報 文

LC/APCI-MS によるひまし油中の
遊離ヒドロキシ脂肪酸の定量

山本信也・吉田誠一・高松 翼

(株) 資生堂研究開発本部安全性・分析センター (〒223 神奈川県横浜市港北区新羽町 1050)

Determination of Free Hydroxy Fatty Acids in Castor Oil by LC/APCI-MS

Shinya YAMAMOTO, Seiichi YOSHIDA, and Tasuku TAKAMATSU

Safety and Analytical Research Center R and D Headquarters, Shiseido Co. Ltd.

(1050 Nippa-cho, Kohoku-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken, 〒223)

Abstract A method was developed for measurement of free ricinoleic acid and 12-hydroxystearic acid in castor oil and hydrogenated castor oil by LC/MS. The interface employed was atmospheric pressure chemical ionization (APCI), which showed a high sensitivity for the fatty acids through Selected Ion Monitoring (SIM) of their respective quasi-molecular ions, m/z 297 and 299. The detection limit was 1ng, with S/N ratio of 2~3. In the range of 4~100ng linear relationships were observed between peak area and the injected amount of each hydroxy fatty acid with correlation coefficients of 0.999 or above. The method showed a satisfactory reproducibility with a coefficient variation of 6.6% or less, and a recovery rate of 89.7~104.2% for the added standards. Results coincided well with amounts calculated from acid value. The minor free fatty acids, linoleic acid and oleic acid were also detected in castor oil. The method developed proved simple, fast and excellently suited to measurement of trace amounts of free fatty acids in the presence of glycerides consisting of the same acids.

Key words : free ricinoleic acid, free 12-hydroxystearic acid, castor oil, hydrogenated castor oil, LC/APCI-MS

1 緒 言

ひまし油の構成脂肪酸は不飽和モノヒドロキシ酸であるリノール酸 (C 18=OH) が大部分を占めるため、他の油脂にはみられない溶解性など、特異な物理的性質を有している¹⁾。ひまし油の用途は広く、工業的には塗料、印刷インキの原料として、また、薬用には下剤、皮膚緩剤として、化粧品用には口紅、ポマードなどの基剤油分に使用されている²⁾。一般に、化粧品に使用される原料は、その色、においが基本的な要素であり、ひまし油も例外ではない。そのために化粧品用のひまし油は高度に精製されており、その安定性も十分に管理されなければならない。

ひまし油の構成脂肪酸の分析法としては、けん化した後にメチルエステル化、及びトリメチルシリル (TMS) 化して GC 分析³⁾、あるいは誘導体化せずに直接 HPLC

分析する方法⁴⁾が一般的に行われている。しかし、純度、安定性に関する一つの評価方法としての遊離脂肪酸の定量法としては、中和滴定である酸価測定以外に有力な方法が見当たらない。しかも精製油脂中の微量遊離脂肪酸の管理となれば、酸価では感度、精度並びに選択性の面で不充分となる。また、けん化せずに TMS 化して GC 分析する方法においても、GC 注入口にて大過剰にあるトリアシルグリセリンの熱分解により構成脂肪酸の一部が検出され、真の値よりも上回った結果を与えてしまう。前処理として、遊離脂肪酸のみを陰イオン交換樹脂に吸着させる方法もあるが、この際には吸着脂肪酸が溶離液に用いるエタノールなどによりエステル化されることでの損失が考えられる。試料を安定に取り扱えるという意味で、HPLC 分析した例^{5),6)}もみられるが、210 nm 付近の UV 検出波長を用いているため、感度が劣り、微量定量には不適當である。従って高感度化のために、UV 及び蛍光標識法が検討されており、4-プロモメ

連絡者：山本信也

チル 7-メトキシマリリン⁷⁾, 9-アンスリルジアゾメタン⁸⁾を用いる方法などが知られている。これらについても、前者のように加熱を伴った反応では発生源であるアシルグリセリンの加水分解による遊離脂肪酸の定量値の増加が懸念される。

最も試料を安定に取り扱え、かつ高感度な方法としては、LC/MS があり、最近では油脂分析にも多用され、高速原子衝撃イオン化 (FAB) 法による高度不飽和脂肪酸含有油脂の組成分析⁹⁾や大気圧化学イオン化 (APCI) 法¹⁰⁾によるリノール酸酸化生成物の分析¹¹⁾などが行われている。本報では LC/APCI-MS による選択イオン検出 (SIM) 法を用いて、ひまし油中の遊離 C18=OH 及び硬化ひまし油中の遊離 12-ヒドロキシステアリン酸 (C18OH) の定量法について検討し、高感度で迅速、簡単に定量できることを見いだしたので報告する。

2 実 験

2.1 試料及び試薬

試料であるひまし油は伊藤製油(株)製、硬化ひまし油は日本ケミカルズ(株)製のものを用い、各々 0.25, 0.1% (wt/vol) メタノール溶液を調製し、試験溶液とした。硬化ひまし油については、溶液が完全に透明にならなかったため、0.45 μm のテフロン製のメンブランフィルターで濾過して試験溶液とした。

標準物質の C18=OH はナカライテスク(株)製、C18OH は和光純薬工業(株)製のものをそのまま用い、検量線作成用標準溶液として、両者の 0.1~10 ppm メタノール溶液を調製した。

試料調製及び HPLC の移動相溶媒として用いたメタノールはナカライテスク(株)製 HPLC 用であり、水はミリポア(株)の MILL-Q 精製システムを通過させたもの、酢酸は和光純薬工業(株)製のものを用いた。

2.2 装 置

HPLC 装置は日立製作所(株)製 L-6300 インテリジェントポンプに資生堂(株)製 CAPCELL PAK C₁₈ UG120A (ϕ 4.6 mm $\times$ 25 cm) をつなげ、日立製 L-5030 カラムオープンで 40°C とした。移動相溶媒は 0.4% 酢酸を含むメタノール: 水 (9:1) であり、試料注入には日立製 AS-4000 オートサンプラーを用いた。MS 装置は四重極型の日立製 M-1000H であり、APCI 法の負イオンモードにて測定した。APCI 法は移動相溶媒分子と試料分子のイオン分子反応に基づいたイオン化法であることより、感度に対する移動相流量の影響は見逃せず、一般に低流量になる程、感度が高くなる。これを利用してセミマイクロカラム LC/APCI-MS によるヘキサメチルメラミンの高感度分析を行った例¹²⁾もあるが、ここでは汎用の HPLC を接続し、10 μL を注入できる通常の流速として、1 mL/min とした。

3 結果と考察

3.1 LC/MS 条件の検討

まず、LC/MS の感度の最適化を行うために、C18=OH の 8.7 ppm と C18OH の 11.1 ppm の混合溶液を注入し、掃引質量範囲 70~400, 掃引速度 300/s のスキャンモードにて生成する擬分子イオン (M-H)⁻ のピーク面積を指標として、インターフェース関連条件である噴霧温度、ドリフト電圧、脱溶媒温度の影響について検討した。

APCI 法による負イオン測定モードでは、HPLC 分析におけるアニオン成分のイオン化抑制剤として多用されるリン酸やトリフロロ酢酸は使用できないために、ここでは酢酸を用いた⁴⁾。酢酸を添加しないと、目的成分のピークはブロードになり、保持時間も 5~20 min まで変動し、安定しなかった。2.2 で示した HPLC 条件における C18=OH と C18OH の保持時間は各々 5.7 min と 6.7 min であり、両者は完全分離した。

Fig. 1 に目的成分の感度に対する噴霧温度の影響を示した。APCI 法における噴霧温度については、サーモプレー法のそれとは異なり、急激に感度が低下するような境界温度はみられず¹³⁾, 120~300°C までの感度変化は 2 倍以内であった。この結果より噴霧温度は両者共に最大のピーク強度が得られた 180°C に設定した。

Fig. 2 には同じくドリフト電圧の影響を示した。ド

Fig. 1 Effect of Vaporization Temperature on the Peak Areas of C18=OH and C18OH.
○: C18=OH, ●: C18OH,
MS conditions: desolvation temp., 399°C;
drift voltage, -30V

Fig. 2 Effect of Drift Voltage on the Peak Areas of C18=OH and C18OH.

○ : C18=OH, ● : C18OH,

MS conditions : desolvation temp., 399°C ; vaporization temp., 180°C

ドリフト電圧はイオンを収束させ、効率良く MS に導くためにインターフェースの2つのオリフィス間に印加されているものである。これを増加させるとフラグメントイオンが生成するようになり、構造情報を得ることがで

きるが、SIM 法においては擬分子イオンのピーク強度のみが重要となる。この結果より両者のピーク面積は -30~-50 V で最大値を得ているが、-50 V ではバックグラウンドスペクトルが高くなったため、ドリフト電圧は -30 V に設定した。

次に、脱溶媒温度の影響について検討したが、200°C では両者共ピークが検出されず、温度の上昇に伴ってピーク面積が増加したので、脱溶媒温度は設定可能な最高温度である 399°C に設定した。

以上の分析条件による C18=OH と C18OH の MS スペクトルを Fig. 3 に示した。後者の MS スペクトルでは擬分子イオンの同位体ピークとして $m/z=297$ が観測されているが、両者の保持時間が充分異なるために、このピークは C18=OH を定量する上で全く支障がなかった。

3.2 定 量

次に、C18=OH と C18OH の擬分子イオンのみをモニタリングする SIM 法による定量を行った。すなわち、試験溶液注入後、6.2 min までは $m/z=297$ 、6.2 min から 10 min までを $m/z=299$ で検出するタイムプログラムにより両者の同時定量を行った。Fig. 4 に両者の検量線を示した。共に 0.4~10 ppm の濃度範囲において、良好な直線関係にあり、相関係数は C18=OH で 0.9991, C18OH で 0.9994 を示した。

Fig. 3 Mass Spectra of C18=OH and C18OH.

Fig. 4 Calibration Curves of C18=OH and C18OH by SIM.

○ : C18=OH ($m/z=297$),
● : C18OH ($m/z=299$).

Fig. 5 に各 1 ng の SIM クロマトグラムを示したが、S/N は前者で約 2, 後者で約 3 であった。

この検量線を用いてのひまし油及び硬化ひまし油中の C18=OH と C18OH の定量結果を Table 1 にまとめた

Table 1 Content of Free Hydroxy Fatty Acids in Castor Oil and Hydrogenated Castor Oil.

	Castor oil	Hydrogenated castor oil
C18=OH (%)	0.341	N.D.
C18OH (%)	N.D.	0.660
c.v. (%)	2.1	6.6

The results were indicated as an average of four replicates.

c.v.=Coefficient of variation.

が、4 回の繰り返し測定における変動率は 2.1 及び 6.6% であり、良好な精度を確認した。各々のクロマトグラムを Fig. 6 に示した。

また、定量値のほぼ同量を添加し、回収率を確認したが、C18=OH で 89.7%, C 18OH で 104.2% であり、ほぼ満足のいく結果であった。一方、同じ試料について、酸価を測定 ($n=2$) した結果、ひまし油は 0.51, 硬化ひまし油は 1.19 であり、これらをすべて C18=OH と C 18OH に換算すると、各々 0.34%, 0.64% となり、本法により求めた定量値と良い一致を示した。また、ひまし油中の C18OH と硬化ひまし油中の C18=OH は各々 40 ppm と 100 ppm を限界として検出されなかった。その他の遊離脂肪酸としては、希釈率を下げた 1% ひまし油溶液中にリノール酸とオレイン酸が定量限界付近で共に約 0.5 ppm, すなわち、試料換算で約 50 ppm 検出された。本条件によるリノール酸とオレイン酸の保持時間は 12.1 min と 16.2 min であり、このときも各々の

Fig. 5 SIM Chromatogram of C18=OH and C18OH 1 ng Each. (a) : C18=OH, (b) : C18OH.

Fig. 6 SIM Chromatograms of Castor Oil and Hydrogenated Castor Oil.

擬分子イオン ($M-H$)⁻ である $m/z=279$, 281 によるモニタリングを行った。

本法による測定と同時にキャピラリー GC による分析も実施した。機器は HEWLETT PACKARD 社製 5890 であり、カラムは J&W SCIENTIFIC 社製 DB-1 ($\phi 0.25$ mm $\times$ 10 m) を用いた。カラム温度は 40 $\sim$ 200 $^{\circ}$ C までは 10 $^{\circ}$ C/min 昇温、それ以降は 20 $^{\circ}$ C/min 昇温であり、注入口及び検出器温度は 300 $^{\circ}$ C であり、キャリアガスはヘリウムで 1 mL/min とした。ひまし油を TMS 化し、1% シクロヘキサン溶液をスプリットレスにて 1 μ L 注入すると、2 回目以降の分析において、溶媒のみの注入でも前回注入の影響による C18=OH のピークが現れる現象がみられた。さらに、定量値も 1.51% と酸価と比較して異常に高い値が得られ、GC 法はひまし油中の遊離脂肪酸の分析に不適当であることがわかった。

4 総括

以上、LC/APCI-MS を用いたひまし油及び硬化ひまし油中の遊離 C18=OH と C18OH の簡便、迅速かつ選択性の高い定量法について示した。ここで、マトリックスであるひまし油は移動相がメタノール：クロロホルム (95 : 5) で溶出するため、メタノール：水 (9 : 1) での

遊離脂肪酸の定量には全く妨害とならず、しかも高濃度ひまし油がインターフェース及び MS 部イオン源を汚すこともない。従って、本法は多検体測定などのルーチン分析にも充分安定して適用できる。また、APCI 法はフロー FAB 法やエレクトロスプレー法と異なり、通常 HPLC の流速である 1 mL/min の溶出液のすべてを MS に導入することができ、試料のロスがないために定量には有利である。本法による脂肪酸の検出限界は約 1 ng であり、今回の分析のように、同じ脂肪酸で構成されるアシルグリセリンの共存下における微量の遊離脂肪酸の定量的場合、試料を安定に取り扱える HPLC 法と高感度な MS を検出器として結合する LC/MS 法は有用な分析法であることがわかった。

(受付：1995 年 9 月 18 日，受理：1995 年 10 月 19 日)

文 献

- 1) 日本公定書協会編，“化粧品原料基準第二版注解” 薬事日報社 (1984) p. 863.
- 2) 光井武夫編，“新化粧品学” 南山堂 (1993) p. 129.
- 3) D. Swern, “Bailey's Industrial Oil and Fats Products” 3rd ed, Interscience Publishers (1964) p. 241.
- 4) J.W. King, E.C. Adams, B.A. Bidlingmeyer, J. Liquid Chromatogr., 5 (2), 275 (1982).

- 5) A.S. Ritchie, M.H. Jee, *J. Chromatogr.*, **329**, 273 (1985).
 - 6) 原 節子, 小野孝久, 打越香悦, 戸谷洋一郎, 油化学, **39** (9), 629 (1990).
 - 7) W. Voelter, R. Huber, K. Zech, *J. Chromatogr.*, **217**, 491 (1981).
 - 8) S.A. Baker, J.A. Monti, S.T. Christian, F. Benington, R.D. Morin, *Anal. Biochem.*, **107**, 116 (1980).
 - 9) 堀 正典, 佐橋裕子, 小池誠治, 油化学, **42** (8), 619 (1993).
 - 10) M. Sakairi, H. Kambara, *Anal. Chem.*, **60**, 774 (1988).
 - 11) 岡田仲子, 藤井富美子, 油化学, **42** (2), 127 (1993).
 - 12) 高橋利明, 千田直人, 零石賢一, 加藤義昭, 能海和宣, 日本分析化学会第44年会講演要旨集(札幌市) (1995) p. 555.
 - 13) C.R. Blakely, J.J. Carmody, M.L. Vestal, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5931 (1980).
-

日本油化学会誌本号掲載 論文要旨

[総説]

新素材「リン脂質」

榊原敏之・難波幸弘

日本精化株式会社(〒541 大阪市中央区備後町2-4-9)

リン脂質を素材という見方で見たときの現状をまとめた。レシチンと称されるリン脂質を除くと、工業化されているリン脂質はグリセロリン脂質の一種のホスファチジルコリンのみで、その価格は数十万円/kgと宝石並の高価品である。しかし、この10年間でリン脂質の研究が進み、① リン脂質そのものの生理活性 ② リポソーム素材 ③ リン脂質複合体 ④ リン脂質による化学修飾 の各分野で新製品が開発されてきた。それらを概説した。

リン脂質を単なる化合物と捉えず、膜構成、複合体化、化学修飾の成分と捉えると、リン脂質は明らかに新素材と言える。今後も注目され続けるだろう。
(連絡者:榊原敏之) Vol. 45, No. 2, 127 (1996).

[報文]

糖脂質酵素モデル(第7報)

糖脂質の炭化水素鎖長の酵素活性への影響

大勝靖一・末吉孝

工学院大学工学部応用化学科 (〒163-91 東京都新宿区西新宿1-24-2)

親水性ないし疎水性を有する各種アミノ酸の加水分解に及ぼす糖脂質触媒の炭化水素鎖長の影響を検討した。糖脂質は反応場として添加したホスファチジルコリンと相互作用し、糖脂質の鎖長に依存して向上した、または低下した加水分解活性を示した。また糖脂質は鎖長に従って基質を識別する能力の異なることも判った。反応場である脂質の糖脂質酵素モデル触媒に及ぼす影響についても議論する。

(連絡者:大勝靖一) Vol. 45, No. 2, 137 (1996).

[報文]

電気化学的ハロホルム反応

メチルケトン類からエステル類への効率的変換

松原義治*・藤本和男*・前川博史**・西口郁三**

*近畿大学理工学部応用化学科(〒577 東大阪市小若江3-4-1)

**大阪市立工業研究所(〒536 大阪市城東区森之宮1丁目6-50)

脂肪族、芳香族および α 、 β -不飽和系など種々のメチルケトン類を臭化ナトリウム(または臭化リチウム)を含む無水メタノール(またはエタノール)中にて、陽陰極として炭素棒を備えた無隔膜セルを用いて電解すれば、ハロホルム型反応が容易に起こり対応するカルボン酸のメチルエステル(またはエチルエステル)が好収率で得られた。反応では陽極酸化により発生するブロモニウムイオンがメディエーターとして重要な働きを果たしていると思われる。一旦生成するブロモホルムが陰極での容易な還元により揮発性の高い物質に変わり、反応終了時に混合物中にほとんど存在しないことは、反応操作上極めて高い簡便性を与える。更に、芳香環やオレフィン結合への簡便で効率的なカルボアルコキシ基の導入が、最初のフリーデル・クラフツ反応により、容易に可能であることを示した。

(連絡者:西口郁三) Vol. 45, No. 2, 147 (1996).

[報文]

LC/MSによるヒマシ油中の遊離

ヒドロキシ脂肪酸の定量

山本信也・吉田誠一・高松 翼

(株)資生堂研究開発本部安全性・分析センター(〒223 横浜市港北区新羽町1050)

LC-MSによりヒマシ油と硬化ヒマシ油中のリシノール酸と12-ヒドロキシステアリン酸の定量法を開発した。用いたインターフェースは大気圧イオン化(APCI)法であり、これは疑分子イオンである m/z 297と299をモニタリングする選択イオンモニタリング(SIM)法により脂肪酸に対して高感度を示し、検出限界は S/N 2~3で1ngであった。4~100ngの注入範囲において、ピーク面積とおおののヒドロキシ脂肪酸量の間に直線関係がみられ、相関係数は0.999以上

であった。本法は変動係数6.6%以下の満足のいく再現性を示し、標準添加に対して89.7~104.2%の回収率を示した。また、遊離脂肪酸の定量結果と酸価より計算した遊離脂肪酸量とは良く一致した。その他の微量の遊離脂肪酸として、ヒマシ油中にリノール酸とオレイン酸が検出された。本法は簡便で迅速かつ同じ脂肪酸で構成されるグリセリドの共存下における微量の遊離脂肪酸の定量に非常に適していることがわかった。

(連絡者:山本信也) Vol. 45, No. 2, 155 (1996).

[報文] フルオロアルキル基含有2-アクリロキシエチルトリメチルアンモニウムクロリドオリゴマー類の合成と性質

沢田英夫*1・片山慎介*1・大植正敏*1・川瀬徳三*2・早川由夫*3・馬場昌範*4・富田敏夫*5・三谷元宏*6

*1 奈良工業高等専門学校化学工学科(〒639-11 奈良県大和郡山市矢田町)

*2 大阪市立大学生活科学部(〒558 大阪市住吉区杉本3-3-138)

*3 名古屋工業技術研究所(〒462 名古屋市北区平手町)

*4 鹿児島大学医学部(〒890 鹿児島市桜ヶ丘)

*5 東北大学農学部(〒980 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1)

*6 日本油脂(株)筑波研究所(〒300-26 つくば市東光台5-10)

過酸化フルオロアルカノイルと2-アクリロキシエチルトリメチルアンモニウムクロリドとを反応させることにより、温和な条件下にてフルオロアルキル基が直接炭素-炭素結合にて導入された新規なトリメチルアンモニウムセグメントを有するオリゴマーが合成された。これらオリゴマーは水、メタノール、エタノール、ジメチルスルホキシドに可溶であることが明らかとなった。またトリメチルビニルシラン、メチルメタクリレート、エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート等のモノマーを用いたコオリゴメライゼーション反応により合成されたトリメチルアンモニウムセグメントを有するフルオロアルキル基含有コオリゴマーは水、メタノール、エタノール等の極性溶媒以外にベンゼン、トルエン等の芳香族非極性溶媒にも可溶となった。これらフルオロアルキル基含有オリゴマーは、高分子量のフルオロアルキル可溶化材料であるにもかかわらず、通常の低分子量フッ素系界面活性剤と同様、水の表面張力を10mN/m付近まで低下させることが明らかとなり、新規なカチオン系オリゴマー界面活性剤としての応用が可能である。これらフッ素系オリゴマーはMT-4細胞における抗HIV-1活性は発現しなかったが、Staphylococcus aureus(黄色ブドウ球菌)に対して抗菌活性を有することが示された。

(連絡者:沢田英夫) Vol. 45, No. 2, 161 (1996).

[報文] フッ化炭素鎖を有するアゾベンゼン系両親媒性物質の合成

好野 則夫*1,*3・浅野 訓*1・近藤 行成*1・阿部 正彦*2,*3

*1 東京理科大学工学部工業化学科(〒162 東京都新宿区神楽坂1-3)

*2 東京理科大学理工学部工業化学科(〒278 千葉県野田市山崎2641)

*3 東京理科大学界面科学研究所(〒162 東京都新宿区神楽坂1-3)

親油性末端にフッ素鎖を有する新しいアゾベンゼン系アニオン界面活性剤を合成した。鎖長の異なるペルフルオロアルキルヨードとアニリンとの銅粉反応により4-ペルフルオロアルキルアニリンを合成し、ついで、ペルフルオロアニリンのジアゾ化ならびにフェノールとアゾカップリング反応により、フルオロアルキル鎖を有するヒドロキシアゾベンゼンを合成した。さらに、安定なスルホン酸塩型アニオン界面活性剤を得るために、亜硫酸ナトリウムとの反応で目的の両親媒性物質4種類を合成した。これらの生成物は¹H-NMR, IR, およびマスペクトルで確認した。

(連絡者:好野則夫) Vol. 45, No. 2, 171 (1996).

[報文] AOT逆ミセルに可溶化した遷移金属塩によるアラニンデシルエステルの加水分解

大谷 規隆・武石 一路・井上 幸彦・松上 真也

秋田大学鉱山学部物質工学科(〒010 秋田市手形学園町1-1)

オクタン中でエーロゾルAOTが形成する逆ミセルに水とともに種々の遷移金属塩を可溶化させた。これら金属塩は油性のアラニンデシルエステル(A1a0DC)の加水分解を促進することがわかった。金属塩として酢酸銅を用い