

# Technical Report

## 質量分析計／水素炎イオン化検出器分岐を用いた 包括的2D GCによるミルクの脂質不けん化画分の分析

Comprehensive 2D GC with Dual Mass Spectrometry / Flame Ionization Detection for the Analysis of the Milk Unsaponifiable Lipid Fraction

Simona Salivo<sup>1</sup>, Peter Q. Tranchida<sup>1</sup>, Paola Dugo<sup>1,2</sup>, Luigi Mondello<sup>1,2</sup>

### Abstract:

各種ミルクの脂質不けん化画分全体の定性および定量分析用にFID/MS検出器分岐の包括的2次元GC (GC×GC) 法を開発した。GC×GCのカラム構成として、1次元目に低極性のものを、2次元目には中極性のものを使用した。いずれも高い熱安定性を特長としている。検出器分岐をすることで、定性データ (マススペクトル情報) および定量データ (%) 採取の両立が可能になった。生成されたフィンガープリントは複雑で、高感度でグループタイプのパターン形成が可能な2次元GCテクノロジーの持つメリットを生かせることが確認できた。

**Keywords:** 包括的2Dガスクロマトグラフィー、不けん化画分、食品分析

### 1. はじめに

ミルクは、脂質をはじめとする様々な化学物質で構成される極めて複雑な混合物である。脂質は被膜で覆われた脂肪球の中に含まれており、乳清とともにエマルジョンを形成する。たとえば牛乳ではトリアシルグリセロールが常に主成分で、脂質画分の95～96%を占めている。その他の微量成分としては、ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール、ケト酸グリセリド、ヒドロキシ酸グリセリド、遊離脂肪酸、ホスホリピド、およびステロールなどがある。

本研究の目的は、各種ミルクの脂質不けん化画分を調べることである。乳脂質についていえば、ステロールクラスが乳製品研究の主対象になっているが、その理由として、(成分的に一番多く含まれている) コレステロールの栄養と健康上への関与、酸化分解生成物の有無、クリームやバターに添加された微量の植物脂質の検出と植物ステロールの定量が挙げられる。

この研究では、FID/MS分岐検出を用いたGC×GC法を開発したが、これはTLC処理を用いた天然化合物クラスの単離を事前に行わず、バター (牛乳) およびミルク (バッファロー、ヤギ、ヒツジ) 中の脂質不けん化画分の全体についての定性および定量用の2次元フィンガープリントを生成させるためである。

GC×GC-MS/FID法は、1次元GCに比べ以下の点で優れている。I) 感度が高い (微量成分の検出)、II) ピークキャパシティが大きい (より多くの成分の分離)、III) 系統的な分析パターン形成による同定能力の向上。

### 2. 実験

#### 2-1. 試薬および材料

BSTFA [N,O-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド] +1% TMCS (トリメチルクロロシラン) キットは、シグマアルドリッチ (ミラノ、イタリア) から入手した。粉末の無水硫酸ナトリウムは、AppliChem (ミラノ、イタリア) から購入した。C<sub>7</sub>～C<sub>40</sub>アルカン系、エイコサノール、ドコサノール、テトラコサノール、コレステロールは、シグマアルドリッチから入手した。

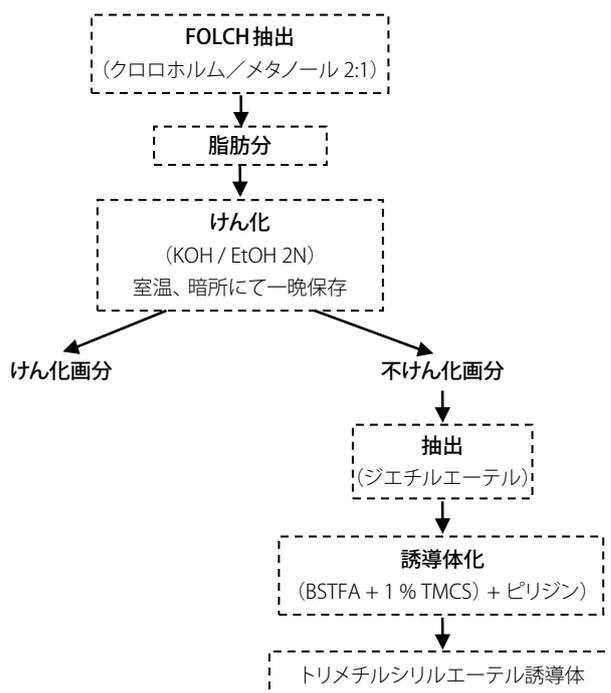


Fig. 1 試料調製のスキーム

## 2-2. 試料調製

ミルクの脂質画分の抽出は、Folch法を用いた。すなわち、クロロホルム/メタノール (2:1) 混合物を添加、氷浴中で30分間、マグネチックスターラで攪拌、抽出した。この内容物の攪拌により脂肪球を壊した。その後、遠心分離により、上部の水相 (さらに2回の抽出を実施)、下部の有機相 (脂質画分を含む)、および中間の固体タンパク質相の3つの相に分けた。抽出した混合有機抽出物は無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、ろ過後、ロータリーエバポレータで蒸留し、脂質分を秤量した。

牛乳バター由来の脂肪の抽出にはジエチルエーテルを用いた。

すべての試料に対し、脂質分は、次の手順で冷けん化を行った。KOH/EtOHの2N溶液を10 mLの脂肪に加え、暗所にて、マグネチックスターラによる攪拌を続けながら、室温にて一晩保管した。その後、ジエチルエーテルを用いて不けん化物の抽出を3回実施した。エーテル混合抽出物は、pHが中性になるまで蒸留水で洗浄した後、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、濾過してから蒸発乾固させた。残渣、つまり、不けん化物については、試料をクロロホルムに溶解させ、BSTFA (1 % TMCS) 試薬を加え (100 μL)、ピリジン環境中にて (100 μL)、70 °Cにて30分間の加熱を行う手順で、誘導体化 (トリメチルシリル誘導体を生成) を行った。

試料調製プロセスの流れをFig. 1に示す。

## 2-3. 装置構成

- AOC-20i スプリット-スプリットレスオートインジェクタ
- GC-2010 ガスクロマトグラフ (GC2)
- Zoex社製2段階ループタイプクライオモジュレータ (冷媒循環型)
- GCMS-QP2010 Ultra

## 2-4. クロマトグラフ法

D1カラム	: SLB-5ms 30 m × 0.25 mm ID × 0.25 μm <i>d<sub>r</sub></i> [silphenylene polymer、極性的にはpoly (5% diphenyl/95% methylsiloxane) とほぼ同等] (Supelco, Milan, Italy)
ループ	: 空カラム (1 m × 0.25 mm ID)
D2カラム	: Rxi-17Sil MS 2 m × 0.25 mm ID × 0.25 μm <i>d<sub>r</sub></i> (silarylene phase, 50% phenyl/50% dimethyl polysiloxane と同等) (Restek, Bellefonte, USA)
FID側	: 空カラム (0.25 m × 0.10 mm ID)
MS側	: 空カラム (0.4 m × 0.10 mm ID)
GC1 オープン	: 90 °C → (3 °C/min) → 325 °C
GC2 オープン	: 140 °C → (3 °C/min) → 360 °C (5 min)
キャリアガス	: He
入力圧	: 145 kPa (定線速度モード)
注入	: 2 μL、スプリット、スプリット比 1:10
モジュレーション	: 5 秒
ホットジェット	: 370 °C (450 msec幅)

## 2-5. ソフトウェア

- GCMSsolution version 4.0

## 2-6. 2Dソフトウェア

- ChromSquare version 2.0

## 2-7. 検出

MS パラメータ	
MSイオン化モード	: EI
スキャン速度	: 20,000 u/sec
測定質量範囲	: 40-600 <i>m/z</i>
サンプリング周波数	: 25 Hz
イオン源温度	: 200 °C
インターフェース温度	: 280 °C

FID パラメータ	
サンプリング周波数	: 50 Hz
温度	: 360 °C
ガス	: メイクアップ He: 40 mL/min; H <sub>2</sub> : 40 mL/min; air: 400 mL/min

## 3. 結果および考察

本研究の目的は、TLCによる特定の化合物クラスの分離を事前に行わず、バターやさまざまなミルクの脂質の全不けん化画分のGC×GCフィンガープリントを作成することであった。高沸点成分が多く含まれるので、熱安定性の高い無極性-中極性カラム対を選択した。50% フェニールの2次元目固定相への極性化合物の過剰な保持を避けるため、2台のオープン間でポジティブオフセット (50 °C) を持たせた。

ピーク同定は、以下のように行った。I) 標準化合物 (純品) の使用 (可能な場合)、II) MSデータベースによるスペクトルサーチ (NIST08およびWiley)、III) オンラインマススペクトルの目視による比較、IV) フラグメンテーションに関する文献情報の利用、V) 化学クラス2D平面の位置。

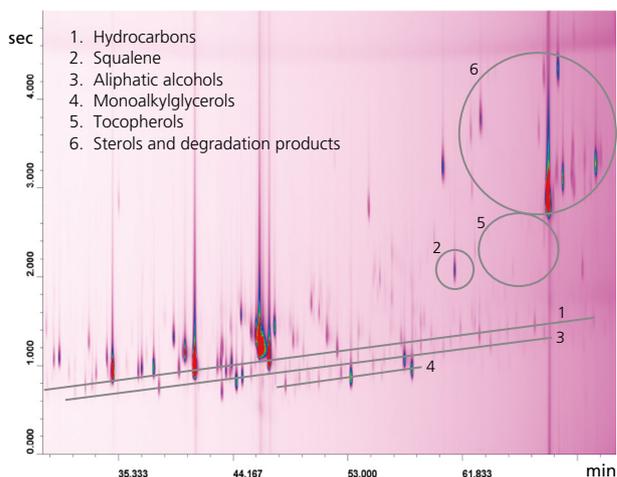


Fig. 2 バッファローミルクにおける不けん化画分の全体におけるGC×GC-qMSクロマトグラム

分子イオンの情報が利用できる場合には、この情報を最優先し、不可能な場合は重要なフラグメントイオンを考慮した。ピーク面積パーセント計算では、特定の化学グループ（例えばステロール）を全体とした。つまり、そのグループを構成成分の和を100%にした。

バッファローミルクのGC×GC-FIDの全体クロマトグラムをFig. 2に示す。図から分かるように一連の化学クラスがクロマトグラムの位置情報から特定できた。まず、炭化水素に関しては、直鎖アルカン（C<sub>17</sub>～C<sub>33</sub>）が斜めに整列し、スクアレンが最も多く含まれている。脂肪族アルコールに関しては、C<sub>14</sub>からC<sub>28</sub>まで8種類の偶数炭素数化合物が、直鎖アルカンの下方に直線状に並んでいる。これらはラップアラウンドを起こしていると考えられる。5種類の飽和モノアルキルグリセロールがC<sub>14</sub>～C<sub>18</sub>の領域で同定され、アルコールラインのやや下に斜めに並んでいる。この場合、C<sub>16:0</sub>およびC<sub>18:0</sub>が多く含まれている。モノアルキルグリセロールは、ヒトや動物の組織において、内因性の天然成分で、抗腫瘍効果、造血刺激、生殖能力の向上などの多くの生物活性を有することが示されている。

Fig. 3にバッファローミルク不けん化画分の拡大GC×GC-FIDクロマトグラムを示すが、ビタミンおよびステロール成分が現れている。1種類のビタミン（E）すなわち $\alpha$ -トコフェロールが、MSデータベース検索により同定できた。全体で10種類のステロールが同定され、それらについて定量を行った（相対%）。一部のステロールについてはMSデータベースとよい類似度を示したが、その他のものについては、オンラインの脂質データベースおよび文献情報を参照した。このゾーン内で、もっとも多く含まれている成分はコレステロールで、コレステロールの生体内還元物質のコプロスタノールが一番少なかった。6種類のコレステロール前駆体（ラトステロール、デスマステロール、ジヒドロラノステロール、14-デスマチルラノステロール、7-デヒドロコレステロール、ラノステロール）を暫定的に同定した。

なお、7-デヒドロコレステロールはビタミンD<sub>3</sub>の前駆体である。また、植物ステロールの一種であるカンペステロールが同定されたが、これは動物の飼料に由来すると思われる。最後にコレステロールの脱水生成物であるコレスタ-3,5-ジエンをMSデータベース検索により暫定的に同定した。そのスペクトルの類似度は91%であった。

他のミルクタイプについても検討したが、定性的に大きな差異は見られなかった。バター試料中には他に2つのビタミンとして、ビタミンAおよび $\gamma$ -トコフェロールが同定された。なお、ステロールの分解物は正確には同定されなかった。ヤギの試料では、バッファローミルクでは見られなかった他のビタミン、 $\gamma$ -トコフェロールも同定された（Fig. 4）。ステロールについては、コプロスタノールは検出されず、別名プロビタミンD<sub>2</sub>として知られるエルゴステロールが、MSのライブラリ検索により高い類似度（88%）にて同定された。最後に、ヒツジミルク中にはトコフェロールが見つからなかったが、その他のステロールについては、バッファローミルクと同種のものが存在した。

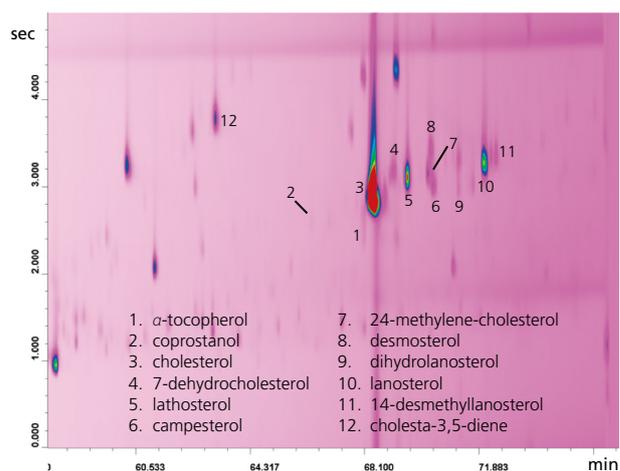


Fig. 3 バッファローミルク不けん化画分のGC×GC-FIDクロマトグラムの拡大図

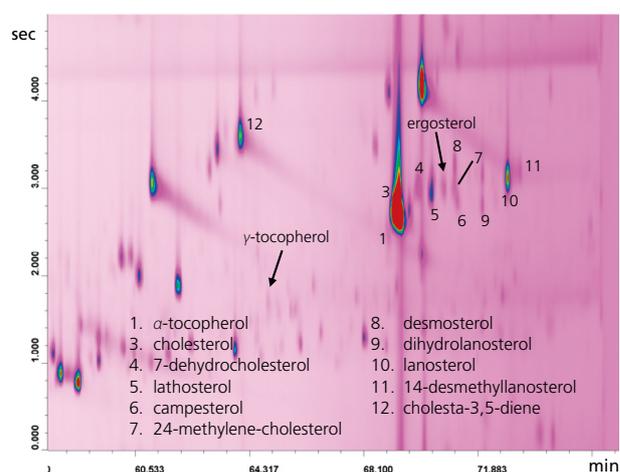


Fig. 4 ヤギミルクGC×GC-FIDクロマトグラムのビタミンおよびステロール領域

Table 1に、バターおよびミルク試料のステロール画分の（連続したn=2のデータの）相対%定量結果を示す。画分全体から言えば、コレステロールが主成分であり、最低値はバッファローミルクの90.5%、最高値はバターおよびヒツジミルクであった（95.2および95.9%）。

次に多く含まれる化合物は、ラノステロールおよびラトステロールであった。

他の少数のステロールについては、全体的に、バッファローミルクにおいて、他のものと比べ高い%で含まれていることが確認できた（Table 1）。最後に付け加えると、コレスタ-3,5-ジエンについては定量しなかった。これは天然に存在するステロールと、考えられないからである。

Table 1 バッファロー、ヤギ、およびヒツジのミルクに対するGC×GC-FID分析から得られたステロール%定量値 (n = 2)

ステロール	% バッファロー	% パター	% ヤギ	% ヒツジ
coprostanol	0.06	0.08	nd*	0.01
cholesterol	90.56	95.22	94.03	95.91
7-dehydrocholesterol	0.97	0.49	0.59	0.45
lathosterol	2.41	1.12	0.94	0.73
ergosterol	nd	nd	0.37	nd
campesterol	0.62	0.40	0.23	0.35
24-methylene-cholesterol	0.69	0.15	0.30	0.45
desmosterol	0.90	0.23	0.39	0.16
dihydrolanosterol	0.32	0.29	0.28	0.19
lanosterol	2.96	1.95	2.49	1.57
14-desmethyl lanosterol	0.51	0.07	0.38	0.17

\*: 検出されず

## 4. まとめ

本テクニカルレポートに報告された結果から、次のように考察できる。

- ここで提案したGC×GC-MS/FID法は、乳製品の品質（分解産物の有無など）および純粋さ（植物脂質に由来した植物ステロールの有無など）の評価に有用なツールとなると思われる。
- 報告したアプリケーションにおいて、高感度およびグループタイプパターン形成というGC×GCの特性が最大限に活用された。