博士（水産科学）　西　村　一　彦

学位論文題名

脂肪酸蛍光誘導体の高速液体クロマトグラフィー／質量分析法に関する研究

学位論文内容の要旨

脂質はタンパク質，炭水化物とともに日常の食生活においてなくてはならない栄養素であり，また，細胞膜をはじめとする生体の重要な構成成分でもある．脂質を構成する脂肪酸には炭素数と二重結合数の異なる多数の同族体が存在し，それぞれ生体内での作用の異なることが知られている．生体内で合成されないリノール酸やα-リノレン酸などの必須脂肪酸については，その測定法，食品中での含量，生体内での働き，立体配置等に関して従来から数多くの研究が行われている．近年は抗ガン作用や痩身効果を有する共役リノール酸などが新たに関心を集めており，天然物中での分布や新たな生理機能及び分析法について活発に研究が行われている．また，脂肪酸（遊離脂肪酸）は水産物，食用油，乳製品等の品質評価因子の一つであり，近年，バターからの異臭により製品が回収された事例もあることから，風味や品質にも影響を与える製品中の脂肪酸を正確に定量し，その組成の詳細を明らかにすることは食品衛生上からも必要であると考えられる．このように，脂肪酸の精密分析は脂質研究において必要不可欠であり，古くから重要な研究課題になっている．

脂肪酸の分析には通常ガスクロマトグラフィー(GLC)が用いられるが，最近では操作の簡単さから高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析する方法，特に脂肪酸を誘導体化して高感度で分析する方法がよく使用されている．これまで種々の誘導体試薬が使われているが，その中でも，9-アンスリルジアゾメタン（ADAM）を用いて脂肪酸を9-アンスリルメチルエステル誘導体（通称ADAM誘導体，Fig. 1）に変換し，これを逆

相 HPLC で分析する方法は操作が簡単で高感度であることから生物試料の分析にしばしば用いられている．しかし，HPLC カラムはキャピラリーGLC カラムに比べて一般に分解能が低いため，植物油のように比較的単純な脂肪酸組成を示す試料の分析では良好な分離が得られるものの，魚油のように構成脂肪酸が複雑な場合は 16:1 と 14:0 など ECN 値（equivalent carbon number: アシル基の総炭素数 － 2 x 二重結合数）の等しい成分同士が重なり，同定が困難となる．また，標準品の入手が難しいために，これを使用して同定することが困難な脂肪酸もしばしば観察される．さらに，過去に報告された飽和及び不飽和脂肪酸 ADAM 誘導体の逆相 HPLC での溶出順番を比較すると，同じカラムと同系移動相を用いて分析した場合でも，異なる溶出順を示す例がみられる．脂肪酸の精密な組成分析を行うにあたっては，逆相 HPLC での個々の脂肪酸の分離挙動を明らかにするとともに，各成分を同定するために分子量情報の得られる HPLC/質量分析（MS）の使用が有効であると考えられるが，これらについてはほとんど検討されていない．

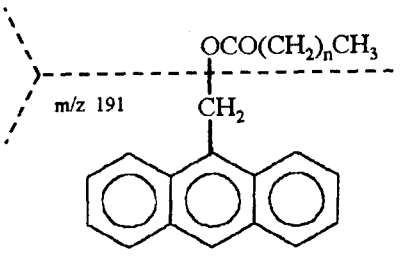

Fig. 1 Structure of fatty acid 9-anthrylmethyl esters

本研究では，脂肪酸 ADAM 誘導体の逆相 HPLC による精密分析法の確立を目的とし，以下の項目について検討した．(1)エイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）など高度不飽和脂肪酸を含む種々の脂肪酸 ADAM 誘導体の逆相 HPLC での分離挙動，(2) HPLC/MS による魚油脂肪酸の精密分析，(3)食品中に少量存在する生理活性脂肪酸（共役リノール酸）の分析，(4)食品の品質評価因子の一つである遊離脂肪酸の組成分析．

(1) 逆相 HPLC を用いて飽和及び不飽和脂肪酸 ADAM 誘導体の分離挙動を詳細に検討した結果，移動相をメタノールからアセトニトリルへ変化させたとき，保持時間は直線ではなく，U 字型の曲線を描くことを見出した．この時，不飽和度が低い脂肪酸ほど保持時間の増加が大きく，ECN 値が類似して不飽和度に差のある 14:1 と 20:5 のよう

な脂肪酸間で溶出順が逆転した.このような現象はADAM誘導体以外の誘導体や遊離脂肪酸でも認められたことから，誘導体部分よりも脂肪酸部分が溶出挙動を決定していることが明らかになった．したがって，逆相HPLC分析では，脂肪酸ばかりでなく，トリグリセリドやリン脂質でも同様の逆転現象が起こるものと推測された．移動相の水含量を増加させた場合，鎖長の長い脂肪酸ADAM誘導体の保持時間増加量が大きく，その結果，有機溶媒100%の移動相で接近して溶出し，鎖長に差のある脂肪酸間で溶出順が逆転した.このことから魚油などの複雑な脂肪酸混合物を正確に分析するためには，移動相の水含量の調整が極めて重要であることが明らかになった.

(2) 脂肪酸ADAM誘導体をエレクトロスプレーイオン化法(ESI/MS)で分析すると，正イオンモードで$[M+Na]^+$のベースピークと誘導体のエステル部分で開裂した$[M-RCOO]^+$（m/z 191 相対強度 15%）の両イオンが検出された．これらのイオンを用いる選択イオン検出では，0.1ngの誘導体混合物をHPLCカラムに注入した場合でもS/N比5以上で個々の成分を検出することが可能であった．一方，大気圧化学イオン化法(APCI/MS)では，正イオンモードで$[M-RCOO]^+$ (m/z 191)が，負イオンモードでは$[RCOO]^-$がそれぞれベースピークとして検出された．これらの結果からESIとAPCIを用いるHPLC/MS法は，脂肪酸 ADAM 誘導体の同定に極めて有効であることが明らかとなった．HPLC/ESI-MS 法をミンククジラのベーコンから調製した脂肪酸混合物の組成分析に適用した結果，得られた各脂肪酸のピーク面積%は蛍光検出HPLCで測定した結果と良く一致したことから，HPLC/ESI-MS 法は成分の同定だけでなく，組成分析法としても有用であることが明らかとなった.

(3) これらの結果をもとに食用油脂中に少量含まれ，生理活性を有する共役リノール酸(CLA)の分析法を検討した．CLAは異性化することなくADAM試薬と反応し，誘導体に変換されることを明らかにした.水/メタノールのグラジェント溶離法を適用することにより,乳及び乳製品に含まれている主用な脂肪酸16成分からCLAを明りょうに分離することに成功した．その結果，CLAは牛乳中に総脂肪酸中0.9% (2.2mg/g fat),

バターに 1.4% (4.0mg/g fat), チーズ中に 2.5% (5.7mg/g fat) 存在することを一度の分析で明らかにすることが可能になった. この技術は, 魚油に含まれる CLA の分析にも有効であることが認められた.

(4) 食品衛生の観点から, 水産物, 食用油, 乳製品等の品質評価因子の一つである遊離脂肪酸を簡単に抽出し, 個々の遊離脂肪酸成分を個別に定量する高感度分析を検討した. 少量のサンプルから固相抽出カートリッジを用い遊離脂肪酸を簡便に抽出する方法を確立した. 水/メタノールのグラジェント溶離法で炭素数 4～20, 二重結合数 0～3 までの 16 種の脂肪酸を互いに明りょうに分離定量できる HPLC 法を確立した. 本分析法で得られたを遊離脂肪酸量から算出した酸価は従来の滴定法で求めた値と良く一致してことから, 本法は簡便で, 従来法よりも詳細な分析が可能であり, 水産物を含む食品一般に広く適用できると考えられる.

以上, 本研究では HPLC と MS を用いて脂肪酸 ADAM 誘導体の分析法を確立し, 水産物の脂肪酸組成の精密分析, 食品に含まれる CLA や遊離脂肪酸の高感度分別定量を可能にした. 本法は, 種々の生体試料中の脂肪酸の組成分析に適用できるものであり, 今後水産を含む多くの分野での利用が期待される.

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　板　橋　　豊
副　査　　教　授　　宮　下　和　夫
副　査　　助教授　　安　藤　靖　浩
副　査　　鈴　木　敏　之
（東北区水産研究所主任研究員）

学位論文題名

脂肪酸蛍光誘導体の高速液体クロマトグラフィー／質量分析法に関する研究

脂肪酸は脂質を構成する基本成分であり，その精確な分析は生物の脂質を研究するあらゆる分野で必要とされる．通常，脂肪酸の組成分析にはガスクロマトグラフィー(GLC)が用いられるが，最近では操作性に優れた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)も広く使われている．一般に，脂肪酸は誘導体に変換した後分析されるが，種々の誘導体の中で，カルボキシル基を 9-アンスリルメチルエステル（通称 ADAM 誘導体）に変換し，これを蛍光検出逆相 HPLC で分析する方法が，誘導体の調製が容易で高感度であることから，生物試料の分析によく用いられている．しかしながら，魚油のように構成脂肪酸の数が多く組成が複雑な場合，HPLC 法では分離の困難な成分や同定できない成分がしばしば観察されたり，個々の成分の溶出順が分析者によって異なっていたり，分析法としての不完全さが認められる．本研究では，蛍光検出逆相HPLC法にHPLC/MS（質量分析法）を併用して脂肪酸ADAM誘導体の精密分析法を確立し，その水産物や食品への応用を検討したものである．得られた成果は以下のように要約される．

(1) ADAM 誘導体の逆相 HPLC での分離挙動を詳細に検討した結果，移動相をメタノールからアセトニトリルへ変化させたとき，及び少量の水を含む移動相を用いたとき，保持時間の推移は従来明らかにされている直線型ではなくU字型の曲線を描き，不飽和度の小さい脂肪酸や長鎖脂肪酸ほどその傾きの大きいことを見出した．このことから，幾つかの脂肪酸間で溶出順の逆転することが明らかになった．溶出順の逆転現象は ADAM 誘導体以外の誘導体や遊離脂肪酸でも認められたことから，ADAM 誘導体の溶出挙動を決定するのは ADAM 部分ではなく，脂肪酸部分であることが結論された．これらの結果から，魚油など複雑な組成を示す脂肪酸を HPLC で精確に分析するためには，たとえ少量の水であっても，移動相組成を正しく調整することが極めて重要であることが明らかになった．
(2) ADAM 誘導体の MS を詳細に検討した結果，エレクトロスプレーイオン化法（ESI）

で，$[M+Na]^+$ とエステル部分が開裂した$[M-RCOO]^+$の両イオンを検出することに成功した．選択イオン検出では，0.1ng の誘導体混合物を HPLC カラムに注入した場合でも S/N 比 5 以上で個々の成分を検出することが可能であった．一方，大気圧化学イオン化法(APCI/MS)では，$[M-RCOO]^+$ と $[RCOO]^-$ のイオンの検出されることを見出した．これらの結果から，ESI と APCI を用いる HPLC/MS 法は，脂肪酸 ADAM 誘導体の同定に極めて有効であることが明らかとなった．

(3) 上述した ADAM 誘導体の逆相 HPLC 法と HPLC/MS 法をミンククジラのベーコンから調製した脂肪酸混合物の組成分析に適用した．その結果，移動相組成などの分析条件を最適化することにより，ドコサヘキサエン酸やドコサペンタエン酸などの高度不飽和酸を含む種々の脂肪酸が，蛍光検出 HPLC でも HPLC/MS でも比較的短時間で明瞭に分離できることが明らかになった．また， HPLC/MS 法で得られた各脂肪酸のピーク面積%は，蛍光検出 HPLC で得られた値と互いに良く一致したことから，HPLC/MS 法は水産油脂脂肪酸の同定だけでなく，組成分析法としても有用であることが認められた．

(4) 本研究で確立した方法は，水産脂質ばかりでなく，抗腫瘍活性や抗肥満効果など種々の生理活性を有する共役脂肪酸（CLA）の分析や乳，乳製品及び油脂食品に存在する遊離脂肪酸の定性・定量分析にも適用できることを示した．前者は，少量の試料（1g）から抽出した脂質をケン化して脂肪酸を調製し，これを ADAM 誘導体に変換して分析するもので，食品中に微量存在する CLA の簡易スクリーニング法として有用であることが明らかにされた．後者の方法は，少量の試料から遊離脂肪酸を固相抽出した後，ADAM 誘導体に変換して HPLC 分析するものである．遊離脂肪酸は食品の品質評価因子の一つとなっていることから，簡便な分析法の開発は食品関連分野において有益である，本研究において確立した方法は高感度で操作が簡単であることから，食品中の遊離脂肪酸の定性・定量分析に広く適用できると考えられる．

以上の成果は，高度不飽和脂肪酸を含む種々の脂肪酸の ADAM 誘導体の逆相 HPLC での分離挙動を明らかにしたものであり，また HPLC/MS 法を併用して水産物の脂肪酸組成分析法と食品に含まれる共役脂肪酸や遊離脂肪酸の高感度分別定量法を確立したものであり，審査員一同は本研究が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。