

# 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による植物油の不けん化画分の分析

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

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

### Abstract:

植物油不けん化画分全体の定性および定量分析を行うためのFID/MS検出器分岐を用いた包括的2次元GC (GC×GC) 法を開発した。植物油の品質や純粋性に関する情報は脂肪酸 (FA) 成分分析から得られる。しかし、多くの植物油のFAプロファイルは類似しているため、不純物を混入の疑いのある粗悪品評価のためには、少量であっても特異的の高い化合物群である不けん化画分を調べることが有用である。

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

### 1. はじめに

植物油は「100%」脂質の食品と見なすことができる。その大部分はアシル脂質（主としてトリアシルグリセロール）で占められている。他には、少量のモノ／ジアシルグリセロール、ワックス、ステロールエステル、リン脂質なども含まれている。植物油の不けん化性（脂肪酸）画分は、従来から、GCのアプリケーションとして分析されてきており、それを定性および定量的に解析することで、オイルの品質、純度、および原産を特定する情報が得られる。

ところが、多くのオイル（すなわち、オリーブやヘーゼルナッツ油）では、それを特徴づけるFAプロファイルが類似しているため、安価なオイルを、混ぜ物として、少量使用された場合には、ピンポイントでそれを特定することが非常に困難となる。このため、非常に特定の構成をもつ植物油の少量化合物群（3%未満）、つまり、不けん化画分を分析することにより、前述した特異性の欠如という問題を解決できる可能性がある。

本テクニカルレポートでは、FID/MS検出分岐を用いたGC (GC×GC) 法開発について説明する。これにより、天然由来の成分クラスを、TLCプロセスであらかじめ単離しなくても、植物油の不けん化画分全体の2次元フィンガープリントを生成することができる。

検出分岐法を採用することで、定量（%値）と定性（マススペクトル情報）の両方を扱うことができた。一方、分離能の向上以外に、感度改善およびグループタイプパターン形成にも注力した。

### 2. 実験

#### 2-1. 試薬および材料

BBSTFA [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>30</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、エリスロジオール、ウバオール、およびβ-シトステロールはシグマアルドリッチから入手した。

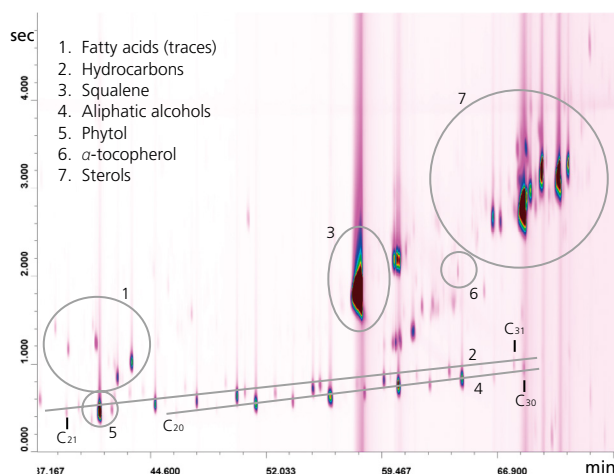


Fig. 1 エクストラヴァージンオリーブ油における不けん化画分全体のGC×GC-qMSクロマトグラム

## 2-2. 試料調製

10 mLのKOH/EtOH 2N溶液に1 g相当の植物油を加え、還流下で80 °Cに過熱、マグネチックスターラを用いて攪拌(溶液の浄化後に約20分間)した。

不けん化画分の抽出は、15 mLジエチルエーテルを用いて3回行った。混合抽出物は蒸留水で、中性になるまで、洗浄した。洗浄後のジエチルエーテル溶液の乾燥には無水硫酸ナトリウムを用い、溶媒を蒸留することで、数マイクロリットルの溶媒を残した。後者は、事前に秤量したバイアルに移し、溶媒の蒸発を穏やかな窒素流下の室温にて実施した。そして、得られた乾燥した残渣、すなわち不けん化画分の秤量を行った。

不けん化画分の誘導体化は以下のようにして行った。すなわち、1 mLのクロロホルムに溶かして200  $\mu$ LのBSTFA (1 % TMCS)と200  $\mu$ Lのピリジンで処理した後、70 °Cで20分間加熱した。それから、この誘導化した試料をGCに注入した。

## 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. ソフトウェア

- GCMSsolution version 4.0

## 2-5. 2Dソフトウェア

- ChromSquare version 2.0

## 2-6. クロマトグラフ法

D1カラム	: SLB-5ms 30 m $\times$ 0.25 mm ID $\times$ 0.25 $\mu$ m $d_f$ [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 $\times$ 0.25 mm ID)
D2カラム	: Rxi-17Sil MS 2 m $\times$ 0.25 mm ID $\times$ 0.25 $\mu$ m $d_f$ (silarylene phase, 50% phenyl/50% dimethyl polysiloxaneと同等) (Restek, Bellefonte, USA)
FID側	: 空カラム (0.3 m $\times$ 0.10 mm ID)
MS側	: 空カラム (0.5 m $\times$ 0.10 mm ID)
GC1 オープン	: 90 °C $\rightarrow$ (3 °C/min) $\rightarrow$ 325 °C
GC2 オープン	: 140 °C $\rightarrow$ (3 °C/min) $\rightarrow$ 360 °C (5 min)
キャリアガス	: He
入力圧	: 178 kPa (定線速度モード)
注入	: 3 $\mu$ L, split 1:10
モジュレーション	: 5 seconds
ホットジェット	: 370 °C (450 msec幅)

## 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 $m/z$
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

植物油の不けん化画分をGC分析する時は、普通、TLC分取プロセスを行うことを前提としている。この場合、TLCプレートの上から以下の順番で溶出してくる。1) スクアレン+炭化水素、2) トコフェロール、3) トリテルペンアルコール (メチルステロール) および脂肪族アルコール、4) デスメチルステロールおよびトリテルペンアルコール (エリスロジオールおよびウバオールなど)、これ以降を「ステロール」画分と定義し、最後に5) 保持された遊離脂肪酸となる。

ステロール分析において、試料調製は労力を要する作業である。最初にけん化性のグループを不けん化物から分離し、その後、TLCプロセスでそれぞれのバンドを不けん化物成分から単離させ、それからトリメチルシリルエーテル誘導体化を行う。

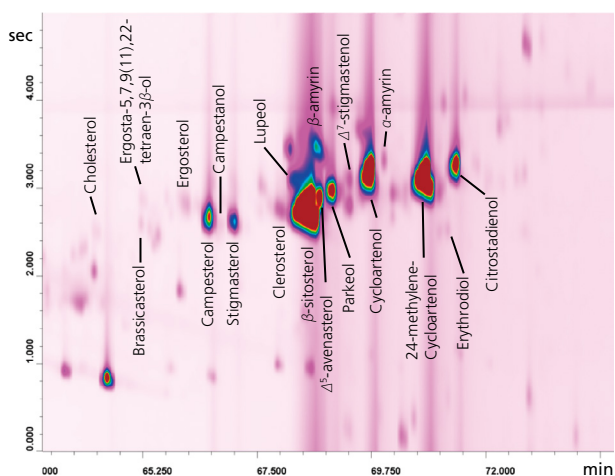


Fig. 2 エクストラヴァージンオリーブ油に対するステロールゾーン

本研究の目的は、植物油の品質と純粋性を評価するために、(TLCによる分別プロセスは行わないで) 不けん化物の全GC×GCフィンガープリントの生成することである。その結果、試料調製に要する時間が短縮される。

成分同定は、次のように行った。I) 純品標準試料の使用(利用できる場合)、II) MSデータベースを用いたスペクトル調査(NIST08およびWiley)、III) 無料オンラインマススペクトルとの目視比較、IV) 文献情報の利用、V) 化合物クラスの2D平面位置。

特定の化合物グループについて、ピーク面積相対%の計算を行った。この際、このグループの構成成分の合算値を100%とした。

純粋なエクストラヴァージンオリーブ油(EVOO)のGC×GC-FIDクロマトグラムをFig. 1に示す。化合物クラスに対応した列が、2D空間上に良好に広がっている。炭化水素では、 $C_{21}$ ~ $C_{33}$ 領域の直鎖アルカンが存在しているが、画分全体で最も多く含まれている成分はスクアレンであった。トコフェロール類では、ここでは「 $\alpha$ 」型のみが2D平面上に存在している。炭化水素の下側には、 $C_{20}$ から $C_{30}$ の脂肪族アルコールが並んでいる。これらの成分は、クロマトグラム上で(y軸方向)やや予想外の位置に現れているが、ラップアラウンドによるものと考えられる。

GC×GC-FIDクロマトグラムの、4-メチル-, 4,4-ジメチル-, 4,4-デスメチルステロール、およびトリテルペンジアルコールの領域を拡大した図をFig. 2に示す。メチルステロール類では、シクロアルテノールと24-メチレン-シクロアルテノールが最も濃度が高く(いずれも4,4-ジメチルステロール)、4,4-デスメチルステロール類では、 $\beta$ -シトステロールがゾーン全体で最も多く含まれていた。 $\beta$ -シトステロールはオリーブ油の分析における重要なマーカーである。トリテルペンジアルコールエリスロジオールも明確に同定されている。

その他の植物油として、ヒマワリ油の不けん化画分のGC×GC-FIDクロマトグラムをFig. 3に示す。

EVOOとの主要な差異は次の点である。I) スクアレン量がより低い、II)  $\alpha$ -トコフェロール以外に $\beta$ -トコフェロールも存在する、III) 脂肪族アルコールが $C_{20}$ から $C_{32}$ に及んでいる、IV) アルカンが $C_{23}$ から $C_{33}$ に及んでいる。ヒマワリ油での測定結果と対比させた「ステロール」ゾーンをFig. 4に示す。EVOOでは検出されていない化合物が一つ存在している。この化合物はエルゴスタ-7-エン-3 $\beta$ -オールで、マーカーとして利用できる可能性がある。ここで言及しておくべきは、EVOOでは、 $\Delta^7$ -シトステロールや $\Delta^7$ -アベナステロールなどの化合物は同定されていないが、これは、大きなピークのシクロアルテノールが共溶出し、それを除外できなかったためである。最後に、ウバオールはEVOOでは検出されなかった。

8つのエクストラヴァージンオリーブ油についての定量データ( $n=3$ )をTable 1に示す。

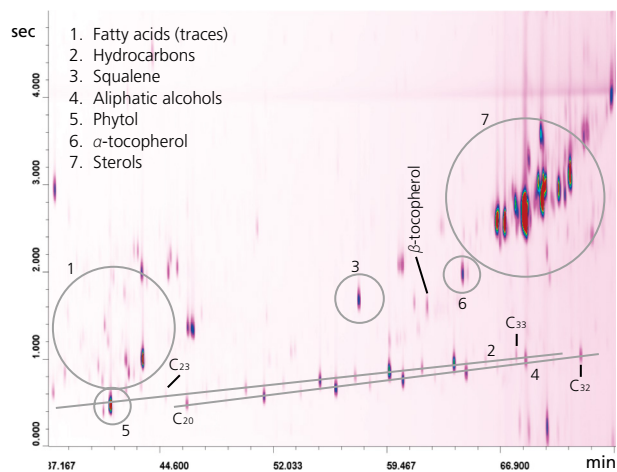


Fig. 3 ヒマワリ油のGC×GC-FIDクロマトグラム

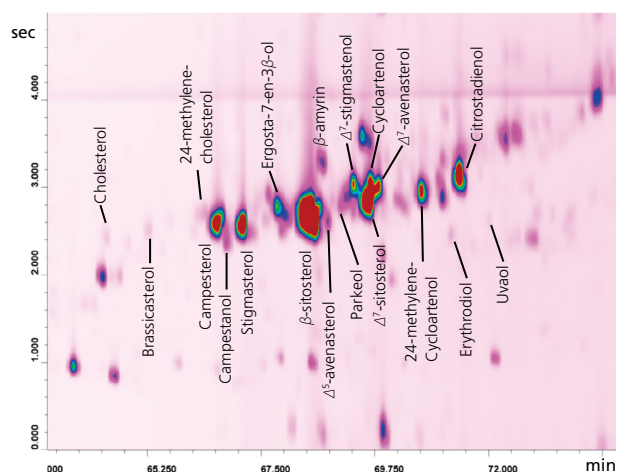


Fig. 4 ヒマワリ油のステロール領域

また、Table 1には、あわせてエクストラヴァージンオリーブ油に含まれる規制ステロールの制限値についても掲載している。たとえば、(動物由来の脂質が混ざらるのを防ぐために) コレステロールの存在比は0.5%を上回ってはならないが、分析したすべての油において、この規制値は満たされていた。ブラシカステロールの制限値0.1%は、アブラナ科(ナタネなど)由来の混ぜ物を防ぐためである。ブラシカステロールが検出されたのは試料EVOO1でのみであった。スチグマステロールおよびカンペステロールに関しては、スチグマステロールが常に高い量で存在していた。見かけ上、 $\beta$ -シトステロールと記載しているものは、いくつかのステロール類(Table 1)の合計で、93%含まれないといけな。

Table 1 オリーブ油の含有ステロール類の法令で定められた相対%および8つのオリーブ油試料で検出された%値 (n = 3)  
略号: Leg.= legislation (規制値)、nd = not detected (非検出)

ステロール	Leg.	EVOO1	EVOO2	EVOO3	EVOO4	EVOO5	EVOO6	EVOO7	EVOO8
Cholesterol	≤ 0.5	0.17	0.55	0.05	nd	nd	0.12 (nd)	0.04 (nd)	nd
Brassicasterol	≤ 0.1	0.06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Campesterol	≤ 4.0	4.44	4.67	4.78	3.71	4.23	4.46 (4.12)	4.67 (4.52)	3.99 (3.73)
Stigmasterol	≤ Camp.	2.01	0.77	0.87	1.46	0.78	1.03 (0.95)	0.90 (1.03)	1.24 (1.23)
β-sitosterol	≥ 93.0 <sup>(1)</sup>	91.92	90.90	91.28	93.01	93.85	92.46 (93.10)	90.86 (91.18)	93.49 (93.70)
Δ <sup>7</sup> -stigmastenol	≤ 0.5	1.03	1.00	0.27	0.76	1.14	1.10 (0.94)	0.85 (0.77)	0.90 (1.08)
Erythrodiol		0.31	1.23	2.75	1.03	nd	0.83 (0.89)	2.53 (2.50)	0.39 (0.26)
Uvaol		nd	0.26	nd	0.03	nd	nd	0.13 (nd)	nd
Erythrodiol + Uvaol	≤ 4.5	0.31	2.10	2.75	1.06	nd	0.83 (0.89)	2.67 (2.56)	0.39 (0.26)

(1) Sum of: Clerosterol + β-Sitosterol + sitostanol + Δ<sup>5</sup>-avenasterol.

## 4. まとめ

GC×GC-FID/MSを用いた各種植物油における不けん化画分の定性および定量分析法を開発し、実際に適用した。

ここで示した機器分析法は、このアプリケーションにおいて有用なツールであることがわかった。実際、GC×GCのもたらすメリットとしては、脂質の不けん化画分に対する詳細な分析が行える点が挙げられる。

この分野での適用において、高い感度と分離能およびグループタイプのパターン形成が、1次元のGC手法にはない明確かつ重要なメリットと見なせる。