

Agilent 6546 LC/Q-TOF システムを用いた 椿油のキャラクタリゼーション

著者

滝埜昌彦

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

本アプリケーションノートでは、Agilent 6546 LC/Q-TOF (LC/Q-TOF) システムを用いた椿油の分析を行い、広義の椿油である山茶花油との比較を行いましたので紹介します。

椿油は、遊離脂肪酸を含めてオレイン酸を多く含む植物油であり古くから髪油として使用されてきました。最近では健康志向の高まりからオレイン酸を多く含む椿油は食用にも使用されています。一般に呼ばれる広義の椿油は、狭義の椿油（ヤブツバキの種子油）、山茶花油（ユチャの種子油）および茶実油（チャノキの種子油）、またはそれらのブレンド油です。一般に市販されている椿油は整髪用、食用ともに種子油が正確に記載されていない場合があります。従って、種子油を識別するのは偽装防止と生産者保護の観点から重要です。そこで今回、ヤブツバキの種子油である椿油とユチャの種子油である山茶花油について、高分解能質量分析計である四重極飛行時間型 Agilent 6546 LC/MS を使用し、脂質成分を含めて成分比較を行いました。

実験

試料には市販の食用椿油 7 品および食用山茶花油 5 品を使用しました。各試料は 0.5 g をヘキサン (5 mL) に溶解後、アセトニトリル (5 mL) を添加し振とうによりヘキサン/アセトニトリル分配を実施しました。得られたアセトニトリル層は遊離脂肪酸とポリフェノール、ヘキサン層は脂質分析に使用しました。バイアルは不活性ガラスバイアルを使用しました。

測定条件

システム

1290 Infinity II High speed Pump (G7120A)
1290 Infinity II Multisampler (G7167B)
1290 Infinity II Multicolumn Thermostat (G7116B)
6546 LC/Q-TOF System

LC/Q-TOF による測定条件を表 1 に示します。C18 カラムを用いた 10 mM 酢酸アンモニウムを含む LC/MS 用超純水 (移動相 A) と遊離脂肪酸およびポリフェノールを分析する際にはアセトニトリルを、脂質を分析する場合には 2-プロパノール (IPA) を用いてグラジエント分析で行いました。脂質の構成成分である、トリグリセライド類は C18 では保持が強いことから移動相に IPA を使用しています。イオン化は、Agilent Jet Stream (AJS) テクノロジーによるエレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) を使用しました。また、MS の測定モードは TOF モード (正イオン、負イオン) および QTOF モード (正イオン、負イオン) の 4 モードを使用しました。

表 1. 椿油および山茶花油の LC/Q-TOF 測定条件

LC	Agilent 1290 Infinity II LC System
カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD (2.1 mm× 100 mm, 1.8 μm) (P/N : 959758-902)
流速	0.2 mL/min
移動相	A : 10 mM 酢酸アンモニウム B1 : アセトニトリル (ポリフェノール・遊離脂肪酸) B2 : IPA (脂質)
ポリフェノール・遊離脂肪酸	10 %B1 --- (30 min) ---100 %B1
脂質	50 %B2 --- (20 min) ---100 %B2/6 min
カラム温度	40 °C
注入量	1 μL
MS	Agilent 6546 LC/Q-TOF System
イオン源	Agilent Jet Stream (AJS)
測定モード	TOF および Q-TOF (正イオン/負イオン)
乾燥ガス	350 °C 10 L/min
シースガス	400 °C 12 L/min
ネプライザ圧	50 psi
キャピラリー電圧	4000 V
ノズル電圧	0 V
QTOF モード	TargetMSMSモード コリジョンエネルギー : 30 eV

結果

脂質分析

表 1 の通り、移動相に IPA を使用し、TOF モード (正イオン) でヘキサン層を測定しました。結果のクロマトグラムを図 1 上段に椿油、下段に山茶花油を示します。双方に大きな違いは観察されませんでした。また、椿油 7 品、山茶花油 5 品を分析しましたが、これら製品による違いもほとんどありませんでした。

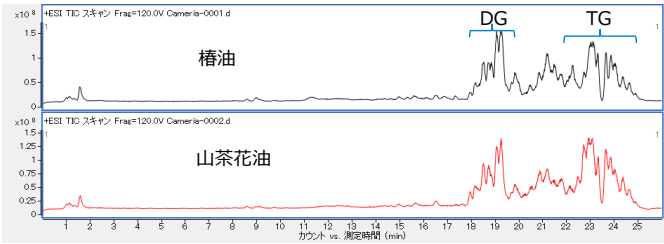


図 1. 椿油と山茶花油のクロマトグラム

図 2 に Lipid annotator ソフトウェア (Agilent) ¹⁾ で解析した結果を示します。このソフトウェアは、各脂質クラス毎に構造式から予測したプロダクトイオンとモノアイソトピックイオンで構築したデータベースを基に各種脂質類の同定、可視化が可能です。図 2 に示すように、椿油、山茶花油共にジグリセライド (DG) とトリグリセライド (TG) のみが同定され、構成脂肪酸は不飽和脂肪酸としてオレイン酸、リノール酸およびリノレン酸、飽和脂肪酸としてパルミチン酸、ステアリン酸およびアラキジン酸でした。

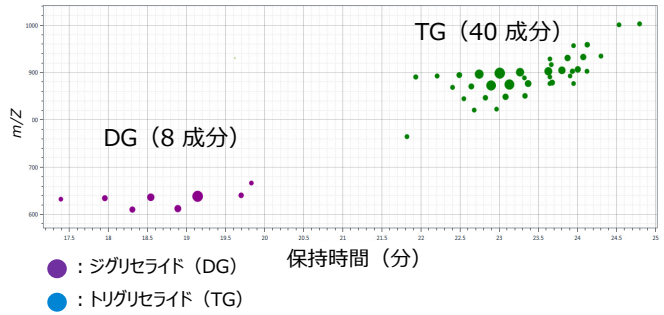


図 2. Lipid annotator を用いた椿油と山茶花油中脂質

遊離脂肪酸、ポリフェノール分析

移動相にアセトニトリルを使用し、表 1 の通り TOF モード（正、負イオン）でアセトニトリル層を測定しました。図 3 にクロマトグラムを示しました。

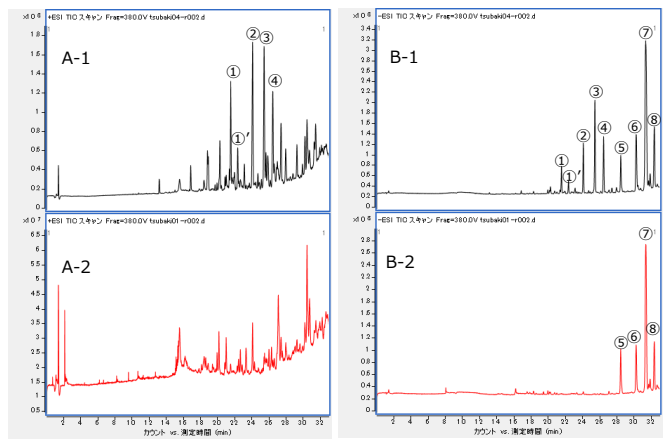


図 3. 椿油と山茶花油のクロマトグラム
A-1：椿油（正イオンモード）、A-2：山茶花油（正イオンモード）
B-1：椿油（負イオンモード）、B-2：山茶花油（負イオンモード）

正イオンモードのクロマトグラムでは多くのピークが検出されましたが、椿油に特異的なピーク（①～④）が検出されました。一方、負イオンモードのクロマトグラムでは正イオンモード同様に椿油特有の ①～④ のピークおよび共通の ⑤～⑧ のピークが検出されました。

検出されたピーク ①～⑧ のマスペクトルは図 4（正イオンモード）および図 5（負イオンモード）に示しました。

正イオンモードでは全て分子量関連イオンの強度は小さく Na イオン付加分子のみ観察されました。ベースピークイオンは水分子が 2 個脱離した (M-2H₂O)⁺ であり、その他 (M-H₂O)⁺ と (M-3H₂O)⁺ がフラグメントイオンとして観察されました。従って、ピーク ①～④ は少なくとも水酸基が 3 個以上存在する化合物と推測されます。

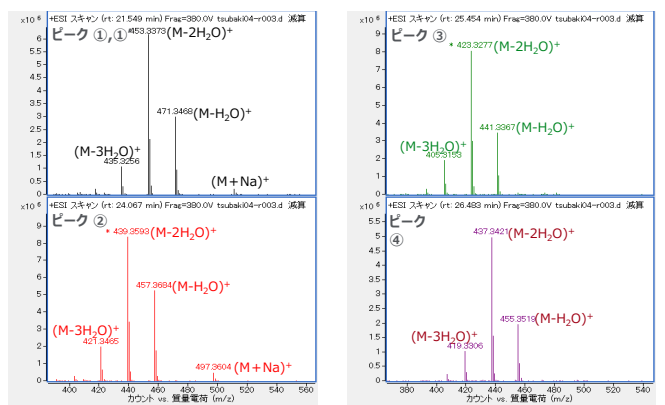


図 4. 正イオンモードによるピーク ①～④ のマスペクトル

負イオンモードではピーク ①～④ および ⑧ は分子量関連イオンとして塩素イオン、酢酸イオン付加分子および強度は小さいですが脱プロトン分子が観察されました。ピーク ⑤～⑦ は脱プロトン分子のみ観察されました。

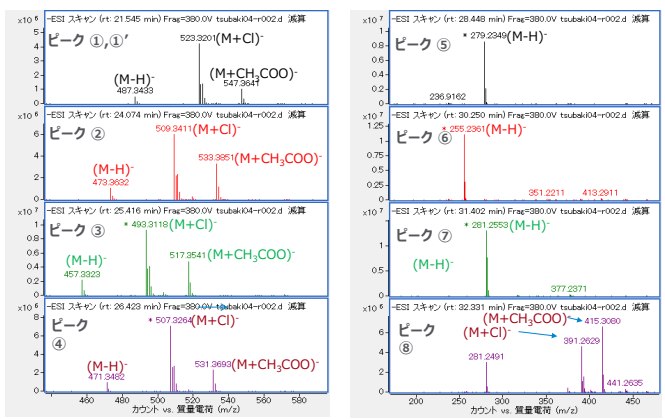


図 5. 負イオンモードによるピーク ①～⑧ のマスペクトル

以上、負イオンモードで観察された分子量関連イオンのモノアイソトピック質量、同位体比と同位体質量差から推定した化学式を表 2 に示しました。また、推定した化学式の相対質量誤差、同位体比と同位体質量差から計算したスコアも表 2 に示しました。推定した化学式はすべて CHO で構成される化合物で、相対質量誤差と同位体スコアからこれら化学式の信頼性は高いと考えられます。

表 2. ピーク ①～⑧ の推定化学式、相対質量誤差および同位体スコア

ピーク番号	化学式	M+Cl		ピーク番号	化学式	M-H	
		相対質量誤差 (ppm)	同位体スコア			相対質量誤差 (ppm)	同位体スコア
①	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	-1.2	98	⑤	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	-1.3	99
②	C ₃₀ H ₅₀ O ₄	-0.6	96	⑥	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	-1.2	98
③	C ₂₉ H ₄₆ O ₄	-1.2	98	⑦	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	-0.8	98
④	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	0.9	96				
⑧	C ₂₁ H ₄₀ O ₄	-1.2	97				

図 6 に正イオンモードによるピーク ①～④ の $(M-H_2O)^+$ をブリカーサーイオンとしたプロダクトイオンスペクトルを示しました。図 7 は負イオンモードによるピーク ①～⑦ の脱プロトン分子 $(M-H)^-$ をブリカーサーイオンとしたプロダクトイオンスペクトルです。

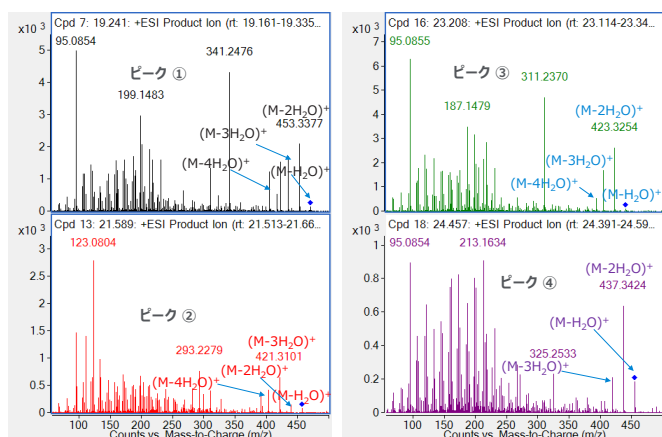


図 6. 正イオンモードによるピーク ①～④ のプロダクトイオンスペクトル

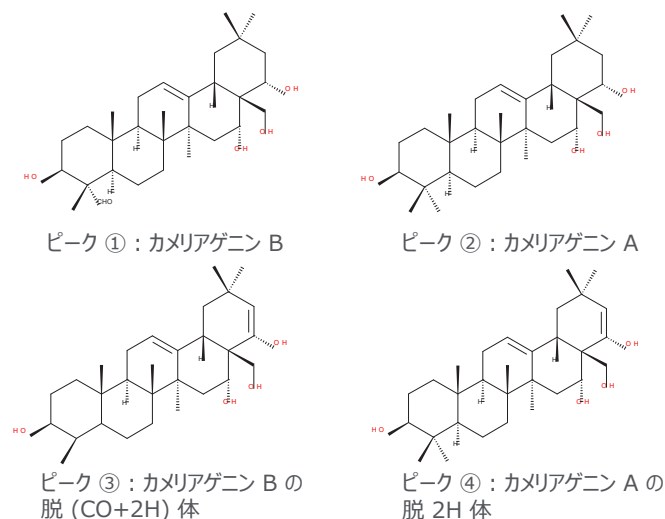


図 8. ピーク ①～④ の推定構造式

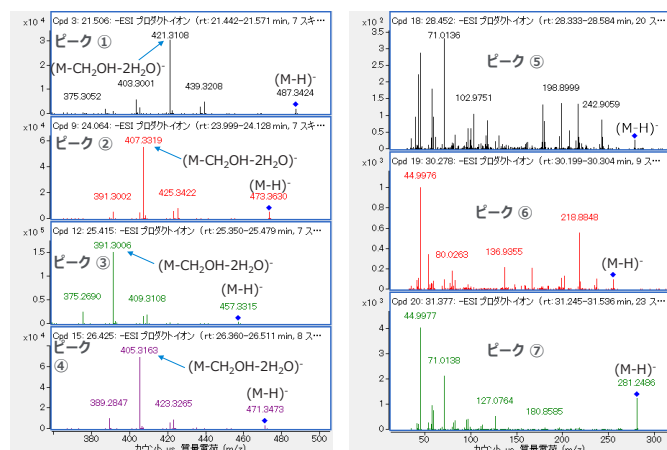


図 7. 負イオンモードによるピーク ①～⑦ のプロダクトイオンスペクトル

正イオンモードでのプロダクトイオンは脱水イオン以外にシグマ結合の開裂と推測されるイオンが多く観察されました。一方、負イオンモードではピーク ①～④ のベースピークイオンはすべて $(M-CH_2OH-2H_2O)^-$ でした。

ピーク ⑤～⑦ は METLIN 精密質量データベースおよびプロダクトイオンスペクトルライブラリから ⑤：リノール酸、⑥：パルミチン酸および ⑦：オレイン酸と推定しました。これらは椿油、山茶花油共に存在する遊離脂肪酸です。

図 9 に椿油および山茶花油全製品中ポリフェノールおよび遊離脂肪酸の強度を示しました。

ポリフェノールは山茶花油でも微量に検出されましたが、明らかに椿油で特異的に検出されました。遊離脂肪酸も椿油中で明確に強度が高く検出されました。

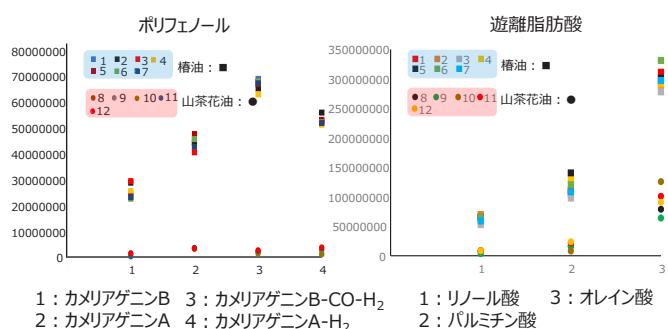


図 9. 椿油および山茶花油中ポリフェノールおよび遊離脂肪酸の強度

まとめ

今回、市販の椿油および山茶花油の異同識別を目的に Agilent 6546 LC/Q-TOF システムを使用して測定を行いました。その結果、脂質類による有意差はありませんでしたが、ポリフェノール類で明らかに有意差が認められました。今回使用したシステムは精密質量が測定可能なことから、検出されたポリフェノール類のモノアイソトピックイオンとプロダクトイオンスペクトルによりカメリアゲニン類の存在が推定され、椿油で特異的に存在することが分かりました。従って Agilent 6546 LC/Q-TOF システムを使用し、カメリアゲニン類を指標にして椿油と山茶花油の識別が可能と考えられます。

参考文献

1) 反復 MS/MS データ取り込み、Lipid Annotator ソフトウェア、6546 LC/Q-TOF を組み合わせた血漿リピドームの分析範囲の改善, アジレント・テクノロジー、アプリケーションノート、資料番号 5994-0775JAJP、2019.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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。

DE68719575

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2024
Printed in Japan, April 11, 2024
5994-7362JAJP