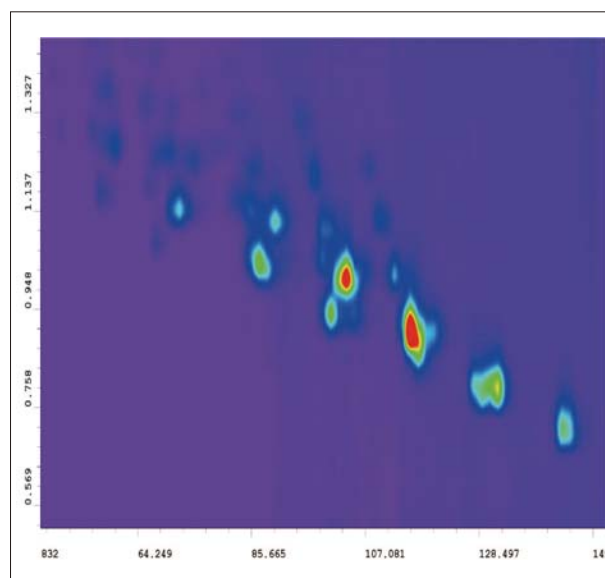


Fig. 1 ELSD 検出により得られたボラージ油中トリグリセリドの包括的 2 次元分離プロット
Comprehensive 2D Plot of Triglycerides in Borage Oil with ELSD Detection

LCMS-IT-TOF によるボラージ油中 トリグリセリドの包括的分離検出

Comprehensive Separation of Tryglycerides in Borage Oil with
LCMS-IT-TOF Detection

先述の様に、本分析では1次元目に脂肪酸側鎖の二重結合の有無や数の違いにより分離を行っています。銀カラムを用いた場合、二重結合の多いトリグリセリドほど保持が強い傾向にあります。二重結合の位置や側鎖の長さによっても保持は影響を受けると考えられます。2次元目の逆相分離にはトリグリセリドの疎水性の大きさから、移動相に水あるいは緩衝液など、水系溶媒を用いない有機溶媒の2液グラジエント分離を採用しています。この分離モードでは、Partition Number と言われるトリグリセリドの全炭素数から二重結合数の2倍を減じた値の順に溶出する傾向があります。Fig. 2 上部は LCMS-IT-TOF 質量分析計での出力を元に描いた2次元プロットです。上記説明で述べた溶出順序によるトリグリセリドの同定を行いやすくするため、プロット中にグリッドを描いています。このプロットから1次元目は二重結合の数の差異、2次元目は Partition Number の差異によって分離が行われている様子がよくわかります。

2次元目の検出器として精密質量値測定が可能な LCMS-IT-TOF を用いることにより、Nexera-e で分離された多数の溶出成分の詳細な定性解析が可能です。Fig. 2 中の白色楕円で示してあるピーク部分 A, B および C について該当部分の MS スペクトルを Fig. 2 下部に示します。側鎖が1つ脱離したジグリセリドのピークから構造情報が得られ、トリグリセリド構造が

A : POP
B : OOP
C : PγLnP
であると、帰属されました。
P : Palmitic acid
O : Oleic acid
γLn : γ-Linolenic acid

これらの化合物は二重結合をそれぞれ1から3個持つため、この順番に1次元目のカラムから溶出されています。脂質関連の化合物はUV吸収のない場合が多く、かつ、示差屈折率検出ではグラジエント溶離法が適応できないことから Nexera-e と ELSD, あるいはトリプル四重極または LCMS-IT-TOF 質量分析法の組合せはこの分野での網羅的解析に必須であると考えられます。

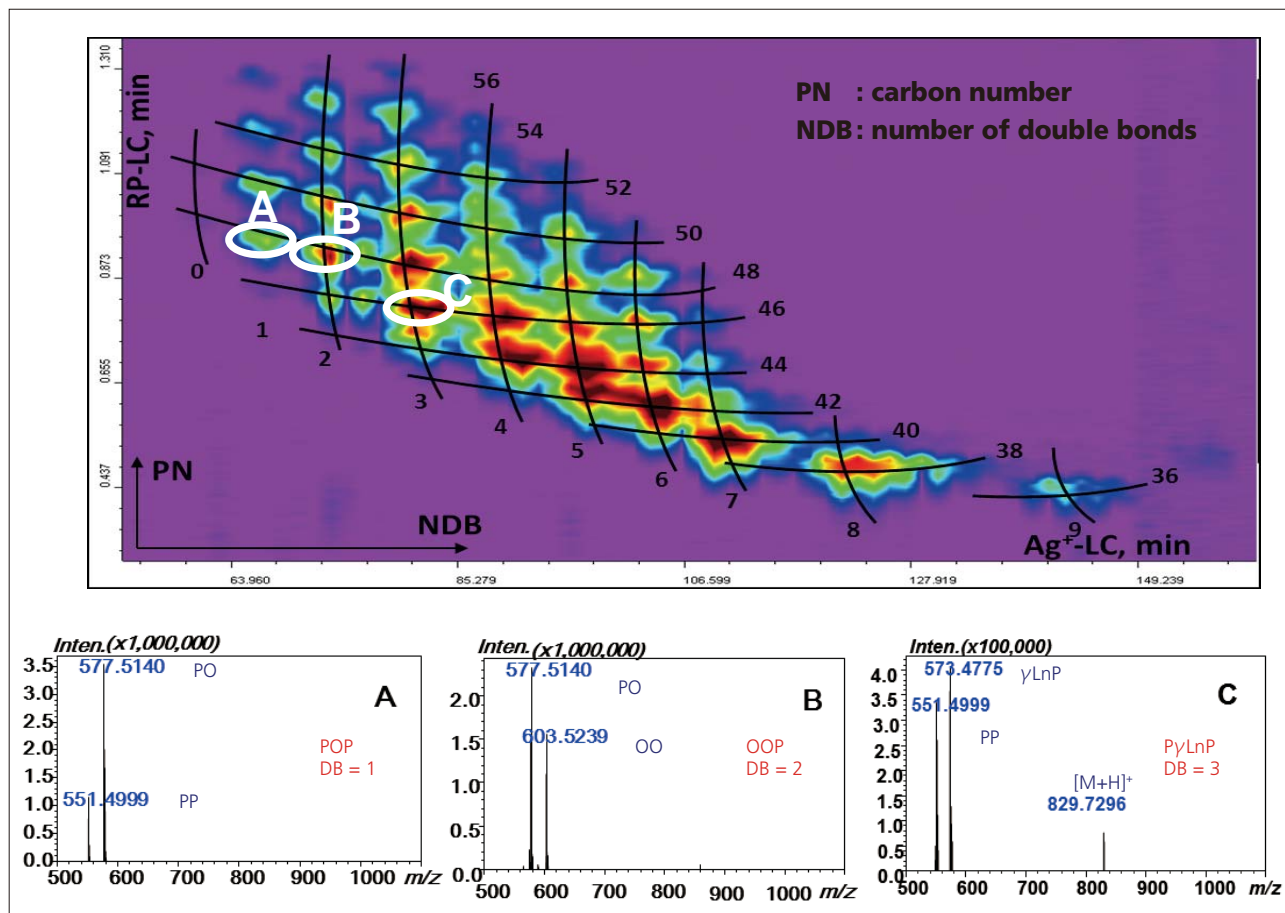


Fig. 2 ボラージ油中トリグリセリドの LCMS-IT-TOF 質量分析法により得られた包括的 2次元分離プロットと特定部分の MS スペクトル
Comprehensive 2D Plot of Tryglycerides in Borage Oil with LCMS-IT-TOF in Addition to the Mass Spectra of Assigned Blob

データ提供 University of Messina, Prof. Luigi Mondello and Chromaleont S.r.l

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

A改訂版発行：2016年2月
初版発行：2015年2月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075)813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。