

Technical Report

溶媒媒介化学イオン化 (SMCI)-GC-MS/MS による種油中の共役リノレン酸の標準試料を使用しない二重結合特性解析

Seed oil conjugated linolenic acid (CLnA) double bond characterization without chemical standards by solvent mediated chemical ionization tandem mass spectrometry

J.T. Brenna¹, D. H. Wang¹

Abstract:

特異な二重結合構造を有する多価不飽和脂肪酸は、自然界で幅広く存在している。それらの化学特性解析には、類似構造を有する化合物と区別する必要がある。溶媒媒介化学イオン化 (SMCI) ユニットとトリプル四重極型 GC-MS/MS では、この構造解析に有用な低揮発性の有機溶媒を利用することができる。本レポートでは、この GC-MS/MS システムを標準試料を用いずに複雑な種油抽出物内の 3 価の共役不飽和脂肪酸の二重結合位置解析に適用し、その性能を評価した。

Keywords: 脂肪酸メチルエステル、FAME、多価不飽和脂肪酸、共役結合付加化学イオン化、脂肪酸構造解析

1. 植物油中脂肪酸の二重結合の多様性

食産業界で大量に使用されている食用油には、不飽和脂肪酸が多く含まれている。これらの不飽和脂肪酸は、構造が限られており、オレイン酸のような一価の不飽和脂肪酸は n-9 または n-7 位置に cis 型 (Z) の二重結合を有する。また、多価不飽和脂肪酸は、二重結合がメチレン基 (-CH₂-) で隔てられたホモアリル (homoallylic) と呼ばれ、cis 配位のオメガ 3 またはオメガ 6 群のいずれかに属している。

近年、特殊な食用油が開発されており、その中に含まれる不飽和脂肪酸も多種多様となっている。特に不飽和脂肪酸の二重結合は、それらの位置により生物活性が異なるため、油製品の付加価値を高めるものとして注目されている。そのため、不飽和脂肪酸に対する迅速な構造解析および定量分析メソッドは、化合物の探索や開発、品質管理を促進させると期待されている。

2 価の共役不飽和脂肪酸は哺乳類への生物活性を有するため、特に着目されているものである。多くの研究結果が、特定の共役リノール酸が二重結合位置/構成に応じて特定の効力があることを明らかにしており、二重結合位置が一つ異なるだけで、機能に大きな変化があることが分かっている。

3 価の共役脂肪酸も生物活性を有することが知られているが、2 価のものほど研究が進んでいない状況である。3 価の共役リノレン酸は、多くの植物油内で 1% 強の存在量であるが、これらの分析手法が煩わしいため、研究が限定的である。特に、他の脂肪酸に比べて低濃度であるために難しいものになっている。

2. 脂肪酸メチルエステルの構造解析

従来の不飽和脂肪酸の二重結合位置解析は、GC-MS の分析に適した化合物に変換するエステル誘導化に加え、更なる特殊な誘導体化が必要である。脂肪酸メチルエステルを再誘導体化する方法は不利な点が多く存在するため、特に微量の不飽和脂肪酸分析においては解析困難になるケースが多い。

そこで、筆者らは、イオントラップ型質量分析計と化学イオン化 (CI) 法を組み合わせた脂肪酸メチルエステルの直接構造解析手法を開発した。この手法は、アセトニトリルを用いた化学イオン化法を利用した共役結合付加化学イオン化質量分析法と呼ばれ、共役リノレン酸を含めた多くの不飽和脂肪酸の構造解析に有用であった。

そこで、本テクニカルレポートでは、同様の共役結合付加化学イオン化質量分析法を実現させるために、トリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-TQ8050 NX (島津製作所製) を用いたシステムを構築した。分析条件は Table 1 に示す。イオン源は CI 専用ものを据付け、アセトニトリルを新型の溶媒媒介化学イオン化ユニット (SMCI ユニット) を用いて質量分析計に導入した。SMCI ユニットは、有機溶媒をガスで加圧して気相を質量分析計へと送り出すシステムである。アセトニトリル (CH₃CN) はまず、イオン源内で相互反応して二重結合に選択的に付加する反応イオン (CH₂=C=N+=CH₂) を生成する。これにより、分子量に 54 加わった親イオン [M+54] を確認することができるようになる^[1,2]。この [M+54] イオンをプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスクリーンを実施することで、2 つないしはそれ以上の特徴的なイオンを確認することができ、それらから二重結合位置を解析することが可能になる。実用面においては、質量分析計と SMCI ユニットの準備しておけば、各種反応からマススペクトルの生成まで特別な作業無く、自動的に進めることが可能である。分析メソッドの詳細については、島津製作所テクニカルレポート C146-0396 に記載する。

Table 1 分析条件

GC-MS:	GCMS-TQ8050 NX
オートサンプラー:	AOC-20i+s
カラム:	BPX-70 (20 m × 0.22 mm I.D., df = 0.25 μm)
ガラスインサート:	Split-less Deactivated Liner w/ Low Wool
GC	
気化室温度:	250 °C
注入モード:	スプリットレス
GCオープン温度:	80 °C → (25 °C/min) → 170 °C (4 min) → (7 °C/min) → 240 °C (10 min)
キャリアガス制御:	線速度一定 (47.2 cm/sec)
MS	
インターフェース温度:	240 °C
イオン源温度:	240 °C
イオン化法:	SMCI
測定モード:	プロダクトイオンスキャン
イベント時間:	0.3 sec

3. 共役リノレン酸(3価不飽和脂肪酸)

油分の多いメロン種中の脂肪酸を抽出し、ナトリウムメトキシドを用いて脂肪酸をメチルエステル化した。共役リノレン酸が溶出してくるクロマトグラム領域を Fig. 2 に示す。トータルイオンカレント (TIC) では、共役リノレン酸と思われる一連のピークが確認できる。[M+54]イオンに対してプロダクトイオンスキャン (m/z 346 → プロダクトイオン) を行うと、Fig. 1 のマススペクトル A が示すように2つの特徴的なイオンが確認することができる。Fig. 1 の構造式に示すように、これらの2イオンより二重結合位置を確認することができる。 α で示すイオンはカルボキシル基側、 ω で示すイオンはメチル基側のプロダクトイオンを示している。構造式上の数値は、構造から見た値と元の二重結合に反応イオンが付加した際の値を示す。また、プロトンはいくつかの分子に移動することが知られているので、結果として m/z 190 と 290 から二重結合が 9, 11, 13 位置に存在していることが分かる。

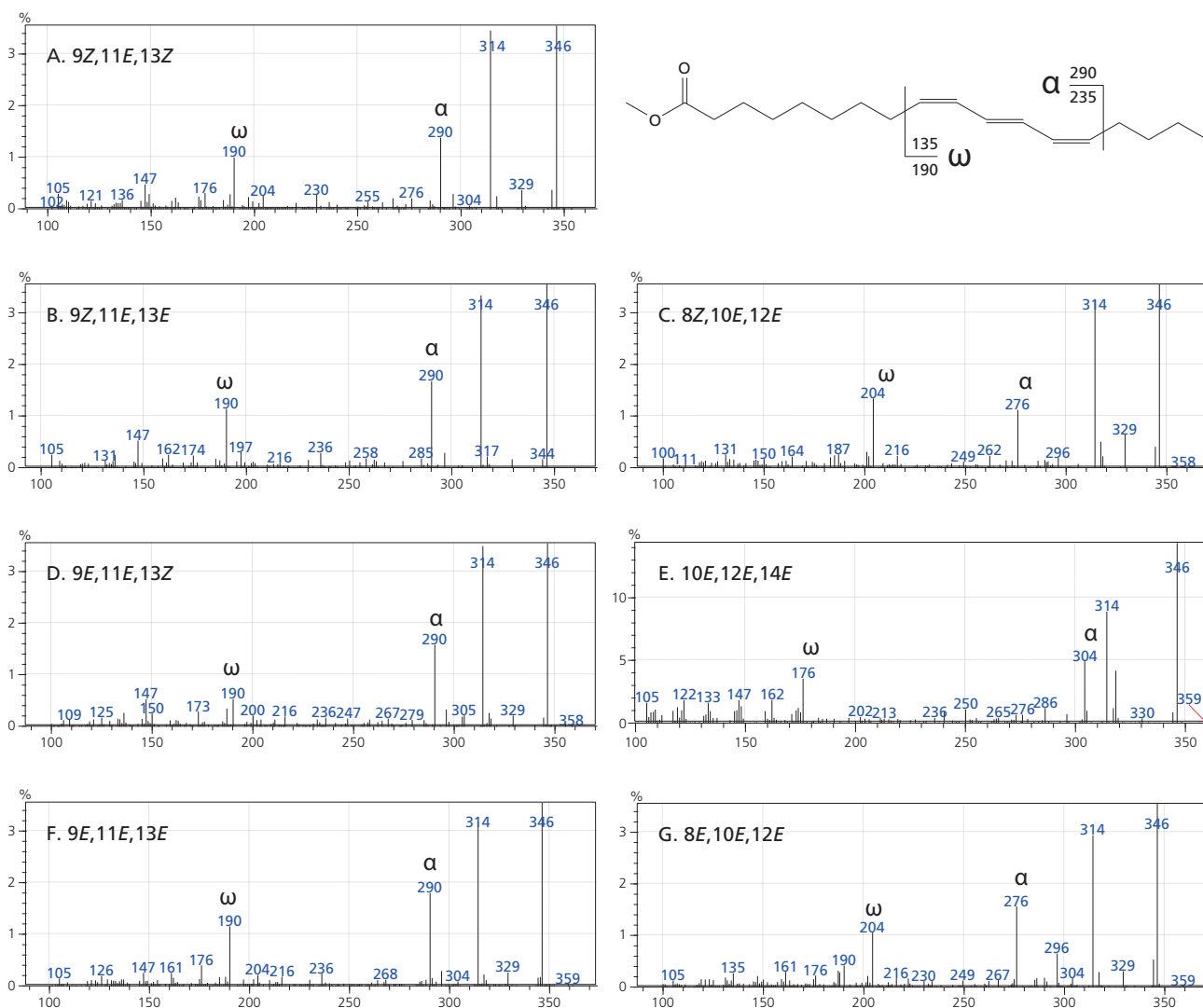


Fig. 1 共役リノレン酸のプロダクトイオンスキャンマススペクトル

Fig. 2に示すマスクロマトグラム (MIC) は、各位置に二重結合を有している異性体の特徴2イオンの和を基に描写されている。A、B、DとFにおいては、9, 11, 13異性体のMIC上で大きなピークが確認できている。相違点は、cis (Z) とtrans (E) の二重結合配位である。CとGでは、8, 10, 12異性体のMICで同様にピークが確

認できており、Eに関しては10, 12, 14異性体のMICで小さいがピークを確認することができる。プロダクトイオンスキャンマススペクトルを同時に確認することで、それぞれのピークを確定できる。

全共役リノレン酸の存在比 (重量比) は約0.2%であり、それぞれは0.1%以下となる。

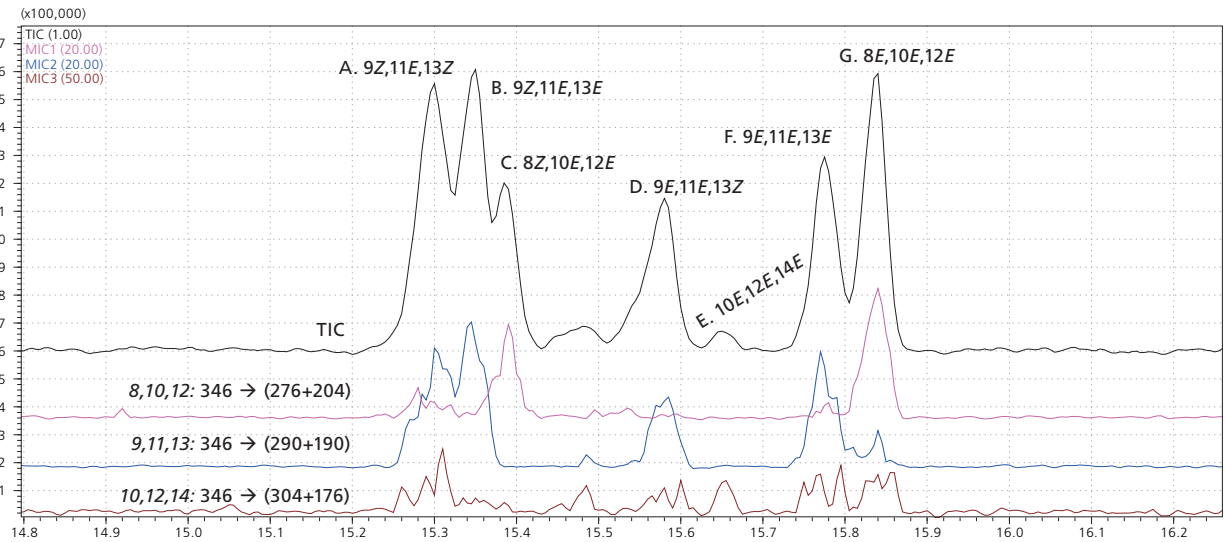


Fig. 2 共役リノレン酸のTICおよびMIC

GCMS-TQ8050 NXを用いた共役結合付加化学イオン化法では、定量的に解析でき、バイオリジカル試料の区別も可能にする。Fig. 3は、2種のコメ種子試料の共役リノレン酸溶出領域におけるプロダクトイオンスキャンのTICを示す。これらの結果から、Aと

B、Cのピーク強度比が異なるため、これらの共役リノレン酸の存在比が異なることが分かる。

より大きな違いがピークEで見られ、サンプル1はサンプル2に比べて数倍量の該当リノレン酸が含有していることが分かる。

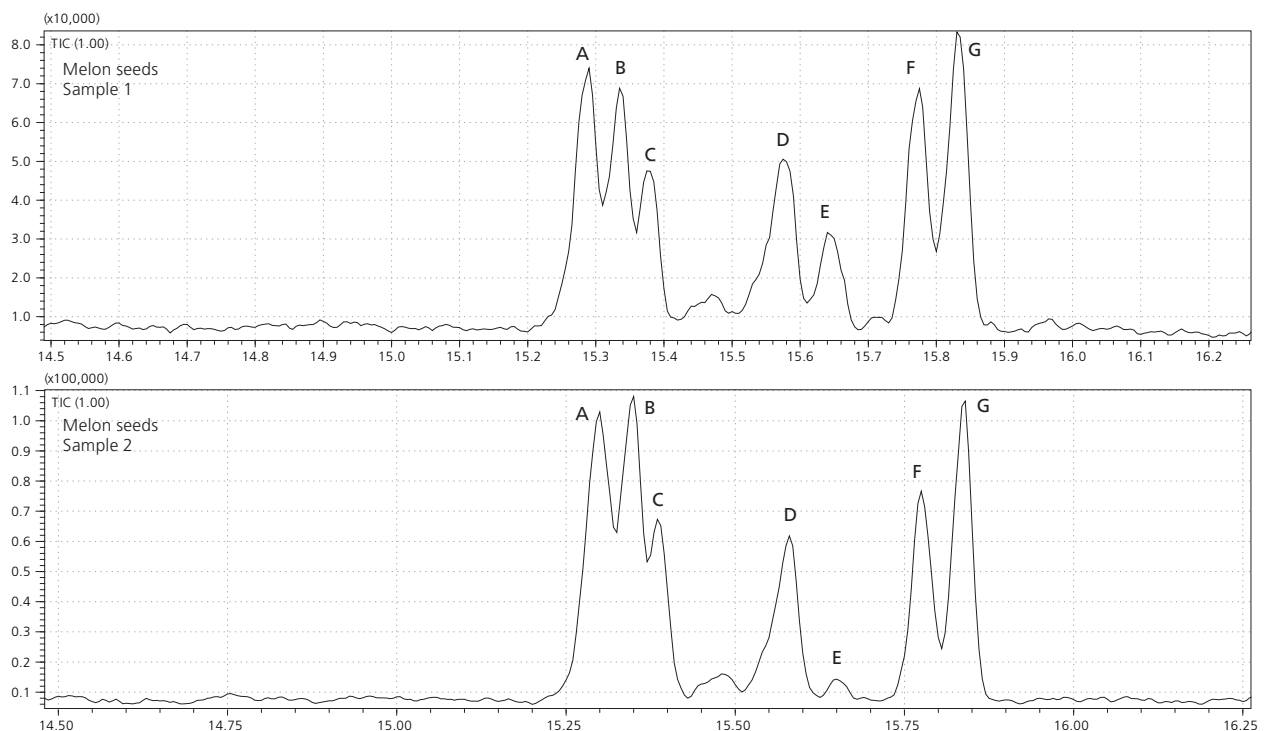


Fig. 3 コメ種子中の共役リノレン酸のTIC

4. 結論

溶媒媒介化学イオン化法はアセトニトリルを用いた共役結合付加化学イオン化を実現し、不飽和脂肪酸メチルエステルの再誘導体化や不明瞭なクロマトグラムの精査を行わずして、二重結合位置の解析を可能にする唯一の方法である。以前のイオントラップ型質量分析計を用いたものとは異なり、トリプル四重極型GC-MS/MSではプロダクトイオンスキャン法だけでなく、MRM測定による高感度化と定量解析も可能にする。本手法を用いた共役リノレン酸のアプリケーションの詳細は、他の文献を参照いただきたい^[3]。キャピラリーガスクロマトグラフの高いピーク分離能と本システムによって得られる多くの構造情報を含んだマススペクトルが得られることにより、この溶媒媒介化学イオン化ユニットを有したGC-MS/MSは不飽和脂肪酸メチルエステルの構造解析に最適で他に類を見ない分析システムと言える。

GCMS-NXシリーズ用オプション SMCIユニット

SMCI (Solvent Mediated Chemical Ionization) ユニットは、試薬ボトルに入れたメタノールなどの有機溶媒のヘッドスペースガスをGCMSイオン源に導入することでイオン化し、ターゲット成分へのプロトン付加による化学イオン化 (CI) を行います (特許出願中)。従来のCIは可燃性高圧ガスボンベを使用していましたが、SMCIはメタノールやアセトニトリルといった一般的な有機溶媒と窒素またはアルゴンガスを使用するため、安全性が高くランニングコストも低減できます。

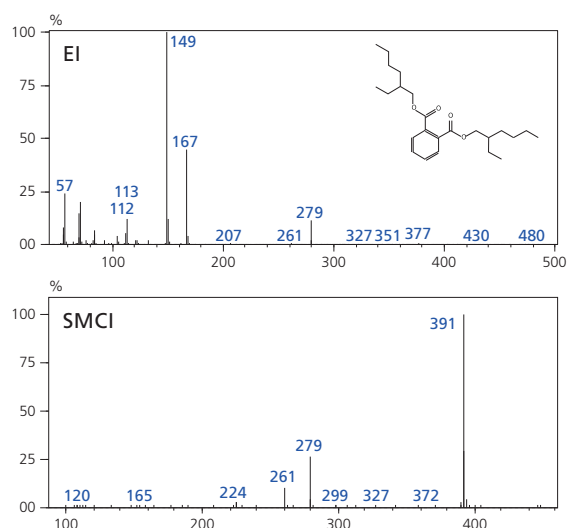


SMCI unit + GCMS-QP2020 NX

参考文献

- [1] Van Pelt, C.K. and J.T. Brenna, *Acetonitrile chemical ionization tandem mass spectrometry to locate double bonds in polyunsaturated fatty acid methyl esters*. *Anal Chem*, 1999. 71(10): p. 1981-9.
- [2] Van Pelt, C.K., B.K. Carpenter, and J.T. Brenna, *Studies of structure and mechanism in acetonitrile chemical ionization tandem mass spectrometry of polyunsaturated fatty acid methyl esters*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1999. 10(12): p. 1253-62.
- [3] Wang, D.H., Wang, Z., Le, K.P., Cortright, J. R., Park, H.G., Tobias, H.J., and Brenna, J.T. *Potentially High Value Conjugated Linolenic Acids (CLnA) in Melon Seed Waste*. *J Ag Food Chem*, 2019, in press.

従来のCI代替法と比べて化合物依存性が低く、CIと同等の結果が得られます。例えば、フタル酸エステル類はEI法やCI代替法では分子量の確認が困難でしたが、SMCI法を用いることにより疑似分子イオンを確認できます。



各イオン化法を使用した場合の

Bis(2-ethylhexyl) phthalate のマススペクトル (MW:390)

GCMS、GCMS-TQは、株式会社島津製作所の商標です。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <https://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。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。

初版発行：2020年2月
© Shimadzu Corporation, 2020