報 文

液体クロマトグラフィー/質量分析法によるアシルグリセロールの 直接検出を用いた植物油の法科学的異同識別

三熊 敏靖^{®1,2}, 金子 毅¹

市販されている7種類の植物油及び2種類の食用加工油について、液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)による分析を行い、これらの識別を行った。LC/MSに非水系の逆相モードを用いることで、油脂の主成分であるトリアシルグリセロール(TAG)を迅速に検出することができ、得られたマススペクトルはTAGの分子構造を反映する特徴的なパターンを示した。更に、各油から得られたクロマトグラムのパターンは、構成脂肪酸の違いから生じるTAGの組成を顕著に反映したものとなり、油種の識別は容易に可能であった。食用加工油の分析においても、中鎖脂肪酸を含む油及びジアシルグリセロール(DAG)を主成分とする油の分析において、通常の植物油には観測されない特徴的なTAG又はDAGが検出され、これらを識別できた。LC/MSを用いることにより、試料への煩雑な前処理を行うことなく、短時間の測定で、油脂の主成分検出と油種の識別を同時に行うことが可能であった。

1 緒 言

植物油は、食用油から工業原料油まで日常生活に幅広く関連する油であり、法科学の分野においても、放火や自然発火の原因物質となり得ることから、その同定、識別に関する多くの研究が行われてきた^{1)~3)}。

植物油を含む油脂類の鑑定法としては、試料の赤外吸収スペクトル(IR)測定に加え、けん化後に分離した構成脂肪酸及び不けん化物をガスクロマトグラフィーによって分析する方法が一般的に用いられている⁴⁾。たしかに、構成脂肪酸の組成比や不けん化物の検出は、油種ごとに特異的な情報を与え、油脂の識別に大変有効である⁵⁾⁶⁾。しかし、これらの情報はけん化を行った後に得られる間接的な情報であり、油脂の主成分であるトリアシルグリセロール(TAG)含有の直接的な証明とはなり得ない。犯罪現場などから採取された証拠資料の鑑定においては、まず初めに未知試料である対象が油脂であることを証明することが必須であるが、これまでTAG含有の証明については、IRに依存する部分が非常に大きかった¹⁾⁴⁾。また近年では、原料を意図的に加工し、構成脂肪酸として中鎖脂肪酸を含む油や、ジアシルグリセロール(DAG)を主成分とする油などが販売され、油種の幅も広がりつつある。これら加工油について、既存の手法を組み合わせることで識別可能であるとの報告もあるが⁷⁾、主成分の直接観測による識別ができ

れば、油種の特定に加え、未知試料である検査対象が油脂であることを明確に証明することが可能となる。

そこで著者らは、液体クロマトグラフィー(LC)により、数種の植物油について主成分であるアシルグリセロールの分析を行った。また、検出器に質量分析計を用いることで、得られた各ピークがアシルグリセロールに由来することを同時に証明することとした。油脂のLCによる分析では、これまでに様々な検出器の使用が報告されている^{8)~13)}。アシルグリセロールは220 nmよりも長い波長領域に吸収を持たないが、205 nm、210 nmなどの紫外線吸収を利用することにより検出できることが知られている。また近年では、蒸発光散乱検出器(Evaporative Light Scattering Detector: ELSD)を利用することで、アシルグリセロールのような揮発性の低い成分を、移動相の影響を受けることなく高感度に検出することが可能である⁹⁾¹⁰⁾。ただし、これらの検出器はいずれも特異性に乏しく、検出されたピークがアシルグリセロールに由来することを示す情報は得られない。これに対し、質量分析計を用いれば、クロマトグラフィーによる分離を行いながら、得られた各ピークがアシルグリセロールに由来することを同時に証明することが可能となる。油脂の液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)による分析についても、すでに多くの報告があり^{11)~13)}、TAGのマススペクトルが分子構造を反映した特徴的なパターンを示すことが知られている。更に現在では、クロマトグラフィー及び質量分析の両者の分離能力を組み合わせることにより、構成脂肪酸の違いから生じるTAGの組成比をも決定することが可能である。ただし、こ

¹ 千葉県警察本部科学捜査研究所: 260-0024 千葉県千葉市中央区中央港 1-71-1

² 現在所属 警察庁科学警察研究所法科学第三部化学第一研究室: 277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-1

れら精密な分離、定量を行うためには、一般的に長時間をかけての測定や、煩雑な分析が必要となり、多検体の鑑定を想定した場合には、大変な時間を要することになる。そこで本研究では、特徴的なマススペクトルを得ることで油脂の主成分である TAG の含有を証明し、同時にクロマトグラフィーの分離能力を用いて迅速に各種油の識別を行うことを目的として、これらを満たす測定条件の検討を行った。その結果、メタノールとアセトンを用いた非水系の逆相モードを利用することにより、1 サンプルあたり 15 分の分析時間で、油脂の同定、識別に有効な結果を得ることができたので報告する。

2 実験

2.1 試薬及び試料

メタノールは関東化学製の電子工業用のものを、アセトンは和光純薬製の特級のものを使用した。

測定試料には、なたね油、大豆油、サラダ油（なたね油と大豆油を原料とし、食用に精製された調合油）、ごま油、ラー油、オリーブ油、ツバキ油に加え、中鎖脂肪酸を構成脂肪酸として含む加工油と、DAG を主成分として含む加工油の計 9 種類を使用した。使用した油は、いずれも近隣のスーパーマーケットにおいて購入したものをを用いた。

2.2 測定条件

各種油は、アセトンで 0.05% (DAG を主成分とする油については 0.2%) になるよう希釈し、試料注入量を 5 μL として LC/MS を行った。

LC/MS は島津製作所製 LCMS-QP8000 α により行った。カラムは GL Sciences 製 Inertsil ODS-3 (長さ 250 mm, 内径 4.6 mm, 粒径 5 μm) を用い、オープン温度は 40 $^{\circ}\text{C}$ とした。移動相にはメタノール及びアセトンの混合溶液を流量 1 mL min^{-1} で用い、グラジエント条件はアセトン濃度を 50% から 7 分間で 95% とし、その後測定終了まで 95% を保持した。質量測定には、大気化学イオン化 (APCI) 法をポジティブモードで用い、キャピラリー電圧 4.5 kV, デイフレクタ電圧を 80 V とした。APCI 温度を 450 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶媒管 (CDL) 温度を 250 $^{\circ}\text{C}$ とし、ネブライザーガスには窒素を 2.5 L min^{-1} で用いた。測定質量範囲は、 m/z 100 ~ 1000 のスキャンモードにより行った。

3 結果と考察

3.1 TAG から得られるクロマトグラムについて

Fig. 1a に、なたね油から得られたトータルイオンクロマトグラムを示す。本測定条件により、TAG に由来するピークを顕著に観測することができた。なお、逆相モードにおける TAG の LC では、下記の式で定義される ECN (equivalent carbon number) と呼ばれる数字が大きなものほど、

保持時間が長くなることが知られており、同一の ECN を持つ TAG を分離するためには、分析時間の延長や、最適な分離条件が必要となる¹¹⁾¹²⁾。

$$\text{ECN} = \text{CN} - 2\text{DB}$$

ECN: equivalent carbon number

CN: the total carbon number in all acyl chains

DB: the number of double bonds

本条件においては、同一の ECN を持つ TAG の分離は行われておらず、検出された各ピークは、同じ ECN の TAG による合成ピークであると考えられる。トータルイオンクロマトグラム (Fig. 1a) 上に、参考文献 (12) 及び後述のオリーブ油のデータを基にして得られた各ピークの ECN を示す。多くの植物油では、構成脂肪酸としてパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸など、炭素数が偶数のものを主体として含むため、TAG の大部分は ECN が偶数となる。これら TAG が ECN の順に検出されることで、クロマトグラムは各種油に固有となる、ECN ごとの TAG の相対比を示すことになり、この結果から油種の識別を行うこととした。

Fig. 1b) ~ e) に、ECN = 42, 44, 46, 48 の各ピークから得られたマススペクトルをそれぞれ示す。APCI 法による TAG のイオン化では、プロトン付加分子に加え、構成脂肪酸が解離して生じるフラグメントイオンや、構成脂肪酸自身のフラグメントイオンなどが生じ、マススペクトルは分子構造を反映した特徴的なパターンを示す^{11)~13)} (Fig. 1b)。ただし、本測定条件で得られたマススペクトルは、同じ ECN をもつ各種 TAG の合成スペクトルであることから、各ピークの厳密な帰属、定量を行うことは困難である。これは、同一質量のイオンであっても、異なる構成脂肪酸の組み合わせが存在することに起因する。例として、Fig. 1b のマススペクトルに対し、各質量電荷比の領域において最も高いピークに値を付したが、構成脂肪酸自身のフラグメントイオンを除き、 m/z 599.5 ではリノール酸 2 分子の組み合わせとオレイン酸、リノレン酸の組み合わせが考えられ、 m/z 879.8 ではリノール酸 3 分子の組み合わせ、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸の組み合わせ、ステアリン酸、リノレン酸 2 分子の組み合わせ (いずれも ECN = 42) が考えられる¹²⁾。検出されたマススペクトル上の各ピークは、これら複数の組み合わせから構成される各種イオンのうちのいずれか、もしくはそれらの合成に由来するものと考えられ、正確な帰属、定量を行うことが困難である。しかしながら、このような特徴的なパターンを持つマススペクトルを観測することにより、試料中に TAG が含有されていることを知ることができ、検査対象が油脂であることを同定することができる。

Fig. 1 (a) Total ion chromatogram of rapeseed oil by LC/MS. The number above each peak indicates equivalent carbon number (ECN). (b) ~ (e) Mass spectra obtained from each peak in the chromatogram, ECN = 42, 44, 46, 48, respectively

またマススペクトルにおいて、ECNが大きくなるにつれ、プロトン付加分子の相対強度が小さくなる現象が観測され、本測定条件においてECN = 48の時点でプロトン付加分子の観測が困難となった (Fig. 1e). APCI 法によるイ

オン化では、飽和脂肪酸のみから構成される TAG (パルミチン酸, ステアリン酸で構成される TAG など) において、プロトン付加分子の相対強度が極めて小さくなることが報告されているが¹²⁾, 不飽和脂肪酸を含む場合においても、

Fig. 2 Total ion chromatograms of (a) salad oil, (b) rapeseed oil, (c) soybean oil, (e) sesame oil, (f) chili oil. Salad oil is the most popular oil for cooking in Japan and is constituted from a refined mixture of rapeseed oil and soybean oil. (d) Sum of the two chromatograms obtained from rapeseed oil and soybean oil in the ratio of 55 to 45

Fig. 3 Total ion chromatograms of (a) olive oil, (b) camellia oil, (c) the oil including medium-chain fatty acids, (d) the oil mainly constituted from diacylglycerols

TAG 全体の不飽和度とプロトン付加分子の相対強度に相関があることが示唆された。実際の鑑定を行う際には、このような現象が起こりうることを理解した上で、測定機器に応じた、イオン源での分子のフラグメンテーションにかかわるパラメータ（本測定機器ではディフレクタ電圧）を

個々に決定する必要がある。

3・2 各種油から得られたクロマトグラムの比較

Fig. 2 及び Fig. 3 に、各種油から得られたトータルイオンクロマトグラムを示す。各々の油から、TAG（又は DAG）

Table 1 Shared percentage of each peak area against total peak one at various oils, %

Oil types	Equivalent carbon number (ECN)						
	38	40	42	44	46	48	50
Rapeseed	0.9	3.7	9.3	22.0	27.9	31.0	5.2
Soybean	1.8	9.2	24.1	28.8	22.2	11.3	2.6
Sum of rapeseed and soybean (in the ratio of 55 to 45)	1.3	6.2	16.0	25.1	25.3	22.1	4.0
Salad	1.1	5.2	15.7	25.1	26.1	22.3	4.5
Sesame	N.D.	N.D.	9.9	24.9	33.2	24.9	7.0
Chili	N.D.	N.D.	11.6	25.1	33.0	23.9	6.4
Olive	N.D.	N.D.	N.D.	4.1	20.8	64.6	10.5
Camellia	N.D.	N.D.	N.D.	3.4	15.3	70.3	11.0

N.D. : Not detected

の組成を示す特有のクロマトグラムを得ることができた。

サラダ油 (Fig. 2a), なたね油 (Fig. 2b), 大豆油 (Fig. 2c) では, それぞれのクロマトグラムが固有のパターンを示し, 油種間の識別は容易に可能であった。また, 本測定条件で得られた各クロマトグラムが, TAG の組成を反映していることを確認するために, 以下の比較を行った。今回使用したサラダ油は, なたね油と大豆油の調合油であることから, 各クロマトグラムが TAG の組成を反映していれば, なたね油と大豆油のクロマトグラムを適切な比率で合成することにより, サラダ油のクロマトグラムのパターンに近づくはずである。各油脂の構成脂肪酸組成から混合比率を概算したところ, 今回使用したサラダ油は, なたね油 60~50% 及び大豆油 40~50% の混合油であることが推測された。そこで, なたね油と大豆油の各クロマトグラムを, 最も高いピークで同一の高さに規格化し, なたね油 55%, 大豆油 45% として各々のクロマトグラムを合成した (Fig. 1d)。得られた合成クロマトグラムのパターンは, サラダ油のクロマトグラムのパターンと同様であった。更に Table 1 に, 加工油を除く各種油について, 検出された総ピーク面積に対する各ピークの割合を百分率で示し, 合わせてなたね油及び大豆油の値を, それぞれ 55% 及び 45% で合成した数値も示した。サラダ油における各ピークの割合と, なたね油及び大豆油における各ピークの割合を合成した数値が類似していることが分かる。これらの結果から, 今回得られた各クロマトグラムのパターンが, 各々の油脂に含まれる TAG の組成を顕著に反映していることが示された。

ごま油 (Fig. 2e), ラー油 (Fig. 2f) では, 両者の間ではほぼ同一のクロマトグラムが得られた。これは, ラー油のベース油がごま油であることを考えれば妥当な結果であり, 油の外観, 添加成分に関係なく, 主成分である TAG の組成を, クロマトグラムが顕著に反映していることを示している。

オリーブ油 (Fig. 3a), ツバキ油 (Fig. 3b) では, 油種は異なるが類似のクロマトグラムが得られた。両者の構成脂

肪酸組成を比較すると, 共にオレイン酸含有率が高く, オリーブ油で約 74%, ツバキ油で約 85% である¹⁴⁾。このことから, クロマトグラム上で最も高いピークが, オレイン酸 3 分子からなる TAG を含んでいると容易に推察することができ, このピークが検出される保持時間に, ECN = 48 [オレイン酸は炭素数 18, 不飽和度 1 の脂肪酸であるから, $ECN = (18 \times 3) - (2 \times 3) = 48$] の TAG が現れることを知ることができる。オレイン酸リッチであることにより, 他の油に比べて TAG の多様性が制限され, クロマトグラムでの差異が小さくなったものと考えられる。

中鎖脂肪酸を構成脂肪酸に含む油 (Fig. 3c) では, 他の油に比べて, より保持時間の短い部分にピークが検出された。これは, 中鎖脂肪酸としてカプリル酸 (炭素数 8) やカプロン酸 (炭素数 10) などを含むため, より ECN の小さな TAG が生じ, これらが保持時間の短い領域に検出されたものと考察される。得られたクロマトグラムのパターンは他と顕著に異なり, 識別は容易に行うことができた。

DAG を主成分とする油 (Fig. 3d) では, DAG 及び TAG がそれぞれ分離され, 両者が同一のクロマトグラム上に明確に検出された。これにより, DAG を主成分とする油は容易に識別可能であった。

4 結 言

9 種類の油について LC/MS による分析を行い, 主成分であるアシルグリセロール含有の証明と, 各種油の識別を同時に試みた。その結果, メタノールとアセトンを用いた非水系の逆相モードを利用することにより, 1 サンプルあたり 15 分の分析時間で, 油脂の同定, 識別に有効な結果を得ることができた。

分析から得られたクロマトグラムは, 各種油の TAG (又は DAG) の組成を反映する特徴的なものであり, 構成脂肪酸として中鎖脂肪酸を含む油や, DAG を主成分とする油においても, 識別に有効な結果を得ることができた。また各ピークからは, 油脂の主成分である TAG に特徴的なマススペクトルが得られ, 検出された各々のピークがアシル

グリセロールに由来することを同時に証明することができた。

ただし、TAGの組成に差異が少ない油種間の識別については、本分析のみでは困難であり、不けん化物の検査など、他の分析を組み合わせることで、より正確な油種の特定を行う必要がある。

文 献

- 1) 高取健彦編：“捜査のための法科学 第二部＜法工学・法化学＞”，(2005)，(令文社)。
- 2) E. Stauffer : *J. Forensic Sci.*, **51**, 1016 (2006)。
- 3) S. J. Pitts, C. I. Thomson : *J. Forensic Sci.*, **48**, 1293 (2003)。
- 4) 科学警察研究所編：“工学的検査法Ⅱ 油類・火薬類・銃器・写真計測”，(1979)，(中和印刷)。
- 5) 山口和隆，倉田正治：分析化学 (*Bunseki Kagaku*)，

- 54**, 1091 (2005)。
- 6) S. Kurata, K. Yamaguchi, M. Nagai : *Anal. Sci.*, **21**, 1457 (2005)。
- 7) 山口和隆：日本法科学技術学会誌，**11**, 52 (2006)。
- 8) S. Momchilova, K. Tsuji, Y. Itabashi, B. Nikolova-Damyanova, A. Kuksis : *J. Sep. Sci.*, **27**, 1033 (2004)。
- 9) S. Heron, M. Dreux, A. Tchaplal : *J. Chromatogr. A*, **1035**, 221 (2004)。
- 10) S. Heron, M. G. Maloumbi, M. Dreux, E. Verette, A. Tchaplal : *J. Chromatogr. A*, **1161**, 152 (2007)。
- 11) H. R. Mottram, R. P. Evershed : *J. Chromatogr. A*, **926**, 239 (2001)。
- 12) M. Holcapek, P. Jandera, P. Zderadicka, L. Hrubá : *J. Chromatogr. A*, **1010**, 195 (2003)。
- 13) L. Fauconnot, J. Hau, J. M. Aeschlimann, L. B. Fay, F. Dionisi : *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 218 (2004)。
- 14) 日本油化学協会編：“油脂化学便覧”，(1990)，(丸善)。

Forensic Discrimination of Vegetable Oils Using Direct Detection of Acylglycerols by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry

Toshiyasu MIKUMA¹ and Tsuyoshi KANEKO¹

¹ Forensic Science Laboratory, Chiba Pref. Police H.Q., 1-71-1, Chuoko, Chuo-ku, Chiba-shi, Chiba 260-0024

(Received 30 July 2009, Accepted 19 February 2010)

Seven types of vegetable oils and two types of processed oils, which have been widely on sale, were analyzed and identified by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). The main constituents, triacylglycerols (TAG), could be rapidly detected using a non-aqueous reversed-phase mode. The characteristic mass spectra which reflected the TAG chemical structure were observed for each oil. Since the sample materials in a forensic examination are mostly unknown, this observation can be powerful evidence to identify an unknown sample as a TAG mixture, that is, fats and oils. Furthermore, each chromatogram pattern clearly reflected its own TAG composition and could be used to discriminate their oils. This phenomenon was also applied to processed oils. The oil including medium-chain fatty acids gave additional peaks on chromatogram compared with those of other vegetable oils. These peaks were derived from additional TAG including medium-chain fatty acids as components. The oil mainly constituted from diacylglycerols (DAG) also gave additional peaks which were derived from DAG themselves. These results indicated that LC analysis may be useful for the analysis of even processed oils. LC/MS analysis of vegetable oil easily gives information concerning the oil's nature without any pretreatment. Therefore, this analysis may be a powerful one for investigations and discriminations of oils in forensic examinations.

Keywords : vegetable oil ; lipid ; triacylglycerol ; diacylglycerol ; liquid chromatography/mass spectrometry.