

報 文

高速液体クロマトグラフィー/質量分析法による食用油中の
1,3-ジアシルグリセロールの分子種分析

鷹野 浩之*, 板橋 豊®*

Molecular species analysis of 1,3-diacylglycerols in edible oils by HPLC/ESI-MS

Hiroyuki TAKANO and Yutaka ITABASHI*

*Laboratory of Bioresources Chemistry, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate-shi, Hokkaido 041-8611

(Received 21 January 2002, Accepted 18 April 2002)

A facile method for the determination of molecular species of regioisomeric 1,3-diacylglycerols (1,3-DG) in edible oils was developed. For this purpose, a DG-rich cooking oil (Econa), which can reduce fat deposits, was treated with 3,5-dinitrophenyl isocyanate in dry toluene under the presence of pyridine at room temperature. The resulting 1,3-DG 3,5-dinitrophenylurethanes were then separated by preparative thin-layer chromatography on silicic acid. The 1,3-DG was followed by reversed-phase HPLC on a C30 column (25 cm × 4.6 mm i.d.), which gave a clear resolution of the individual molecular species. Reversed-phase HPLC in conjunction with negative electrospray ionization MS (ESI-MS) showed a prominent $[M - H]^-$ ion, by which individual molecular species could be identified.

Keywords : edible oil ; 1,3-diacylglycerol ; 3,5-dinitrophenylurethane ; reversed-phase HPLC ; electrospray ionization MS.

1 緒 言

食用油の主成分はトリアシルグリセロール (TG) であるが, ジアシルグリセロール (DG) も 1~10% 含まれている¹⁾²⁾. DG は抗肥満効果を有するなど, 脂質代謝の面で TG と異なることが知られている^{3)~6)}. 最近, DG を高濃度を含む食用油が開発されて, 特定保健用食品として厚生労働省の認可を受けて発売されている. DG には 1,3-DG と 1,2-DG の位置異性体が存在するが, 食用油では全 DG 含量の約 70% が 1,3-DG である⁶⁾. 抗肥満効果を有するのは 1,3-DG であるとされているが, これは 1,3-DG の消化の最初の過程で 1-モノアシルグリセロール (MG) が生成し, TG 再合成の前駆体である 2-MG が生じないためであると考えられている⁵⁾⁶⁾.

食用油中の DG は, 脂肪酸の組み合わせの異なる種々の

分子種から構成されているため, 組成は極めて複雑である. TG と同様に DG の消化, 吸収, 再合成は分子種によって異なると考えられることから^{3)~5)}, 食用油中の 1,3-DG の分子種を正しく把握することは, 抗肥満効果など脂質代謝の過程をより詳細に解析するために必要である. 現在, 食用油中の 1,3-DG の分子種と抗肥満効果との関係については何も明らかにされていないが, 分子種分析の難しさがその要因の一つになっていると考えられる. 食用油中の DG の分子種分析は, 極性液相を固定相とする気液クロマトグラフィー (GLC) によって試みられているが⁷⁾, 本研究では操作性に優れた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に質量分析法 (MS) を併用して, 食用油中の 1,3-DG 分子種の詳細を明らかにする簡便な分析法を検討した. その結果, C30 カラムを装備した逆相 HPLC とエレクトロスプレーイオン化 (ESI)-MS が, この目的に極めて有効であることが認められたので報告する.

* 北海道大学大学院水産科学研究科生物資源化学講座: 041-8611 北海道函館市港町 3-1-1

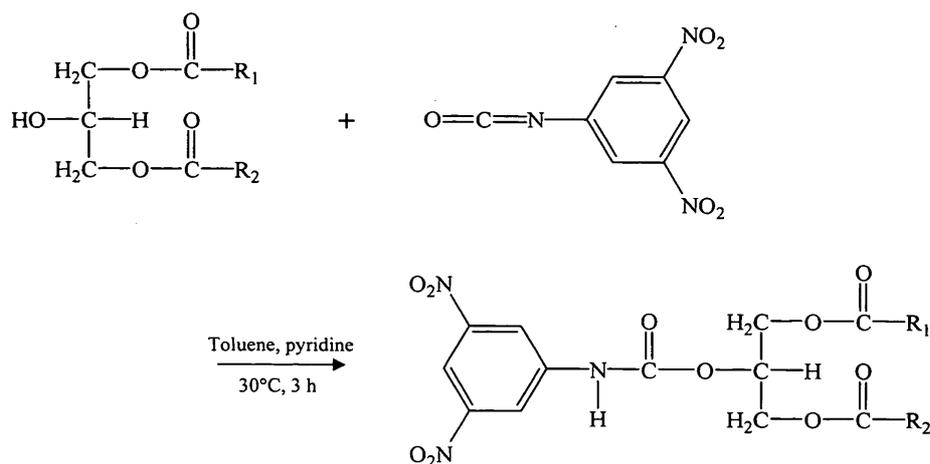


Fig. 1 Preparation of the 3,5-dinitrophenylurethane derivatives of 1,3-diacylglycerols

2 実験

2.1 試料

DG を 80% 以上含む市販の食用油 (エコナクッキングオイル, 花王製)⁵⁾⁶⁾ を実験に用いた。

2.2 誘導体の調製

試料油 1 mg に, 数倍量の 3,5-ジニトロフェニルイソシアネート (DNPI) を含む脱水トルエン (関東化学製, 0.5 ml) 溶液と脱水ピリジン (関東化学製, 30 μ l) を加え, 室温で 3 時間反応させて, DG の 3,5-ジニトロフェニルウレタン (DNPU) 誘導体を調製した (Fig. 1)⁸⁾. なお, DNPI はアンスリルイソシアネートの合成⁹⁾と同様に, アセトニトリル溶液中で, トリホスゲンと 3,5-ジニトロアニリンを 60°C で 30 分間反応させて合成した. 反応混合物から, 薄層クロマトグラフィー (TLC) {シリカゲル GF (Merck 製, 20 \times 20 cm, 厚さ 0.5 mm); 移動相, *n*-ヘキサン-ジクロロメタン-エタノール (40 : 10 : 3, v/v/v)} を用いて DG の DNPU 誘導体 {1,2-DG (R_f = 0.53) と 1,3-DG (R_f = 0.57) の混合物} を分離し, ジエチルエーテルを用いてシリカゲルから抽出した. この DG 異性体混合物を再度 TLC {クロロホルム-アセトン (99 : 1, v/v)} に付して, 1,2-DG (R_f = 0.25) を含まない純粋な 1,3-DG (R_f = 0.40) を得た.

2.3 順相 HPLC

DG 異性体混合物をシリカカラム (ワイエムシイ製, Pack-sil A-003, 25 cm \times 4.6 mm i.d.) を用いて分析し, 1,3-DG と 1,2-DG の比率を求めた. HPLC 用ポンプには L-6000 (日立製) を使用した. カラム温度を 25°C とし, 移動相 (関東化学製の HPLC 用溶媒を使用) には *n*-ヘキサン-2-プロパノール (99 : 1, v/v) の混液を用い (流量

0.5 ml/min), イソクラティック溶離法で分析した. 移動相は使用前に 0.45 μ m の PTFE フィルター (富士フィルム製) を用いて汙過した. 試料約 1 mg を 1 ml の *n*-ヘキサンに溶解し, その 5 μ l を Rheodyne 製 7125 型インジェクターを用いてカラムに注入した. 検出器には UVD-1 (島津製) を用い, 溶出した成分を 254 nm で検出した. クロマトグラムの記録にはクロマトパック C-R6A (島津製) を使用した.

2.4 逆相 HPLC

1,3-DG (3,5-DNPU 誘導体) の分子種分析には, C30 カラム (野村化学製, C30-UG-5, 25 cm \times 4.6 mm i.d.) を使用した. L-7100 ポンプ (日立製) を使用し, カラム温度 18°C, 移動相には HPLC 用のアセトニトリルと 2-プロパノール (関東化学製) の混液を用い (流量 0.5 ml/min), リニアグラジエント溶離法で分析した. すなわち, アセトニトリルと 2-プロパノールの組成を初め 7 : 3 (v/v) から, 50 分後に 1 : 1 (v/v) となるように変化させ, これを 10 分間維持した. 移動相は順相 HPLC (2.3) の場合と同様に, 使用前に PTFE フィルターを用いて汉過したものを使用した. 試料約 500 μ g を 500 μ l の 2-プロパノールに溶解し, その 5 μ l を Rheodyne 製 7125 型インジェクターを用いてカラムに注入した. 検出器には L-4000 UV 検出器 (日立製) を用い, 溶出した成分を 254 nm で検出した.

2.5 HPLC/MS

1,3-DG の分子種の同定は逆相 HPLC/MS で行った. 質量分析にはイオントラップ型質量分析計 (サーモクエスト製 LCQ) を用い, 質量範囲を 200 ~ 1200 amu, 加熱キャピラリー温度 280°C, スプレー電圧 4.0 kV, シースガス (窒素) を 80 arb (arbitrary units) に設定した. エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法で負イオンスペクトルを測

定した。逆相 HPLC は 2・4 と同一の条件で行った。試料を 100 µg/ml の濃度になるように 2-プロパノールに溶解し, その 3 µl をオートインジェクターを使用してカラムに注入した。

2・6 脂肪酸分析

1,3-DG (DNPU 誘導体) から硫酸-メタノール (6 : 94, v/v) 溶液を用いて脂肪酸のメチルエステルを調製し¹⁰⁾, GLC 分析に供した。水素炎イオン化検出器付き GC-6AM 装置 (島津製) に Silar 5CP カラム (日本クロマト工業製, 50 m × 0.25 mm i.d.) を取り付け, キャリヤーガス (水素) 流量 1 ml/min, スプリット比 1/50, カラム温度 180°C, 注入口及び検出器温度 230°C の条件で分析した。トランス脂肪酸を含む各成分は, 既報¹¹⁾に記載した精製植物油脂肪酸の GLC 分析の結果と比較することにより同定した。

3 結果と考察

3・1 位置異性体の分析

DG は UV 領域に強い吸収をもたないため, HPLC により DG の異性体や分子種を高い感度で精密に分析するには, UV 又は蛍光誘導体に変換することが必要である¹²⁾。本研究ではヒドロキシル基と容易に反応する DNPI 試薬を用いて, DG を UV 誘導体 (DNPU)⁸⁾¹²⁾ に変換して HPLC 分析した。試料油に DNPI を直接反応させて得られた混合物を, シリカゲル TLC で分析した結果, 未反応の DG はヨウ素蒸気下では検出されず, 反応は定量的に進行したものと判断された。反応混合物中には DG, MG 及びトコフェロールの各 DNPU 誘導体と, DNPI とは反応しない TG が含まれた。DG 誘導体は, シリカゲル TLC によりほかの成分から明りょうに分離された。適用した TLC の条件 {*n*-ヘキサン-ジクロロメタン-エタノール, 40 : 10 : 3 (v/v/v)} では, 1,3-DG は 1,2-DG から明りょうに分離されないため, これらをまとめて TLC 板から回収した。この DG 異性体混合物を順相 HPLC で分析したところ, 1,3-DG は 1,2-DG から完全に分離されたので (クロマトグラムは示さない), 両異性体の比率を正しく求めることが可能であった。その結果, 1,3-DG は 62%, 1,2-DG は 38% であった。文献⁵⁾⁶⁾には, 測定法は不明であるが, 約 70% が 1,3-DG であると記載されている。

3・2 脂肪酸組成

試料油中の 1,3-DG の脂肪酸組成を Table 1 に示す。主要構成脂肪酸はリノール酸 (18 : 2 *cis*-9, *cis*-12) とオレイン酸 (*cis*-9 18 : 1) で, 全脂肪酸中のそれぞれ約 56% と 28% を占めた。また, リノール酸と α -リノレン酸 (18 : 3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15) ではシス型二重結合の一つがトランス異性化した脂肪酸が検出された。これらは, 食用

Table 1 Fatty acid composition of 1,3-diacylglycerols in a cooking oil, Econa

Fatty acid	ECL ^{a)}	1,3-Diacylglycerol, wt%
12 : 0	12.00	0.22
14 : 0	14.00	0.41
16 : 0	16.00	3.66
16 : 1	16.32	0.32
18 : 0	18.00	1.14
18 : 1 <i>cis</i> -9	18.35	28.14
18 : 1 <i>cis</i> -11	18.41	1.73
18 : 2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 + <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -12	18.89	56.22
<i>trans</i> -9, <i>cis</i> -12	18.93	2.92
18 : 3 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>trans</i> -15	19.39	1.08
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15	19.51	2.93
<i>trans</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15	19.57	1.23

a) Equivalent chain length

油製造の際の脱臭などの精製工程においてトランス化したものと考えられる¹¹⁾¹³⁾。通常の市販食用油中のトランス酸含量は総脂肪酸中 3% 以下であるが¹¹⁾, 本研究で分析した DG 油中では約 5% と幾分高い値が得られた。精製条件の違いによるものと推測される。

3・3 逆相 HPLC

試料油中の 1,3-DG (3,5-DNPU) 誘導体の逆相 HPLC による分子種の分離を Fig. 2 に示す。本研究では, 分子種間の良好な分離を得るために, カラムの種類と移動相の組成を検討した。本研究で使用した C30 カラムによる DG 分子種の溶出順序は, 脂質の分析に広く用いられている C18 カラムと同様に, ECN (equivalent carbon number) 値に従った。また, C18 ではピーク 7, 8, 9 及びピーク 12 と 13 が重なり, それぞれ一つのピークとして溶出した (クロマトグラムは省略した)。このことから, 食用油中の DG 分子種の分離には, C18 よりも C30 カラムのほうが優れていることが認められた。移動相はイソクラティック {移動相 : アセトニトリル-2-プロパノール (70 : 30, v/v)} 溶離法では全分子種の溶出に 90 分以上の時間を必要としたが, これらの溶剤を使用したリニアグラジエント溶離法では溶出時間が短縮され, 少量成分を含めて種々の分子種が 60 分以内に明りょうに分離された (Fig. 2)。

3・4 逆相 HPLC/ESI-MS

1,3-DG 分子種の HPLC/ESI-MS 分析の結果を Fig. 3 に示す。DNPU 誘導体の負イオン ESI スペクトルは, [M - H]⁻ の顕著な分子量関連イオンを与え, 各分子種の同定に極めて有効であった。例えば, ピーク 9 (Fig. 2) に対応する全イオンクロマトグラム上の 32 分から 33 分に溶出するピークの質量スペクトルにおける *m/z* 801.2 の分子量関連イオンは, 脂肪酸組成 (Table 1) から 16 : 0-18 : 2

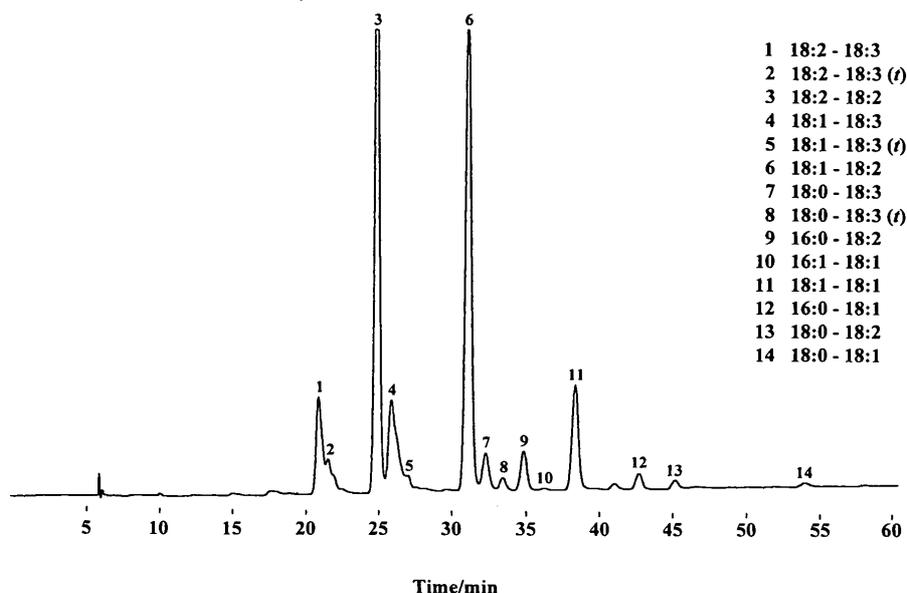


Fig. 2 Reversed-phase HPLC separation of the 3,5-dinitrophenylurethane derivatives of 1,3-diacylglycerols in a cooking oil (Econa) on a C30 column
t, trans

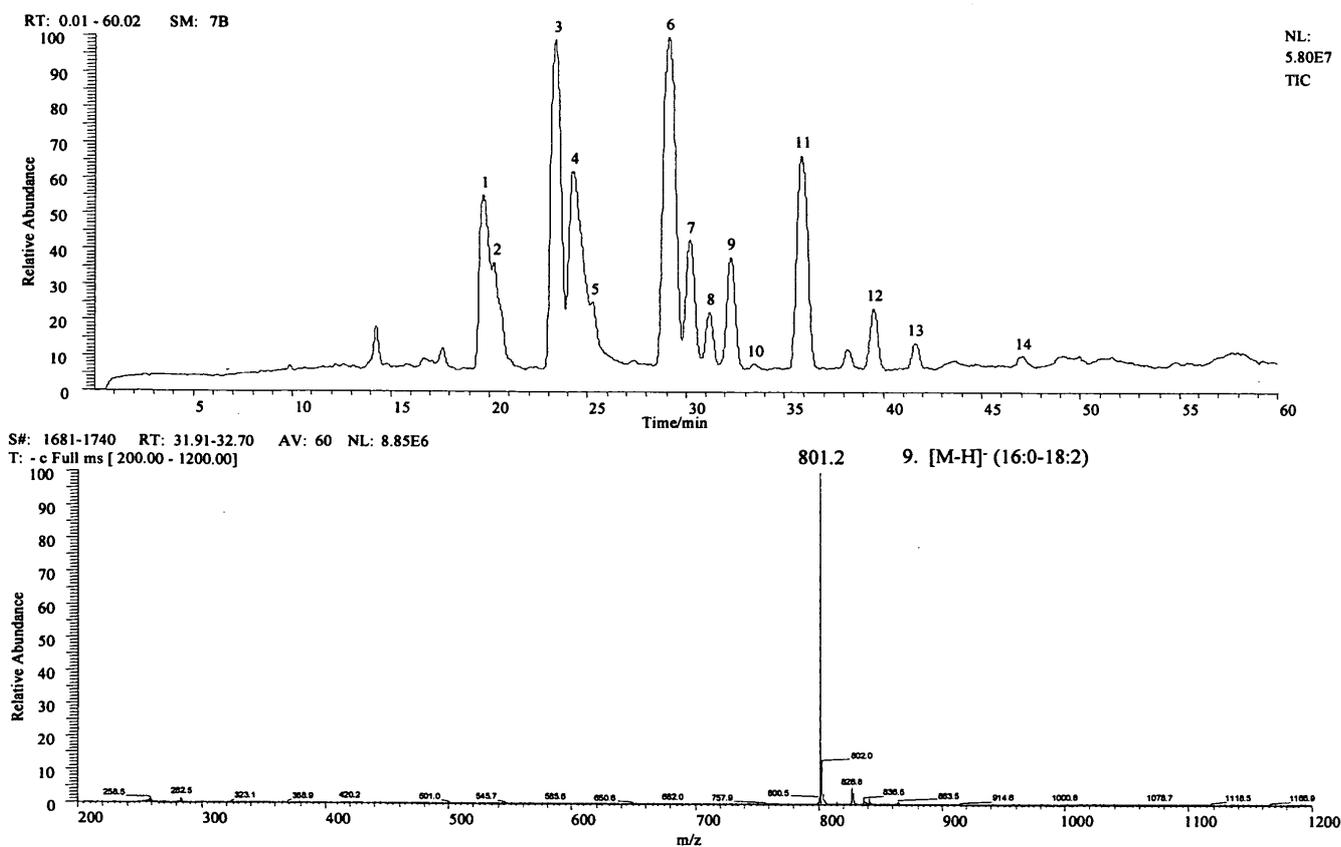


Fig. 3 Reversed-phase HPLC/ESI-MS of the 3,5-dinitrophenylurethane derivatives of 1,3-diacylglycerols in a cooking oil, Econa

A: total ion chromatogram (TIC); B: mass spectrum averaged over the peak between 31.9 and 32.7 min on TIC

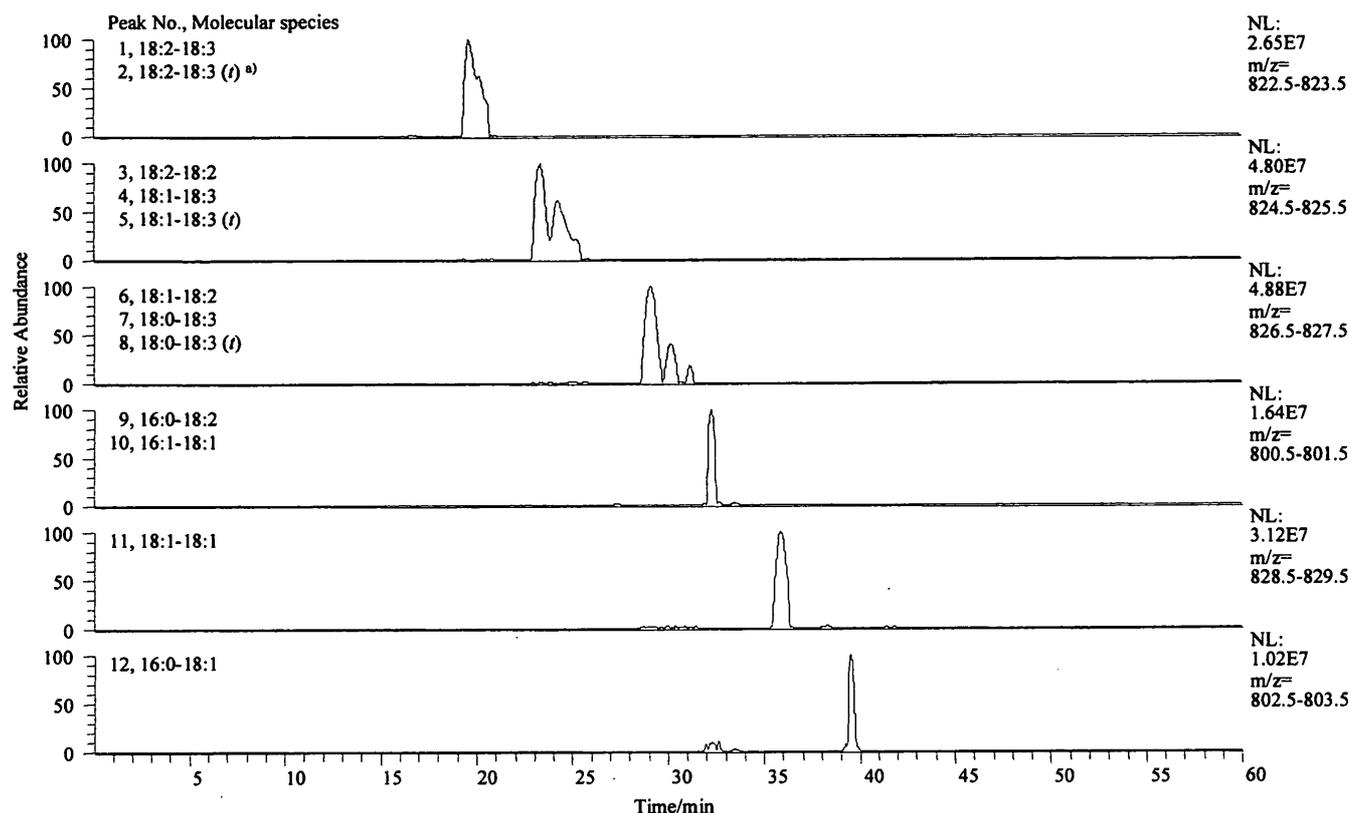


Fig. 4 Selected ion $[M - H]^-$ monitoring of major molecular species of the 3,5-dinitrophenylurethane derivatives of 1,3-diacylglycerols in a cooking oil, Econa

$m/z = [M - H]^- \pm 0.5$; t , trans

分子種と考えられる。同一分子量の分子種、例えばピーク 6, 7, 8 は同一の質量スペクトルを示したが、最大ピーク 6 は、Table 1 から主要脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸から構成された分子種 18:1-18:2 であると判定された。同様にピーク 7 の構成脂肪酸はステアリン酸 (18:0) と α -リノレン酸 (18:3)、ピーク 8 はステアリン酸とトランス化した α -リノレン酸 (Table 1 参照) であると同定された。ピーク 2 と 5 はピーク 1 (18:2-18:3) 及び 4 (18:1-18:3) と同一のスペクトルを示したことから、ピーク 2 と 5 もトランス化した 18:2 又は 18:3 を含む分子種であると考えられた。このような方法により、組成が 1% 以下の分子種でもピークが明りように分離されたものについては同定が可能であった。分子種の同定は選択イオンモニタリング (SIM) による解析結果によっても確認された (Fig. 4)。例えば、質量数 827 を示す分子種ピークは三つ存在したが、これらはそれぞれ Fig. 2 及び 3 中のピーク 6 (18:1-18:2)、7 (18:0-18:3)、8 (18:0-18:3*t*) に明りように対応した。ほかの分子種ピークについても同様の方法で解析を行った。

本法で求めた試料油中の 1,3-DG の分子種組成を Table 2 に示す。主要分子種は 18:2-18:2 と 18:1-18:2 で、

Table 2 Molecular species composition of 1,3-diacylglycerols in a cooking oil, Econa

Peak No. ^{a)}	Molecular species	ECN ^{b)}	RRT ^{c)}	1,3-Diacylglycerol ^{d)} , mol%
1	18:2-18:3	26	0.67	6.72
2	18:2-18:3 (t) ^{e)}	26	0.69	2.70
3	18:2-18:2	28	0.80	32.16
4	18:1-18:3	28	0.83	9.36
5	18:1-18:3 (t)	28	0.87	1.04
6	18:1-18:2	30	1.00	31.12
7	18:0-18:3	30	1.04	2.92
8	18:0-18:3 (t)	30	1.08	1.01
9	16:0-18:2	30	1.12	2.83
10	16:1-18:1	30	1.16	0.24
11	18:1-18:1	32	1.23	7.62
12	16:0-18:1	32	1.37	1.20
13	18:0-18:2	32	1.45	0.69
14	18:0-18:1	34	1.73	0.39

a) Peak numbers correspond to those in Fig. 1. b) Equivalent carbon number = total acyl carbon numbers - 2 × number of double bonds. c) Retention times relative to 18:1-18:2. d) No distinction is made between *sn*-1 and *sn*-3 positions. e) *t* = trans.

全分子種中それぞれ 32% と 31% を占め、次いで 18 : 1-18 : 3 (9%), 18 : 1-18 : 1 (8%), 18 : 2-18 : 3 (7%) であった。用いた DG 油の分子種組成は本研究によって初めて明らかにされたものであり、この結果は 1,3-DG の抗肥満効果や脂質代謝に関する研究に有益な情報を提供すると思われる。

以上の検討により、DG 高含有油中の 1,3-DG の構成分子種の詳細を明らかにする HPLC/MS 法を確立した。本法は食用油に広く分布する 1,3-DG 分子種の精密分析法として有用であると考えられる。

文 献

- 1) R. P. Dalonzo, W. J. Kozarek, R. L. Wade: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **59**, 292 (1982).
- 2) A. A. Abdel-Habey, A. A. Y. Shehata, M. H. Ragab, J. B. Rossell: *Riv. Ital. Sostanze Grasse.*, **69**, 443 (1992).
- 3) 柳田晃良, 村田昌一: *臨床栄養*, **79**, 657 (1991).
- 4) 渡邊浩幸, 鬼沢孝司, 田口浩之, 小堀真由美, 千葉啓恵, 内藤幸雄, 松尾 登, 安川拓次, 服部道廣, 島崎弘幸: *日本油化学会誌*, **46**, 309 (1997).
- 5) 時光一郎: *科学と工業*, **74**, 33 (2000).
- 6) N. Matsuo, I. Tokimitsu: *Inform*, **12**, 1099 (2001).
- 7) N. Frega, F. Bocci, G. Lercker: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, 175 (1993).
- 8) 板橋 豊: *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **48**, 1145 (1999).
- 9) H. Okabe, Y. Itabashi, T. Ota, A. Kuksis: *J. Chromatogr. A.*, **829**, 81 (1998).
- 10) W. W. Christie: "*Lipid Analysis*", Second edition, p. 52 (1982), (Pergamon Press, Oxford).
- 11) 高木 徹, 板橋 豊: *日本油化学会誌*, **33**, 23 (1984).
- 12) 板橋 豊: *日本油化学会誌*, **47**, 971 (1998).
- 13) Z. Kemeny, K. Recseg, G. Henon, K. Kovari, F. Zwobada: *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **78**, 973 (2001).

要 旨

抗肥満作用を有する 1,3-ジアシルグリセロール (1,3-DG) の分子種を正確に求める方法を確立した。食用油 (エコナクッキングオイル) 中の 1,3-DG を 3,5-ジニトロフェニルウレタン (DNPU) 誘導体に変換した後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と質量分析法 (MS) を用いて分析した。その結果、C30 カラム (25 cm × 4.6 mm i.d.) を装備した逆相 HPLC により 1,3-DG を構成する種々の分子種が 60 分以内に明りょうに分離された。また、HPLC/エレクトロスプレーイオン化 (ESI)-MS 分析では、分離された各成分について顕著な $[M - H]^-$ イオンが得られた。このイオンを利用して、各分子種を同定した。本法は、種々の食用油に存在する 1,3-DG の分子種分析に適用できる。