



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	キラル高速液体クロマトグラフィー/大気圧化学イオン化質量分析法によるグリシドール脂肪酸エステル光学異性体分析
Author(s)	吉岡, 智史; 西村, 一彦; 高村, 岳樹 他
Citation	分析化学, 61(9), 783-790 https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.61.783
Issue Date	2012-09-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/50328
Type	journal article
File Information	_.pdf



報 文

キラル高速液体クロマトグラフィー/大気圧化学イオン化質量分析法による グリシドール脂肪酸エステルの光学異性体分析

吉岡 智史¹, 西村 一彦², 高村 岳樹³, 酒々井眞澄⁴, 津田 洋幸⁴, 板橋 豊^{®5}

キラル高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (HPLC/MS) を用いて, 食用油に微量存在し, 安全性が危惧されているグリシドール脂肪酸エステル (GE) の光学異性体を分離, 定量する方法を検討した. HPLC 分析には, アミロース誘導体を固定相とするカラムとアセトニトリルに少量のメタノールを添加した移動相を使用した. MS には四重極型質量分析計を用いて, 大気圧化学イオン化法で正イオンスペクトルを測定した. その結果, 炭素数と不飽和度の異なる GE の光学異性体が明瞭に分離され, それぞれから顕著なプロトン化分子 $[M+H]^+$ が検出された. このイオンを用いる選択イオン検出法によって, ジアシルグリセロールを約 80 % 含有する食用油 (DAG 油) を直接分析した結果, アシル基の異なる 5 種の GE (16:0-GE, 18:0-GE, 18:1-GE, 18:2-GE, 18:3-GE) が検出され, これらはいずれも (R)-異性体と (S)-異性体のほぼ等量混合物であることが明らかになった. 得られた結果から, DAG 油に含まれる GE の光学異性体は, ほぼラセミ体の 1-モノアシルグリセロールから生成するものと考えられた.

1 緒 言

食用油 (精製植物油) に微量含まれるグリシドール脂肪酸エステル (GE, 1-アシル-2,3-エポキシプロパン) の安全性が危惧されており, 世界的に大きな問題となっている¹⁾²⁾. GE は, 食用油の主成分であるトリアシルグリセロール (TAG) やジアシルグリセロール (DAG) が脱臭などの精製工程で高温, 高圧下に置かれることで生成すると考えられている²⁾³⁾.

食用油に含まれる微量の GE を精確に定量することは容易ではなく, 信頼のおける分析法の開発が緊急の課題となっている¹⁾. これまで, GE の分析法がいくつか報告されている. たとえば, Masukawa⁴⁾⁵⁾らは食用油中の GE を 2 回の固相抽出によって濃縮した後, 逆相高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (HPLC/MS) を用いてアシル基の異なる 5 種の GE を定量している. WeiBhaar³⁾らは食用油中の GE をゲル透過によって分離後, ガスクロマトグラ

フィー/質量分析法 (GC/MS) を用いて同定している. 一方, Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF, ドイツ脂質科学会)⁶⁾は, GE を加水分解して生成する 3-モノクロロ-1,2-プロパンジオールをフェニルホウ酸で誘導体化した後, GC/MS を用いて GE を間接的に定量する方法を推奨している. これらの方法は, 食用油に含まれる GE の検出と定量に有用であると思われるが, 存在可能な 1 対の光学異性体 (Fig. 4 参照) については何も考慮されていない. GE の光学異性体間の生物活性の差異は明らかではないが, 光学異性体は, 一方が有効な活性を示し, もう一方が毒性を示すなど生物に対する作用が異なる場合があることから, 食品中の GE をリスク評価する際には, 安全性が危惧されている GE の光学異性体分析は不可欠であると考えられる.

本研究では逆相キラル HPLC を用いて GE の光学異性体を分離し, MS を併用して前処理なしで実試料中の GE 光学異性体を直接分析する方法を検討した. 得られた結果から GE 光学異性体の生成経路を推測した.

2 実 験

2.1 試 薬

以下の試薬を用いた. パルミチン酸 (16:0), ステアリン酸 (18:0), オレイン酸 (18:1), リノール酸 (18:2), リノレン酸 (18:3) (Sigma 製, 純度 99 % 以上); パルミチン酸グリシジル (16:0-GE, 純度 98 % 以上), オレイン酸グリシジル (18:1-GE, 純度 98 % 以上), リノール酸グ

[®] E-mail: yutaka@fish.hokudai.ac.jp

¹ 北海道大学大学院水産科学院海洋応用生命科学分野: 041-8611 北海道函館市港町 3-1-1

² 北海道立衛生研究所: 060-0819 北海道札幌市北区北 19 条西 12 丁目

³ 神奈川工科大学工学部応用化学科: 243-0292 神奈川県厚木市下荻野 1030

⁴ 名古屋市立大学大学院医学研究科分子毒性学分野: 467-8601 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄 1

⁵ 北海道大学大学院水産科学院海洋応用生命科学部門: 041-8611 北海道函館市港町 3-1-1

リシジル (18:2-GE, 純度 90 % 以上), リノレン酸グリシジル (18:3-GE, 純度 85 % 以上) (和光純薬工業製); 4ジメチルアミノピリジン (DMAP), 無水硫酸ナトリウム, *N,N*-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (ナカライテスク製); (*R*)-, (*S*)-及びラセミ体グリシドール (Aldrich 製, 純度 96~97 %); DAG 高含有 (約 80 %) 食用油⁷⁾ (DAG 油, 花王製, 2008 年に函館市内の食料品店にて購入)。

2・2 GE 標準品の合成

(*R*)-グリシドール, (*S*)-グリシドール及びラセミ体グリシドール (各 0.9 mmol), 脂肪酸 (1.0 mmol), DCC (1.2 mmol), DMAP (0.2 mmol) をクロロホルム 5 mL に溶解し, 攪拌しながら 20 °C で 16 時間反応させた。^{かくはん} 反応後, クロロホルムを窒素気流下で除去して得られた残渣約 20 mg を 200 μ L のクロロホルムに再度溶解させた。このクロロホルム可溶物からシリカゲル薄層クロマトグラフィー {Merck 製シリカゲル 60 F₂₅₄ (厚さ 0.25 mm, 20 cm $\times$ 20 cm)} を用いて GE を単離した。展開溶媒にはヘキサン-ジエチルエーテル (60:40, v/v) を使用した。展開後, 0.2 % 2',7'-ジクロロフルオレセイン試薬を噴霧して, 紫外線照射下で市販標準品と同一の R_f 値を示すバンドを確認し, ジエチルエーテルを用いて抽出した。得られた GE 画分を大気圧化学イオン化質量分析法 (APCI-MS) で確認し, その純度を光散乱検出逆相 HPLC (HPLC/ELSD) で求めた。MS には四重極型質量分析計 LC/MS-2010EV (島津製作所製) を用い, インフュージョン法で GE のマスペクトルを m/z 200~ m/z 1000 の範囲で測定した。ネブライザーガス 2.5 L min⁻¹, インターフェース温度 400 °C, 加熱ブロック温度 200 °C に設定し, 正イオンスペクトル測定した。HPLC 分析には Gemini 5u C18 110A カラム (Penomenex 製, 内径 4.6 mm, 長さ 25 cm, 粒径 5 μ m), LC-20AD ポンプ (島津製作所製), カラム恒温槽 Cool Pocket (Thermo Fisher Scientific 製), 蒸発光散乱検出器 (SEDEX55, SEDERE 製) 及びクロマトパック C-R6A (島津製作所製) を使用した。試料は 2-プロパノールに 1 mg mL⁻¹ の濃度になるように溶解し, その 5 μ L を Rheodyne 製インジェクター (Model 7725) を用いてカラムに注入した。移動相にはアセトニトリル/メタノール (10:90, v/v) (関東化学製 HPLC 用) を用いて 0.5 mL min⁻¹ の流量で送液した。カラム温度は 20 °C とし, 検出器の温度を 50 °C (空気圧力 2.3 bar, Gain 8) に設定して溶出成分を検出した。

2・3 キラル HPLC/ELSD 分析

キラル HPLC 分析には, 固定相に Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) を含むダイセル製の CHIRALPAK IA カラム (内径 4.6 mm, 長さ 25 cm, 粒径 5 μ m) と 2・2 に記載した機器類を使用した。カラム温度は 5 °C または

25 °C に設定し, GE の光学異性体分離を検討した。合成した GE 標準品を 2-プロパノールに 200 μ g mL⁻¹ の濃度になるように溶解し, その 5 μ L を Rheodyne 製インジェクター (Model 7725) を用いてカラムに注入した。移動相には, アセトニトリルに少量のメタノール, 2-プロパノール, エタノールまたは水 (いずれも関東化学製 HPLC 用) を加えたものを使用し (組成については 3・1 参照), 0.5 mL min⁻¹ の流量で送液した。

2・4 キラル HPLC/APCI-MS

実試料 (DAG 油) に含まれる GE の光学異性体の分離と定量にはキラル HPLC/APCI-MS を使用した。キラル HPLC は 2・3 と同一の条件で行った。APCI-MS は 2・2 と同一条件で行い, プロトン化分子を用いる選択イオン検出 (SIM) により各光学異性体を定量した。合成した GE 標準品 (ラセミ体) を 2-プロパノールに 0.5, 1, 5, 10, 20, 50 μ g mL⁻¹ の濃度になるように溶解し, その 5 μ L をオートインジェクター用いてカラムに注入した。溶出した各光学異性体のピーク面積を測定して検量線を作成した。検出限界と定量限界は, それぞれ $S/N = 3$, $S/N = 10$ で求めた。DAG 油は 2-プロパノールに 30 mg mL⁻¹ の濃度になるように溶解し, その 20 μ L をオートインジェクターを用いてカラムに注入した。移動相を 150 分間送液して, GE の後に溶出する多量の DAG などの夾雑物 (きょうぶつ) をカラムから排出した。

3 結果と考察

3・1 GE 標準品の純度検定

インフュージョン法による MS 分析の結果, 本研究で合成したすべての GE からベースピークとして $[M+H]^+$ が検出された。また, C18 カラムを用いた逆相 HPLC/ELSD 分析では, いずれの試料からも単一のピークが得られ, 合成した GE 標準品はすべて高純度であることが確認された。

3・2 キラル HPLC による GE の光学異性体分離

キラル HPLC 分析に使用した CHIRALPAK IA カラムは従来型の CHIRALPAK AD カラムと同様, 固定相として Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) を含むが, 耐溶剤性に優れ, 順相と逆相の両モードで使用できる特徴を有する⁸⁾。本研究では, HPLC/MS でのイオン化を促進するために, またアシル基の異なる種々の GE の光学異性体を一斉に分離するために逆相モードを選択した。移動相にアセトニトリル/メタノール, アセトニトリル/2-プロパノール, アセトニトリル/エタノール (組成はいずれも 98.5:1.5, v/v), 及びアセトニトリル/水 (90:10, v/v) を用いて GE の光学異性体分離を検討した結果, アセトニトリル/メタノールで最も良い分離が得られた。たとえば,

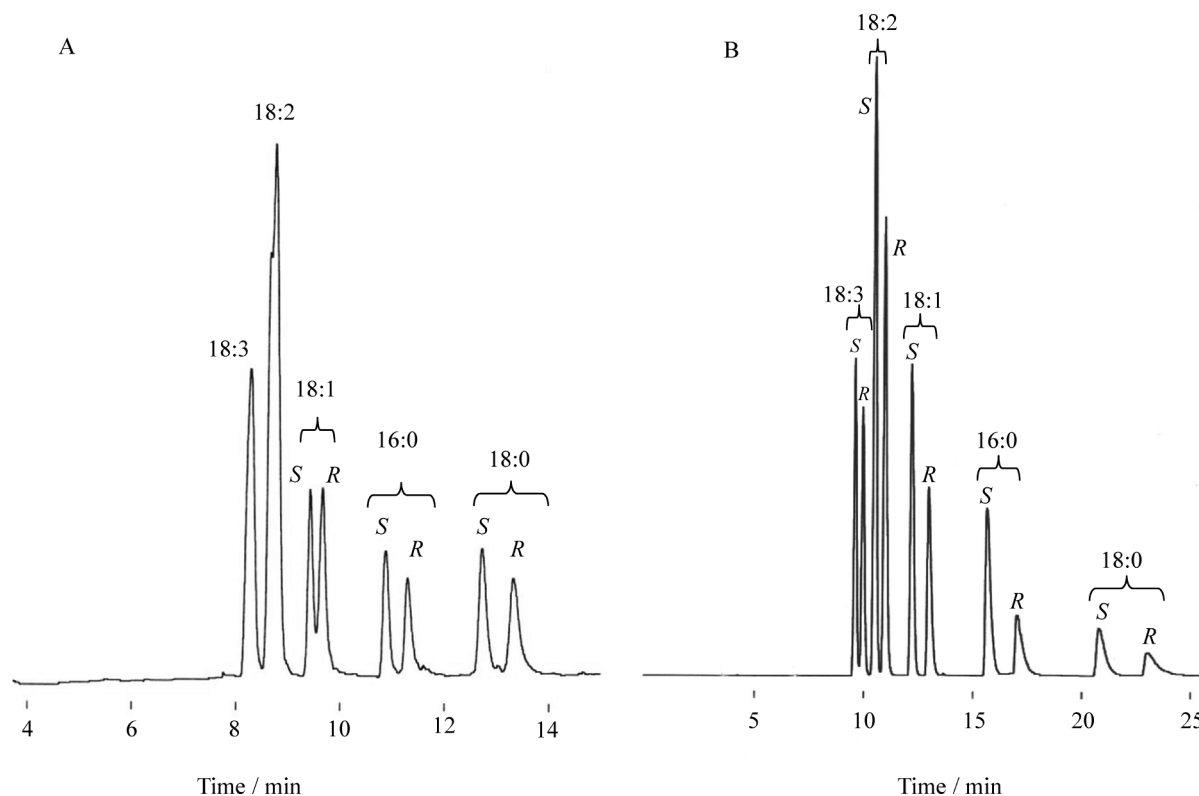


Fig. 1 Chiral-phase HPLC/ELSD profiles of racemic glycidyl fatty acid esters

18 : 3, glycidyl linolenate ; 18 : 2, glycidyl linoleate ; 18 : 1, glycidyl oleate ; 16 : 0, glycidyl palmitate ; 18 : 0, glycidyl stearate.

Column, CHIRALPAK IA (250 × 4.6 mm i.d.); Mobile phase, Acetonitrile/methanol. A, 90 : 10 (v/v); B, 98.5 : 1.5 (v/v). Column temperature : A, 25 °C ; B, 5 °C. Flow rate, 0.5 mL min⁻¹.

Table 1 Chromatographic parameters of enantiomeric glycidyl fatty acid esters (GE) obtained by chiral-phase HPLC/ELSD^{a)}

GE enantiomer		Column temperature							
		25 °C				5 °C			
		$V_R^{b)}$	$k'^{c)}$	$\alpha^{d)}$	$R_s^{e)}$	V_R	k'	α	R_s
16 : 0	S	0.31	0.62	1.10	1.70	0.69	1.39	1.16	2.98
	R	0.34	0.69			0.81	1.61		
18 : 0	S	0.45	0.90	1.10	1.82	1.09	2.18	1.17	3.27
	R	0.49	0.99			1.27	2.55		
18 : 1	S	0.20	0.41	1.09	1.09	0.42	0.85	1.15	2.78
	R	0.22	0.44			0.49	0.97		
18 : 2	S	—	—	—	—	0.29	0.59	1.12	1.85
	R	—	—			0.33	0.66		
18 : 3	S	—	—	—	—	0.23	0.45	1.12	1.60
	R	—	—			0.25	0.50		

a) Mobile phase : Acetonitrile/methanol (98.5 : 1.5, v/v); b) V_R = retention volume (mL) corrected by subtracting the column void volume (Chiralpak IA, 3.35 mL); c) k' = capacity ratio ; d) α = separation factor ; e) R_s = peak resolution. $R_s = 1.18 (R_{t2} - R_{t1}) / (w_2 + w_1)$, where w = peak half width (min).

25 °C で分析した場合, 16 : 0-GE, 18 : 0-GE 及び 18 : 1-GE の分離係数は, アセトニトリル/2-プロパノールではそれぞれ 1.38, 1.40, 0.78, アセトニトリル/エタノールでは 1.42, 1.58, 0.79, アセトニトリル/水では 1.37, 1.16, 1.05 で

あったのに対し, アセトニトリル/メタノールではいずれの GE についても 1.70, 1.82, 1.09 と高い値が得られた. Fig. 1 に, アセトニトリル/メタノール (98.5 : 1.5, v/v) を移動相に用いて, GE のラセミ体混合物 (16 : 0-GE,

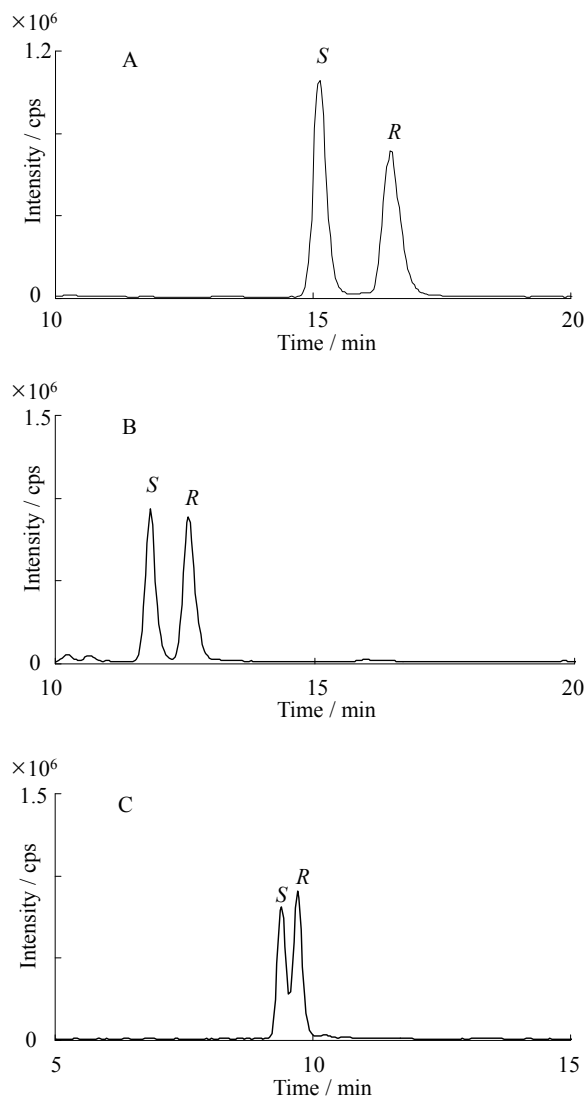


Fig. 2 Chiral-phase HPLC/APCI-MS profiles (selected ion monitoring of $[M+H]^+$) of racemic glycidyl fatty acid esters on CHIRALPAK IA

A, glycidyl palmitate (m/z 313); B, glycidyl oleate (m/z 339); C, glycidyl linolenate (m/z 335). Mobile phase and column temperature are the same as those in Fig. 1B. Other HPLC and MS conditions as given in text.

18 : 0-GE, 18 : 1-GE, 18 : 2-GE, 18 : 3-GE) を分析して得られたクロマトグラムを示す。25℃ のカラム温度で分析した結果、16 : 0-GE と 18 : 0-GE の光学異性体は完全に分離されたが、不飽和度の増加とともに GE の分離は低下し、18 : 3-GE の光学異性体分離は得られなかった (Fig. 1A)。各 GE の光学異性体を同時に分離するために 5℃ のカラム温度で分析した結果、すべての GE が明瞭に分離され、飽和及び不飽和 GE の光学異性体 10 成分の一斉分析が可能となった (Fig. 1B)。アシル基の鎖長と不飽和度は光学異性体の溶出順には影響を及ぼさず、いずれの GE も (S)-異性体が先に溶出した。Morante-Zarcero ら⁹⁾は CHIRALPAK

AD-H カラムを用いてグリシドールの光学異性体分離を検討した結果、ヘキサン/エタノール (80 : 20, v/v) の移動相で良好な分離が得られ (分離度, $R_s = 1.8$)、S 配置が R 配置よりも強く保持されることを報告している。GE の光学異性体を順相移動相 (ヘキサン / 2-プロパノール, 99 : 1, v/v) を用いて CHIRALPAK IA カラムで分析した場合、不飽和 GE (18 : 1-GE, 18 : 2-GE, 18 : 3-GE) の光学異性体は良好に分離され、逆相のときと溶出順は逆転して (R)-異性体が先に溶出した (クロマトグラムは省略)。多糖誘導体型固定相のキラル認識のメカニズムは十分解明されていないが¹⁰⁾、Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) による GE のキラル認識には、水素結合形成、 π - π 相互作用、双極子-双極子相互作用などに加え、移動相溶剤の極性が大きく関与しているものと推察される。

GE 光学異性体の保持容量 (V_R)、保持係数 (k')、分離係数 (α) 及び分離度 (R_s) を Table 1 に示す。GE は二重結合数が増すにつれて極性が増大し、溶出時間が短くなって分離度が低下した。同様に、極性のより大きい 16 : 0-GE は 18 : 0-GE より早く溶出し、分離度が低下した。このようなアシル基の分離に与える影響はグリセロ脂質のキラル HPLC において広く認められている¹¹⁾¹²⁾。一般に光学異性体は低温で良い分離が得られるが¹¹⁾、本研究においてもカラム温度を 25℃ から 5℃ に下げることで、不飽和 GE (18 : 1-GE, 18 : 2-GE, 18 : 3-GE) についてはいずれも 1.6 以上の分離度が得られ、分離は著しく改善した (Table 1)。このことから、低温での分析は実試料中の GE 光学異性体の分析に特に有効であると考えられた。

3.3 キラル HPLC-MS による GE 光学異性体の定量

移動相にアセトニトリル/メタノール (98.5 : 1.5, v/v) を用いて、カラム温度 5℃ で、各 GE 標準品をキラル HPLC/APCI-MS 分析した結果、すべての GE からプロトン化分子 $[M+H]^+$ がほぼ単一のピークとして検出された。このイオンを選択して得られた GE ラセミ体の SIM クロマトグラムを Fig. 2 に示す。いずれのラセミ体についても ELSD 検出の場合と同様に良好な分離が得られた。GE の MS において、 $[M+H]^+$ をモニターした場合、APCI-MS は ESI-MS の 10 倍高感度であることが報告されている⁴⁾。本研究でも ESI-MS を検討したが、適用した条件では $[M+H]^+$ は検出されず、 $[M+Na]^+$ が APCI-MS で得られた $[M+H]^+$ に匹敵する感度で検出された。したがって、ESI-MS でも GE の分析は十分可能であると考えられる。

Table 2 に検出限界、定量限界及び検量線について検討した結果を示す。各 GE の検量線の相関係数は 0.997 以上であり、良好な直線関係が得られた。検出限界 ($S/N = 3$) と定量限界 ($S/N = 10$) は、それぞれ 0.2, 0.67 $\mu\text{g mL}^{-1}$ であった。

Table 2 Limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), and calibration lines obtained for enantiomeric glycidyl fatty acid esters (GE)

GE	LOD ^{a)} /μg mL ⁻¹		LOQ ^{a)} /μg mL ⁻¹		Calibration line ^{b)}			
	Enantiomer		Enantiomer		<i>S</i> -enantiomer		<i>R</i> -enantiomer	
	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	Equation	<i>R</i> ²	Equation	<i>R</i> ²
16 : 0	0.2	0.2	0.66	0.66	$y = 1061175x - 736213$	0.9967	$y = 953826x - 250272$	0.9997
18 : 0	0.2	0.2	0.66	0.66	$y = 743751x - 549055$	0.9978	$y = 699722x - 151986$	0.9985
18 : 1	0.2	0.2	0.66	0.66	$y = 802928x - 275120$	0.9993	$y = 801020x - 312693$	0.9988
18 : 2	0.2	0.2	0.66	0.66	$y = 954918x - 519142$	0.9980	$y = 984471x - 672675$	0.9973
18 : 3	0.2	0.2	0.66	0.66	$y = 580746x - 234941$	0.9984	$y = 588035x - 173547$	0.9990

a) Defined as $S/N = 3$ for LOD and 10 for LOQ based on 5 μL injection of the standard GE solution at a concentration of 0.2 μg mL⁻¹. b) Calculated from the equation $y = Ax + B$, where x is the injected concentration (μg mL⁻¹), y is the peak area, A is the slope, and B is the intercept in the range between 0.5 and 50 μg mL⁻¹ (0.5, 1, 5, 10, 20 and 50 μg mL⁻¹).

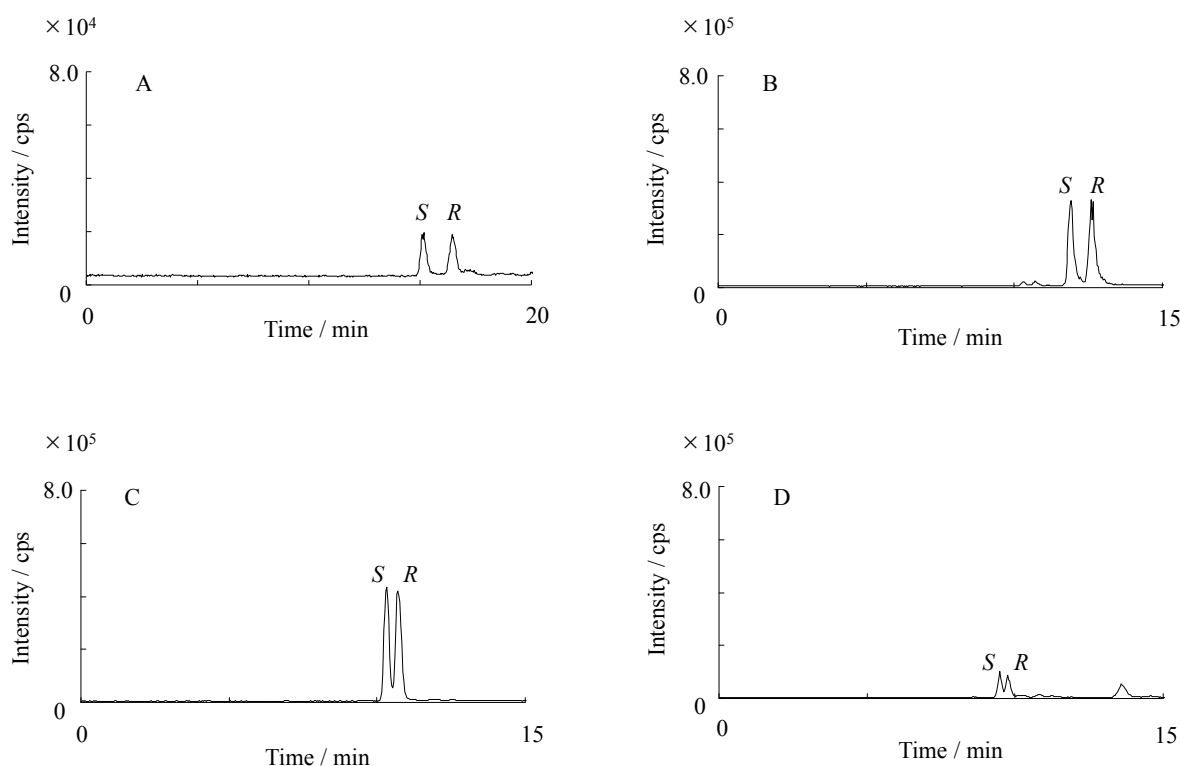


Fig. 3 Chiral-phase HPLC/APCI-MS profiles (selected ion monitoring of $[M+H]^+$) of the glycidyl fatty acid esters from a diacylglycerol-rich oil (DAG oil)

A, glycidyl palmitate (m/z 313); B, glycidyl oleate (m/z 339); C, glycidyl linoleate (m/z 337); D, glycidyl linolenate (m/z 335). Glycidyl stearate is not shown. Chiral-phase HPLC-MS conditions are the same as those in Fig. 2.

キラル HPLC/APCI-MS を用いて, DAG 油中の GE を分析して得られたクロマトグラムを Fig. 3 に示す. 濃縮や単離などの前処理を行わずに GE を検出するために, 600 μg の試料油をカラムに注入した. その結果, 試料に含まれる 5 種の主要な GE のそれぞれの光学異性体は, 25 分以内にほぼ完全に分離して溶出し (18 : 0-GE のクロマトグラムは省略), 試料注入量の分離に及ぼす悪影響はほとんど認められなかった. 得られた各 GE の光学異性体含量を Table 3 に示す. DAG 油の主成分である 1,3-DAG を構成する主な

脂肪酸は, 16 : 0 (総脂肪酸中 3.4 %), 18 : 0 (同 1.1 %), 18 : 1 (同 29.9 %), 18 : 2 (同 59.1 %), 18 : 3 (同 5.2 %) であることが報告されている¹³⁾. この脂肪酸組成を反映して GE も 18 : 2-GE が最も高く (総 GE 中 44.9 %), 次いで 18 : 1-GE (同 40.5 %), 18 : 3-GE (同 10.4 %), 16 : 0-GE (同 2.1 %), 18 : 0-GE (同 2.1 %) であった. いずれの GE についても, (*S*)-異性体と (*R*)-異性体はほぼ等量存在した. 試料油中の GE の総含量は 238 μg g⁻¹ であり, GE を固相抽出法で濃縮してから分析する方法で得られた値

Table 3 Levels of enantiomeric glycidyl fatty acid esters (GE) in a diacylglycerol-rich oil ($\mu\text{g g}^{-1}$)

GE	This study			Previous study ^{b)}
	<i>S</i> -enantiomer	<i>R</i> -enantiomer	<i>S</i> + <i>R</i> ^{a)}	
16 : 0	2.4	2.3	4.7	6
18 : 0	3.1	2.0	5.1	< 5
18 : 1	48.9	47.4	96.3	94
18 : 2	52.6	54.2	106.8	132
18 : 3	13.0	11.7	24.7	32
Total	120.0	117.6	237.6	269

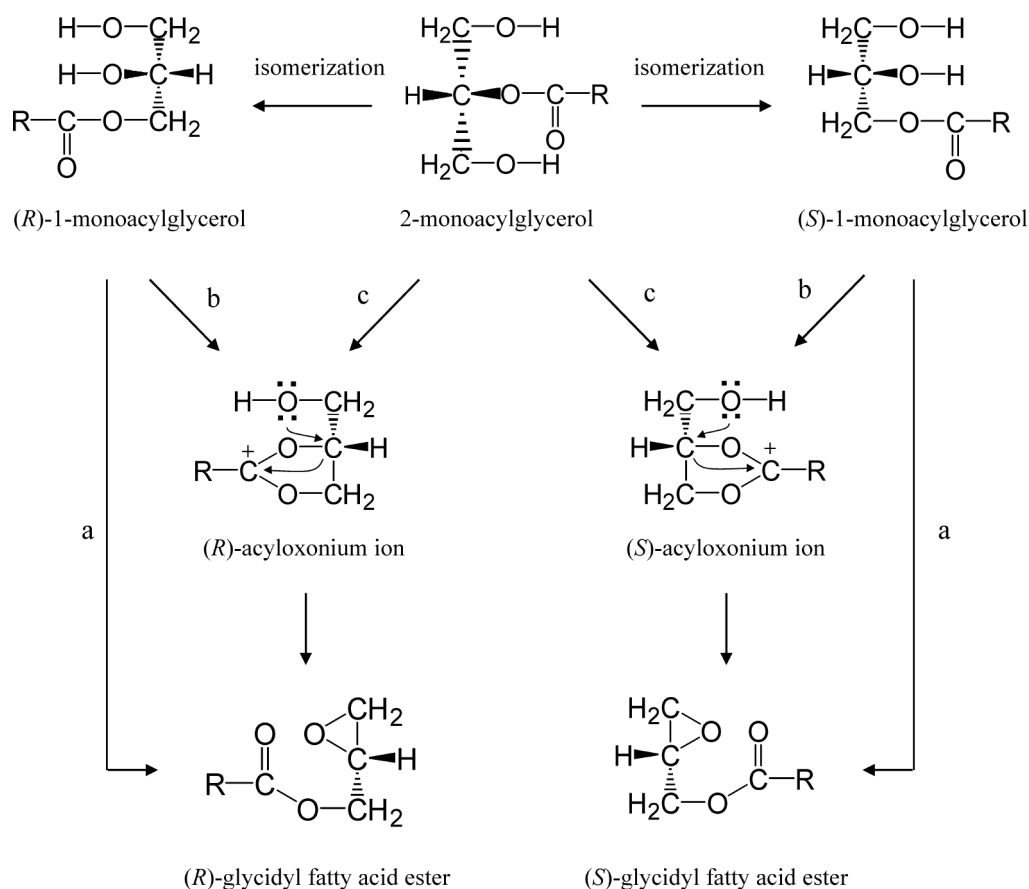
a) Sum of *S*- and *R*-enantiomers. b) Data from Masukawa *et al*⁴⁾.

Fig. 4 Possible mechanism of formation of enantiomeric glycidyl fatty acid esters from refined edible oils

($264 \mu\text{g g}^{-1}$)⁴⁾と比較して幾分小さかった。この違いは不飽和度が高く、かつ主要成分である 18 : 2-GE と 18 : 3-GE において明瞭であった (Table 3)。今後、同一試料を両方法で分析して結果を比較することが必要であると考えられる。

DAG 油は他の食用油に比べて GE を数十倍多く含む⁴⁾ことから本法での検出が容易であったが、本法を極微量 ($0.1 \sim 0.5 \mu\text{g g}^{-1}$) の GE を含むとされる精製大豆油や精製ナタネ油など¹⁴⁾一般の食用油に広く適用するにはあらかじめ GE を濃縮したり、より高感度の MS 装置を使用することが有効であると考えられる。

3・4 GE 光学異性体の生成機構の推定

GE は食用油の脱臭工程において、TAG と DAG 由来のモノアシルグリセロール (MAG) から脱水またはアシルオキシニウムイオンの形成を経て生成すると考えられているが²⁾³⁾、光学異性体は考慮されていない。Fig. 4 に、本研究において推定した GE 光学異性体の生成機構を示す。DAG 油の主な原料である大豆油とナタネ油の TAG の *sn*-1 位と *sn*-3 位に結合する脂肪酸の組成はおおむね等しいことから¹⁵⁾、DAG 油から生成する 1-MAG も (*S*)-1-MAG (*sn*-1-MAG) と (*R*)-1-MAG (*sn*-3-MAG) のほぼ等量混合物であると考えられる。TAG 及び DAG からは 2-MAG も生成する

が, これは熱力学的により安定な (S)-1-MAG と (R)-1-MAG に容易に異性化 (ラセミ化) する¹⁶⁾. MAG のヒドロキシル基の脱水により, (S)-1-MAG からは (S)-GE が, (R)-1-MAG からは (R)-GE が生成すると推定される (経路 a). したがって, (R)-異性体と (S)-異性体のほぼ等量混合物である MAG からは GE のほぼラセミ体が生成する. 一方, (S)-1-MAG からは (S)-アシルオキシニウムイオンを経て (S)-GE が, (R)-1-MAG からは (R)-アシルオキシニウムイオンを経て (R)-GE がそれぞれ生成すると推定される (経路 b). したがって, この場合も生成する GE はほぼラセミ体である. 2-MAG から生成するアシルオキシニウムイオンは (R)-異性体と (S)-異性体のほぼ等量混合物であると推定されることから (経路 c), 得られる GE もほぼラセミ体となる. これらのことから, DAG 油に含まれる GE は, R 配置と S 配置の異性体のほぼ等量混合物から構成されるものと考えられる.

4 結 言

本研究ではキラル逆相 HPLC を用いて, 炭素数と二重結合数の異なる GE の光学異性体分離に初めて成功した. この方法に APCI-MS を併用して DAG 油中に含まれる微量の GE 光学異性体をあらかじめ濃縮することなしに SIM モードで直接分析した結果, 5 種の GE (16:0-GE, 18:0-GE, 18:1-GE, 18:2-GE, 18:3-GE) の光学異性体がそれぞれ明瞭に分離され, 10 成分の一斉分析が可能となった. 各光学異性体含量は DAG 油の脂肪酸組成を反映して 18:2-GE が最も高く, 次いで 18:1-GE であった. いずれの GE も R 配置と S 配置の異性体のほぼ等量混合物であったが, このことは, GE の前駆体である 1-MAG がほぼラセミ体であることに起因すると考えられる.

謝 辞

本研究の一部は, 財団法人旗影会の助成により行われた.

文 献

- 1) Federal Institute for Risk Assessment (BfR) : "Initial evaluation of the assessment of levels of glycidol fatty acid esters detected in refined vegetable fats (in German)", <http://www.bfr.bund.de/cm/343/erste_einschaetzung_von_glycidol_fettsaeureestern.pdf>, BfR Opinion No. 007/2009, 10 March (2009).
- 2) C. G. Hamlet, L. Asuncion, J. Velíšek, M. Doležal, Z. Zelinková, C. Crews : *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **113**, 279 (2011).
- 3) R. Weißhaar, R. Perz : *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **112**, 158 (2010).
- 4) Y. Masukawa, H. Shiro, S. Nakamura, N. Kondo, N. Jin, N. Suzuki, N. Ooi, N. Kudo : *J. Oleo Sci.*, **59**, 81 (2010).
- 5) Y. Masukawa, H. Shiro, N. Kondo, N. Kudo : *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **88**, 15 (2011).
- 6) Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e. V. : "DFG Standard Methods C III 18 (09). Ester-bound 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD esters) and glycidol (glycidyl esters). Determination in fats and oils by GC-MS.", <www.dgfett.de/methods/>.
- 7) T. Yasukawa, Y. Katsuragi : "Diacylglycerol Oil (2nd Edition)", Edited by Y. Katsuragi, T. Yasukawa, N. Matsuo, B. D. Flickinger, I. Tokimitsu, M. G. Matlock, p. 1 (2008), (AOCS Press, Urbana).
- 8) Chiral Technologies Europe : "Instruction manual for Chiralpak® IA columns", <<http://www.chiral.fr>>.
- 9) S. Morante-Zarero, I. del Hierro, M. Fajardo, I. Sierra : *Anal. Chim. Acta*, **566**, 185 (2006).
- 10) T. E. Beesley, R. P. W. Scott (Eds.) : "Chiral Chromatography", p. 239, (1998), (John Wiley & Sons, New York).
- 11) Y. Itabashi : "HPLC of Acyl Lipids", Edited by J.-T. Lin, T. A. McKeon, p. 167 (2005), (HNB Publishing, New York).
- 12) Y. Itabashi : *Chromatography*, **32**, 59 (2011).
- 13) 鷹野浩之, 板橋 豊 : 分析化学 (Bunseki Kagaku), **51**, 437 (2002).
- 14) R. Weißhaar : *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **113**, 304 (2011).
- 15) W. C. Breckenridge : "Handbook of Lipid Research I. Fatty Acids and Glycerides", Edited by A. Kuksis, p. 197, (1978), (Plenum Press, New York).
- 16) F. H. Mattson, R. A. Volpenhein : *J. Lipid Res.*, **3**, 281 (1962).

Analysis of Enantiomeric Glycidyl Fatty Acid Esters by Chiral-phase HPLC/MS with Atmospheric Pressure Chemical Ionization

Satoshi YOSHIOKA¹, Kazuhiko NISHIMURA², Takeji TAKAMURA³, Masumi SUZUI⁴,
Hiroyuki TSUDA⁴ and Yutaka ITABASHI^{®5}

[®] E-mail : yutaka@fish.hokudai.ac.jp

¹ Division of Marine Life Science, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1, Minato-cho, Hakodate-shi, Hokkaido 041-8611

² Hokkaido Institute of Public Health, Kita 19-Nishi 12, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060-0819

³ Kanagawa Institute of Technology, 1030, Shimoogino, Atsugi-shi, Kanagawa 243-0292

⁴ Graduate School of Medical Sciences and Medical School, Nagoya City University, 1, Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya-shi, Aichi 467-8601

⁵ Division of Marine Life Science, Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1, Minato-cho, Hakodate-shi, Hokkaido 041-8611

(Received April 13, 2012 ; Accepted May 21, 2012)

A simple and selective method was developed for the determination of enantiomeric glycidyl fatty acid esters (GE) in refined edible oils, which are undesirable trace contaminants formed during refining processes. For this purpose, chiral-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) was performed with a column containing amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) as a chiral selector, using an acetonitrile/methanol mixture as the mobile phase, which gave clear enantiomer resolution of synthetic saturated and unsaturated GE racemates. This was followed by on-line atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (APCI/MS) to obtain prominent protonated $[M+H]^+$ molecules, by which individual GE molecules could be identified and quantified. The quantification of GE enantiomers was performed in the selected ion monitoring (SIM) of $[M+H]^+$. This chiral-phase HPLC/APCI-MS-SIM method was standardized with synthetic GE racemates, and applied to the separation, identification and quantification of individual GE enantiomers in a commercial diacylglycerol (DAG)-rich oil produced originally from soybean oil and rapeseed oil. The results clearly showed that the DAG-rich oil contained almost equal amounts of *R*- and *S*-enantiomers of glycidyl palmitate (16 : 0-GE), stearate (18 : 0-GE), oleate (18 : 1-GE), linoleate (18 : 2-GE), and linolenate (18 : 3-GE), suggesting that both enantiomers would be formed from the corresponding almost racemic 1-monoacylglycerols. The most predominant GE was 18 : 2-GE, followed by 18 : 1-GE, which accounted for 107 and 25 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively, reflecting the fatty acid composition of the DAG oil.

Keywords : glycidyl fatty acid ester ; enantiomer ; diacylglycerol-rich oil ; chiral-phase HPLC ; atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry.