

Agilent 1260 Infinity II 分取精製 LC/MSD システムを用いた 油脂中トリアシルグリセロールの MS ベース分取

著者

澤田 浩和
林 慶子

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

Agilent 1260 Infinity II 分取精製 LC/MSD システムを用いて油脂中トリアシルグリセロールの MS ベース分取を検討しました。移動相にはメタノール、アセトン移動相を使用し、MSD へのメイクアップ溶液としてギ酸アンモニウムを含むメタノール溶液を使用しました。イオンソースに ESI (Agilent JetStream) を使用することで、トリアシルグリセロール類はアンモニウム付加体としてイオン化しました。このシステムでは、MSD でのイオン化を達成しつつ、各フラクションにはギ酸アンモニウム塩を含みません。そのため、分取後の脱塩操作が不要なトリアシルグリセロール類の単離精製が可能となりました。

測定システム

Agilent 1260 Infinity II 分取精製 LC/MSD システム
 G7111B クォータナリポンプ
 G7129A バイアルサンプラ
 G7116A マルチカラムサーモスタット
 G1364F 分析スケールフラクションコレクタ
 G7110B アイソクラティックポンプ
 G7170B フローモジュレーター (スプリット比可変)
 LC/MSD XT (G6135B)
 Agilent JetStream (ESI) イオンソース
 Agilent OpenLab ChemStation Ed. ソフトウェア

試料調製

市販のオリーブ油をアセトンで 1% (v/v) に溶解し、LC/MS 分析に供しました。

分析条件

HPLC 条件を表 1 に示しました。HPLC カラムは内径 4.6 mm、長さ 250 mm の Agilent Pursuit XR_s 3 C18 カラムを 2 本直列に接続して用いました。表 3 には MS トリガー条件を含む MSD 条件を示しました。イオン化は ESI で行い、MS トリガーのしきい値は 700,000 カウント、想定される付加体としてアンモニウム付加体を選択しました。

表 1. HPLC 条件

カラム	Pursuit XR _s 3 C18 (内径 4.6 mm x 長さ 250 mm) x 2 本 (Agilent, p/n A6001100X030)
移動相	A: メタノール B: アセトン
移動相流量	1 mL/min
グラジエント	(表 2 参照)
カラム温度	20 °C
注入量	5 µL
メイクアップ溶媒	100 mM 硝酸アンモニウム含有メタノール、0.5 mL/min
スプリット比	1:50

表 2. グラジエント条件

時間 / min	%B
0	20
20	50
50	100
75	100

表 3. MSD 条件

イオン化	Agilent JetStream (ESI)
極性	ポジティブ
スキャン範囲	$m/z=200-1000$
フラグメンタ電圧	170 V (分取トリガー用) 350 V (フラグメント情報)
乾燥ガス	6 L/min, 250 °C
シーガス	12 L/min, 350 °C
ネプライザ圧力	25 psi
分取トリガーしきい値	700,000 counts
分取トリガー付加体	NH ₄ (アンモニウム付加体)

結果

ディレイボリウムキャリブレーション

UV ベースの分取精製システムと同様¹⁾、MS ベース分取システムにおいても MS 検出器とフラクションコレクタ間のディレイボリウムを正確に把握することは、精密な分取を実現するうえで重要です。図 1 には MS ベース分取システムにおけるディレイ計算の概念図を示します。オートサンプラから色素サンプルを注入することで、UV 検出器 (オプション)、MS 検出器およびフラクションコレクターで色素をピークとして検出し、MS 検出器とフラクションコレクタ間の正確なディレイタイムを測定することが可能となりました。ディレイセンサシグナルよりも MS 検出器のシグナルが早く確認できるようにメイクアップポンプの流速あるいはスプリッタとフラクションコレクタ間の配管容量を最適化します。図 2 には、本報で構築したシステムでのディレイボリウムキャリブレーションの結果を示しました。MS 検出器とフラクションコレクタのディレイタイムは 0.154 分と自動算出されました。

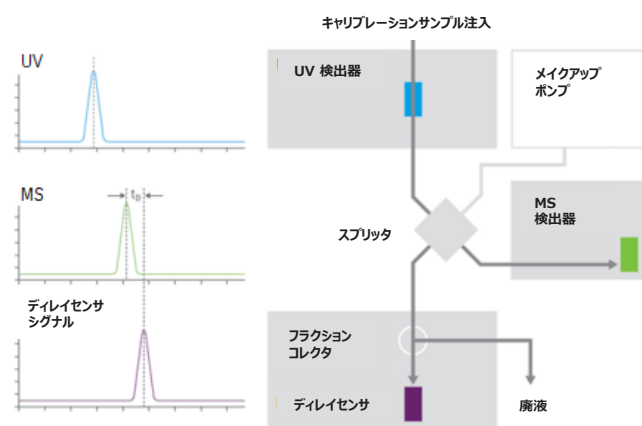


図 1. ディレイボリウムキャリブレーションの概念図

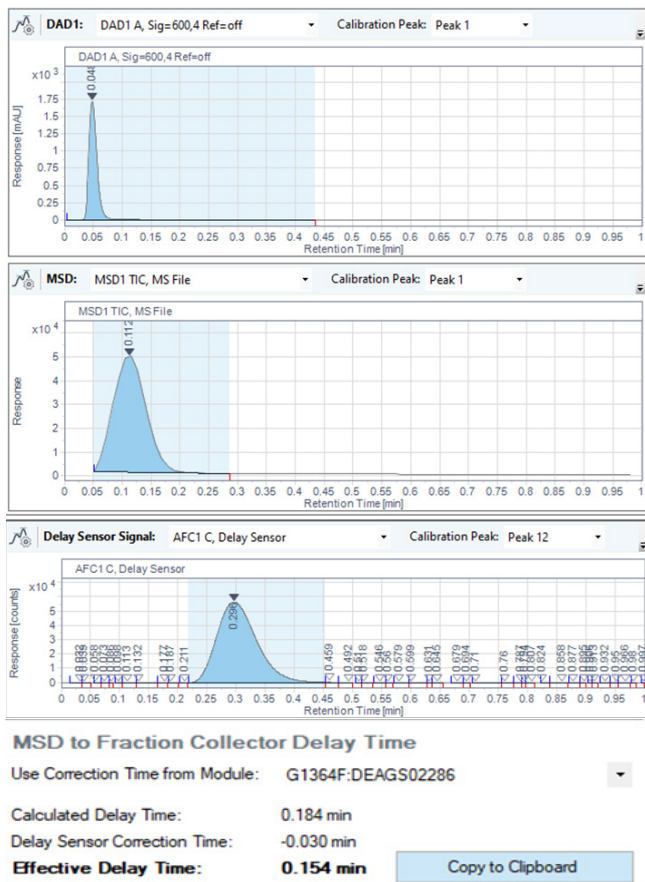


図 2. デレイボリュームキャリブレーション結果
(上: UV 検出器 中: MS 検出器 下: フラクシオンコレクタ)

油脂中トリアシルグリセロールの MS ベース分取

最適化したシステムでオリーブ油中のトリアシルグリセロールの MS ベース分取を検討しました。例としてターゲットマスに 858.7 (OOP に相当) と 884.7 (OOO に相当) を入力し得られた結果を図 3 に示しました。それぞれ入力したターゲットマスの情報と表 3 に示した付加体情報を考慮し、しきい値を超えた場合に MS トリガーが動作して、良好に 2 種のトリアシルグリセロールを分取できました。移動相にはメイクアップポンプで使用している脂肪酸アンモニウムは含まれていませんので、分取後のフラクシオンの脱塩操作などが不要になります。

得られたフラクシオンのうち、後者のフラクシオン 2 を再分析し得られた TIC を図 4 に示しました。図 4 からは近接するピークからのこのフラクシオンへの混入は確認されませんでした。

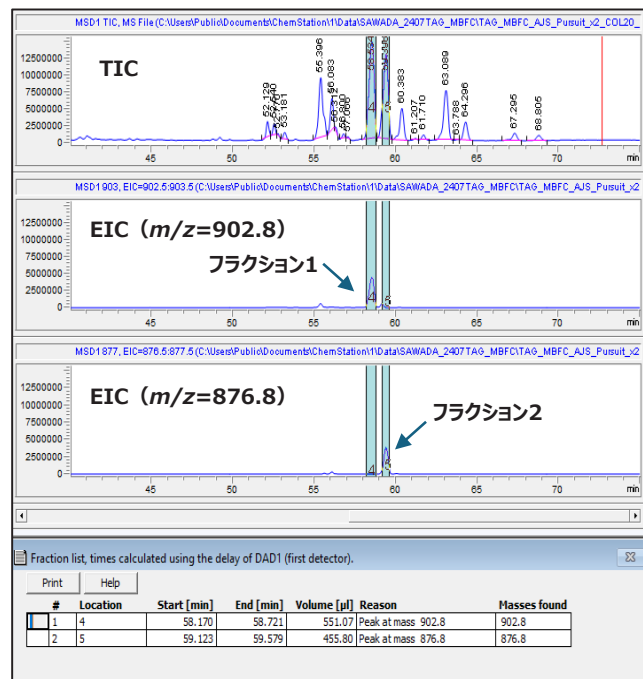


図 3. オリーブ油 (1% (v/v)) の MS ベース分取結果
(ターゲットマス: 858.7, 884.7, 付加体の選択: アンモニウム付加イオン)

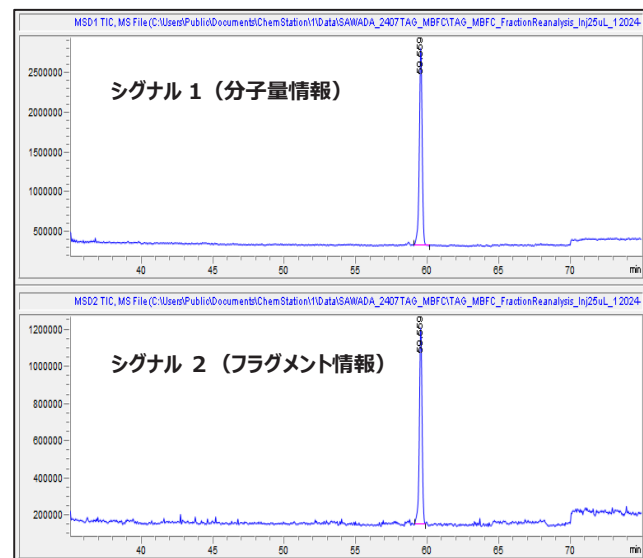


図 4. フラクシオン 2 の再分析結果
(上: フラグメンタ電圧 170 V, 下: フラグメンタ電圧 350 V)

図 5 には図 4 で確認されたピークに関して、それぞれフラグメンタ電圧 170 V および 350 V の設定で得られたマススペクトルを示しました。フラグメンタ電圧 170 V ではトリアシルグリセロール OOP のアンモニウム付加体として分子量関連イオンが確認できました。また、フラグメンタ電圧を 350 V に設定し、同時測定することで既報²⁾のような分取したトリアシルグリセロール類の確認、同定をすることも可能になります。

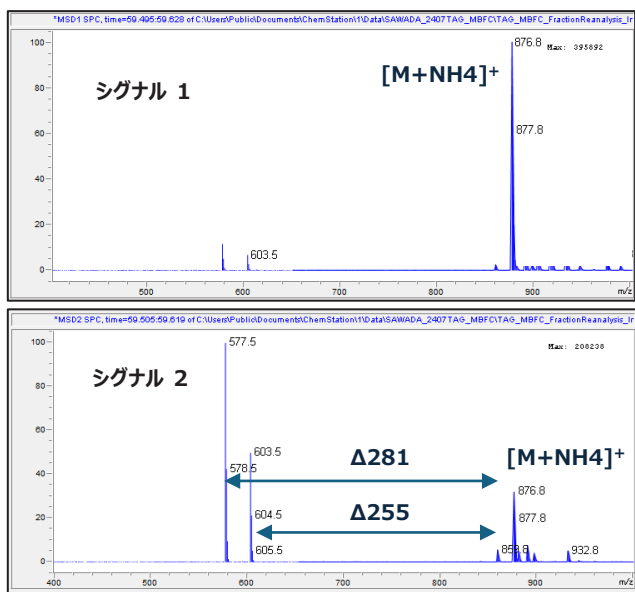


図 5. フラクシオン 2 の再分析で得られたマススペクトル
(上：フラグメンタ電圧 170 V, 下：フラグメンタ電圧 350 V)

まとめ

Agilent 1260 Infinity II 分取精製 LC/MSD システムを用いて油脂中のトリアシルグリセロールの MS ベース分取を検証しました。移動相にメタノールおよびアセトン、MSD 用のメイクアップポンプにギ酸アンモニウムを含むメタノールを使用することで、トリアシルグリセロール類をアンモニウム付加体として良好にイオン化しつつ、ターゲット成分の分取フラクションには塩類を含まない状態で MS ベース分取を行うことができました。MS ベース分取は、ターゲット化合物の情報が既知の場合に有効な分取精製手法であり、UV ベース分取と比較すると選択性の高い分取が可能のため、不要なフラクション数を削減することができます。また分取と同時に定性情報が入手できるなどの利点があります。今回検討したトリアシルグリセロール類だけでなくさまざまな化合物に適用することが可能です。

参考文献

- 1) 分析スケール分取精製システムの高機能化, Agilent Technologies Application Note, publication number 5994-7460JAJP.
- 2) Agilent 6120 シングル四重極 LC/MS システムを用いたトリアシルグリセロール、ジアシルグリセロールおよび遊離脂肪酸の網羅的解析, Agilent Technologies Application Note, publication number LC-MS-201707HK-001.

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おりません。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。

DE-001738

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, October 11, 2024

5994-7880JAJP