[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ACQUITY UPC²システムとACQUITY UPC² Trefoilカラムを用いた香料およびエッセンシャルオイル成分中のエナンチオマー、ジアステレオマーの分離

John P. McCauley and Rui Chen
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- キラルGCと比較し、分析時間を短縮可能
- 2.5 µm 粒子径のキラル固定相を用いることで、フレグランス成分についてエナンチオマー分離を効率よく行うことが可能
- システム容量およびカラム外容量が小さいACQUITY UPC² システムにより、従来のSFCより優れた、高速かつ効率的なエナチオマー分離が可能
- UPC² で使用する溶媒は順相キラル HPLC で用いる溶媒に比べ、質量分析計に導入しやすいため、リアルタイムでピーク同定が可能

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPC²® Trefoil™ AMY1 および CEL1　2.5 µm カラム

ACQUITY UPC² PDA および ACQUITY® TQD と ACQUITY UPC² システム

MassLynx® ソフトウェア

キーワード

エナンチオマー、キラル固定相、香料、エッセンシャルオイル、超高性能コンバージェンスクロマトグラフィー (UPC²)、コンバージェンスクロマトグラフィー (CC)、Trefoil

はじめに

匂いという感覚は、嗅覚膜において感じられます。この膜はたんぱく質および炭水化物の一部であり、自然界ではキラルとして存在しています。この嗅覚受容体はエナンチオマーを識別します。香り分子のエナンチオマーの多くは、異なる匂いとして感じられます [1]。キラルテルペノイドである carvone を例にとると、R体はスペアミントのような香りがしますが、S体はこれとは異なりキャラウェイシードの香りがします [2]。

香り分子のキラル合成は食品、化粧品、日用品などの産業分野において製品の香りをコントロールする際に、とても重要です [1]。さらにキラル分析は、定期的にエッセンシャルオイルの供給源を証明するために用いられます。天然由来のエッセンシャルオイルは合成品に比べ、一般的に高価で、より健康に良いとされています。キラル分析を迅速に行うことで、製造者はラセミ体の合成品が入った安価な製品を排除することが可能です [3]。

従来、香り分子のキラル分離は主にキャピラリーガスクロマトグラフィー（GC）でキラル固定相（CSPs）が用いられてきました [2,3,4]。分析時間は 15-50 分程度要します [3]。最近では CSPs を用いた超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）で分離が実現され、同等の分離で分析時間を短縮可能です [5,6]。SFC によりキラル分離が実現されましたが、HPLC 分野では関連する機器や CSPs について技術の進歩が遅れています。例えば過去 10 年続いた HPLC を飛躍的に向上させた 2 µm 以下の粒子径カラムを用いたウォーターズの UPLC® 技術があげられます。ACQUITY UPLC® システムは HPLC の実用性や原理を維持し、スピード、感度、分離を向上させます。ごく最近まではCSPsの一般的なカラム粒子径は5 µmでしたが、コンバージェンスクロマトグラフィーでは SFC は次のステップに進化しています。ウォーターズの ACQUITY UPC² システムは順相クロマトグラフィーの選択性をもつよう総合的にデザインされ、実績のある UPLC テクノロジーに基づいて構築されています。超高性能コンバージェンスクロマトグラフィー (UPC²®) はシステムおよびデュエル容量が最小化され、より小さな粒子径ならではの優れた分離を可能にします。

実験方法

装置

すべての検討は ACQUITY UPC^2 システムおよび ACQUITY UPC^2 PDA 検出器、ACQUITY TQD を用いました。システム制御は MassLynx ソフトウェアを用いています。

サンプル

検討に用いた標準品（図 1）は TCI アメリカから購入しました。エッセンシャルオイルはさまざまな民間企業から購入しました。すべてのサンプルは tert-butyl methyl ether（TBME）に溶解しました。

UPC^{2}条件

カラム：ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY もしくは CEL1（2.5 µm、3.0×150 mm）

ABPR 圧：1740 psi

温度：40℃

移動相 A：CO_2

移動相 B：イソプロパノール

MS：APCI ポジティブモード

その他の主なパラメーターはそれぞれの図の注釈に記載しています

Waters® ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 および CEL1 カラムを用い ACQUITY UPC^2 システムで行った 4 種の香り化合物のエナンチオマーおよびジアステレオマー分離を紹介します。従来の GC 分析に比べて、同等の高分離を維持し、分析時間を大幅に短縮することで生産性が向上します。

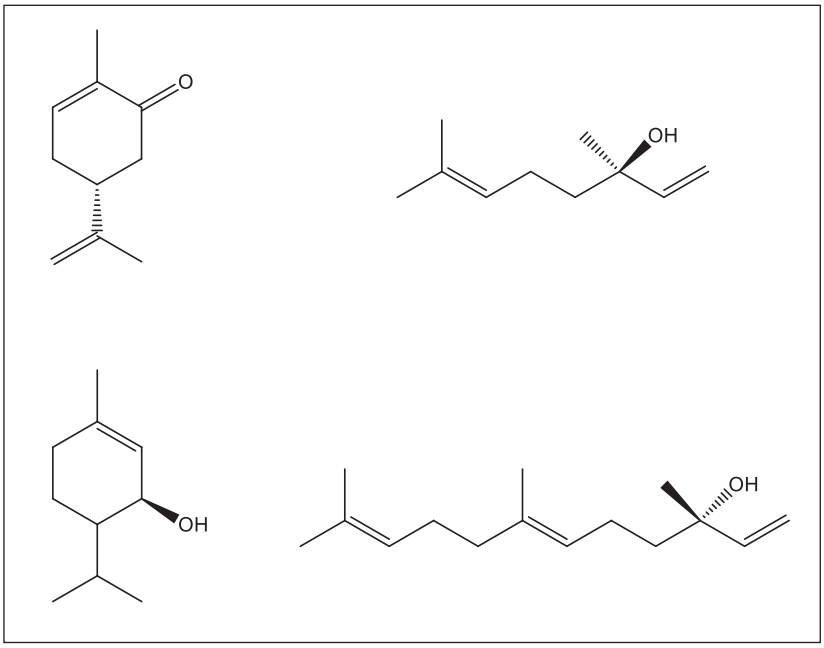

図 1. 本検討で用いた 4 種の香り化合物の構造

結果および考察

図 2 に carvone エナンチオマーについて、ACQUITY UPC^2 Trefoil CEL1 カラムを用いた UPC^2-UV クロマトグラムを示します。一対のエナンチオマーが 2.5 分以内にベースライン分離しています（図 2C）。50% 高さ位置でのピーク幅は 2-3 秒です。それぞれ単体の標準品においても異性体が検出され（図 2A および図 2B）、エナンチオマーの存在が確認されました。どちらの場合も小さなピークはメインピークに対して約 1% なので、鏡像体過剰率（e.e.）98% になります。この例では ACQUITY UPC^2 システムにおいて、2.5 µm CSP カラムを用いて、高効率なキラル分離により、分析時間短縮、シャープなピーク形状、感度の向上を実現しています。

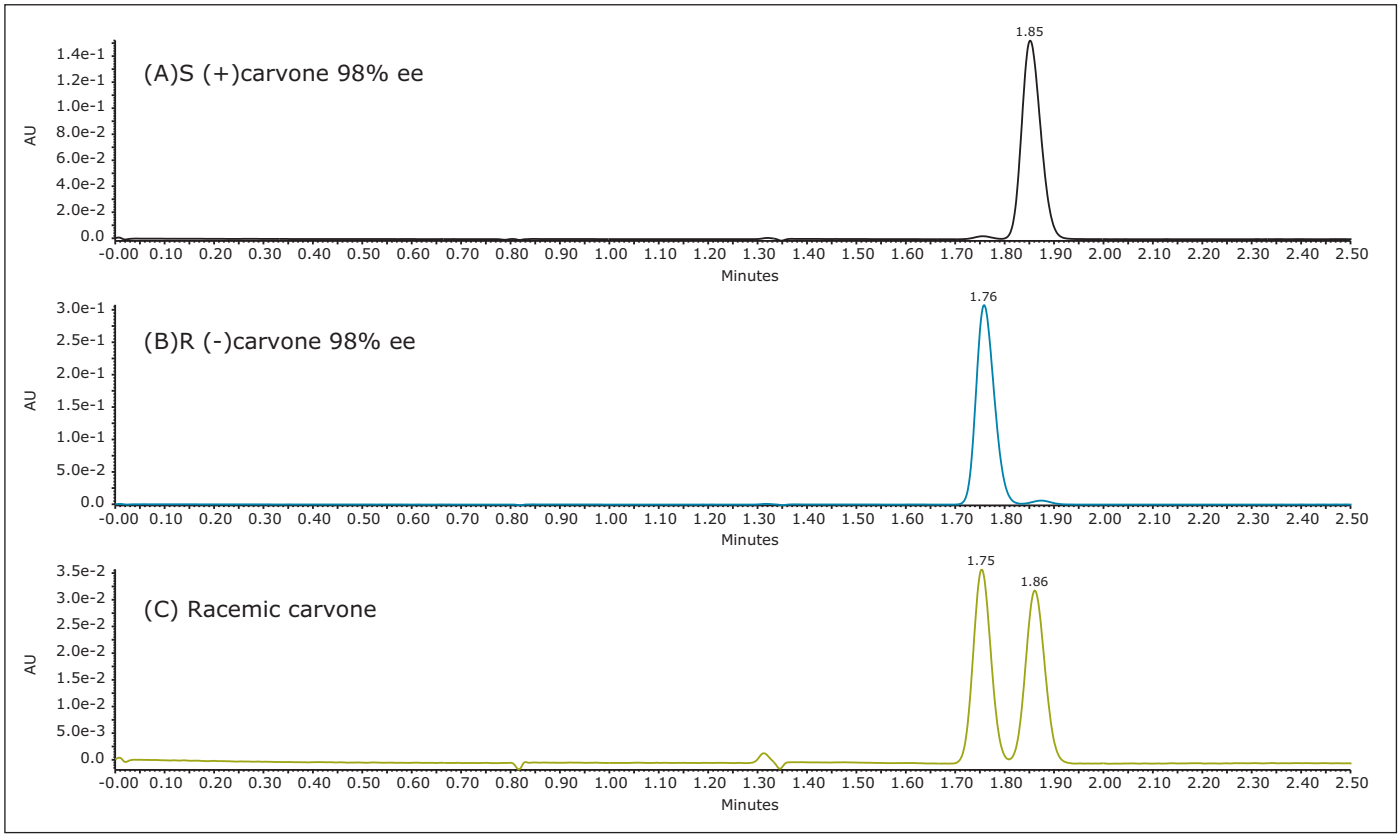

図 2. ACQUITY UPC^2 Trefoil CEL1 カラムによる carvone のエナンチオマー分離を示した UPC^2-UV クロマトグラム：(A) S (+)-carvone (B) R (-)-carvone (C) carvone ラセミ体 分離条件は 4% イソプロパノールのアイソクラティック条件を用い、流速は 0.9 mL/ 分で行った。

linalool はフローラルな香りをもつテルペンアルコールであり、さまざまな植物抽出物中に存在します。図 3A に ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 カラムを用いた linalool 標準品のエナンチオマー分離を示しています。linalool の標準品はラセミ体ではなかったため（図 3A）天然物から抽出した標準品であることを示しています。後ろに溶出した異性体をもとに算出した e.e. は 40% でした。図 3B は広く利用されているラベンダーエッセンシャルオイルを同条件で分析した UPC^2-UV クロマトグラムを示しています。2 つの linalool エナンチオマーは保持時間および MS スペクトル（結果は示さず）により同定しています。MS は複雑なマトリックスサンプルにおけるターゲット分析において正しく同定するために重要です。順相 LC と似た選択性をもちつつ、MS に導入しやすい移動相を用いるため MS 検出器を組み込むことができ、UPC^2 は非常に高い利便性を持っています。後段に溶出した 2.07 分のピークを元に算出したラベンダーエッセンシャルオイル中の linalool の e.e. は 92% でした。

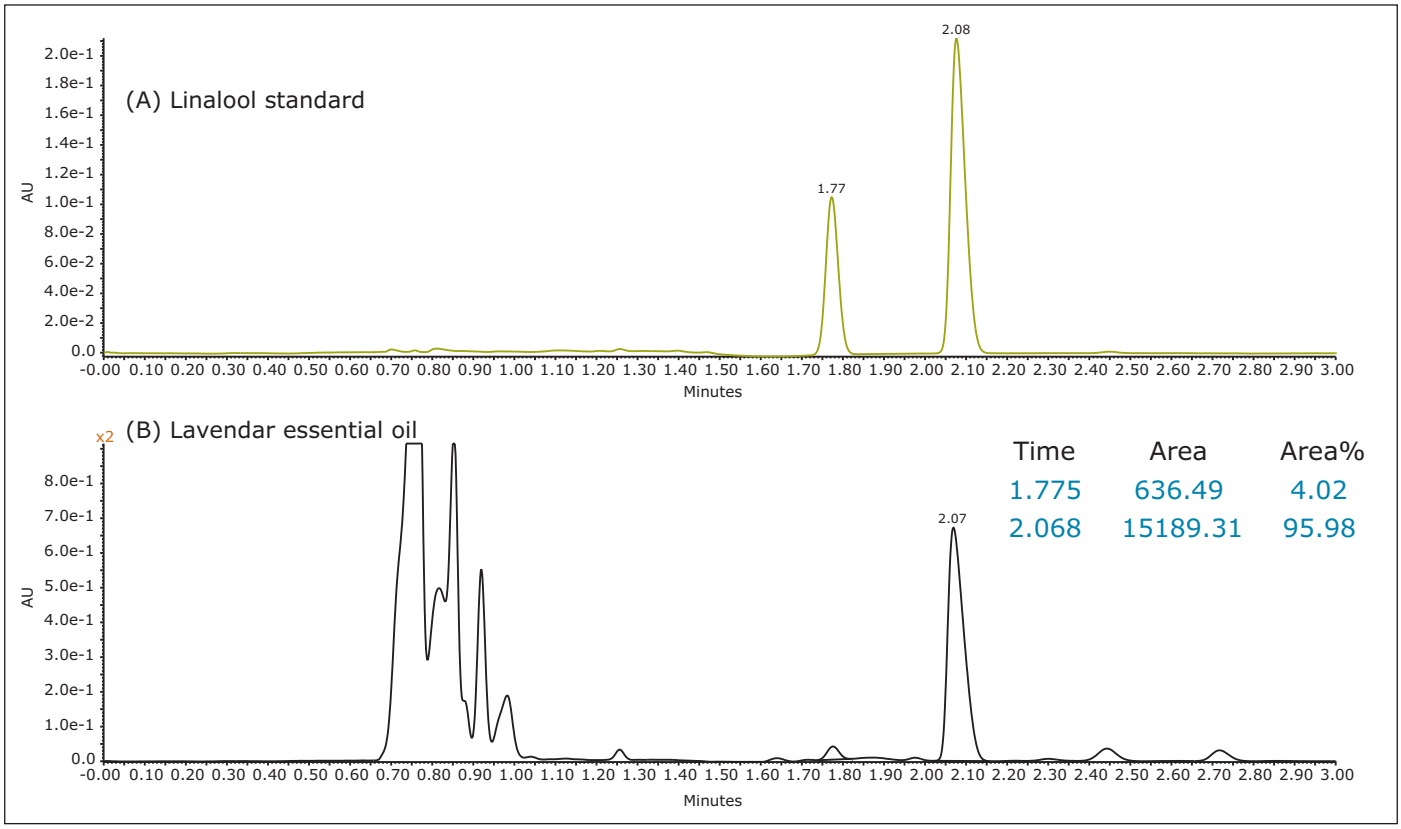

図 3. ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 カラムを用いた（A）linalool 標準品（B）ラベンダーエッセンシャルオイルの UPC^2-UV クロマトグラム。分離条件は 3% イソプロパノールのアイソクラティック条件を用い、流速は 1.0 mL/分で行った。（A）linalool 標準品　（B）ラベンダーエッセンシャルオイル

同様に terpinen-4-ol は針葉樹臭を有するテルペンで、ティーツリーオイルの主成分です。図 4A に ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 カラムを用いて、terpinen-4-ol の二つの異性体についてエナンチオマー分離を行った結果を示します。terpinen-4-ol はほぼラセミ体であり (図 4A)、合成物であることを示しています。ティーツリーオイルの結果 (図 4B) より、terpinen-4-ol は先に溶出した 1.95 分のピークの方が多く含まれ、e.e. は 37% でした。

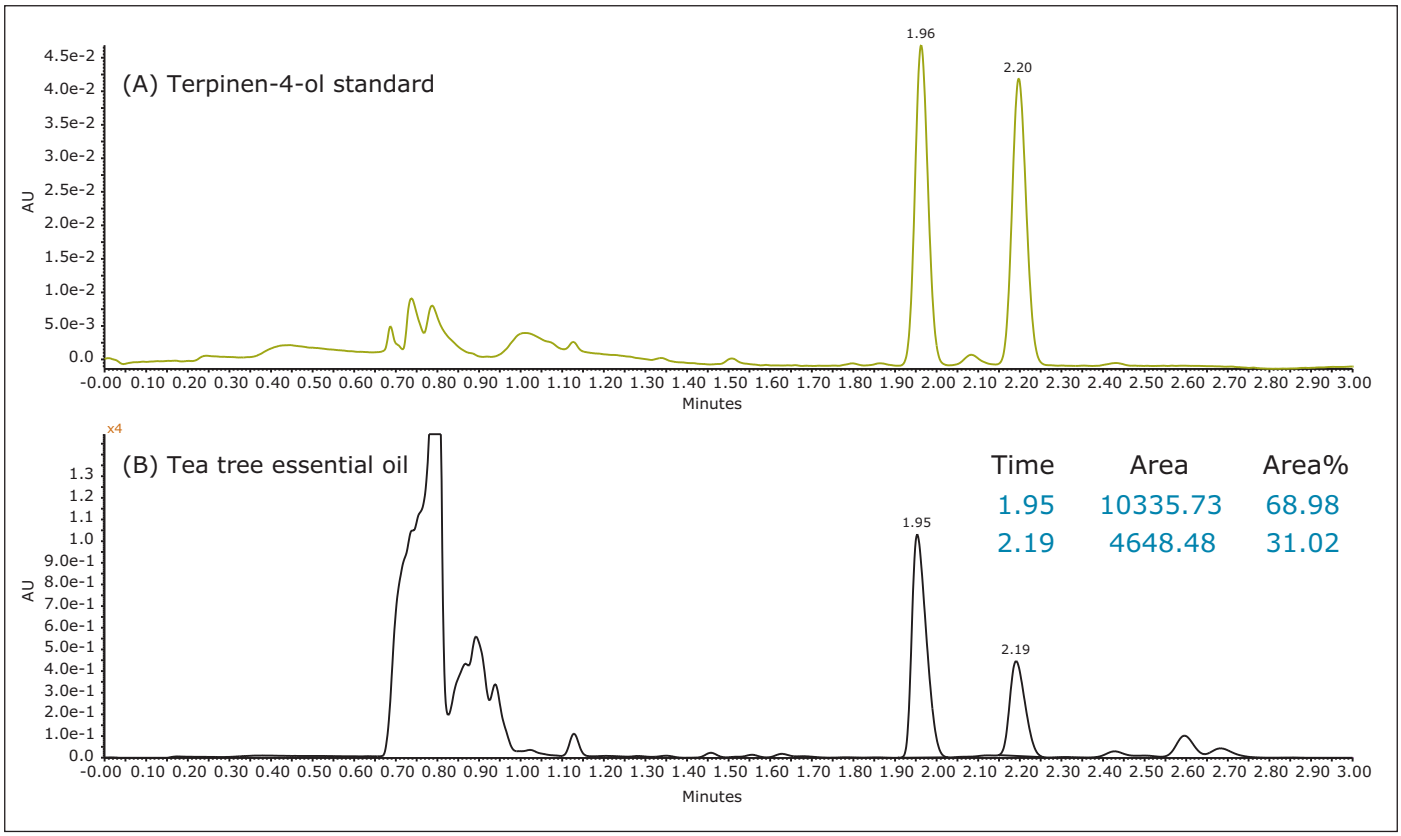

図 4. ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 カラムを用いた (A) terpinen-4-ol 標準品および (B) ティーツリーエッセンシャルオイルの UPC^2-UV クロマトグラム。分離条件は 5% イソプロパノールのアイソクラティック条件を用い、流速は 1.0 mL/ 分で行った。(A) terpinen-4-ol 標準品 (B) ティーツリーエッシャンシャルオイル

ビターオレンジ由来のネロリエッセンシャルオイルである nerolidol はセスキテルペンの一種であり、新鮮な樹皮を思わせる心地よいウッディ臭を有しています。nerolidol 分子（図 1）はキラル中心をもち、シス / トランス異性体を有する二重結合が含まれるため、混合物には 4 種の立体異性体が存在します。図 5 に ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 カラムを用いて 4 種の異性体を 3 分以内に一斉分析した結果を示します。図 5B には異性体混合物について、nerolidol の $[(M+H)-H_2O]^+$ に対応する *m/z* 205.2 の選択イオンレコーディング（SIR）の結果を示しています。

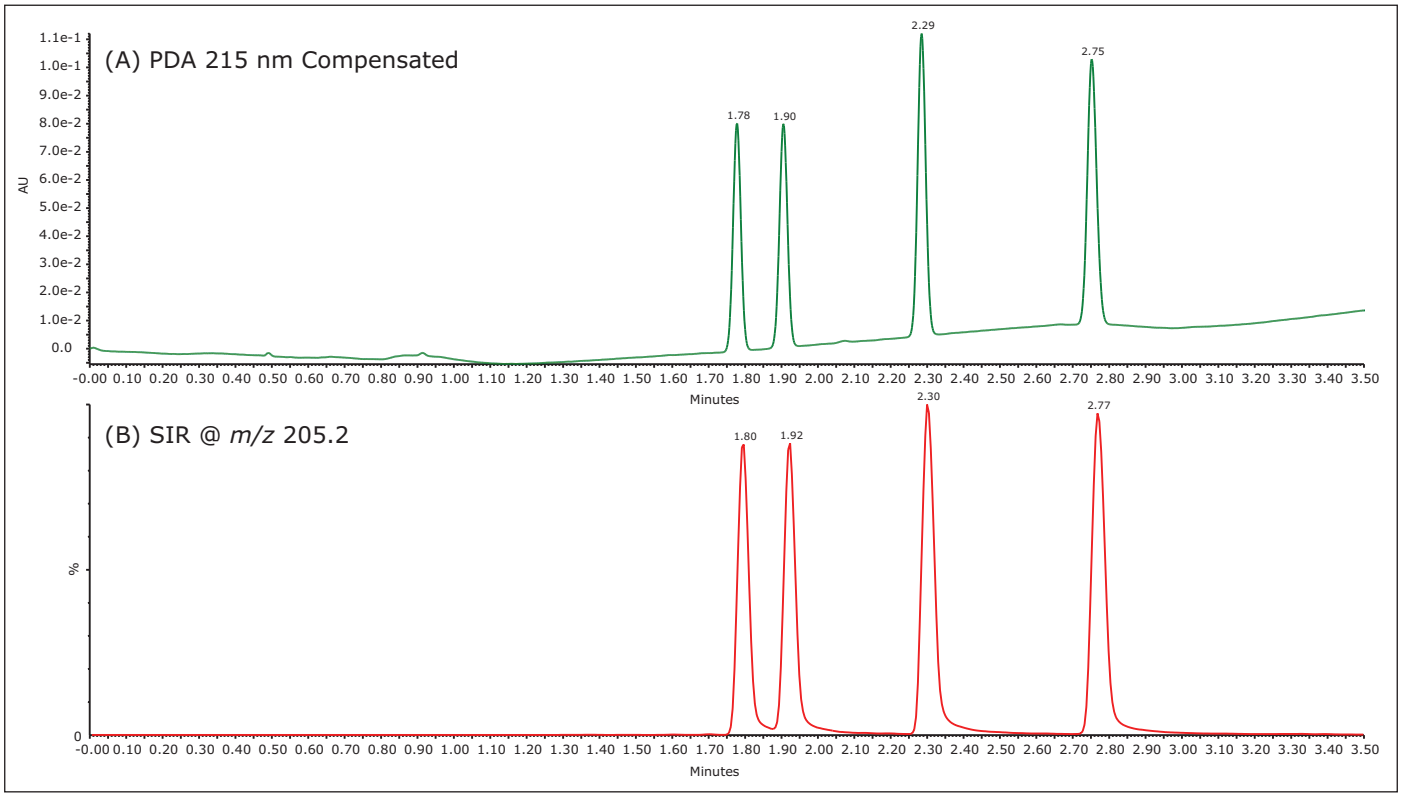

図 5. ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 カラムを用いた UPC^2 クロマトグラム（A）260-310 nm の補正波長を用いた UV215 nm（B）m/z 205.2 の SIR。分離条件は流速 1.5 mL/ 分でイソプロパノール 2-7% を 3.5 分でグラジエント。

結論

本アプリケーションノートでは ACQUITY UPC^2 システムと ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 および CEL1 カラムを用いて香り化合物で達成したキラル分離を紹介しました。システムボリュームおよびカラム外ボリュームが最小化された UPC$^{2®}$ と粒子径の小さい ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 および CEL1 カラムを用いることで、従来の SFC や GC に比べて、さらに高速で高効率な分離が可能になります。従来のキラル GC では 15-50 分程度要していた分析時間も 2-3 分と大幅に短縮が可能となり、エッセンシャルオイルが天然由来かどうか迅速に証明できるようになりました。いずれのケースにおいても、近接する異性体ピークはベースライン分離しました。エッセンシャルオイルの分析において、ACQUITY UPC^2 システムを用いることで、煩雑な前処理なしで、オイルサンプルを溶解し、直接注入できます。さらに UPC^2 と MS を組み合わせて用いることで複雑なサンプルマトリックス中におけるターゲット分子を明確に同定可能です。高効率で分析時間が短くサンプル処理が簡便であることから、本検討は香り化合物のキラル分析をルーチンで行っている分野に有用なツールとなります。

参考文献

1. Leffingwell J, Leffingwell D. Chiral chemistry in flavours and fragrances. *Specialty Chemicals Magazine* 2010 March; 30-33.
2. Ravid U, Putievsky E, Katzir I, Weinstein V, Ikan R. Chiral GC analysis of (S)(+)- and (R)-carvone with high enantiomeric purity in caraway, dill and spearmint oils. *Flavour and Fragrance Journal* 1992; 7, 5, 289-292.
3. Konig W, Hochmuth D. Enantioselective Gas Chromatography in Flavor and Fragrance Analysis: Strategies for the Identification of Plant Volatiles. *Journal of Chromatographic Science* 2004; 44, 423-429.
4. Uzi R, Putievsky E, Katzir I, Raphael I. Determination of the enantiomeric composition of terpinen-4-ol in essential oils using a permethylated β-cyclodextrin coated chiral capillary column. *Flavour and Fragance Journal* 1992; 7, 1, 49-52.
5. Yaguchi, Y. Enantiomer separation of fragrance compounds by supercritical fluid chromatography. Seibutsu Kogaku Kaishi 2010; 88, 10 520-524.
6. Sugimoto D, Yaguchi Y, Kasuga H, Okajima S, Emura M. Preparation of chiral flavor chemicals using enatioselective supercritical fluid carbon dioxide chromatography. Recent Highlights in Flavor Chemistry and Biology, Proceedings of the 8th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry and Biology. Eisenach, Germany, February 27-March 2, 2007, 340-344.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第 5 小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118

大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル 11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌 富山

Waters、ACQUITY、ACQUITY UPC^2、ACQUITY UPLC、UPC^2、UPLC および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。 UltraPerformance Convergence Chromatography, および Trefoil は Waters Corporation の商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2015 Waters Corporation. Produced in Japan. 2015年2月 720004901JA PDF