報 文

トリグリセドの GC-MS 分析 (第1報)

総 脂 肪 酸 組 成

深津 誠・渡部 績・田村 利武

日本大学理工学部 (東京都千代田区神田駿河台 1-8)

GC-MS Analysis of Triglyceride. I.

Total Fatty Acid Composition

Makoto FUKATSU, Isao WATANABE, and Toshitake TAMURA

College of Science and Technology, Nihon University
(1-8, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo)

On the analysis of triglyceride by GC-MS, it was commonly assumed that the intensity of some fragment ions (RCO^+ and $[\text{RCO}+128]^+$ ion) were proportional to the quality of corresponding fatty acid. The propriety of the assumption was investigated.

Prepared model triglyceride mixture consisted of saturated straight chain fatty acid and had wide molecular distribution. As for total fatty acid composition, GC-MS method was compared with usual hydrolysis-GC method. GC-MS (depend on intensity of RCO^+ ion) provided slight excess value at C_8 to C_{14} -acid, and less value at C_{16} to C_{20} -acid. $[\text{RCO}+128]^+$ ion had same tendency as RCO^+ ion, but it was susceptible to obstruction of $[\text{RCO}+128+14\text{n}]^+$ ion series.

1 緒 言

現在、トリグリセドの分析法としては、試料トリグリセドを不飽和度や分子量の差によって分別した後に加水分解とメチルエステル化を行って、それぞれの脂肪酸組成をガスクロマトグラフィー (GC) で求める方法が広く採られている^{1),2)}。この方法は各種のクロマトグラフィーや酵素反応を利用することで精度は向上してきているが、一般に手間と時間のかかるものが多い³⁾。一方、迅速な組成解析の手段として有望なものに、トリグリセドを前処理することなしに直接分析するガスクロマトグラフィー・質量スペクトル法 (GC-MS 法) がある。GC-MS 法とは、まず GC によりトリグリセドを構成するアシル基の炭素数合計 (Σ) 別にトリグリセドを分別し、GC に直結した MS 装置で質量スペクトルの測定をそれぞれ行い、スペクトル中の脂肪酸特定イオンの強度から Σ 値別の脂肪酸組成を推定する方法である⁴⁾。この場合、アシル基量と特定イオン強度との間の比例性が実際に正しく成立するか否かを検討した例は少なく、GC-MS 法によってトリグリセド分析を定量的に行う上で問題がある。

本研究では、トリグリセド組成データのうち最も信頼性の高いものとして、通常の加水分解によって得た脂肪酸区分の GC により求めた組成⁵⁾、すなわちトリグリ

セドを構成する総脂肪酸組成 (加水分解 GC 法) を選び、これとトリグリセドの GC-MS データ中の特定フラグメントイオン強度から計算した総脂肪酸組成 (GC-MS 法) の比較をし、GC-MS 法を用いてトリグリセドの組成解析を定量的に行う場合の問題点を検討した。試料のモデルトリグリセド混合物は、フラグメンテーションの複雑化⁶⁾を避けるために不飽和脂肪酸をほとんど含まぬ極度硬化油とし、なるべく広範囲の脂肪酸分布を持ち、しかも理論的な取り扱いを容易にするために、極度硬化油混合物をエステル交換して脂肪酸基をランダム分布化させたものを用いた。

2 実 験

2.1 試料の調製

モデルトリグリセド混合物は、Table-1 に示す性状の極度硬化やし油と極度硬化牛脂を等量混合し、0.5wt% のナトリウムメトキシドを触媒として、1 h エステル交換反応を行って調製した⁷⁾。Fig-1 に示すように、このモデルトリグリセド混合物は Σ 値で 32~54 の分布を持つ。

2.2 GC

GC 装置は島津 GC-4 CM (検出器: FID, キャリヤーガス: N_2 , 40 ml/min) で行った。トリグリセドの GC 条件は、カラム: OV-1 (1%), 3 mmφ×0.5 m, カ

Table-1 Properties of hardened coconut oil and hardened beef tallow.

	Hardened coconut oil	Hardened beef tallow
AV	0.03	0.02
SV	254	196
IV	0.5	0.5
mp (°C)	33.2	60.8

Conditions: 0.5m×3mm i.d. glass column packed with 1%OV-1; 160~330°C (at 4°C/min) programmed temperature.

Fig.-1 Gas chromatogram of model triglyceride mixture. The carbon numbers (Σ values) are written on the peaks.

ラム温度: 160~330°C, 4°C/min 昇温プログラム, である⁹⁾。GC によるトリグリセリド中の総脂肪酸組成は、常法によりけん化して得た脂肪酸をメチルエステル化した後、カラム: DEGS (20%), 3mmφ×2m, カラム温度: 100~195°C, 2°C/min 昇温プログラム, で求めた⁹⁾。ガスクロマトグラムの各ピーク面積から求める定量値は、定量用標準混合試料, トリグリセリド: ガスクロ工業製 Cat. No. A 1402 G (Σ 値 24~48), 及び A 1403 G (Σ 値 48~66), 脂肪酸メチルエステル: ガスクロ工業製 Cat. No. A 1105 Y ($C_8 \sim C_{20}$), のデータと比較し補正した。

2.3 GC-MS

トリグリセリドの GC-MS 測定装置は島津 LKB-9000 で, GC 部分の条件はキャリアガスがヘリウム (25 ml/min) である外は 2.2 に示したものと同一である。MS 部分の条件を次に示す。

セパレーター温度: 330°C

イオン源温度: 330°C

イオン化電圧: 70 eV

加速電圧: 3.5 kV

トラップ電流: 60 μ V

測定データはオンラインのコンピューターによりバックグラウンド消去処理を行った。

3 結果と考察

3.1 総脂肪酸組成

Table-2 に 2.2 によって求めたモデルトリグリセリド混合物を構成する脂肪酸の組成を示す。これを加水分解 GC 法による総脂肪酸組成と呼ぶこととする。

Table-2 Total fatty acid composition of model triglyceride mixture by hydrolysis-GC method.

Carbon number of fatty acid	6	8	10	12	14	16	18	20
mol%	Tr.	7.1	4.1	29.3	11.4	17.1	30.3	0.8

3.2 GC-MS 法による脂肪酸組成

トリグリセリド分析における GC-MS 法とは、前述したように、 Σ 値別に分別して MS 測定を行い、スペクトル中の脂肪酸特定イオン強度比から Σ 値別の脂肪酸組成を推定するものである。 Σ 値別の脂肪酸組成が得られれば Bezard ら¹⁰⁾の方法によりトリグリセリドのタイプ別の組成が推定できる。 Σ 値別の脂肪酸組成を求める方法としては Bezard らが行ったように GC 分取をした後、加水分解、メチルエステル化をして GC 分析する方法があるが、GC 分取に技術を要し、時間もかかるので一般的でない。その点、GC-MS 法は特別な技術を要せず、分析時間も短い。

トリグリセリドの質量スペクトル中の主要フラグメントイオンには、 $[M-RCO_2]^+$, $[RCO+128]^+$, $[RCO+115]^+$, $[RCO+74]^+$, RCO^+ などがある⁹⁾。トリグリセリドの GC-MS 法で用いられる特定フラグメントイオンは定量性から、主として $[RCO+128]^+$ 及び RCO^+ であり、両者は近似した脂肪酸組成を与えると言われて⁹⁾いる⁹⁾。**Table-3** はモデルトリグリセリド混合物の Σ 値 32 から 54 の各脂肪酸組成を $[RCO+128]^+$ イオンに相当する質量数のピーク強度比から求めたもので、モデルトリグリセリド混合物に対する mol % で示した。GC-MS 分析において、 $[RCO+128]^+$ イオンなどの特定イオン強度は GC で一本のピークとなる同一 Σ 値をもつトリグリセリド混合物の質量スペクトル中では比較できるが、 Σ 値の異なるトリグリセリド相互の質量スペクトル間での比較を直接に行うことはできない。従って、**Table-3** の値は質量スペクトルから得られる各 Σ 値のトリグリセリドごとの脂肪酸組成 ($[RCO+128]^+$ イオン強度比) を直接 GC 分析によるトリグリセリドの Σ 値別組成比 (2.2 により補正済みの **Table-3** の Total⁹⁾ 欄の値) に従って比例配分したものである。得られる質量スペクトルには **Table-2** から考えて存在しないこと

Fig-2 Total fatty acid composition by hydrolysis-GC method and GC-MS method (C_8 to C_{20}).

Fig-3 Total fatty acid composition by hydrolysis-GC method and GC-MS method (C_6 to C_{20}).

Table-3 Fatty acid composition of model triglyceride mixture by relative intensity of $[RCO+128]^+$ ions. (mol%)

FA Σ	8	10	12	14	16	18	20	Total ^{a)}
32	0.21	0.05	0.24	0.07	0.04	—	—	0.61
34	0.08	0.05	0.10	0.05	0.04	0.02	—	0.34
36	0.27	0.15	0.71	0.15	0.23	0.17	0.04	1.72
38	0.84	0.35	1.34	0.62	0.45	0.42	0.23	4.25
40	0.71	0.76	2.49	0.89	1.38	0.87	0.41	7.51
42	1.66	0.86	6.50	1.83	2.76	2.64	0.89	17.14
44	1.18	1.10	4.00	2.86	3.00	3.05	1.45	16.64
46	0.62	1.16	5.02	1.95	4.69	3.57	1.38	18.39
48	0.65	0.56	5.08	2.30	3.41	5.47	1.19	18.66
50	—	0.32	0.47	1.44	1.60	2.52	0.51	6.86
52	—	—	0.30	0.37	1.84	2.41	0.49	5.41
54	—	—	—	0.19	0.27	2.36	0.13	2.95
Total ^{b)}	6.22	5.36	26.25	12.72	19.71	23.5	6.72	100.00

a) This composition was obtained by gas chromatography (OV-1 column).

b) This is total fatty acid composition by GC-MS method.

が明らかなアシル基 (C_6 以下, C_{22} 以上, 奇数炭素数など) や試料トリグリセリドの構成上存在し得ないアシル基 (Σ 値 32 における C_{18} など) の特定イオン $[RCO+128]^+$ に相当する m/z をもつピークが若干現れることがあるが, Table-3 はこれらをあらかじめ除外して計算してある。

$[RCO+128]^+$ のイオンの強度比から求めた総脂肪酸組成 (Table-3 の Total^{b)} 欄) と, RCO^+ イオンに着目して同様の方法で計算した総脂肪酸組成と, 加水分解 GC 法による総脂肪酸組成 (Table-2) を比較検討した (Fig-2)。Fig-2 に示すとおり, 2 種の GC-MS 法で得られた総脂肪酸組成は, 現在最も信頼性が高いとさ

れている加水分解 GC 法での総脂肪酸組成とある程度類似したパターンを示しており, Murata らの報告⁴⁾と同様に GC-MS 法がある程度の定量性をもつことがわかった。次に Fig-2 をやや詳細に観察すると, RCO^+ イオンの強度比から求めた総脂肪酸組成は, 加水分解 GC 法によるものに比べ, 短鎖脂肪酸 (C_{14} 以下) の含有率が増加し, 長鎖脂肪酸 (C_{18} 以上) の含有率が減少する傾向が見られる。 $[RCO+128]^+$ イオンの強度比から求めた総脂肪酸組成もほぼ同様の傾向が見られるが, RCO^+ イオンによるもの程顕著ではない。これは $[RCO+128]^+$ イオンに重なって出現する $[RCO+128+14n]^+$ 系列 (特に $[RCO+184]^+$) のイオン⁶⁾ が, 上記の傾向を打ち消す方向に働くためである。

前述したように生の MS データには, 実際には含まれないヘキサン酸 (C_6) の特定イオンに相当する m/z にかかりの強度のピークが出現する。これを含めて計算した総脂肪酸組成のグラフを Fig-2 と同様にして示した (Fig-3)。 RCO^+ イオンによるもの, $[RCO+128]^+$ イオンによるもの, 共にヘキサン酸の含有率がステアリン酸 (C_{18}) の含有率の減少分とほぼ同量であり, ヘキサン酸に相当するイオンの生成に対するステアリン酸の関与の可能性もある。

以上のように, 構成脂肪酸の含有量と特定イオン強度が必ずしも比例しない理由としては, イオンの二次的な開裂, 妨害イオン ($[RCO+128]^+$ イオンに対する $[RCO+184]^+$ イオンなど) の出現等が挙げられる。トリグリセリドの GC-MS 分析において定量的な取り扱いをする場合は, これらのことに十分な注意を払う必要があろう。

なお本研究に用いた極度硬化油は旭電化工業 (株) 食品油脂開発研究所から提供して頂いた。ここに謝意を表します。

(昭和 56 年 10 月 26 日受理)

文 献

- 1) 高木 徹, “油脂・脂質の機器分析”, 幸書房 (1976) p. 259
- 2) A. Daneshrad, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **55**, 317 (1978)
- 3) C. Litchfield, “Analysis of Triglyceride”, Academic Press, New York (1972) p. 272
- 4) T. Murata, S. Takahashi, *Anal. Chem.*, **45**, 1816 (1973)
- 5) 日本油化学協会編, “基準油脂分析試験法” 2.4.21.3-77
- 6) R.A. Lauer, A.J. Aasen, G. Graff, R.T. Holman, *Lipids*, **5**, 861 (1970)
- 7) 桜井一男, 村川清人, 油化学, **19**, 562 (1970)
- 8) R.J. Hamilton, *J. Chromatog. Sci.*, **13**, 474 (1975)
- 9) 日本油化学協会編, “基準油脂分析試験法” 2.4.20.2-77
- 10) J. Bezard, M. Bugaut, G. Clement, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **48**, 134 (1971)