

天然油脂トリアシルグリセロール異性体分析法の開発応用研究

著者	永井 利治
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301乙第9212号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58310

天然油脂トリアシルグリセロール
異性体分析法の開発応用研究

永井利治

目次

第一章 緒言 (p.1)

第二章 ポリメリック型 ODS カラムを用いた逆相 HPLC による食用油脂中のトリアシルグリセロールの位置異性体分析法の開発 (p.8)

第一節 緒言

第二節 材料および方法

第三節 結果と考察

第三章 C28 カラムを用いた逆相 HPLC による食用油脂中のトリアシルグリセロールの位置異性体分析法の開発 (p.19)

第一節 緒言

第二節 材料および方法

第三節 結果と考察

第四章 キラル HPLC による食用油脂中のトリアシルグリセロールの鏡像異性体分析法の開発 (p.28)

第一節 緒言

第二節 材料および方法

第三節 結果と考察

第五章 魚油および海獣油中のトリアシルグリセロールの位置・鏡像異性体分析 (p.44)

第一節 緒言

第二節 材料および方法

第三節 結果と考察

第六章 乳脂中のトリアシルグリセロールの位置異性体分析 (p.59)

第一節 緒言

第二節 材料および方法

第三節 結果と考察

総括 (p.71)

引用文献 (p.73)

謝辞 (p.82)

略語一覧

略語	日本語	英語
APCI	大気圧化学イオン化	Atmospheric pressure chemical ionization
DAG	ジアシルグリセロール	Diacylglycerol
FFA	遊離脂肪酸	Free fatty acid
GC	ガスクロマトグラフィー	Gas chromatography
HPLC	高速液体クロマトグラフィー	High performance liquid chromatography
HUFA	高度不飽和脂肪酸	Highly unsaturated fatty acid
LDL	低密度リポタンパク質	Low density lipoprotein
MAG	モノアシルグリセロール	Monoacylglycerol
MCFA	中鎖脂肪酸	Medium chain fatty acid
MS	質量分析	Mass spectrometry
MS/MS	エムエスエムエス (または、タンデム質量分析)	Mass spectrometry / Mass spectrometry (or Tandem mass spectrometry)
ODS	オクタデシルシリル	Octadecylsilyl
Rs	分離度	Resolution
SIM	選択イオンモニタリング	Selected ion monitoring
SRM	選択反応モニタリング	Selected reaction monitoring
TAG	トリアシルグリセロール	Triacylglycerol
TF	テーリングファクター	Tailing factor
TLC	薄層クロマトグラフィー	Thin layer chromatography
UV	紫外吸光度検出器	Ultraviolet absorption detector
UV-VIS	紫外可視吸光度検出器	Ultraviolet-visible absorption detector

略語	日本語	英語	炭素数：不飽和度
C ₈	カプリル酸	Caprylic acid	C8:0
C ₁₀	カプリン酸	Capric acid	C10:0
C ₁₂ (La)	ラウリン酸	Lauric acid	C12:0
C ₁₄	ミリスチン酸	Myristic acid	C14:0
C ₁₆ (P)	パルミチン酸	Palmitic acid	C16:0
C ₁₈ (St)	ステアリン酸	Stearic acid	C18:0
O	オレイン酸	Oleic acid	<i>cis</i> -9-C18:1
El	エライジン酸	Elaidic acid	<i>trans</i> -9-C18:1
L	リノール酸	Linoleic acid	<i>cis,cis</i> -9,12-C18:2
E (EPA, E)	エイコサペンタエン酸	Eicosapentaen acid	<i>cis,cis,cis,cis,cis</i> -5,8,11,14,17-C20:5
D (DHA, D)	ドコサヘキサエン酸	Docosahexaenoic acid	<i>cis,cis,cis,cis,cis,cis</i> -4,7,10,13,16,19-C22:6
S (SFA)	飽和脂肪酸	Saturated fatty acid	
U (UFA)	不飽和脂肪酸	Unsaturated fatty acid	

第一章 緒言

脂質は、炭水化物、タンパク質と並ぶ三大栄養素の一つであり、生物にとって非常に重要な栄養素、すなわちエネルギー源である。トリアシルグリセロール (TAG) は天然界に最も多く存在する脂質の存在形態であり、食用油脂の主成分として知られている。TAG はグリセリンに 3 分子の脂肪酸がエステル結合した構造を持ち、TAG の構造を Fischer 投影式で図 1.1 のように示した場合、脂肪酸の結合位置を上から順に *sn*-1、*sn*-2、*sn*-3 位と称して区別している²⁾。‘*sn*’は stereospecific numbering の意味である。また、*sn*-1,3 位を α 位、*sn*-2 位を β 位とも称する。図 1.1 に示した例は 1,2-dipalmitoyl-3-oleoyl-*sn*-glycerol であり、2 分子のパルミチン酸 (P) と 1 分子のオレイン酸 (O) が *sn*-1、*sn*-2、*sn*-3 位に表記順に結合した TAG を示している。これは、*sn*-PPO のように 3 つの脂肪酸の略号を用いて略記することができる。*sn*-1,3 位に異なる脂肪酸が結合している場合、*sn*-2 位の炭素原子は不斉中心となり、*sn*-PPO に対して結合順が逆の *sn*-OPP は鏡像異性体となる。これらの鏡像異性体を区別しない場合は β -PPO と表記することができ、これは β (*sn*-2) 位の脂肪酸のみが固定され、*sn*-PPO/*sn*-OPP 比は任意であることを示す。 β (*sn*-2) 位の脂肪酸がオレイン酸 (O) である β -POP (= *sn*-POP) は β -PPO とは位置異性体の関係にある。‘ β ’を用いた表記は位置異性体を議論する場合に便利である。このような構造の TAG 中の脂肪酸の結合位置はランダムではなく、TAG の生合成経路に存在する酵素により厳密に制御されているため、TAG の組成はそれぞれの生物および組織に固有のものとなる。

このような脂質の特徴を調べるために一般的に広く用いられているのは脂肪酸組成分析である³⁾。これには主にガスクロマトグラフィー/水素炎イオン化検出 (GC/FID) が用いられ、全脂質、あるいは、目的の脂質クラスから調製した脂肪酸メチルエステルを、極性カラムを用いて分離・検出する。油脂を構成する脂肪酸の種類、その存在比から、油脂の種類、物性などを推測でき、非常に便利な方法である。しかしながら、前述のごとく油脂の

主成分は TAG であり、脂肪酸の種類のみならずその組合せ、さらには、結合位置が油脂の物理的、栄養学的な性質に影響を及ぼしているため、脂肪酸組成のみで油脂を特徴づけることには限界がある。油脂の構造的な特徴をより詳しく知るために、立体特異的分析 (Stereospecific analysis) と呼ばれるグリセロール骨格上の結合位置ごとに脂肪酸組成を求める手法が開発され、様々な油脂の分析に用いられてきている。1965 年、Brockhoff は、*sn*-1、*sn*-2、*sn*-3 位を識別し、それぞれの結合位置ごとの脂肪酸組成を求める立体特異的分析を開発した⁴⁾。この方法では、リパーゼあるいはグリニャール反応により TAG を部分的に加水分解し 1,2 (or 2,3)-ジアシルグリセロール (DAG) を得た後に、1,2 (or 2,3)-ホスファチド誘導体とし、(ホスホリパーゼ A₂) PLA₂ により 1,2-ジアシルホスファチドの *sn*-2 位の脂肪酸を加水分解することにより、1-アシルリゾホスファチドから *sn*-1 位の、PLA₂ により得られた遊離脂肪酸から *sn*-2 位の脂肪酸組成を求めることができる。*sn*-3 位の脂肪酸組成は油脂 (すなわち TAG) 全体の脂肪酸組成から *sn*-1,2 位の脂肪酸組成を減じることによって求めることができる。また、1986 年に板橋らは、油脂の部分加水分解により得られた 1 (or 3)-モノアシルグリセロール (MAG) に 3,5-ジニトロフェニルイソシアネートを結合させてそれぞれをビス-3,5-ジニトロフェニルウレタン(DNPU)誘導体として、キラル高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離する方法を考案し、立体特異的分析に応用した⁵⁾。脂肪酸の種類が異なっても、1-MAG と 3-MAG の DNPU 誘導体はそれぞれがまとまった時間に溶出する。これらの画分をメチルエステル化後に GC/FID で分析することにより立体特異的分析が可能である。後に 1,2 (or 2,3)-DAG の DNPU 誘導体も同様にキラル HPLC で分離できることが報告され、こちらも油脂の立体特異的分析に応用されている⁶⁾。これらの方法により、植物油、動物脂、乳脂、魚油等のグリセロール骨格上の *sn*-1,2,3 位ごとの脂肪酸組成が明らかにされた⁷⁻¹²⁾。例えば、一般に植物油は *sn*-1,3 位に飽和脂肪酸が多く、*sn*-2 位に不飽和脂肪酸が含まれている傾向がある。また、魚類は高度不飽和脂肪酸 (Highly unsaturated fatty acid, HUFA) が *sn*-2 位に、アザラシなどの海獣類は *sn*-1,3

位に偏在することなどが報告されている。このような立体特異的分析は、油脂全体の脂肪酸の結合位置を知ることができる優れた方法であるが、非破壊で TAG 分子種を測定することはできない。

TAG の組成、すなわち、3 つの脂肪酸の“組合せ”である TAG 分子種の分析には GC、HPLC がともに用いられてきた。GC で TAG を分析するためには、高温で気化させる必要があり、試料注入口、カラムは 350°C 程度に設定される場合が多い。このため、TAG 分析に用いる分析用カラムは高温に耐える必要があり、また、TAG 自身も分析中に分解されてはならない。こうした制約はあるものの、GC/FID 法は定量性に優れた方法であり、以下の分離モードで使用されている¹³⁾。一般に無極性カラムを使用すると、TAG は総アシル炭素数の順に溶出する。また、極性カラムを使用すると総アシル炭素数の順に溶出し、さらに同じ炭素数であっても二重結合数の多い分子種の方が強く保持される。GC による TAG 分析では主に炭素数の違いによる分子種の分布を知ることが可能であるが、前述の TAG 中の脂肪酸の結合位置の異なる位置異性体や鏡像異性体 (図 1.1) は分離されない。

HPLC についても TAG 分子種分析のために種々の分離モードが開発されてきた。広く用いられる分離モードは (非水系) 逆相 HPLC、銀イオン HPLC である。検出器には、UV 検出器、示差屈折率検出器、質量分析計 (MS)、蒸発光散乱検出器 (ELSD)、荷電粒子検出器 (Corona CAD) などが用いられるが、それぞれ感度や選択性が異なるため分析の目的によって使い分ける必要がある。TAG の逆相 HPLC には Octadecylsilyl (ODS) カラムが用いられ、移動相にはアセトン、2-プロパノール、アセトニトリル、メタノール、エタノール、ジクロロメタン、クロロホルム、テトラヒドロフラン、ヘキサンなどから数種類の溶媒を組み合わせ用いる場合が多い¹⁴⁾。一般的な手法は固定相として ODS カラムを用い、アセトニトリルとアセトンを移動相としたイソクラテックモード、あるいはグラジエントモードでの溶出である。この場合、TAG 分子種の溶出順は総アシル炭素数と二重結合の数に従い、Partition number (PN = TAG 中の総アシル炭素数 - 二重結合数 × 2) という数値が小さい順

に溶出する(ECN : Equivalent carbon number と呼ばれる場合もある)¹⁵⁾。例えば、トリラウリン(LaLaLa, PN=36)はトリパルミチン(PPP, PN=48)より先に溶出する(ラウリン酸 : La, パルミチン酸 : P)。また、不飽和脂肪酸をもつトリオレイン(OOO)、ジオレオイルパルミトイルグリセロール(OOP)(※TAG 分子種では TAG での脂肪酸の組合せだけを考慮し、結合位置は考慮に入れない)、ジパルミトイルオレオイルグリセロール(PPO)はいずれも PN=48 で PPP と同じであるが、この場合、二重結合数の多いものから先に溶出する(O : オレイン酸)。逆相 HPLC には ODS カラムの他に C22、C30 といった長鎖アルキル基を固定相としたカラムも用いられ、一般に ODS よりも保持が強くなる傾向があるため、多くの TAG 分子種を分離しなくてはならない場合は有利である¹⁶⁻¹⁸⁾。一般的な逆相 HPLC 条件では、TAG 分子種は PN に依存して分離するが、脂肪酸結合位置の異なる TAG 位置異性体(2種類以上の脂肪酸から成る TAG で 8 位の脂肪酸を固定して区別される異性体)、TAG 鏡像異性体(2種類以上の脂肪酸から成り *sn*-1,2,3 位の結合順を区別した異性体)は分離されない。TAG 分子種としての 3 つの脂肪酸の組合せとその結合位置を同時に分析するということは TAG 異性体分析に他ならない。近年、TAG 分子種の同定にはマススペクトルが用いられ、TAG のプロトン付加分子 ($[M+H]^+$)、アンモニウムイオン付加分子 ($[M+NH_4]^+$) など、さらにここからアシル基が 1 つ脱離した $[M-RCOO]^+$ イオン (DAG イオン) の質量電荷比 (m/z) の値から TAG の脂肪酸組成が推定できるようになった¹⁹⁻²³⁾。また、イオン源でアシル基が脱離する際に *sn*-1,3 位のアシル基が脱離しやすい (1,3-DAG イオンが生じにくい) という特徴があるため、TAG 位置異性体の間で異なる DAG イオン比が得られる²¹⁾。クロマトグラム上で TAG 位置異性体が重なっていても、そのピークの DAG イオン比からもとの TAG 位置異性体比を求めることも可能であり、植物油、動物油の分析にも応用されている²²⁻²⁴⁾。

逆相 HPLC 以外の手法で TAG 位置異性体を分離するためには銀イオン HPLC が用いられる²⁵⁾。これは固定相の銀イオンが TAG 上の不飽和脂肪酸の二重結合の数や位置を認識で

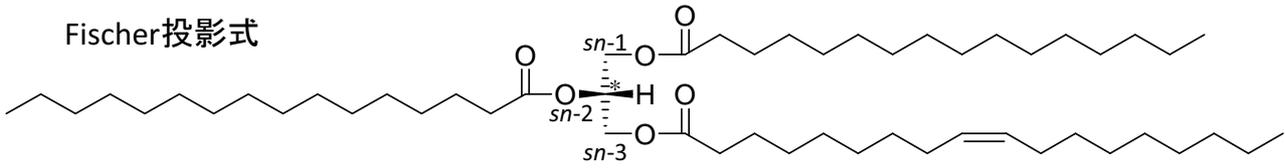
きることに基づいている。溶出順は、SSS<SSM<SMM<SSD<MMM<SMD<MMD<SDD
~SST<SMT~MDD<MMT<SDT~DDD<MDT~STT<DDT<MTT<DTT<TTT (S : 飽和脂肪
酸, M : モノ不飽和脂肪酸, D : ジ不飽和脂肪酸, T : トリ不飽和脂肪酸) となり、位置異
性体の場合は *sn*-1,3 位の二重結合が多いものがより保持される。このため
β-StOSt<β-StStO、β-StOO<β-OStO のような溶出順となる (St : ステアリン酸、O : オレ
イン酸)。

一般的な ODS カラムを用いた逆相 HPLC では TAG 位置異性体を分離することはできな
いが、逆相モードであってもカラムの種類や分離条件を変更することによって TAG 位置異
性体を分離できる例も報告されている。Momchilova らは、残存シラノール基の量の異なる
数種の ODS カラムを用いて、飽和脂肪酸 (S) であるパルミチン酸 2 つと、不飽和脂肪酸
(U) (リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエ
ン酸) からなる TAG 位置異性体 (β-SUS 型/β-SSU 型) の分離条件を検討し、残存シラ
ノール基が分離に寄与していると述べている²⁶⁾。また、著者らは残存シラノール基だけでは
なく、ODS 固定相の結合密度が高く、平面・非平面分子の違いを認識できるポリメリック
構造も分離に寄与することを示し、リサイクル HPLC システムと併用して β-POP/β-PPO、
β-OPO/β-OPO を分離した²⁷⁾。リサイクル HPLC とは、カラムの出口の流路をポンプの
入り口に戻して、分析種が十分に分離するまでカラムを循環させる機能をもつ HPLC システ
ムである。ポリメリック型 ODS カラムの特徴は β-SUS 型/β-SSU 型のみならず、β-USU 型
/β-UUS 型も分離できる点にある。このカラムは温度を下げることにより TAG の保持を強
めることができる一方、ピークの対称性は悪化する。しかし、汎用性、耐久性に優れた逆
相カラムでの TAG 位置異性体分析は大いに検討の余地があると考えられる。

そこで本研究では、TAG 位置異性体、鏡像異性体分析法の開発と、天然油脂に含まれる
TAG 異性体存在比の分析を目標として以下の実験を行った。第二章、第三章ではポリメリ
ック ODS カラム、C28 カラムを用いた逆相 HPLC による TAG 位置異性体分析法を開発し

た。さらに、第四章ではキラル HPLC を用いて TAG 鏡像異性体の直接分離を開発し、第五章では第二章、第四章で開発した分析法を使って、特徴的な脂肪酸の分布を持つと考えられる魚類、海獣類の脂質に含まれる TAG 位置異性体・鏡像異性体分析を試みた。また、第六章では乳脂の TAG 位置異性体分析を試みた。得られた結果を従来の立体特異的分析による脂肪酸分布と比較することで、新たに開発した分析法の有用性を評価するとともに、天然油脂を構成する TAG の生合成経路に関しても考察を行った。

Fischer投影式



* 不斉中心

例) 1,2-dipalmitoyl-3-oleoyl-*sn*-glycerol = *sn*-PPO

“*sn*-”の後の表記順にパルミチン酸とオレイン酸がグリセロール骨格の*sn*-1,2,3位に結合している。

P=パルミチン酸、O=オレイン酸

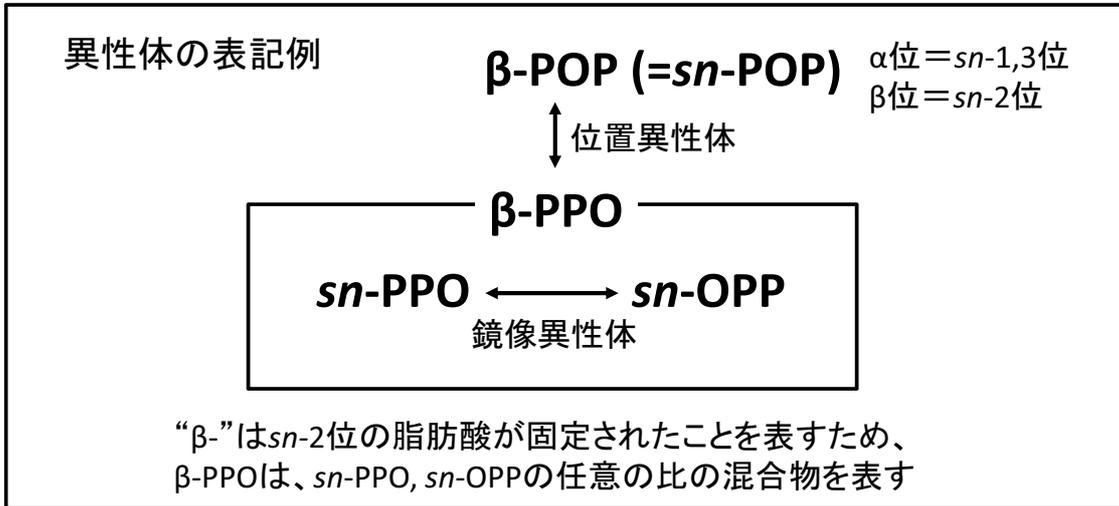


図 1.1 トリアシルグリセロールの構造と表記法

第二章 ポリメリック型 ODS カラムを用いた逆相 HPLC による食用油脂中のトリアシルグリセロールの位置異性体分析法の開発

第一節 緒言

TAG はグリセロールと 3 つの脂肪酸から成り、食用油脂の主成分である¹⁾。その組成は油脂の物性、栄養に影響を及ぼすため、油脂の特徴を捉えるためにはその組成分析する必要がある。TAG の分子種の HPLC 分析に用いられる分離モードは主に逆相 HPLC と銀イオン HPLC である。逆相 HPLC では TAG はアシル基と ODS 等を固定相とする逆相カラムのアルキル鎖との疎水性相互作用により保持され、総アシル炭素数と不飽和度から計算される PN¹⁵⁾が大きい程、また、不飽和度が小さいほど保持が強くなる。一般に逆相 HPLC ではグリセロール骨格上で脂肪酸の結合位置が異なる位置異性体を分離することはできない。一方、銀イオン HPLC²⁸⁻³⁰⁾では不飽和度に従って分離し、二重結合数が多いほど保持が強くなる。また、分離条件によっては位置異性体の分離も可能な優れた分離モードである。しかし、銀イオン HPLC ではヘキサンに少量のアセトニトリルを加えた移動相を用いるため、アセトニトリルがカラムにコーティングされている銀を徐々に溶出させてしまう。このため、カラムの寿命が縮まり再現性の低下につながる。以上の点から、銀イオンカラムを用いた TAG 分子種分析、位置異性体分離には難点が多く、位置異性体の分離可能で、かつ、耐久性のあるカラムや分離モードの開発が求められている。

近年、感度、選択性の高い分析を行うため質量分析計が多用されている。TAG 分析においても、大気圧化学イオン化-質量分析装置 (APCI-MS) を用いられ、位置異性体分析の研究にも応用されている。APCI 法は試料を脱溶媒ガスで加熱気化し、コロナ放電によって試料をイオン化する方法である。APCI 法では、TAG のプロトン付加分子、アンモニウムイオン付加分子、ナトリウムイオン付加分子、DAG フラグメントイオン (TAG からアシル基が脱離したイオン) 等が検出され、その質量電荷比 (m/z) を解析することで分子種の同定

が可能である。Mottram (1996) らは β -AAB および β -ABA 型 TAG 位置異性体をクロマトグラフィーで分離せずにその存在比を DAG フラグメントイオンから求める方法を発表した²¹⁾。TAG はイオン化の際に、「*sn*-1,3 位の脂肪酸が *sn*-2 位の脂肪酸と比べて脱離しやすい」という経験則に基づいて DAG⁺イオンを生成する。x 軸に TAG 位置異性体の比率、y 軸に 2 種類の DAG イオン ([AA]⁺および [AB]⁺) のマスクロマトグラムのピーク面積比をプロットし、検量線を作成することで位置異性体存在比を測定することを可能とした。この方法は植物油や動物脂において TAG 位置異性体の分析に応用されている²²⁻²⁴⁾。しかし、このように生成したフラグメントイオンを利用する方法が行われる一方で、この手法には分析する TAG の脂肪酸の炭素鎖や二重結合数の違いによって、イオン化率やフラグメンテーションパターンが異なるという問題点が存在する。また、Mottram らが提唱した経験則が、二重結合数の多い不飽和脂肪酸には当てはまらないこともわかっており³¹⁾、魚油のように HUFA を多く含む天然油にこの手法を適応することには問題がある。また、この法則とは矛盾する結果も報告されている³²⁻³⁵⁾。

前述のとおり、逆相 HPLC による TAG 分子種分析では、ODS カラム等が用いられることが一般的であり、多くのこれまでの研究では TAG 位置異性体の分離に逆相系のカラムは適していないと考えられてきた。しかし、近年ではカラム技術の発達により、逆相 HPLC による TAG 位置異性体分析が可能であることがいくつか報告されている。Momchilova (2004) らは、4 種の ODS カラムを用いて β -POP/ β -PPO の分離を検討し、TAG 位置異性体の分離を行う上で、カラムと移動相選択の重要性を示した³⁶⁾。この研究に続き、彼らは 2006 年に、エンドキャップ処理をしていない ODS カラムを用いることで、パルミチン酸 2 分子と 2~6 の二重結合を持つ不飽和脂肪酸 1 分子から構成された 5 つの TAG 位置異性体ペアの一斉分離を可能にした²⁶⁾。その後、著者ら (2008) は、ポリメリック ODS カラムとリサイクル HPLC システムを併用することで、 β -POP/ β -PPO または β -OPO/ β -OOP を個々の位置異性体に分離することに成功した²⁷⁾。リサイクル HPLC とは、一度カラムから溶出し

たピークを再びポンプの入り口に戻して同じカラムに試料を繰り返し循環させることのできるシステムで、1本のカラムでカラム圧を上げることなく高理論段数を得ることができ技術である。主に分取 HPLC で使われてきたものだが、最近では分析用のシステムも市販されるようになった。ここで用いたポリメリック ODS カラムとは、アメリカの National Institute of Standards and Technology (NIST)の標準物質 (Standard reference material, SRM) 869b³⁷⁾の benzo[a]pyrene (BaP)と 1,2:3,4:5,6:7,8-tetrabenzonaphthalene (TBN)の分離係数 ($\alpha_{TBN/BaP}$) によって規定され、 $\alpha_{TBN/BaP} < 1$ のときポリメリック型、 $1 < \alpha_{TBN/BaP} < 1.7$ のときインターメディアート、 $1.7 < \alpha_{TBN/BaP}$ のときモノメリック型という。一般にポリメリック型の方が平面分子と非平面分子の認識能が高いとされている。ポリメリック ODS カラムについて、いくつかの TAG 位置異性体の分離が確認されているが、ポリメリック ODS カラムの TAG の保持の特性は未だ明らかになっていない。天然の油脂に含まれる TAG 位置異性体を分析するためには、ポリメリック ODS カラムが認識できる TAG 位置異性体の特徴を知る必要がある。

本章では、数種類の TAG 位置異性体を用いて、ポリメリック ODS カラムで分離可能な TAG 位置異性体を明らかにし、カラムの分離特性を精査することを目的として以下の実験を行った。中鎖脂肪酸であるカプリル酸(C₈)が 2 分子、および飽和脂肪酸 (C₁₀~C₁₈) が 1 分子結合する TAG 位置異性体、 β -C₈C₁₀C₈、 β -C₈C₈C₁₀、 β -C₈C₁₂C₈、 β -C₈C₈C₁₂、 β -C₈C₁₄C₈、 β -C₈C₈C₁₄、 β -C₈C₁₆C₈、 β -C₈C₈C₁₆、 β -C₈C₁₈C₈、 β -C₈C₈C₁₈、 β -C₈DC₈、 β -C₈C₈D、HUFA である DHA(D)が 2 分子、および飽和脂肪酸 (C₁₀~C₁₈) が 1 分子結合する TAG 位置異性体、 β -DC₁₀D、 β -DDC₁₀、 β -DC₁₂D、 β -DDC₁₂、 β -DC₁₄D、 β -DDC₁₄、 β -DC₁₆D、 β -DDC₁₆、 β -DC₁₈D、 β -DDC₁₈を用意し、ポリメリック ODS カラムを用いて HPLC での分離挙動を調べた。

第二節 材料と方法

第一項 標準品

TAG 標準品は自社（月島食品工業株式会社）製品を用いた。以下に示す各 TAG 位置異性体ペアを 1:1 で混合し、2-プロパノールを用いて約 200 ppm に濃度を調整した。最終的に 11 種類の TAG 位置異性体ペアを用意した（表 2.1）。

β -C ₈ C ₁₀ C ₈ + β -C ₈ C ₈ C ₁₀	β -C ₈ C ₁₂ C ₈ + β -C ₈ C ₈ C ₁₂	β -C ₈ C ₁₄ C ₈ + β -C ₈ C ₈ C ₁₄
β -C ₈ C ₁₆ C ₈ + β -C ₈ C ₈ C ₁₆	β -C ₈ C ₁₈ C ₈ + β -C ₈ C ₈ C ₁₈	β -C ₈ DC ₈ + β -C ₈ C ₈ D
β -DC ₁₀ D + β -DDC ₁₀	β -DC ₁₂ D + β -DDC ₁₂	β -DC ₁₄ D + β -DDC ₁₄
β -DC ₁₆ D + β -DDC ₁₆	β -DC ₁₈ D + β -DDC ₁₈	

第二項 LC/APCI-MS による TAG 位置異性体ペアの分離

試料をリサイクル HPLC システム（ジーエルサイエンス(株)）に 20 μ L 注入し、カラムを通過させて APCI-MS へ導入した。まず、カラムを 1 回通過させる分析を行い、分離の不可能だったものに対してはリサイクル分離を行った（図 2.1）。カラムは Intersil ODS-P（5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm I.D., ジーエルサイエンス(株)）を二本直列につなぎ使用した。移動相はアセトニトリル / 2-プロパノール = 6 : 4 (v/v)、流速 0.8 mL/min、カラム温度は試料によって 18°C~30°C の間で変更した。検出には四重極型質量分析装置 Waters ZMD（Waters Corporation, Milford, MA）を用いた。このとき、移動相にアセトニトリルを用いていることが原因で、通常の APCI-MS で検出されるプロトン付加分子よりもアンモニウムイオン付加分子がより多く検出されたため、感度の問題からアンモニウムイオン付加分子をモニタリングイオンとして分析を行った。

【リサイクル HPLC システムの構成】

ポンプ : PU611C（ジーエルサイエンス(株)）

カラムオープン : MO706（ジーエルサイエンス(株)）

UV 検出器 : UV702 (ジーエルサイエンス(株))

リサイクルバルブ : HPV-Rc (ジーエルサイエンス(株))

インジェクター : Model 7725 (50 μ L サンプルループ付) (Rheodyne LLC, Rohnert Park, CA)

【APCI-MS 分析条件】

コロナ電圧 : 3.5 kV コーン電圧 : 40 V

APCI プローブ温度 : 400°C ソースブロック温度 : 135°C

スキャン時間 : 1.0 s

モニタリングモード : 選択イオンモニタリング(Selected ion monitoring, SIM)モードで
[M+NH₄]⁺に相当する m/z のイオンを選択した。

β -C₈C₁₀C₈ + β -C₈C₈C₁₀ : m/z 516 β -C₈C₁₂C₈ + β -C₈C₈C₁₂ : m/z 545

β -C₈C₁₄C₈ + β -C₈C₈C₁₄ : m/z 573 β -C₈C₁₆C₈ + β -C₈C₈C₁₆ : m/z 601

β -C₈C₁₈C₈ + β -C₈C₈C₁₈ : m/z 629 β -C₈DC₈ + β -C₈C₈D : m/z 673

β -DC₁₀D + β -DDC₁₀ : m/z 885 β -DC₁₂D + β -DDC₁₂ : m/z 913

β -DC₁₄D + β -DDC₁₄ : m/z 941 β -DC₁₆D + β -DDC₁₆ : m/z 969

β -DC₁₈D + β -DDC₁₈ : m/z 997

第三項 分離度およびテーリングファクターの算出

得られたクロマトグラムから、分離度 (R_s) およびテーリングファクター (TF) を算出した。 R_s は TAG 位置異性体ペアに対して算出し、 $R_s=1.5$ 以上でベースライン分離と判断できる。TF は各 TAG に対して算出し、TF=1.0 以上になることでピークがテーリングしていることを示し、数値が増すごとにピーク対称性が失われていることを指す。

第三節 結果と考察

第一項 ポリメリック ODS カラムによる TAG 位置異性体の分離

図 2.2 に 2 分子の C₈ および 1 分子の飽和脂肪酸が結合する TAG 位置異性体のクロマトグラム (リサイクルを使用していない) を示した。C₁₄ (ミリスチン酸)、C₁₆ (パルミチン酸)、C₁₈ (ステアリン酸) が結合した TAG 位置異性体の分離が可能であったが、C₁₀ (カプリン酸) と C₁₂ (ラウリン酸) が結合した TAG 位置異性体の分離は不可能であった。これらに対してリサイクルシステム (図 2.1) を使用したところ、C₁₀ が結合した TAG 位置異性体は分離されなかったが、C₁₂ が結合した TAG 位置異性体は分離可能であった。分離度 (R_s) およびテーリングファクター (TF) を算出した結果を表 2.2 に示した。R_s>1.5 においてベースライン分離と判断される。分離可能な TAG 位置異性体ペアに関しては全て R_s>1.0 となり、C₁₆ が結合した TAG 位置異性体 (β-C₈C₁₆C₈ + β-C₈C₈C₁₆) で R_s=1.88 となり最大であった。TF はいずれも 2.0 以下であった。

同様に図 2.3 に 2 分子の DHA および 1 分子の飽和脂肪酸が結合した TAG 位置異性体のクロマトグラム (リサイクルを使用していない) を、また、表 2.3 に R_s と TF を示した。C₁₂~C₁₈ が結合した TAG 位置異性体の分離が可能であったが、C₁₂ は R_s=0.22 と十分な分離ではなかった。分離できなかった C₁₀ を結合した TAG 位置異性体にリサイクルを使用した分離することはできなかった。C₁₆ を結合した TAG 位置異性体 (β-DC₁₆D + β-DDC₁₆) のときに R_s は 2.11 であり、β-C₈C₁₆C₈ + β-C₈C₈C₁₆ と同様に C₁₆ のときに最も高い分離度を示した。2 分子の DHA と C₁₆ が結合した TAG 位置異性体では、2 分子の C₈ と C₁₆ が結合した場合と比べて TF が大きく、2 分子の DHA と C₁₈ が結合した TAG 位置異性体では TF=2.0 を示す結果となった。この実験に用いたポリメリック ODS カラムは炭素量が多く、長鎖飽和脂肪酸を含む TAG 位置異性体の分離に適している一方で、長鎖飽和脂肪酸とポリメリック ODS 固定相との疎水的相互作用が強くテーリングを引き起こしてしまうものと考えられる。

これまでの結果から、ポリメリック ODS カラムが TAG 位置異性体を認識するためには、長鎖の飽和脂肪酸が必要と考えられた。そこで、DHA2 分子とオレイン酸もしくはエライジン酸が結合した TAG 位置異性体について、ポリメリック ODS カラムでの分離の可否を調べた。オレイン酸とエライジン酸は共に炭素 18 のモノ不飽和脂肪酸であるが、オレイン酸は *cis* 型であるのに対し、エライジン酸は *trans* 型である。エライジン酸が結合した TAG 位置異性体はリサイクルによりカラム通過回数 6 回目以降、徐々に分離していく傾向が見られたが、オレイン酸が結合した TAG 位置異性体は 14 回カラムを通過させても分離されなかった (図 2.4)。すなわち、ポリメリック ODS カラムはエライジン酸の結合位置は認識できるが、オレイン酸の結合位置は認識できず、ポリメリック ODS カラムが TAG 位置異性体を認識するには少なくとも 1 分子の一定の鎖長と直線構造を持つ脂肪酸が必要であることが示唆された。

以上の結果から、ポリメリック ODS カラムとリサイクル HPLC と併用することで、炭素鎖 12 以上の飽和脂肪酸が結合する TAG 位置異性体の分離が可能であることが示された。

第二項 ポリメリック ODS カラムの TAG 位置異性体分離メカニズムに関する考察

前項でポリメリック ODS カラムにおける TAG 位置異性体の分離は、飽和脂肪酸の炭素鎖の長さが影響していることが示唆された。リサイクルを用いずに十分な分離度を得るには、少なくとも炭素鎖 14 以上の飽和脂肪酸 1 分子が必要である。我々は以前の研究で、ポリメリック ODS 固定相における TAG 位置異性体の保持機構について考察している²⁷⁾。ポリメリック ODS 固定相は、モノメリック等他の種類の ODS 固定相よりアルキル鎖が密に配列されているため、飽和脂肪酸が密なアルキル鎖の中に深く入り込むことで、保持され TAG 位置異性体が識別される。また、移動相も TAG の保持に影響を与える。例えば、カラム内の ODS 固定相はテトラヒドロフランを含んだ移動相と溶媒和することで膨張し、それぞれの ODS 群が上向きに立ってしまう可能性がある。このため、ポリメリック ODS 固定

相のアルキル鎖の間の狭い空間が消失し、TAG 位置異性体の溶出能力が無くなると考えられている。本実験で用いたアセトニトリルと 2-プロパノール (6 : 4 , v/v) の移動相の場合には、アルキル鎖の間の狭い空間が保たれ、TAG 位置異性体の分離が達成されたと考えられる。このことから、移動相中の TAG 位置異性体の溶解度、ポリメリック ODS 固定相のアルキル鎖の結合密度と移動相中での密な構造が TAG の構造と同様に位置異性体分離が達成されるために重要な要素となっていると考えられる。

表2.1 分析に用いたTAG位置異性体

β -C ₈ C ₈ C ₁₀	β -C ₈ C ₁₀ C ₈	β -DDC ₁₀	β -DC ₁₀ D
β -C ₈ C ₈ C ₁₂	β -C ₈ C ₁₂ C ₈	β -DDC ₁₂	β -DC ₁₂ D
β -C ₈ C ₈ C ₁₄	β -C ₈ C ₁₄ C ₈	β -DDC ₁₄	β -DC ₁₄ D
β -C ₈ C ₈ C ₁₆	β -C ₈ C ₁₆ C ₈	β -DDC ₁₆	β -DC ₁₆ D
β -C ₈ C ₈ C ₁₈	β -C ₈ C ₁₈ C ₈	β -DDC ₁₈	β -DC ₁₈ D
β -C ₈ C ₈ D	β -C ₈ DC ₈	β -DDO	β -DOD
		β -DDEI	β -DEID

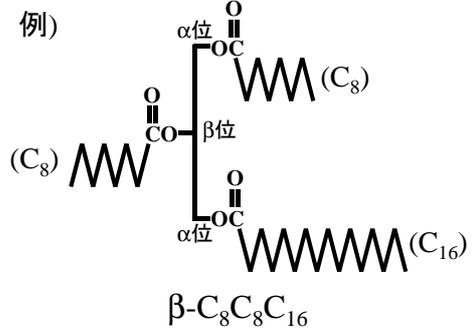


表2.1に記載されたTAGの構成脂肪酸の略記

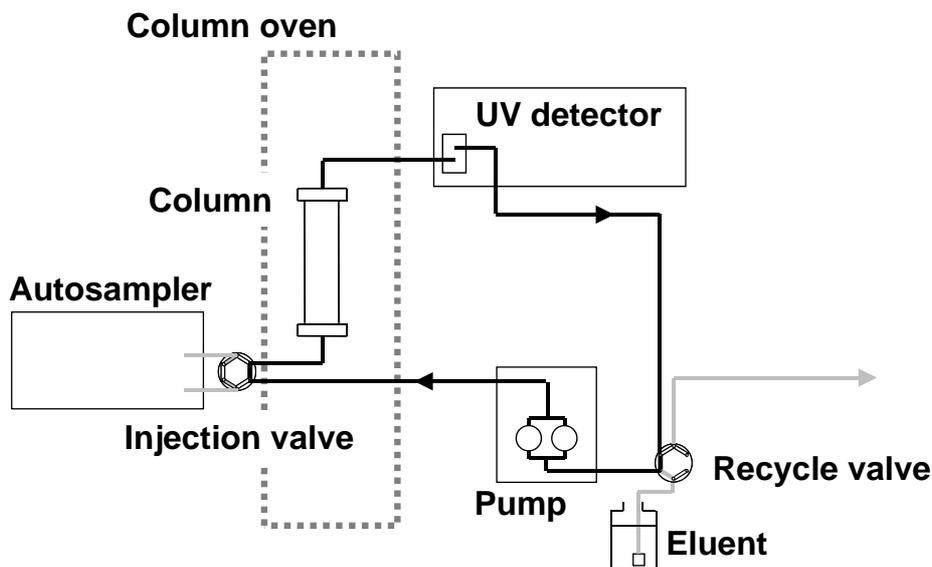
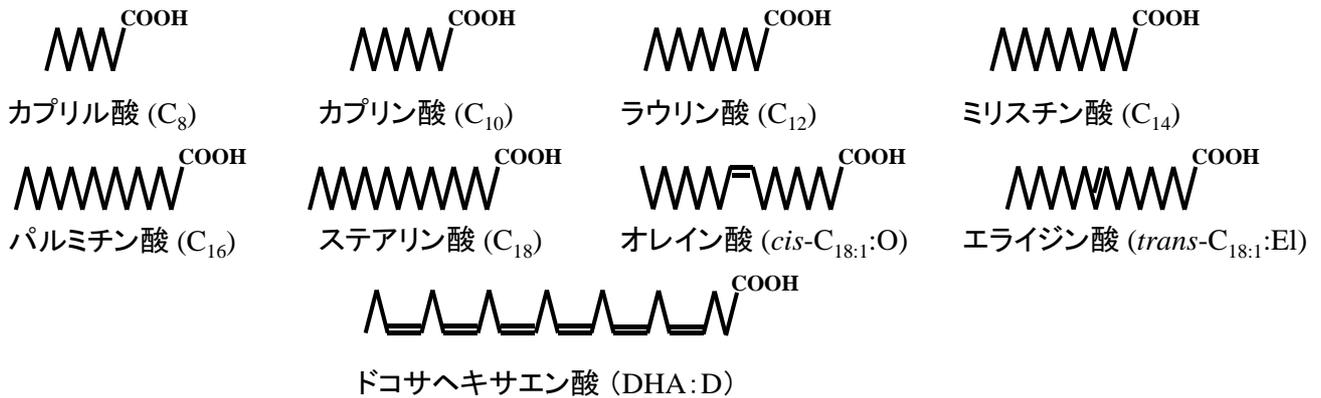


図2.1 リサイクルHPLCシステムの流路図

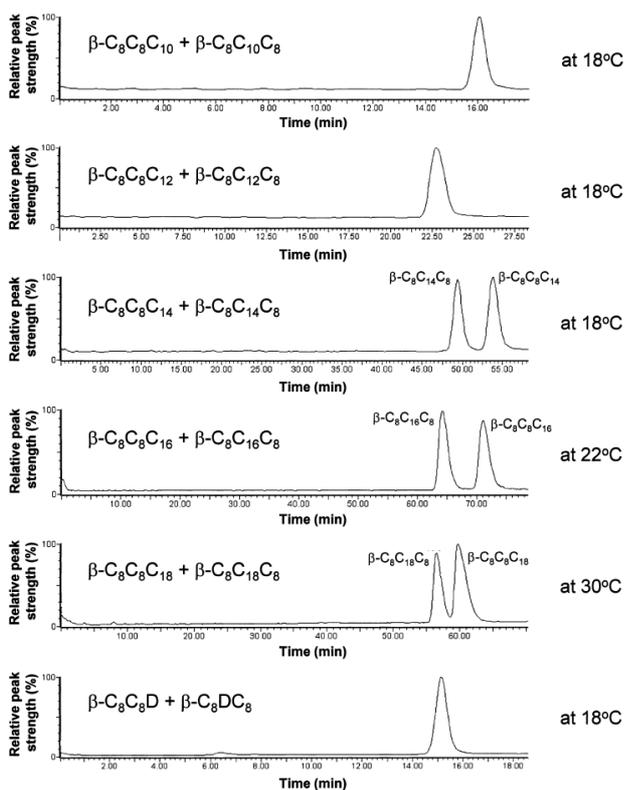


図 2.2 2分子のカプリル酸および1分子の飽和脂肪酸が結合したTAG位置異性体の分離挙動

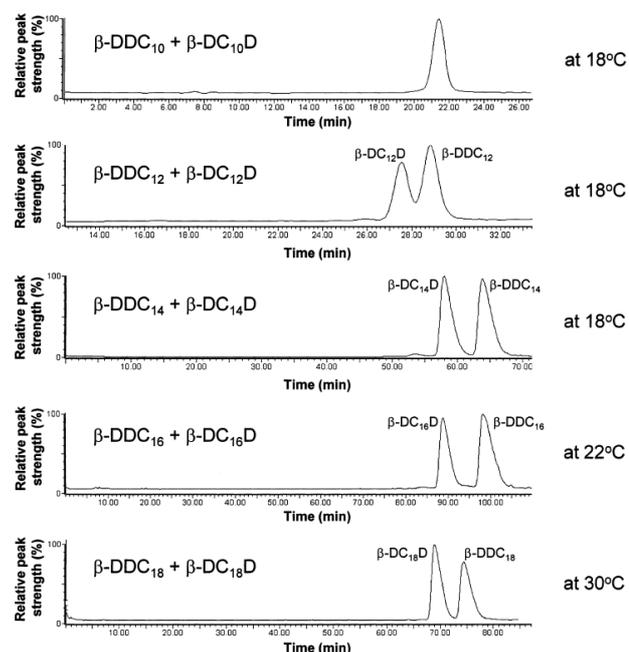


図 2.3 2分子のDHAおよび1分子の飽和脂肪酸が結合したTAG位置異性体の分離挙動

表 2.2 2つのカプリル酸(C₈)を含むTAG位置異性体ペアの分離度(R_s)とテーリングファクター(TF)

Pair of TAG-PI (Column temperature)	$\beta\text{-C}_8\text{C}_8\text{C}_{10}$ + $\beta\text{-C}_8\text{C}_{10}\text{C}_8$ (at 18 °C)	$\beta\text{-C}_8\text{C}_8\text{C}_{12}$ + $\beta\text{-C}_8\text{C}_{12}\text{C}_8$ (at 18 °C)	$\beta\text{-C}_8\text{C}_8\text{C}_{14}$ + $\beta\text{-C}_8\text{C}_{14}\text{C}_8$ (at 18 °C)	$\beta\text{-C}_8\text{C}_8\text{C}_{16}$ + $\beta\text{-C}_8\text{C}_{16}\text{C}_8$ (at 22 °C)	$\beta\text{-C}_8\text{C}_8\text{C}_{18}$ + $\beta\text{-C}_8\text{C}_{18}\text{C}_8$ (at 30 °C)			
R_s	Not Separated	Not Separated	1.02	1.88	1.05			
TAG-PI	$\beta\text{-C}_8\text{C}_8\text{C}_{10}$ $\beta\text{-C}_8\text{C}_{10}\text{C}_8$	$\beta\text{-C}_8\text{C}_8\text{C}_{12}$ $\beta\text{-C}_8\text{C}_{12}\text{C}_8$	$\beta\text{-C}_8\text{C}_8\text{C}_{14}$ $\beta\text{-C}_8\text{C}_{14}\text{C}_8$	$\beta\text{-C}_8\text{C}_8\text{C}_{16}$ $\beta\text{-C}_8\text{C}_{16}\text{C}_8$	$\beta\text{-C}_8\text{C}_8\text{C}_{18}$ $\beta\text{-C}_8\text{C}_{18}\text{C}_8$			
TF	-	-	1.12	1.10	1.34	1.23	1.88	1.60

TAG-PI: TAG positional isomer

表 2.3 2つのドコサヘキサエン酸(D)を含むTAG位置異性体ペアの分離度(R_s)とテーリングファクター(TF)

Pair of TAG-PI (Column temperature)	$\beta\text{-DDC}_{10}$ + $\beta\text{-DC}_{10}\text{D}$ (at 18 °C)	$\beta\text{-DDC}_{12}$ + $\beta\text{-DC}_{12}\text{D}$ (at 18 °C)	$\beta\text{-DDC}_{14}$ + $\beta\text{-DC}_{14}\text{D}$ (at 18 °C)	$\beta\text{-DDC}_{16}$ + $\beta\text{-DC}_{16}\text{D}$ (at 22 °C)	$\beta\text{-DDC}_{18}$ + $\beta\text{-DC}_{18}\text{D}$ (at 30 °C)				
R_s	Not Separated	0.22	1.82	2.11	1.36				
TAG-PI	$\beta\text{-DDC}_{10}$ $\beta\text{-DC}_{10}\text{D}$	$\beta\text{-DDC}_{12}$ $\beta\text{-DC}_{12}\text{D}$	$\beta\text{-DDC}_{14}$ $\beta\text{-DC}_{14}\text{D}$	$\beta\text{-DDC}_{16}$ $\beta\text{-DC}_{16}\text{D}$	$\beta\text{-DDC}_{18}$ $\beta\text{-DC}_{18}\text{D}$				
TF	-	1.03	1.10	1.73	1.42	2.17	1.53	1.97	2.00

TAG-PI: TAG positional isomer

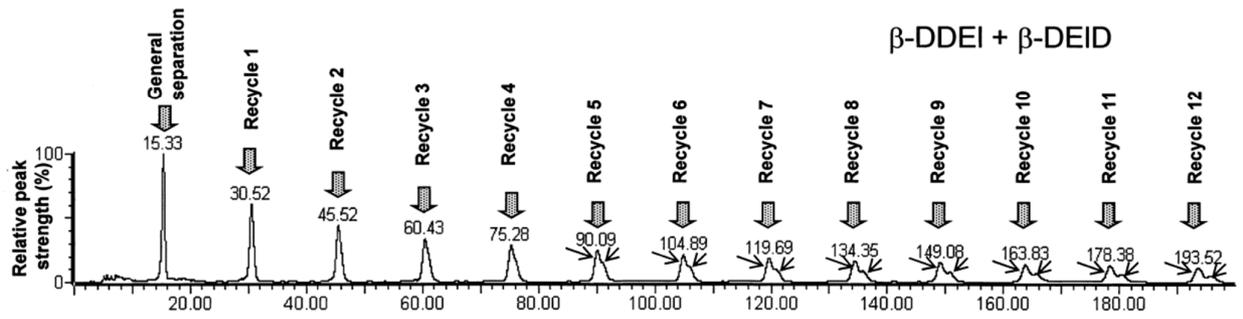
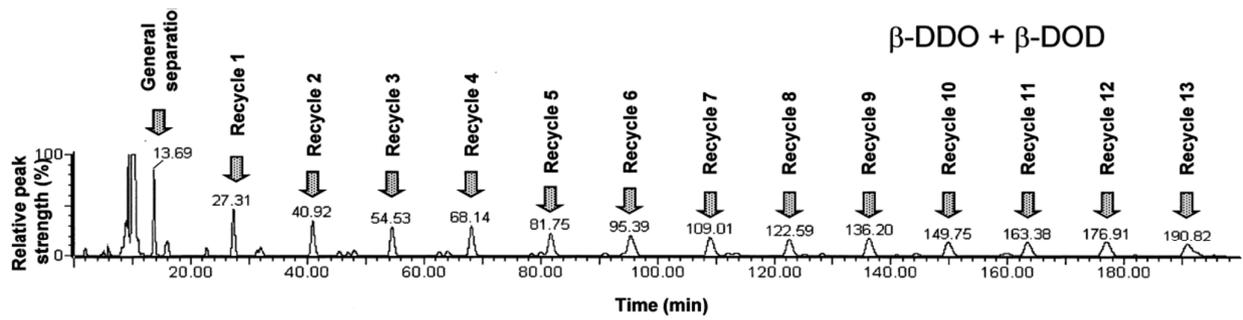


図2.4 β -DOD/ β -DDO(上段)と β -DEID/ β -DDEI(下段)のリサイクル分離

第三章 C28 カラムを用いた逆相 HPLC による食用油脂中のトリアシルグリセロールの位置異性体分析法の開発

第一節 緒言

前述の如く、食用油脂の主成分はトリアシルグリセロール (TAG) である。TAG はグリセロール骨格に脂肪酸が 3 つ結合した構造であり、食用油脂はそれぞれ固有の脂肪酸組成、および、TAG 組成をもち、これらがそれぞれの油脂の物性や栄養機能に寄与している。油脂の特徴をとらえるために一般的に行われるのは GC による脂肪酸組成分析である。さらに、グリセロール骨格上の結合位置別に脂肪酸組成を測定する方法も用いられている⁷⁻¹²⁾。隣りパーゼにより α 位、 β 位の脂肪酸組成を、また、ホスホリパーゼやキラル HPLC を利用して *sn*-1,2,3 位の結合位置別に脂肪酸組成を測定する方法は、油脂全体の脂肪酸の分布から油脂全体の構造を知る上で非常に有用である。しかし、こうした手法は油脂の主成分である TAG を直接分析しているわけではないため、実際にどのような TAG 分子種がどのような比率で存在しているかを知ることができない。このため、GC、HPLC を使った TAG 分子種を直接分析する方法が開発されてきた。GC では総炭素数、あるいは、総炭素数と不飽和度に従った分離が可能であるが¹³⁾、TAG 位置異性体、鏡像異性体を分離することはできない。このような異性体分析法は、現在のところ HPLC のみで可能であり、これは TAG の脂肪酸の組み合わせと同時にその結合位置を明らかにできる分析法に他ならない。

HPLC による TAG 分析で広く用いられるのは逆相 HPLC である。固定相として ODS カラムが用いられる場合が多く、移動相にはアセトン、アセトニトリル、クロロホルム、2-プロパノール、エタノール、メタノール、テトラヒドロフランなどの有機溶剤を組み合わせさせて溶出させる¹⁴⁾。最も一般的なのは、アセトン/アセトニトリルの混合溶媒でのイソクラテック溶出、グラジエント溶出である。各種 TAG は、TAG の総アシル炭素数-2×二重結合数で導かれる Partition number (あるいは Equivalent carbon number) の順に従って溶出

する¹⁵⁾。この場合 TAG 位置異性体、鏡像異性体は分離されない。しかし、逆相 HPLC であっても、条件によっては位置異性体を分離できる場合もある。近年の ODS カラムはエンドキャップ処理が施されたものが多いが、Momchilova らはエンドキャップ処理を施していない ODS カラムの残存シラノール基がパルミチン酸 2 分子、不飽和脂肪酸 1 分子を持つ TAG 位置異性体分離に寄与していることを示した²⁶⁾。我々はさらに、残存シラノール基に加え、固定相の ODS がポリメリック型であることも位置異性体分離に影響を及ぼすことを示した²⁷⁾。1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerol (*sn*-POP) / 1,2-dipalmitoyl-3-oleoyl-*rac*-glycerol (*rac*-PPO)、あるいは、1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol (*sn*-OPO) / 1,2-dioleoyl-3-palmitoyl-*rac*-glycerol (*rac*-OOP)をエンドキャップ処理されていないポリメリック型 ODS カラムとリサイクル HPLC システムを用いて分離することができたが、一般的なエンドキャップ処理されたモノメリック型 ODS カラム、あるいは、エンドキャップ処理をしていないモノメリック ODS カラムを同条件で用いても分離することはできなかった。いずれの分離方法も逆相条件で TAG 位置異性体を分離できる方法であるが、分析時間が長い、ピークテーリングが大きいなどの問題を抱えていた。ここで TAG 位置異性体分離が達成される要因の一つとしてポリメリック型 ODS 固定相が考えられる。しかし、ポリメリック型の場合は ODS 固定相合成の段階からその結合密度が高くなる傾向があり、パルミチン酸のような飽和脂肪酸を含む TAG との相互作用が強く、テーリングを引き起こしてしまう。近年、逆相 HPLC 用カラムで、ポリメリック ODS カラムのような炭素量が比較的大きいもの以外にも、保持が強く、異なる選択性を示すカラムが市販されている。炭素数 18 の ODS の代わりに C28, C30 などの長鎖アルキル基を結合させた逆相 HPLC 用カラムである。これらはポリメリック ODS に比べ、アルキル鎖の結合密度が低くなるため、テーリングを引き起こさずに位置異性体分離を達成できる可能性が考えられた。そこで、本章では C28 カラムを用い、*sn*-POP/*rac*-PPO 等の TAG 位置異性体分離を検討した。

第二節 材料と方法

第一項

a. 試薬 トリアシルグリセロール標準品 (*sn*-POP, *rac*-PPO, *sn*-OPO, *rac*-OOP, *rac*-POSt, *rac*-OPSt, *rac*-PStO, *sn*-PDP, *rac*-PPD, *sn*-DPD, *rac*-DPD, *sn*-PEP, *rac*-EEP, *sn*-PC₁₀P, *rac*-PPC₁₀) は、自社製品を用いた (表 3.1)。他の試薬は和光純薬工業(株)より購入し、HPLC の溶離液に用いたアセトン等の有機溶媒は全て HPLC 用以上のグレードのものを使用した。

b. 装置 HPLC システム : Alliance e2695 (Waters Corporation, Milford, MA)、UV-VIS 検出器 : 2489 (Waters Corporation)、カラム : Sunrise C28 (5 μ m, 4.6 \times 250 mm I.D., (株)クロマニックテクノロジーズ)、大気圧化学イオン化タンデム形質量分析装置 (APCI-MS/MS, Quattro micro API, Waters Corporation)、オペレーションソフトウェア : MassLynx Ver. 4.1(Waters Corporation)。

第二項 β -POP/ β -PPO, β -OPO/ β -OOP の分離

TAG 位置異性体のペア(β -POP/ β -PPO, β -OPO/ β -OOP)を 2-プロパノールに溶解し、それぞれが 100 μ g/mL となるように濃度を調整した。試料溶液 5 μ L を HPLC に注入し、APCI-MS/MS で検出した。カラム温度は 25、20、15、10 $^{\circ}$ C でそれぞれ分析を行った。その他の HPLC 条件は以下のとおりに設定した。溶離液 : アセトン 100%, 流量 : 1.0 mL/min, 検出 : UV 205 nm。APCI-MS/MS のイオン源、測定条件は以下のとおりとした。イオン源 : APCI ポジティブモード, コロナ電流 : 3.0 μ A, ソースブロック温度 : 120 $^{\circ}$ C, 脱溶媒温度 : 450 $^{\circ}$ C, コーンガス流量 : 50 L/h (窒素ガス), 脱溶媒ガス流量 : 200 L/h (窒素ガス), MS 分析モード : Selected reaction monitoring (SRM)モード, SRM トランジッション : m/z 834 $>$ 578 (PPO 検出用), m/z 860 $>$ 578 (OOP 検出用), コーン電圧 : 40 V, コリジョンエネルギー : 24 eV。

第三項 β-POST/β-OStP/β-StPO の分離

β-POST、β-OStP、β-StPO をそれぞれ 2-プロパノールに溶解し、濃度を 1000 µg/mL になるように調整して標準液とした。β-POST/β-OStP/β-StPO、β-POST/β-OStP、β-OStP/β-StPO、β-StPO/β-POST 混合液はそれぞれの標準液を等量ずつ混合して調製し、それぞれ 10 µL を上記 LC-MS/MS システムに注入し分析を行った。HPLC 条件はカラム温度を 15°C とした以外は第二項と同じ値を用いた。MS はフルスキャンモードに設定し、 m/z 300–1000 の範囲をコーン電圧 20 V でスキャンした。Scan time は 0.5 s とした。

第四項 β-PDP/β-PPD, β-DPD/β-DDP, β-PEP/β-PPE, β-EPE/β-EEP, β-PC₁₀P/β-PPC₁₀ の分離

β-PDP, β-PPD, β-DPD, β-DDP, β-PEP, β-PPE, β-EPE, β-EEP, β-PC₁₀P, β-PPC₁₀ をそれぞれ 2-プロパノールに溶解し、濃度を 1000 µg/mL になるように調整して標準液とした。β-PDP/β-PPD, β-DPD/β-DDP, β-PEP/β-PPE, β-EPE/β-EEP, β-PC₁₀P/β-PPC₁₀ 混合液はそれぞれの標準液を等量ずつ混合して調製し、それぞれ 5 µL を上記 LC-MS/MS システムに注入し分析を行った。HPLC 条件はカラム温度を 15°C とした以外は第二項と同じ値を用いた。β-PDP/β-PPD, β-DPD/β-DDP, β-PEP/β-PPE, β-EPE/β-EEP の検出には UV 205 nm を用いたが、β-PC₁₀P/β-PPC₁₀ の検出には UV 吸収が弱いため、APCI-MS を用いた。MS 条件は SRM モード (m/z 724>522, コーン電圧: 15 V, コリジョンエネルギー: 20 eV) を用いた。

《分離度の計算》 以下の式を用いて分離度を計算した。

$$R_s = 2(t_{r2} - t_{r1}) / (W_1 + W_2)$$

t_{r1} : 初めのピークの保持時間, t_{r2} : 次のピークの保持時間

W_1 : 初めのピークのピーク幅, W_2 : 次のピークのピーク幅

$R_s = 1.0$ を 98% 分離、 $R_s = 1.25$ をベースライン分離 (99.5% 分離)、 $R_s > 1.5$ を完全分離とす

る。

第三節 結果と考察

アセトンを移動相として TAG 位置異性体の分離検討を行った。これは、アセトンは TAG の溶解性が高く、逆相 HPLC のカラム圧を比較的強く保つことができるからである。また、アセトンは TAG 位置異性体を短時間に溶出、分離させるという本研究の目的に合致していた。初めに、4つのカラム温度 (25, 20, 15, 10°C) で β -POP/ β -PPO の分離条件を検討した。結果を図 3.1 に示す。カラム温度を低く設定するにつれて、 β -POP、 β -PPO ともに保持時間は徐々に大きくなった。25°C のときは β -POP/ β -PPO は全く分離しなかったが、20°C では部分的に分離し、カラム温度 15、10°C で十分に分離することが分かった。溶出時間はカラム温度 15°C のときは 22 min、10°C では 32 min であり、C28 カラムにおける β -POP/ β -PPO の分離に際しては 10~15°C が最適なカラム温度であることが分かった。図 3.2 に他の TAG 位置異性体ペアのクロマトグラムを、また、これらの分離度を表 3.2 に示した。これらの結果から、C28 カラムは飽和脂肪酸を 2 つ、不飽和脂肪酸を 1 つもつ TAG 位置異性体ペアを分離できることが分かった。しかし、ポリメリック型 ODS カラム (Inertsil ODS-P, (株)ジーエルサイエンス)、銀イオンカラムでは β -OPO/ β -OOP のような不飽和脂肪酸を 2 つ、飽和脂肪酸を 1 つもつ TAG 位置異性体のペアを分離することはできるが、C28 カラムでは β -OPO/ β -OOP を分離できなかった(データは示さない)。また、この C28 カラムはカカオ脂に含まれる対称型 TAG の一つでもある β -POST を非対称型の β -OStP、 β -StPO と分離できることが分かった。非対称型である β -OStP と β -StPO を分けることはできなかった (図 3.3)。これらの結果から、パルミチン酸を 2 つ含む TAG 位置異性体ペアの分離が達成されるためには、分子内の他の脂肪酸の鎖長、二重結合の数や位置などの構造がパルミチン酸と大きくことなっている必要があることを示唆している。C28 固定相がパルミチン酸やステアリン酸のような長鎖飽和脂肪酸と強い相互作用をもつと仮定すれば、飽和脂

脂肪酸を2つ含む TAG 異性体のペアの分離機構を説明できるかもしれない。C28 カラムは2つの不飽和脂肪酸と1つの飽和脂肪酸からなる TAG 位置異性体のペアを分離することができないことから、C28 カラムによる TAG 位置異性体の分離機構は銀イオンカラムやポリメリック ODS カラムとは異なると考えられる。銀イオンカラムは TAG のアシル基の二重結合の数や位置を認識できるため、 β -OPO/ β -OOP を分離することができる。ポリメリック ODS カラムの場合は”slot model”と言われる保持機構で TAG 位置異性体の分離が説明される²⁷⁾。C28 と ODS の違いの一つはアルキル基の長さである。これにより、C28 カラムはパルミチン酸やステアリン酸のような飽和脂肪酸に対して強い疎水性相互作用を示し、さらに C28 アルキル基であれば1つのアルキル鎖で β -PPO のような α 位、 β 位に存在する2つのパルミチン酸を同時に強く保持できる可能性がある (図 3.4)。このような相互作用は C28 と β -POP の1つのパルミチン酸のとの相互作用よりも強いのであろう。こうした C28 アルキル基の TAG 位置異性体との疎水性相互作用の違いが保持時間に差を生み出し分離を可能にしていると考えられる。

β -POP/ β -PPO の分離に関しては、ポリメリック ODS のときよりも C28 の方がピークテールリングが起りにくくなる。すなわち、C28 の方がカラムへの試料負荷量を増やすことができるため分析、特に、分取の場合は有利な固定相である。同様に銀イオンカラムもピーク形状は良好であるが二重結合数に従った溶出順となる。逆相モードの C28 カラムの方が TAG は PN に従って溶出するため、溶出順が分かりやすいというメリットもある。

表3.1 分析に用いたTAG位置異性体

β -PPO	β -POO	β -PPSt	β -POST	β -StPO	β -PPD	β -PDD	β -PPE	β -PEE	β -PPC ₁₀
β -POP	β -OPO	β -PStP	β -OStP		β -PDP	β -DPD	β -PEP	β -EPE	β -PC ₁₀ P

例)

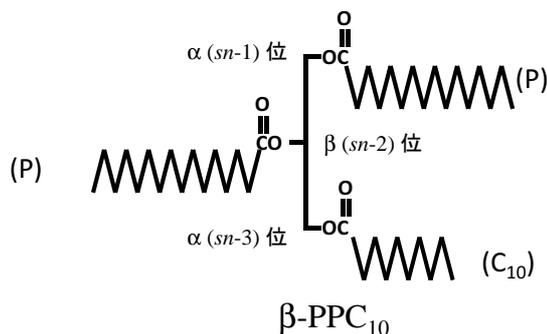


表3.1に記載されたTAGの構成脂肪酸の略記

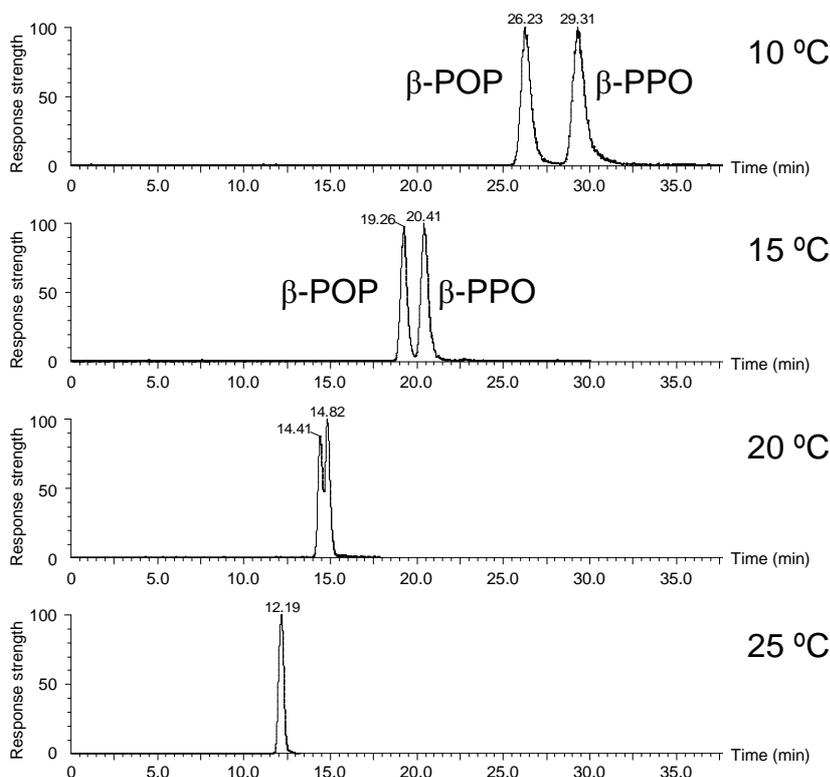
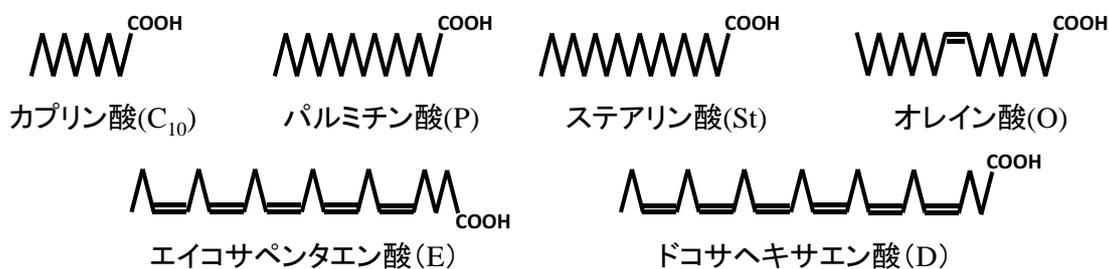


図3.1 C28カラムによる β -POP/ β -PPOの分離状態とカラム温度

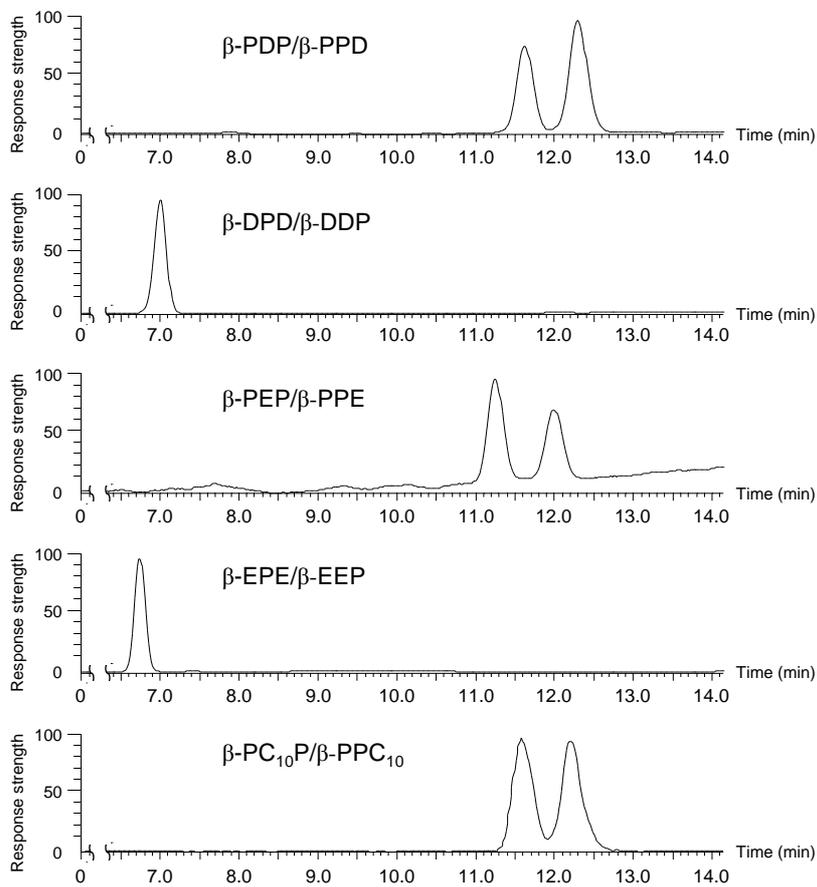


図3.2 C28カラムによる β -PDP/ β -PPD、 β -DPD/ β -DDP、 β -PEP/ β -PPE、 β -EPE/ β -EEP、 β -PC₁₀P/ β -PPC₁₀のクロマトグラム

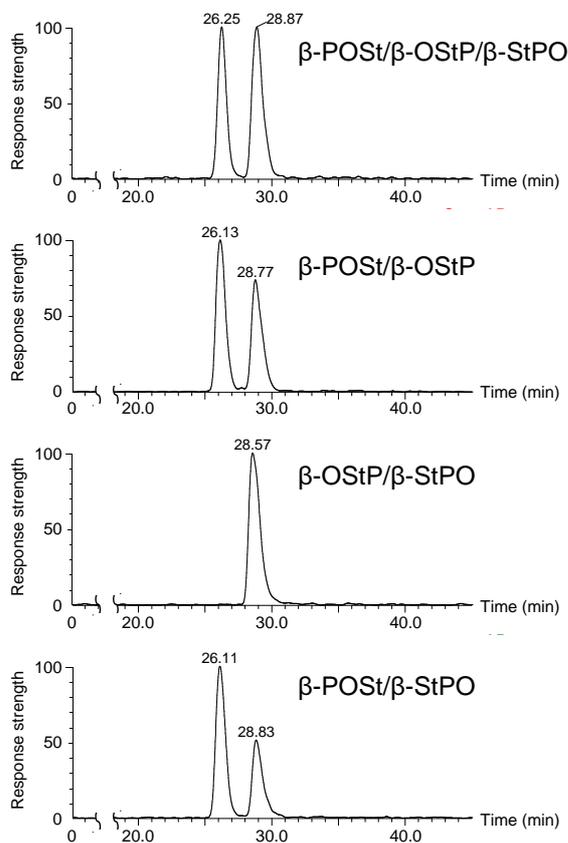


図3.3 C28カラムによる β -POST/ β -OSTP/ β -StO、 β -POST/ β -OSTP、 β -OSTP/ β -StPO、 β -POST/ β -StPOのクロマトグラム

表3.2 各種TAG位置異性体の分離度 (n=3)

Pair of TAG-PI	β -PPO	β -OOP	β -POSt	β -POSt	β -OSnP	β -PPSt	β -PPC ₁₀	β -PPD	β -PDD	β -PPE	β -PEE
	+ β -POP	+ β -OPO	+ β -StPO	+ β -OSnP	+ β -StPO	+ β -PStP	+ β -PC ₁₀ P	+ β -PDP	+ β -DPD	+ β -PEP	+ β -EPE
Rs	0.94	N. S.	1.00	1.12	N. S.	N. S.	0.87	1.05	N. S.	1.09	N. S.

N.S.: Not Separated

TAG-PI: TAG positional isomer

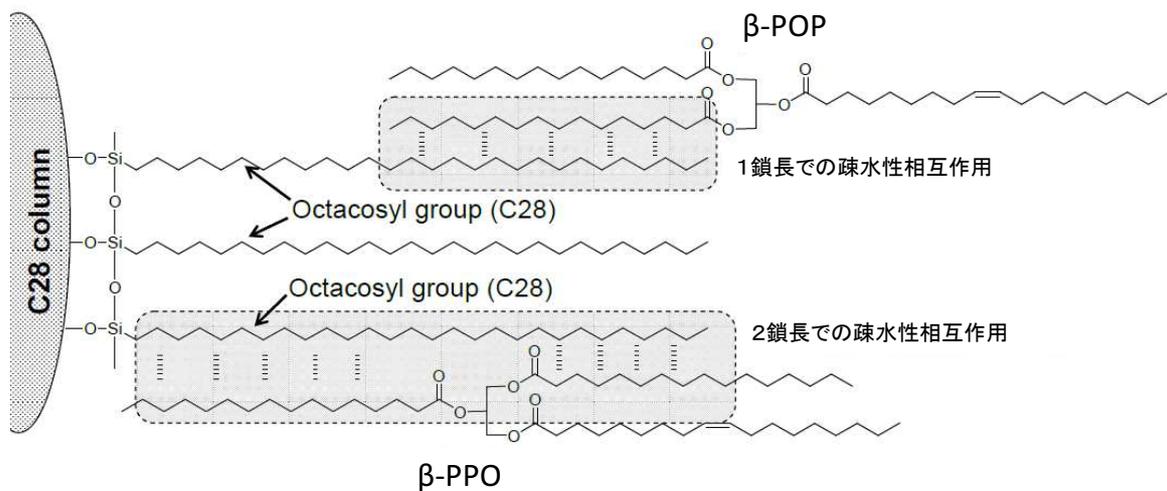


図3.4 β -POPと β -PPOのC28カラムの固定相への保持機構の違い

第四章 食用油脂中のトリアシルグリセロールの鏡像異性体分析法の開発

第一節 緒言

前章で述べたように TAG はグリセロール骨格に 3 つの脂肪酸が結合した構造をもつ食用油脂の主成分であり、その脂肪酸の結合位置によっては位置異性体、鏡像異性体を生じる。第二章、第三章では逆相 HPLC による位置異性体分離方法について述べたが、逆相 HPLC では非対称型 TAG の中に含まれる鏡像異性体を直接分離することは不可能である。

立体特異的分析により油脂の脂肪酸組成を *sn*-1~3 位の結合位置ごとに調べることによって油脂全体の特徴を知ることができる⁷⁻¹²⁾。前章で述べたように植物油は *sn*-2 位に不飽和脂肪酸が多く結合した対称型の構造をしている場合が多いが、非対称型の分布を特徴とする脂肪の存在も確認できる。牛乳に代表される反芻動物の乳脂肪は短鎖および中鎖脂肪酸が *sn*-3 位に多く結合している傾向がある¹⁰⁾。海獣油は魚油と異なり、HUFA を *sn*-1,3 位の両方あるいはいずれか一方に結合している^{11,12)}。こうした油脂にはキラルな非対称型の TAG 分子種が存在することが示唆されるが、具体的に TAG 鏡像異性体がどのような存在比で入っているかを調べるためには非対称型 TAG をクロマトグラフィーにより直接的にキラル分離することが必要である。しかし、最近までこうした分離を達成した報告は存在しなかった。唯一の例外は、岩崎らの多糖誘導体型キラルカラムを用いた *sn*-DC₈C₈/*sn*-C₈C₈D、*sn*-EC₈C₈/*sn*-C₈C₈E のキラル分離の報告である。³⁸⁾ この方法は TAG 鏡像異性体をキラル HPLC で直接分離した最初の報告であるが、ここで用いた TAG はリパーゼを使って合成したもので、*sn*-1,3 位の鎖長、不飽和度に大きな差があり、キラル HPLC で分離しやすい構造であった。このため、この方法は天然の油脂に含まれる炭素数 16-18 の飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸からなるような TAG 分子種の分析に応用されることはなかった。

HPLC の技術は近年著しく発展しており、粒子径の小さな充填剤の開発、装置の高耐圧化等により分離能の向上、分析の高速化などが可能である。キラルカラムも例外ではなく、

岩崎らが使用したカラムと同じタイプのものも充填剤の粒子径が 10 μm から 5 μm 、3 μm と小さくなり、分離度、耐久性などが大幅に向上し、キラル固定相の種類も増えて選択性の幅も広がってきている。本研究では、このようなキラルカラムを利用して天然の油脂に含まれる TAG 鏡像異性体の分離方法を開発するために、天然の油脂の多く含まれるパルミチン酸、オレイン酸からなる非対称 TAG のモデルとして *rac*-PPO を選択してキラルカラムのスクリーニングを行った。また、より高い分離能を得るために前章でも述べたリサイクル HPLC システムを併用した。さらに、スクリーニングにより得られた HPLC 条件をパーム油中の *sn*-OOP/*sn*-POO 比の分析へ応用した。

第二節 材料と方法

第一項 材料

1,2-ジパルミトイル-*sn*-グリセロール (*sn*-1,2-PP)、1,2-ジパルミトイル-*rac*-グリセロール (*rac*-1,2-PP)、1,2-ジオレオイル-*sn*-グリセロール (*sn*-1,2-OO)、1,2-ジオレオイル-*rac*-グリセロール (*rac*-1,2-OO)、1,3-ジパルミトイル-2-オレオイルグリセロール (*sn*-POP)、1,3-ジオレオイル-2-パルミトイルグリセロール (*sn*-OPO)、1,2-ジオレオイル-3-パルミトイル-*rac*-グリセロール (*rac*-OOP)、1,2-ジオレオイル-3-リノレオイル-*rac*-グリセロール (*rac*-OOL)、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸はジグマ-アルドリッチ社 (St. Louis, MO) より、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC)、4-ジメチルアミノピリジン (DMAP) は東京化成工業(株)より購入した。パーム油は市販品を用いた。その他の試薬は分析グレードの物を和光純薬工業(株)より購入して用いた。HPLC 用キラルカラム—CHIRALPAK IA, IB, IC (4.6 mm i.d. \times 250 mm, 5 μm , (株)ダイセル); CHIRALPAK AD-H, AS-H, AY-H, CHIRALCEL OD-H, OJ-H, OZ-H (4.6 mm i.d. \times 250 mm, 5 μm , (株)ダイセル); CHIRALPAK AD-RH, AS-RH, OD-RH, OJ-RH (4.6 mm i.d. \times 150 mm, 5 μm , (株)ダイセル)—を *rac*-PPO の分離条件のスクリーニングに用いた。HPLC

の溶離液に用いたメタノール等の有機溶媒は全て HPLC 用以上のグレードのものを使用した。

第二項 非対称型 TAG の合成 (*sn*-PPO, *rac*-PPO, *sn*-OOP, *rac*-PPSt, *rac*-PPL)

sn-1,2-PP, オレイン酸, EDC, DMAP, N-エチルジイソプロピルアミンを各 0.2 mmol ずつ、ジクロロメタン中、アルゴンガス存在下、0°C で 12 時間反応させた。³⁹⁾ 溶離液にヘキサン/酢酸エチル(90/10, v/v)を用いて、反応生成物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィで精製し、*sn*-PPO を収率 83% で得た。これらの構造はマスペクトルで確認した。検出されたイオンの質量電荷比 m/z 834、578、552 はそれぞれ[PPO+H]⁺、[PO]⁺、[PP]⁺ に相当する。APCI-MS/MS のイオン源のパラメーターは以下(第四項 a)に示す。*rac*-PPO、*sn*-OOP、*rac*-PPSt、*rac*-PPL も *sn*-PPO と同様に合成、精製した。*rac*-PPO は *rac*-1,2-PP とオレイン酸、*sn*-OOP は *sn*-1,2-OO とパルミチン酸、*rac*-PPSt は *rac*-1,2-PP とステアリン酸、*rac*-PPL は *rac*-1,2-PP とリノール酸を用いて合成した。これらの TAG の構造はマスペクトルで確認した。

第三項 キラルカラムのスクリーニング

a. 順相モード

順相モードでのスクリーニングには以下の装置で構成される HPLC システムを用いた。オンライン脱気装置(DGU-20A5, (株)島津製作所)、ポンプ(LC-20AB, (株)島津製作所)、オートサンプラー(SIL-20A, (株)島津製作所)、カラム恒温槽(CTO-20AC, (株)島津製作所)、UV-VIS 検出器(SPD-20A, (株)島津製作所)。*rac*-PPO をヘキサンに溶解し、濃度を 1.7 mg/mL に調整し、キラルカラム (CHIRALPAK IA, IB, IC, AD-H, AS-H, AY-H, CHIRALCEL OD-H, OJ-H, OZ-H) で分析した。溶離液にはヘキサン/エタノール (100/0.5, v/v)、あるいは、ヘキサン/2-プロパノール (100/0.5, v/v) を用いた。流量、検出波長、カラ

ム温度, 注入量は、それぞれ 1.0 mL/min, 210 nm, 25°C, 10 μ L とした。

b. 逆相モード

HPLC システムは 2.1 と同じものを使用した。*rac*-PPO をメタノールに溶解し濃度を 1.2 mg/mL に調整し、キラルカラム (CHIRALPAK IA, IB, IC, AD-RH, AS-RH, CHIRALCEL OD-RH, OJ-RH) で分析した。溶離液にはメタノール (100%)、あるいは、アセトニトリル (100%)を用いた。流量、検出波長、カラム温度, 注入量は、それぞれ 0.5 mL/min、210 nm、25°C、10 μ L とした。

第四項 リサイクル HPLC の条件

a. TAG 鏡像異性体の分離

分離検討に用いたリサイクル HPLC システム(図 2.1)は、リサイクルポンプ (PU712R, ジーエルサイエンス(株))、オートサンプラー (GL-7420, ジーエルサイエンス(株))、カラム恒温槽 (CO705C, ジーエルサイエンス(株))、UV-VIS 検出器 (UV702, ジーエルサイエンス(株))、2つの自動切換バルブ (VALVE UNIT 401, (株)フロム)から構成される。リサイクル HPLC システムは、リサイクルバルブにより目的物が十分分離するまでカラムを繰り返し循環させる機構をもつ。もう1つのバルブはリサイクル運転中にカラム外容積となるオートサンプラーの流路を切り離すために使用した。リサイクル HPLC の制御ソフトウェアには EZChrom Elite (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA)を用いた。検出には APCI-MS/MS (Quattro micro API, Waters Corporation, Milford, MA)を用い、MassLynx Ver. 4.1 (Waters Corporation)でリサイクル HPLC システムと連動させた。TAG 鏡像異性体分離用のカラムには CHIRALCEL OD-RH (4.6 mm i.d. \times 150 mm, 5 μ m)に専用のガードカートリッジ(CHIRALCEL OD-RH, 4.0 mm i.d. \times 10 mm, 5 μ m)を付けたものを用い、カラム温度を 25°C に設定し、溶離液としてメタノール(100%)を流量 0.5 mL/min で送液した。

注入量は 20 μL とし、リサイクル運転中の分離度の変化を UV 205 nm でモニターした。非対称型 TAG (図 4.1C–F; *rac*-PPO, *sn*-POO, *rac*-OOP, *sn*-OOP) を 2-プロパノールに溶解して濃度を 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整し標準溶液として用いた。*rac*-PPO/*sn*-PPO (あるいは *rac*-OOP/*sn*-OOP) 混合溶液をそれぞれ等量の *rac*-PPO 標準溶液と *sn*-PPO 標準溶液 (あるいは *rac*-OOP 標準溶液と *sn*-OOP 標準溶液) を混合して調製し、溶出順の確認のために用いた。*rac*-PPL、*rac*-OOL、*rac*-PPSt (図 4.1G–I) をそれぞれ 2-プロパノールに溶解し濃度をそれぞれ 500、1000、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整して標準溶液とした。20 μL の各標準溶液をオートサンプラーから注入し、カラムと UV 検出器を通過した分析種のピークをリサイクルバルブを経由してポンプ入口に戻すことにより、分析種が十分分離するまで繰り返しカラムを循環通過させた。標準溶液として調製した分析種のキラル分離の可否は UV クロマトグラムで確認した。また、ピークが十分分離した後にリサイクルバルブを元に戻し、APCI-MS/MS で検出した。イオン源のパラメーターは以下のとおりである。イオン化モード：APCI ポジティブ，コロナ電流：3.0 μA ，ソースブロック温度：120°C，脱溶媒温度：450°C，コーンガス流量：50 L/h，脱溶媒ガス流量：200 L/h，データ取得モード：スキャン m/z 500–1000，スキャン時間：0.5 s，コーン電圧：20 V。

b. TAG 位置異性体の分離

上記 a で用いたリサイクル HPLC システムを TAG 位置異性体 (*sn*-POP/*rac* (or *sn*)-PPO, *sn*-OPO/*rac* (or *sn*)-OOP) 分離にも用いた。TAG 位置異性体のペア *sn*-POP/*rac*-PPO (1/1 混合物)、*rac*-PPO、*sn*-PPO、*sn*-OPO/*rac*-OOP (1/1 混合物)、*rac*-OOP、*sn*-OOP を 2-プロパノールに溶解し、それぞれの濃度が 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように調整して標準溶液とした。2 本連結したノンエンドキャップ ODS カラム (Inertsil ODS-P, 4.6 mm i.d. \times 250 mm, 5 μm , ジーエルサイエンス(株)) を用い、カラム温度は *sn*-POP/*rac*-PPO 分離の場合は 25°C に、*sn*-OPO/*rac*-OOP 分離の場合は 10°C に設定した。アセトニトリル/2-プロパノール/ヘキサン (3/2/1, v/v/v) を移動相とし、流量 1.0 mL/min で送液した。オートサンプラーの注入

量は 10 μL 、UV-VIS 検出器の波長は 205 nm に設定した。APCI-MS/MS のパラメーターは、コーン電圧を除き TAG 鏡像異性体分離と同じ条件とした。イオン源での衝突誘起解離 (collision-induced dissociation, CID) により DAG イオンの生成を促進するため、コーン電圧を 40 V に設定した。

第五項 パーム油中の *sn*-OOP/*sn*-POO 比の分析

a. 逆相 HPLC による β -OOP の分画

パーム油をアセトンで希釈し濃度を 0.5% に調整した。これをカラム温度 10°C に設定したポリメリック ODS カラムとリサイクル HPLC システムを用いて β -OPO と β -OOP を分離し、 β -OOP に相当するピークを分取した。オートサンプラーの注入量は 20 μL とした。HPLC、MS/MS の条件は第四項 b と同じ条件を用い、リサイクル運転によるカラムの通過回数は 4 回とした。分取した β -OOP はエバポレーターで減圧濃縮した。

b. β -OOP のキラル分離

第五項 a で濃縮乾固した β -OOP 画分を 200 μL の 2-プロパノールに溶解し、そのうち 20 μL をキラル HPLC 分析に供した。分離にはリサイクルシステムを使用し、検出には APCI-MS/MS を用いた。分析条件は第四項 a に従った。*sn*-OOP と *sn*-POO を選択的に検出するために SRM モードを使用した。プレカーサーイオンに $[\text{M}+\text{H}]^+$ に相当する m/z 860、プロダクトイオンに $[\text{M}-\text{RCO}_2]^+$ に相当する m/z 578 を設定した。コーン電圧は 20 V、コリジョンエネルギーは 26 eV に設定した。

第三節 結果と考察

第一項 キラルカラムスクリーニング

初めに *rac*-PPO のキラル分離を指標として、キラルカラムのスクリーニングを行った。

スクリーニングに用いた多糖誘導体型キラルカラムの中で、CHIRALCEL OD-RH のみが *rac*-PPO を *sn*-PPO と *sn*-OPP にわずかに分離させることができた。この分離は移動相としてメタノール(100%)を用いたときのみ達成されたが、アセトニトリル(100%)ではどのカラムを用いても *rac*-PPO を分離することができなくなった。分離度を上げるためメタノール、あるいは、アセトニトリルに蒸留水を 20% 添加した移動相を用いるとピークは溶出しなくなった。岩崎らは CHIRALCEL OD-H、OD-RH と同種のキラル固定相を持つ順相モード用の CHIRALCEL OD で *sn*-EC₈C₈/*sn*-C₈C₈E または *sn*-DC₈C₈/*sn*-C₈C₈D の分離を達成しているが³⁸⁾、本研究では順相モード用の CHIRALCEL OD-H は *rac*-PPO を分離することはできなかった。CHIRALPAK IA, IB, AD-RH は CHIRALCEL OD-RH と同じ 3,5-dimethylphenylcarbamate を多糖の置換基として採用しているが、いずれのカラムも *rac*-PPO を分離することはできなかった。特に、CHIRALPAK IB は CHIRALCEL OD-RH と同じセルロースであるが、シリカゲル担体に多糖誘導体が化学結合により固定化されている点が異なっている。おそらく、この化学結合処理がキラル固定相の立体構造に影響を及ぼし分離能を損ねていると考えられる。CHIRALPAK AD-RH は CHIRALCEL OD-RH と同様にコーティング型のキラル固定相を採用しているがアミロースを骨格とするキラル固定相を採用している。CHIRALCEL OJ-RH はセルロース骨格の置換基が 4-methylbenzoate である以外は CHIRALCEL OD-RH と同じである。これらはいずれも CHIRALCEL OD-RH と共通の要素を持つが *rac*-PPO を分離することはできなかった。

これらの結果から、*rac*-PPO の分離にはキラルカラムの構成要素である多糖の種類、置換基の種類、キラル固定相の固定化方法の組合せが不可欠であり、CHIRALCEL OD-RH の cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) がコーティングされたシリカゲルがキラル固定相として最適であることが分かった。移動相として用いたメタノールも *rac*-PPO のキラル分離に必要な要素であり、これは CHIRALCEL OD-RH のキラル固定相がメタノール中で *sn*-PPO/*sn*-OPP の認識に必要な高次構造を取ることが理由の一つとして考えられる。

故に、我々はカラムに CHIRALCEL OD-RH、移動相にメタノールを採用し、以降の TAG 鏡像異性体分離の研究を行った。また、さらに高い分離能を得るためにリサイクル HPLC システムも併用した。

第二項 TAG 鏡像異性体の溶出順

図 4.2A は CHIRALCEL OD-RH による *rac*-PPO のリサイクル分離を示した UV クロマトグラムである。*rac*-PPO が繰り返しカラムを通過することにより、徐々に *sn*-OPP と *sn*-PPO に分離していく様子を示している。ベースラインレベルが徐々に上がっているのは、*rac*-PPO の UV 吸収がベースラインの上昇を無視できるほど十分に大きくないためである。分離後、これらのピークを APCI-MS/MS へ導入しマススペクトルを得た。図 4.3A, 4.3B, 4.3C は PPO のプロトン化分子に相当する m/z 834 の抽出イオンクロマトグラム(Extract ion current chromatogram, EICC)である。図 4.3A は図 4.2A に示した *rac*-PPO のリサイクル分離後の EICC を示している。*sn*-PPO と *sn*-OPP の溶出順を確認するため、*rac*-PPO と *sn*-PPO を同時に分析した。図 4.3B, 4.3C はそれぞれ *sn*-PPO、*sn*-PPO/*rac*-PPO 混合物の EICC を示している。これらの結果から、*sn*-PPO は *sn*-OPP の後に溶出することが分かった。これらの非対称型 TAG のマススペクトルは全て同一であった(データは示さない)。さらに、この分離が *rac*-PPO のキラル分離を確認するために、*rac*-PPO や *sn*-PPO の中に位置異性体である *sn*-POP (図 4.1A)が混入しているかどうかを調べた。*rac*-PPO や *sn*-PPO の合成中に原料である *rac*-1,2-PP (あるいは *sn*-1,2-PP) からアシル転移反応⁴⁰⁾により *sn*-1,3-PP が生じていれば、*rac*-PPO や *sn*-PPO の中に *sn*-POP が副生成物として含まれる可能性があるからである。図 4.4A は非エンドキャップ型ポリメリック ODS カラム³⁷⁾とリサイクル HPLC システム²⁷⁾を用いて位置異性体の標品である *sn*-POP と *rac*-PPO を分離したクロマトグラムである。この手法で、キラル分離に用いた *rac*-PPO、*sn*-PPO を分析したところ、これらに *sn*-POP の混入がないことが確認された (図 4.4B, 4.4C)。このとき分

離を達成するために必要なカラム温度は 25°C であるが、この温度は分析に用いた TAG の結晶化開始点に近い温度である。この分析に用いたポリメリック ODS カラムは炭素量が他の一般的なモノメリック ODS カラムよりも多く、このように TAG の結晶化開始点付近のカラム温度で分析を行うとテーリングを引き起こしてしまう問題もある。しかし、不純物として可能性のある *sn*-POP は、*rac*-PPO (あるいは *sn*-PPO) よりも先に溶出するため、テーリングの影響を受けずに検出されるはずである。*rac*-PPO と *sn*-PPO のマススペクトル (図 4.5C, 4.5D) を標品である *sn*-POP/*rac*-PPO を HPLC で分離した *rac*-PPO (図 4.5B) と比べると、*m/z* 552, 578 ([PP]⁺と[PO]⁺に相当する) のイオン比が同一であり、このことも *rac*-PPO と *sn*-PPO には *sn*-POP (図 4.5A) の混入のないことを裏付けている。

rac-PPO の場合と同様に、図 4.2B のクロマトグラムは *rac*-OOP のそれぞれの鏡像異性体である *sn*-OOP/*sn*-POO へのキラル分離を示している。図 4.6A, 4.6B, 4.6C は OOP のプロトン化分子に相当する *m/z* 860 の EICC であり、図 4.6A は図 4.2B に示した *rac*-OOP のリサイクル分離後の EICC を示している。*sn*-OOP と *sn*-POO の溶出順を確認するため、*rac*-OOP と *sn*-OOP を同時に分析した。図 4.6B, 4.6C はそれぞれ *sn*-OOP、*sn*-OOP/*rac*-OOP 混合物の EICC を示している。これらの結果から、*sn*-OOP は *sn*-POO の前に溶出することが分かった。これらの非対称型 TAG のマススペクトルは全て同一であった (データは示さない)。さらに、この分離が *rac*-OOP のキラル分離を確認するために、*rac*-OOP や *sn*-OOP の中に位置異性体である *sn*-OPO が混入しているかどうかを調べた。カラム温度を 10°C とし、非エンドキャップ型ポリメリック ODS カラムとリサイクル HPLC システムを用いて、*rac*-OOP、*sn*-OOP を分析したところ、これらに *sn*-OPO の混入がないことが確認された。このときの、*rac*-OOP、*sn*-OOP のピークの前に *sn*-OPO は検出されず、*rac*-OOP、*sn*-OOP のマススペクトルの *m/z* 578, 603 ([PO]⁺と[OO]⁺に相当する) のイオン比も同一であった。

第三項 パーム油中の *sn*-OOP と *sn*-POO の存在比の分析

前述の分析法を用いて、パーム油中の *sn*-OOP/*sn*-POO の存在比を調べた。このキラル分離を行う前に、逆相 HPLC を用いてパーム油中の *sn*-OOP と *sn*-POO を含む画分 (β -OOP 画分と同義) を分画する必要があった(図 4.7)。これはキラル HPLC で SRM モードにより *sn*-OOP/*sn*-POO を検出する際に、位置異性体である *sn*-OPO (β -OPO と同義) がほぼ同じ保持時間に溶出してピークが重なってしまうためである。逆相 HPLC により非対称型 TAG である β -OOP を分画し、これをキラル HPLC で分析した結果、パーム油中の *sn*-OOP/*sn*-POO 比は、およそ *sn*-OOP/*sn*-POO=3/2 であることが分かった(図 4.8)。個々の鏡像異性体の物理的性質は等しく、イオン源でのイオン化やフラグメンテーションの起こり方に差はないと考えられるため、SRM クロマトグラムのピーク面積比をそのまま存在比とみなした。

第四項 キラル分離が可能な TAG の構造

CHIRALCEL OD-RH で分離可能な非対称型 TAG の構造的特徴を調べるために、*rac*-PPL、*rac*-OOL、*rac*-PPSt がこのカラムで分離が達成されるかどうかを調べた。その結果、*rac*-PPL (図 4.9A) はそれぞれの鏡像異性体に分離されたが、*rac*-OOL、*rac*-PPSt は分離されなかった(図 4.9B, 4.9C)。これらの結果は、*rac*-PPO、*rac*-OOP (図 4.2A, B) が分離されることから、*sn*-1,3 位にパルミチン酸のような飽和脂肪酸とオレイン酸、リノール酸のような不飽和脂肪酸をともに持つことがキラル分離が達成されるために必要な構造であることを示している。これらのキラル認識機構は“three-point attachment model”と呼ばれるにより説明できる可能性がある。これはキラル認識の原則を説明するために一般的に引用されるモデルである⁴¹⁻⁴²。このモデルでは、キラル受容体とキラルな基質(分析種)との間に少なくとも 3 種類の相互作用が働くことが必要であるとされている。この場合、*sn*-PPO のような非対称型 TAG では、*sn*-1 位と *sn*-2 位に結合した 2 種類のパルミチン酸

とキラル固定相の間に2種類の疎水的相互作用が働き、*sn*-3位に結合したオレイン酸とキラル固定相の間に π 電子相互作用が働いているため、*sn*-PPOと*sn*-OPPでは保持に差が生まれるのではないかと考えられる。これらが*rac*-PPOのキラル分離が可能な理由と考えられる。同じように、このモデルを使えば*rac*-OOP、*rac*-PPLのキラル分離も説明できる。本研究では、パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸から成るTAGとキラル固定相の“three-point attachment model”を仮定して実験を行ったが、アシル基の鎖長、二重結合の数、位置等が異なる非対称型TAGがキラル固定相と3つの異なる相互作用を形成することができるか否かも調べる必要がある。今後、短鎖、中鎖、長鎖の飽和脂肪酸から構成される非対称型TAG、モノ不飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸、およびこれらの異性体を含むような非対称型TAGのキラル分離について研究を進めていく予定である。

結論

本研究により、cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate)がコーティングされたシリカゲルを固定相とするCHIRALCEL OD-RHをリサイクルHPLCと併用することで、非対称型TAGのラセミ体である*rac*-PPO、*rac*-OOP、*rac*-PPLを個々の鏡像異性体にキラル分離できることが明らかとなった。我々の開発した新しいキラルHPLC法をAPCI-MS/MSと組み合わせることによって、パーム油中の*sn*-OOP/*sn*-POO存在比を直接測定することができた。これは天然に存在する非対称型TAGの初めてのキラルHPLCによる直接分離である。今後、この手法が多価不飽和脂肪酸、トランス脂肪酸、鎖長差のある飽和脂肪酸などから成る非対称型TAGを認識できるかどうか明らかにしていくことが必要である。キラル固定相により認識されるTAGの構造を調べていくことにより、さらに詳細なキラル認識メカニズムが分かっていくであろう。また、この手法は天然の非対称型TAG分析に応用することができ、これにより脂質代謝や食用油脂の物性の研究に新たな知見が得られるであろう。

表4.1 *rac*-PPOのキラル分離のスクリーニングを行った多糖誘導体型キラルカラムの特徴

カラム名	キラル固定相		シリカゲル上のキラル固定相の状態	<i>rac</i> -PPOのキラル分離	
	多糖の種類	置換基		順相	逆相
CHIRALPAK IA	Amylose	3,5-Dimethylphenylcarbamate	固定化	不可	不可
CHIRALPAK IB	Cellulose	3,5-Dimethylphenylcarbamate	固定化	不可	不可
CHIRALPAK IC	Cellulose	3,5-Dichlorophenylcarbamate	固定化	不可	不可
CHIRALPAK AD-H or AD-RH	Amylose	3,5-Dimethylphenylcarbamate	コーティング	不可	不可
CHIRALPAK AS-H or AS-RH	Amylose	(S)- α -Methylbenzylcarbamate	コーティング	不可	不可
CHIRALPAK AY-H	Amylose	5-Chloro-2-methylphenylcarbamate	コーティング	不可	X
CHIRALCEL OD-H or OD-RH	Cellulose	3,5-Dimethylphenylcarbamate	コーティング	不可	可 (OD-RH)
CHIRALCEL OJ-H or OJ-RH	Cellulose	4-Methylbenzoate	コーティング	不可	不可
CHIRALCEL OZ-H	Cellulose	3-Chloro-4-methylphenylcarbamate	コーティング	不可	X

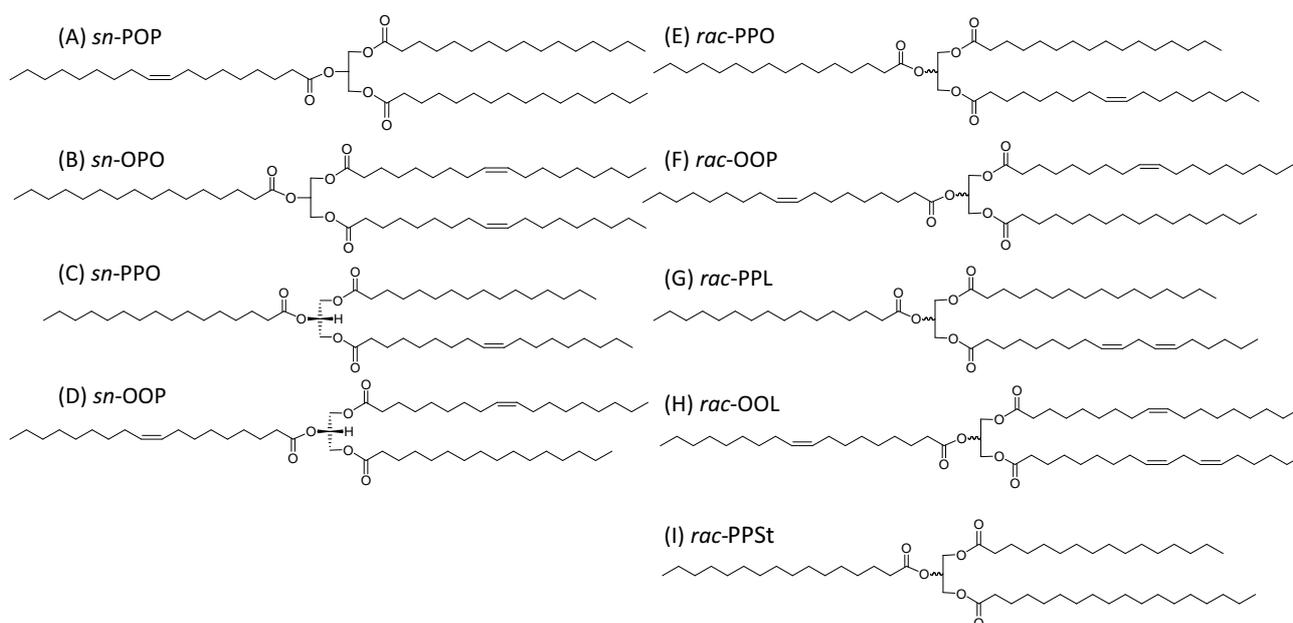


図4.1 分析に用いた対称型、非対称型TAGの構造

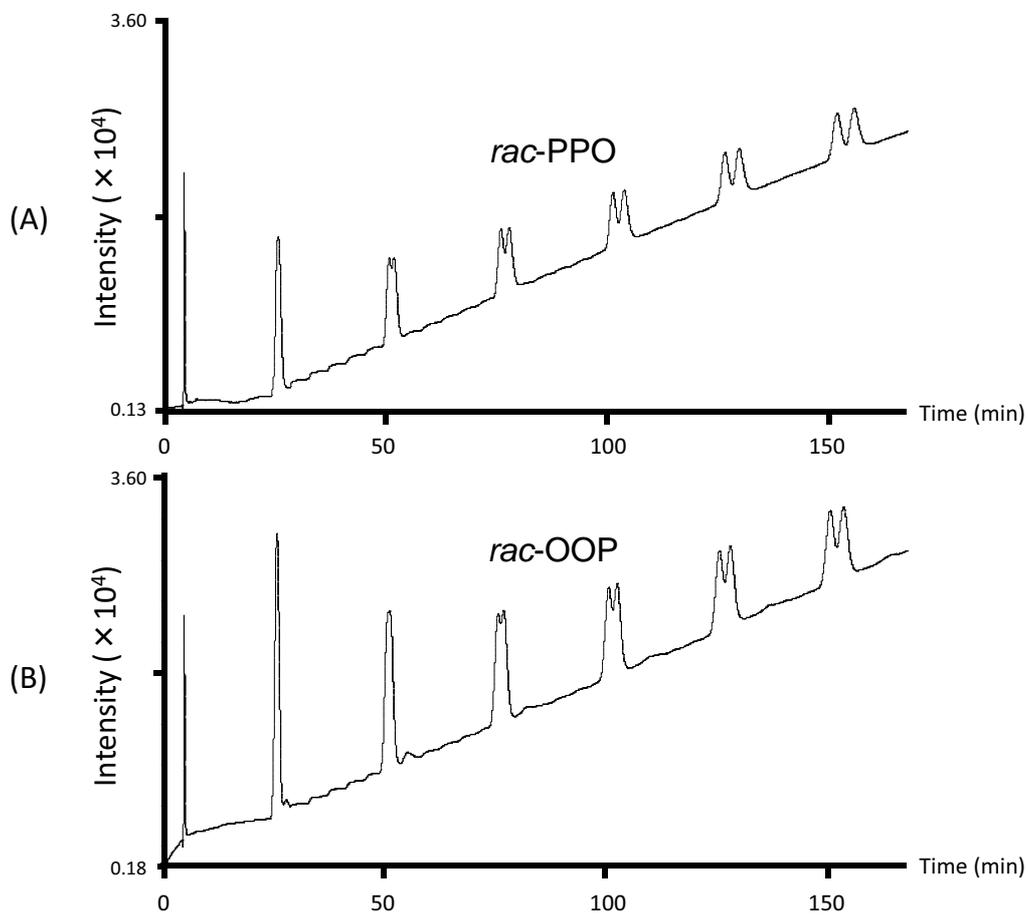


図4.2 CHIRALCEL OD-RHによる*rac*-PPOと*rac*-OOPのキラル分離

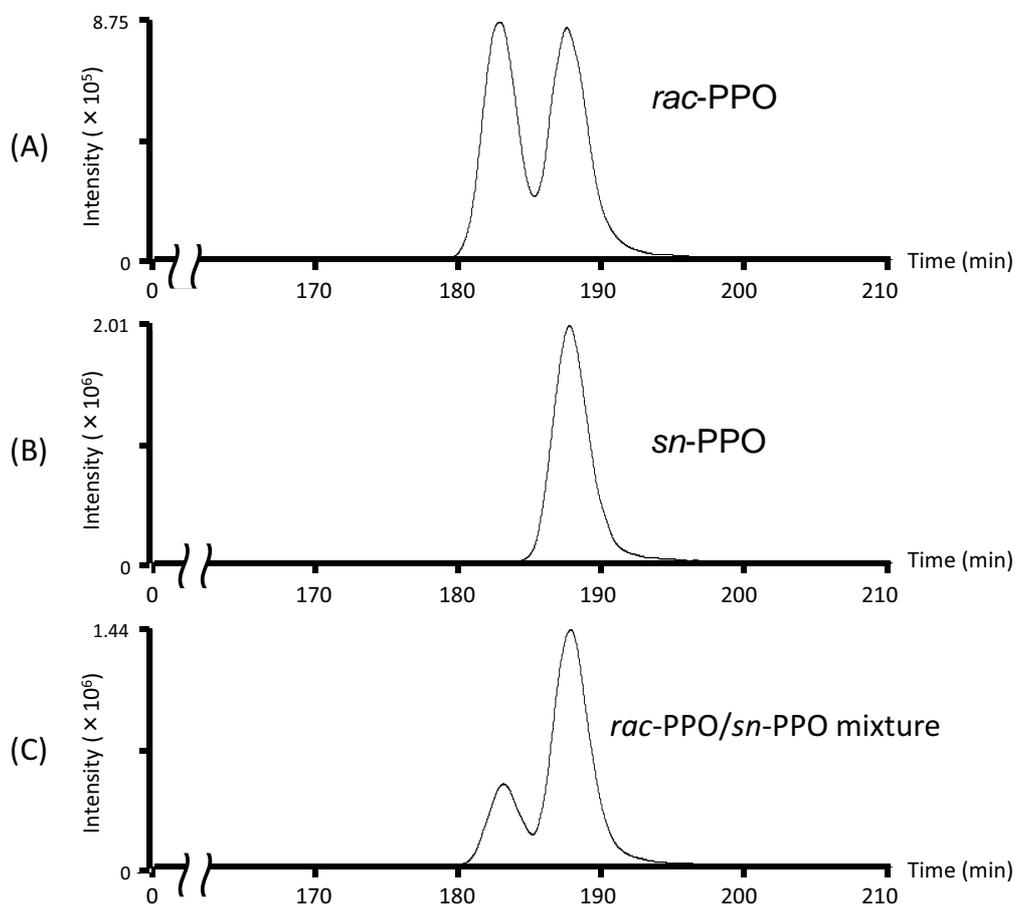


図4.3 CHIRALCEL OD-RHによる*sn*-PPOと*sn*-OPPの溶出順

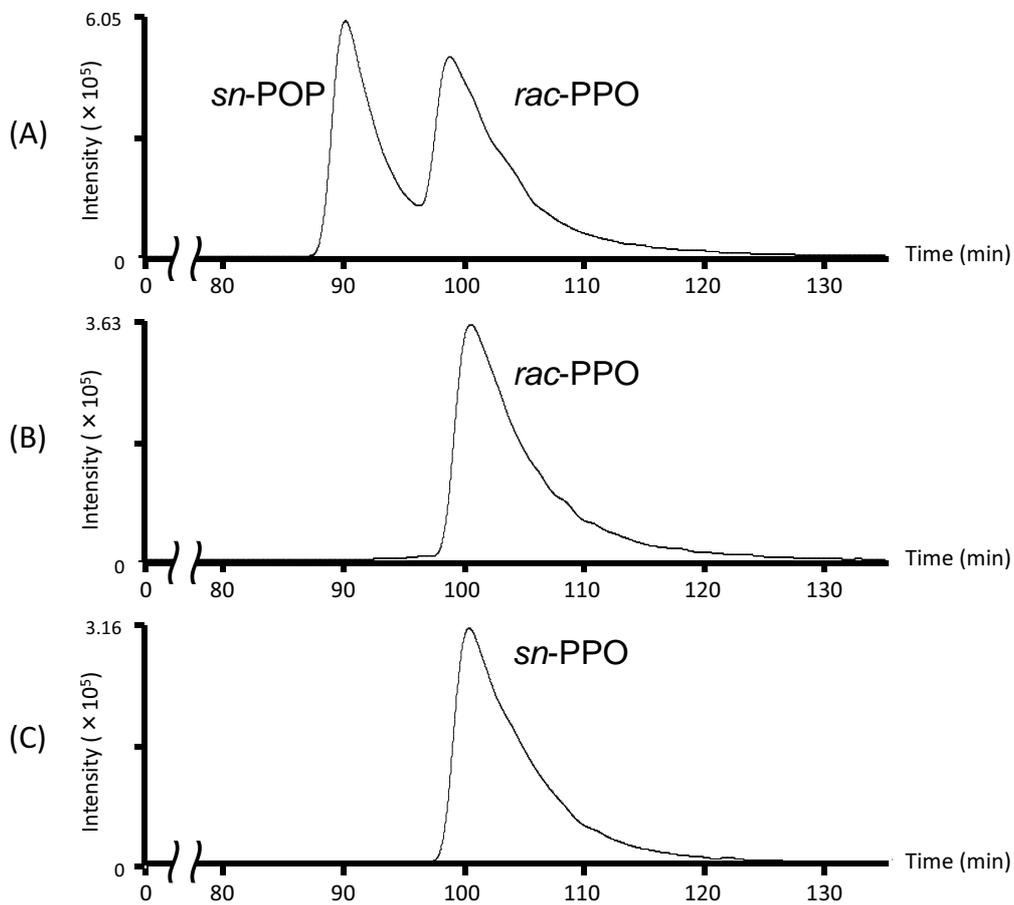


図4.4 逆相HPLCによる(A) *sn*-POPと*rac*-PPO、(B)*rac*-PPO、(C)*sn*-PPOの分離

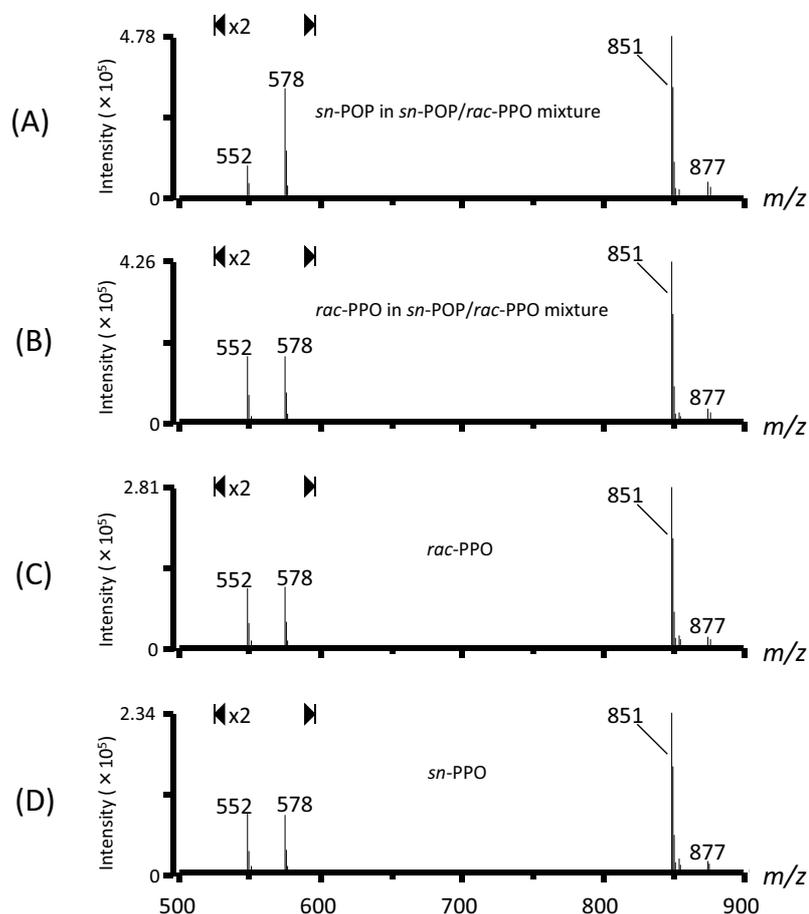


図4.5 (A) *sn*-POPと*rac*-PPOの混合物から分離した*sn*-POP、(B) *sn*-POPと*rac*-PPOの混合物から分離した*rac*-PPO、(C)*rac*-PPO、(D)*sn*-PPOのマスペクトル

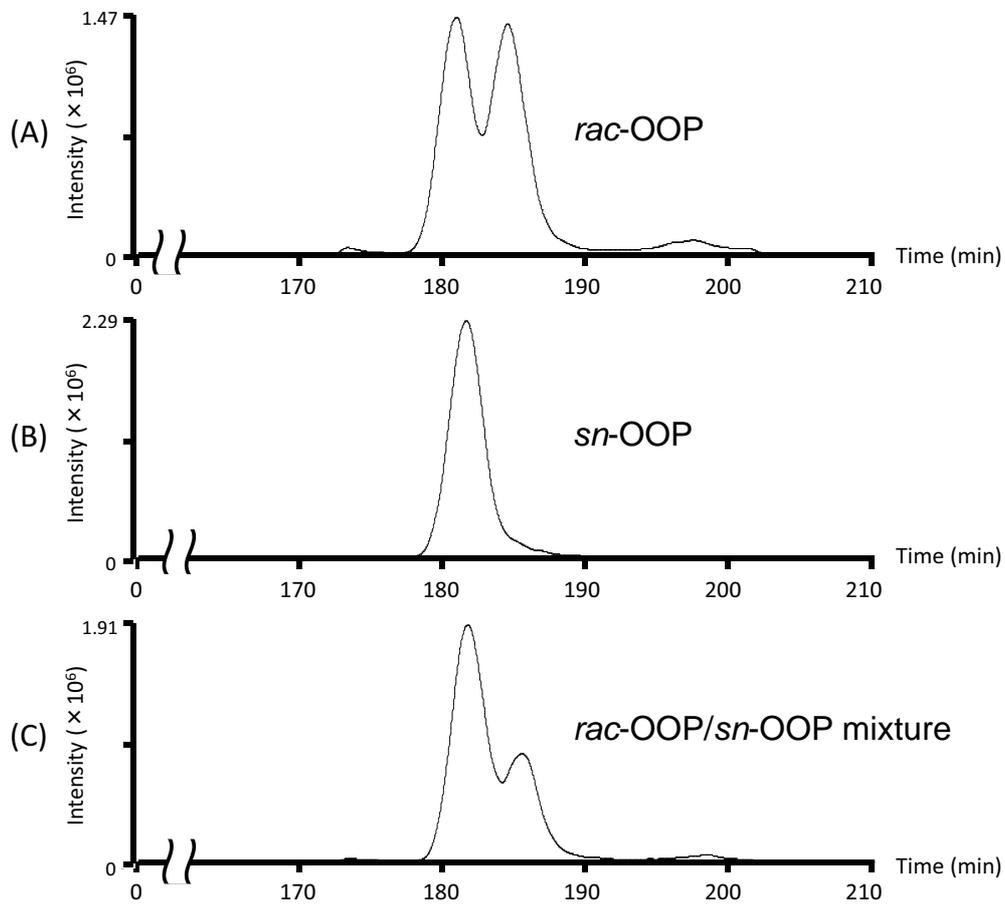


図4.6 CHIRALCEL OD-RHによる*sn*-OOPと*sn*-POOの溶出順

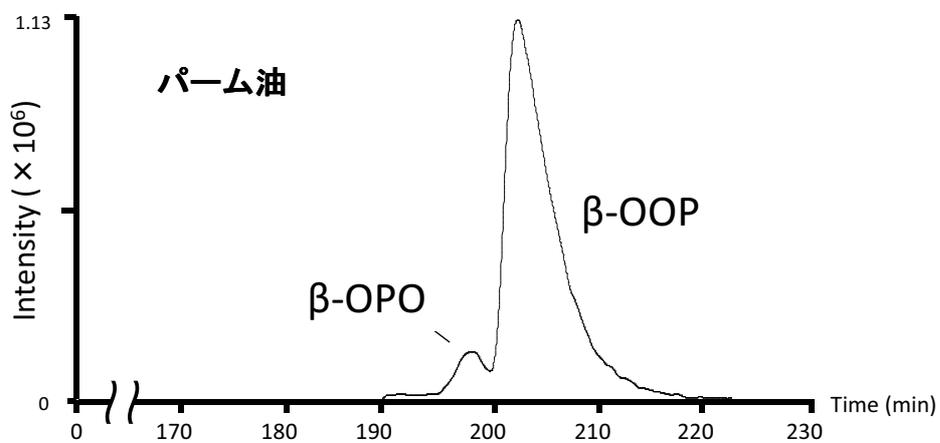


図4.7 逆相HPLCによるパーム油中の β -OOP画分の分取

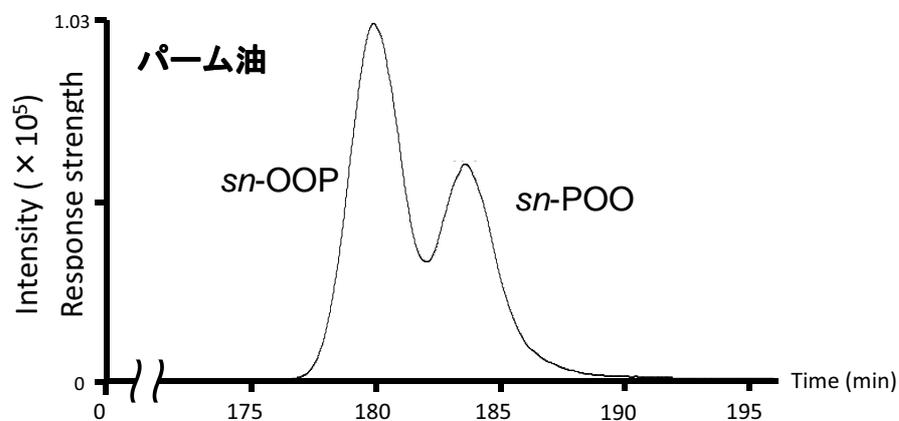


図4.8 CHIRALCEL OD-RHによるパーム油中の β -OOP画分のキラル分離

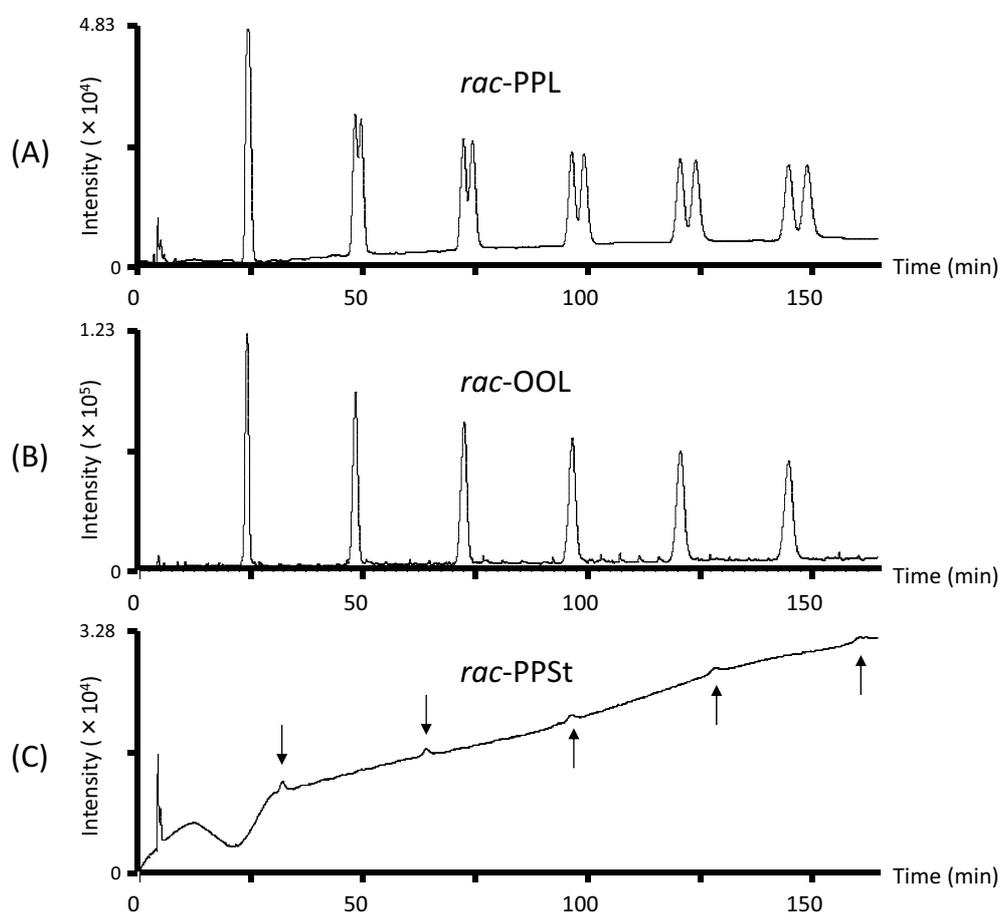


図4.9 CHIRALCEL OD-RHによる *rac*-PPL, *rac*-OOL, *rac*-PPSt の分離挙動 43

第五章 魚油および海獣油中のトリアシルグリセロールの位置・鏡像異性体分析

第一節 緒言

天然の油脂の特徴を知るための脂肪酸組成を分析する機会が多い。しかし、前述のごとく油脂の主成分は TAG¹⁾であり、油脂全体の脂肪酸組成のみでは、油脂の物性や栄養に寄与する TAG としての組成を知ることはできない。TAG の組成、すなわち、3つの脂肪酸の“組合せ”としての TAG 分子種は逆相 HPLC を用いれば分離することができるが、前章までに述べた分離モードを除き、汎用性が高く一般に用いられることの多いモノメリック型の ODS カラム等では TAG 異性体を分離することはできなかった。このため、Brockerhoff、板橋らにより開発された立体特異的分析⁴⁻⁶⁾により、植物油、動物脂、乳脂、魚油等のグリセロール骨格上の *sn*-1,2,3 位毎に脂肪酸組成が明らかにされてきた⁷⁻¹²⁾。グリセロール骨格上の脂肪酸の結合位置は TAG 全体の構造を反映するものであるため、個々の TAG と同様に油脂の物性や栄養に影響を及ぼす。特に魚油等に含まれる EPA、DHA など HUFA は脂質代謝等に影響を及ぼす生理活性^{43,44)}をもっており、その結合位置を調べる意義は大きい。例えば、魚類は HUFA が *sn*-2 位に、アザラシなどの海獣類は *sn*-1,3 位に偏在することが報告されている¹¹⁾。このような立体特異的分析は、油脂全体の脂肪酸の結合位置を知ることができる優れた方法であるが、非破壊で TAG 分子種を測定することはできない。油脂を構成する TAG の特徴を全てとらえるには、脂肪酸結合位置を区別した TAG 分子種分析が必要である。これまでこのような分析は技術的に困難であったため行われてこなかったが、これまでに述べてきた第二章、第三章の TAG 位置異性体分析法、第四章の鏡像異性体分析法を組み合わせれば、TAG を構成する脂肪酸に制約はあるものの、魚油や海獣油の立体特異的分析から予想される具体的な TAG の構造や組成を分析できると考えられる。第四章では、逆相 HPLC を用いてパーム油の *B*-OOP 画分を分取し、これをリサイクルシステムを備えたキラル HPLC で分離することによりパーム油の *sn*-OOP/*sn*-POO 比を

測定することに成功している。

そこで本研究では、魚油、海獣油を構成する脂肪酸の中の HUFA と主要な飽和脂肪酸であるパルミチン酸からなる TAG 分子種をターゲットとして、これらの位置異性体・鏡像異性体分析を試みた。初めに、ポリメリック ODS カラムを用いた逆相 HPLC により TAG 位置異性体存在比を分析した。その中から非対称型 TAG を分画し、キラル HPLC によりその鏡像異性体存在比を分析した。これらの TAG 異性体存在比を既に報告されている立体特異的分析による HUFA のグリセロール骨格上の分布^{11,12)}と比較した。

第二節 材料と方法

第一項 材料

表 5.1 に実験に用いた TAG を示した。これらはすべて自社製品である。他の HPLC の移動相などの試薬は全て和光純薬工業(株)の HPLC 用以上のグレードのものを用いた。魚類は東京都内のスーパーマーケットで購入した。タテゴトアザラシ油は東京都内の健康食品販売店からカプセルを購入し抽出した。トド肉は兵庫県たつの市の食肉店より通販にて購入した。

第二項 脂質の抽出と TAG の分画

魚肉およびトド肉から Bligh & Dyer 法⁴⁵⁾で脂質を抽出した。タテゴトアザラシ油はカプセルから取り出した。得られた脂質をそれぞれヘキサンに希釈し、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (Thin layer chromatography, TLC) プレートにスポットし、TLC プレートを石油エーテル/ジエチルエーテル/酢酸(80:20:1, v/v/v)で展開した。トリオレインを標準品として同時に展開し、同じ Rf 値を示すバンドをかき取りクロロホルム/メタノール(20:1, v/v)で TAG を抽出した。抽出した TAG 画分はロータリーエバポレーターで減圧乾固させ、秤量後 2-プロパノールに溶解させた。分析するまでの間、これらの試料溶液はスクリー

キャップ付バイアル瓶にアルゴンガスを封入し-40°C で保管した。

第三項 TAG 画分中の β -DPD/ β -DDP、 β -EPE/ β -EEP の部分精製

試料である TAG 画分中の β -DPD/ β -DDP、 β -EPE/ β -EEP は非常に少ないため、LC/MS 分析（第二節 第四項）の前に部分精製を行なった。HPLC には、ポンプ(LC-10AD, (株)島津製作所)、UV-VIS 検出器(SPD-10A, (株)島津製作所)、200 μ L サンプルループを備えたインジェクションバルブ (Model 7725, Rheodyne LLC, Rohnert Park, CA)、ODS カラム (Inertsil ODS, 250 mm \times 10 mm i.d., 10 μ m, ジーエルサイエンス(株))から構成されるシステムを用いた。TAG を 2-プロパノールで濃度を約 1%に調整し、セミ分取用逆相 HPLC により精製した。HPLC 条件を以下に示す。移動相：アセトニトリル/2-プロパノール(70:30, v/v)、流量：3.0 mL/min、検出波長：215 nm、カラム温度：25°C、注入量：100 μ L、試料溶液：TAG で 2-プロパノールで濃度を 1%に調整したもの。 β -DPD/ β -DDP と β -EPE/ β -EEP が保持時間 11 min 付近に溶出することを標準品を用いて確認し、このピークを分取した(データは示さない)。この画分を濃縮し、濃度を 1000 μ g/mL に調整した。

第四項 TAG 位置異性体分析

8 種類の TAG 異性体 *rac*-PPD、 β -PDP、*rac*-PPE、 β -PEP、*rac*-PDD、 β -DPD、*rac*-PEE、 β -EPE を標準品として用いた。これら標準品を全て等量ずつ混合し、2-プロパノールでそれぞれの濃度が 1000、500、250、100、50 μ g/mL になるように調整し、LC/MS の SIM モードで検量線作成に用いた。装置の構成、分析条件を以下に示す。LC/MS は、ポンプ (PU-611C, ジーエルサイエンス(株))、UV-VIS 検出器 (UV-702, ジーエルサイエンス(株))、カラム恒温槽 (MO-706, ジーエルサイエンス(株))、50 μ L サンプルループを備えたインジェクションバルブ (Model 7725, Rheodyne LLC)、APCI-MS (ZMD, Waters Corporation, Milford, MA)、ポリメリック型 ODS カラム (Inertsil ODS-P, 250 mm \times 4.6 mm, i.d. 5 μ m,

ジーエルサイエンス(株)、2本直列に連結して使用)でシステムを構成した。β-PDP/β-PPD または β-PEP/β-PPE の分離の場合、カラム温度：18°C、移動相：アセトニトリル/2-プロパノール/ヘキサン (3:2:1, v/v/v)、流量：0.8 mL/min、注入量：20 μL とした。β-DPD/β-PDD または β-EPE/β-PEE の分離の場合、カラム温度：22°C、移動相：アセトニトリル/2-プロパノール (3:2, v/v)、流量：0.8 mL/min、注入量：20 μL とした。質量分析計のイオン源は、イオン化モード：APCI ポジティブ、キャピラリー電圧：3.5 kV、コーン電圧：40 V、ソースブロック温度：135°C、脱溶媒温度：400°C、脱溶媒ガス流量：500 L/h に設定した。SIM モードにおけるモニタリングイオンは m/z 871、897、917、969 に設定した。これらはそれぞれ、β-PEP/β-PPE、β-PDP/β-PPD、β-EPE/β-PEE、β-DPD/β-PDD のアンモニウムイオン付加分子に相当する。第二項、第三項で調製した TAG 試料溶液を上記の標準溶液と同じように分析し、測定は3回繰り返した。それぞれの標準品の SIM クロマトグラムから得られたピークエリアから検量線を作成し、TAG 位置異性体間の傾きの比を補正係数として、試料中の TAG 位置異性体の応答強度の差を補正することによりそれぞれの存在比を求めた。

第五項 魚油、海獣油中の TAG 中の非対称型 TAG の分画

第四項の方法に従って、非対称型 TAG (β-PPD, β-PPE, β-DDP, β-EEP) の分画を行った。魚油、海獣油の TAG 画分の濃度を約 1 mg/mL に調整し、20 μL ずつ分取を行った。それぞれの保持時間は標準品の SIM クロマトグラムを用いて確認した。得られた画分は窒素気流化で濃縮し、2-プロパノールに再溶解させて濃度を約 100 μg/mL に調整した。

第六項 リサイクルシステムを付したキラル HPLC による TAG 鏡像異性体分析

第五項で分画した非対称型 TAG 画分をキラル HPLC によりそれぞれの鏡像異性体に分離してその存在比を求めた。分離に用いたリサイクル HPLC システムは、第四章第四項 a と同じものを使用した。キラルカラムは、*sn*-PPD/*sn*-DPP、*sn*-DDP/*sn*-PDD、または、

sn-PPE/*sn*-EPP を分離するためには CHIRALCEL OD-RH (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, (株)ダイセル)に専用のガードカートリッジ(CHIRALCEL OD-RH, 4.0 mm i.d. × 10 mm, 5 μm, (株)ダイセル)をつけたものを用い、*sn*-EEP/*sn*-PEE を分離するためには CHIRALCEL OZ-3R (4.6 mm i.d. × 150 mm, 3 μm, (株)ダイセル)に専用のガードカートリッジ (CHIRALCEL OZ-3R, 4.0 mm i.d. × 10 mm, 3 μm, (株)ダイセル)をつけたものを用いた。カラム温度を 25°C に設定し、溶離液としてメタノール(100%)を流量 0.5 mL/min で送液した。注入量は 10 μL とし、リサイクル運転中の分離度の変化を UV 205 nm でモニターした。非対称型 TAG の標準品 *rac*-PPD、*rac*-PPE、*rac*-DDP、*rac*-EEP を 2-プロパノールに溶解して濃度を 1 mg/mL に調整し標準溶液として用いた。10 μL の各標準溶液をオートサンプラーから注入し、カラムと UV 検出器を通過した後のピークをリサイクルバルブを経由して再びポンプ入口に戻すことにより、分析種が十分分離するまで繰り返しカラムを循環通過させた。また、TAG 鏡像異性体のピークが十分分離した後にリサイクルバルブを元に戻し、APCI-MS/MS の SRM モードで検出した。イオン源のパラメーターは以下のとおりである。イオン化モード:APCI ポジティブ, コロナ電流:3.0 μA, ソースブロック温度:120°C, 脱溶媒温度:450°C, コーンガス流量:50 L/h, 脱溶媒ガス流量:200 L/h, データ取得モード:SRM モード (SRM トランジションは *sn*-PPD/*sn*-DPP、*sn*-PPE/*sn*-EPP、*sn*-DDP/*sn*-PDD、*sn*-EEP/*sn*-PEE の検出のために、それぞれ *m/z* 880>625、854>597、952>625、900>597 に設定した)。上記の条件で、分画した非対称型 TAG 画分を分析した。測定はそれぞれ3回ずつ行った。各 TAG 鏡像異性体の溶出順は *sn*-PPD、*sn*-PPE、*sn*-DDP、*sn*-EEP の標準品とそれぞれのラセミ体の溶出パターンを比較して確認した。TAG 鏡像異性体存在比は SRM クロマトグラムのピーク面積比をそのまま用い、これを第四項で求めた非対称型の存在比に乗じて全ての異性体の存在比を求めた。

第三節 結果と考察

第一項 TAG 位置異性体分析

本研究では、トド、タテゴトアザラシ、キハダマグロ、カツオ、ゴマサバ、サケ、サンマ、イワシ、マアジの筋肉に含まれる TAG 位置異性体、 β -PDP/ β -PPD、 β -PEP/ β -PPE、 β -DPD/ β -DDP、 β -EPE/ β -EEP を分析対象とした。初めに、TAG 位置異性体の標準品を用いたクロマトグラムを図 5.1 に示した。いずれの TAG 位置異性体のペアにおいてもベースライン分離が確認された。これらの TAG は HUFA をもつため UV 検出器でも検出できるが、 β -PDP/ β -PPD と β -PEP/ β -PPE、および、 β -DPD/ β -DDP と β -EPE/ β -EEP はそれぞれ保持時間が非常に近いため APCI-MS による検出が必要であった。用いた HPLC 条件ではいずれもアセトニトリルを使用しており、TAG のプロトン付加分子よりもイオン源でアンモニウムイオン付加分子が多く生成するため、アンモニウムイオン付加分子をモニタリングイオンとして選択した。全ての TAG 位置異性体について、原点を通過する一次式（直線）として検量線を作成した（表 5.2）。いずれも相関係数は 0.97 以上であった。TAG 位置異性体間でイオン源でのアシル基の脱離仕方が異なるため SIM クロマトグラムから得られるピーク面積比は実際の存在比と異なっている。この応答強度の差を補正するために検量線の傾きの比をもとめ、これを補正係数として各 TAG 位置異性体の存在比を求めた（表 5.3, 5.4）。魚油と海獣油の TAG 位置異性体分離の代表的なクロマトグラムを図 5.2 に示した。表 5.3 は、魚油、海獣油の 2 分子のパルミチン酸と 1 分子の HUFA から成る TAG 位置異性体存在比である。海獣油では 2 分子のパルミチン酸と 1 分子の HUFA から成る TAG の場合は、HUFA が α 位に結合した β -PPD、 β -PPE のみが検出され、対称型の β -PDP、 β -PEP は検出されなかった（検出下限 4 ng, 定量下限 12 ng）。魚油ではサンマ、サケで β -PDP が多い傾向が見られたが、その他は極端にいずれか一方に偏る傾向は見られなかった。また、1 分子のパルミチン酸と 2 分子の HUFA から成る TAG の場合は（表 5.4）、海獣油と魚油で全体的な傾向の違いが見られ、海獣油では β -DPD、 β -EPE のような α 位に 2 つの HUFA が結合した異性体が多く、魚油では β -PDD、 β -PEE のような α 位 β 位に 1 分子ずつ HUFA が結合

した異性体が多いという結果となった。このような違いは魚類と海獣類の TAG の生合成経路にある酵素の選択性に起因すると考えられる。TAG は主に 2 つの経路で生合成されることが知られている。例えば、食事由来の TAG は十二指腸で膵リパーゼにより 2-モノアシルグリセロール (MAG) と 2 分子の遊離脂肪酸 (FFA) に加水分解される。2-MAG と FFA は小腸で吸収され、小腸粘膜の中で TAG に再合成される。これはモノアシルグリセロール経路⁴⁶⁾として知られ、小腸粘膜にのみ存在する。再合成された TAG は小腸粘膜でカイロミクロンに取り込まれリンパ系に分泌され、血流に入る⁴⁷⁾。この経路では食事由来の TAG の β 位に結合している脂肪酸は再合成後の TAG の β 位に残る可能性が高い。トドとタテゴトアザラシの主食は魚であり、魚類の HUFA は α 位と β 位の両方に結合している (表 5.3, 5.4)。カイロミクロン中の再合成された TAG はリポ蛋白質リパーゼにより血流の中でカイロミクロンレムナントになる。レムナントは LDL レセプターを介して筋肉や脂肪組織に取り込まれる。この場合 β 位に HUFA を結合した TAG が蓄積すると考えられる。しかし、海獣類の場合、パルミチン酸 2 分子と DHA または EPA から成る TAG は、ほとんどが β -PPD、 β -PPE であった。もう一つの TAG の生合成経路はグリセロール-3-リン酸経路⁴⁶⁾であり、これは Kennedy 経路とも呼ばれる。この経路では、*sn*-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼによりグリセロール-3-リン酸の *sn*-1 位に脂肪酸 (アシル-Co-A) が結合する。このアシルトランスフェラーゼは基質として飽和脂肪酸を好む。この反応の後、1-アシル-*sn*-グリセロール-3-リン酸の *sn*-2 位は 1-アシル-*sn*-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼによりさらにエステル化を受けて 1,2-ジアシル-*sn*-グリセロール-3-リン酸となる。この酵素は基質として不飽和脂肪酸を好む。1,2-ジアシル-*sn*-グリセロール-3-リン酸 (ホスファチジン酸) は TAG のみならず、ホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質の前駆体でもある。これらのアシルトランスフェラーゼの特徴のため、リン脂質は主に *sn*-1 位に飽和脂肪酸、*sn*-2 位に不飽和脂肪酸を持つものが多い。ホスファチジン酸はホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼにより 1,2-ジアシル-*sn*-グリセロ

ールとなり、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼによりさらに *sn*-3 位がエステル化を受けて TAG となる。生体内の組織や器官に蓄積しているほとんどの TAG はこのグリセロール-3-リン酸経路により生合成されると考えられている。海獣類においてもこの機構で TAG が生合成されているとしたら、組織中に見られる TAG は β 位に HUFA を持つ傾向があるはずである。しかし、実際の結果は逆になっていた。この理由として、1 つはグリセロール骨格の *sn*-1, *sn*-2 位にアシル基を導入する *sn*-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ、1-アシル-*sn*-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼの選択性が通常と逆で、*sn*-1 に不飽和脂肪酸、*sn*-2 位に飽和脂肪酸を好む可能性がある。もう一つは、*sn*-3 に最後にアシル基を導入するジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼが HUFA を基質として好む可能性である。これまでの結果から、HUFA は魚油の β 位に、海獣油の α 位に多く存在ことが分かったが、TAG の生合成経路を考えた場合、グリセロール骨格に最初に導入されるアシル基がパルミチン酸と HUFA のいずれであるかを知る必要がある。これは非対称型 TAG がどちらの鏡像異性体なのかを調べることに他ならない。故に、海獣油の HUFA の結合位置に注目し、我々の開発したキラル HPLC 法を用いて魚類・海獣類の非対称型 TAG の鏡像異性体存在比を測定した。

第二項 TAG 鏡像異性体分析

初めに、CHIRALCEL OD-RH を HUFA を含む非対称型 TAG (β -PPD, β -PPE, β -DDP, β -EEP) の鏡像異性体分離に適用できるかどうかをラセミ体の標準品を使って確かめた。*rac*-PPD、*rac*-PPE、*rac*-DDP についてはリサイクルシステムを使用してカラムを 5 回通過させることによりそれぞれの鏡像異性体に分離することができた。溶出順は第四章と同様の方法で確認し、*sn*-1 位に不飽和脂肪酸をもつ鏡像異性体の方が先に溶出することが分かった。CHIRALCEL OD-RH のキラル固定相は cellulose tris (3,5-dimethylphenyl carbamate) がシリカゲルにコーティングされたものであり、広範囲のキラル化合物の分離

に適用できることが知られている⁴⁸⁾。しかし、*rac*-EEPについては CHIRALCEL OD-RH では十分な分離が達成できなかった。多糖誘導体型キラル固定相は規則的ならせん構造を持ち、これがキラル化合物に対する不斉認識能を示す。キラル認識のメカニズムの説明のために、“three-point attachment model”^{41,42)}というモデルが用いられる場合がある（第四章参照）。このモデルではキラル基質とキラル受容体の間で少なくとも3種の相互作用が働くことが必要であるとされている。非対称型 TAG の場合、キラル固定相によって *sn*-1,3 位の脂肪酸の違いが認識され、*sn*-1,3 位に飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸を持つ TAG はキラル分離が可能であることは第四章で述べたとおりである。しかし、CHIRALCEL OD-RH により *rac*-PPE はキラル分離が可能であったが、*rac*-EEP は、*rac*-PPE と同様に *sn*-1,3 位にパルミチン酸と EPA を持っているにも関わらず、ほとんど分離することができなかった。これとは対照的に、*rac*-PPD と *rac*-DDP についてはどちらも同様に CHIRALCEL OD-RH によりキラル分離が可能であった。これらの結果から、*rac*-EEP の *sn*-2 位の EPA が CHIRALCEL OD-RH のキラル認識を妨げたことが示唆される。すなわち、非対称型 TAG は *sn*-1,3 位の脂肪酸の違いのみでキラル認識がなされるのではなく、*sn*-2 位に結合する脂肪酸の種類もキラル固定相と非対称型 TAG のキラル認識に寄与しているということを示している。*rac*-EEP のキラル分離のために、別のキラル固定相を持つ CHIRALCEL OZ-3R を選択した。このキラル固定相は tris (3-chloro-4-methylphenylcarbamate) がコーティングされたシリカゲルである。CHIRALCEL OZ-3R により *rac*-EEP は十分に分離させることができたが、興味深いことに溶出順が CHIRALCEL OD-RH の場合とは逆で *sn*-3 位に不飽和脂肪酸を持つ鏡像異性体 *sn*-PEE が先に溶出した（図 5.3）。CHIRALCEL OD-RH のフェニル基に結合している置換基は 2 つのメチル基であり、これらは電子供与性がある。一方、CHIRALCEL OZ-3R のフェニル基の置換基は 1 つの塩素原子と 1 つのメチル基である。塩素は電子吸引性があり、フェニル基の電子密度が TAG 鏡像異性体の溶出順に影響を及ぼしたのかもしれない。岩崎らの報告においても、1-eicosapentanoyl-2,3-dicapryloyl-

sn-glycerol (*sn*-EC₈C₈)と 1,2-dicapryloyl-3-eicosapentanoyl-*sn*-glycerol (*sn*-C₈C₈E)の溶出順にキラルカラムの種類が影響を及ぼすことが示されている³⁸⁾。我々が使用した CHIRALCEL OD-RH の順相用カラムに相当する CHIRALCEL OD (Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)をシリカゲル担体にコーティングした固定相) を使用した場合の溶出順は *sn*-EC₈C₈<*sn*-C₈C₈E (*sn*-EC₈C₈ が先に溶出) となり、CHIRALCEL OF (Cellulose tris(4-chlorophenylcarbamate)をシリカゲル担体にコーティングした固定相) の場合は *sn*-C₈C₈E<*sn*-EC₈C₈ (*sn*-C₈C₈E が先に溶出) となる。我々の結果と同様に、塩素を置換したキラルカラムを使用したときに *sn*-3 位に不飽和脂肪酸をもつ鏡像異性体が先に溶出している。多糖誘導体型キラルカラムにおいて、フェニルカルバメート誘導体の置換基はフェニル基の電子密度に影響を与え、TAG 鏡像異性体の分離度や溶出順に大きな影響を及ぼすと考えられる。

これらのキラルカラムを使用して、魚油、海獣油の中から、トド、タテゴトアザラシ、カツオ、イワシ (図 5.3) について、*sn*-PPD/*sn*-DPP、*sn*-PPE/*sn*-EPP、*sn*-DDP/*sn*-PDD、*sn*-EEP/*sn*-PEE の存在比を測定し、先に示した非対称型 TAG に乗じて、*sn*-PPD/PDP/*sn*-DPP、*sn*-PPE/PEP/*sn*-EPP、*sn*-DDP/DPD/*sn*-PDD、*sn*-EEP/EPE/*sn*-PEE の存在比を求めた (表 5.5、5.6)。パルミチン酸 2 分子と HUFA1 分子から成る TAG の場合、海獣油は PDP、PEP を含まないが、海獣油も魚油も *sn*-PPD/*sn*-DPP、*sn*-PPE/*sn*-EPP の存在比は同じ傾向であり、主に *sn*-3 位に HUFA を結合していた。パルミチン酸 1 分子と HUFA2 分子から成る TAG の場合、海獣油は対称型の β-DPD、β-EPE が多いが、非対称型 TAG は海獣油も魚油も HUFA は *sn*-2,3 位に結合していた。これらの結果から、組織中に蓄積している TAG はグリセロール-3-リン酸経路で生合成されるが、海獣類の 1-アシル-*sn*-グリセロール-3-リン酸は魚類と異なり HUFA を基質として好まないこと、また、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼは海獣類も魚類も *sn*-3 に HUFA を結合させる傾向が強いことが示唆された。*sn*-2 位に結合する脂肪酸の種類は生物のホメオスタシスの維持

に極めて重要である。細胞膜のリン脂質の *sn*-2 に結合している脂肪酸はホスホリパーゼ A₂ により加水分解される⁴⁹⁾。ここで生じた遊離脂肪酸は局所ホルモンであるプロスタグランジンやロイコトリエン、トロンボキサン等のエイコサノイドの産生に使われる。これらの基質となるのはアラキドン酸や EPA であり、これらの HUFA はリン脂質の *sn*-2 位に存在しているはずである。しかし、海獣類の TAG の *sn*-2 位の存在比は小さかった。前述のように、TAG もリン脂質もグリセロール骨格の *sn*-2 位に存在する脂肪酸は同じアシルトランスフェラーゼに制御されている。海獣類のリン脂質の *sn*-2 位の脂肪酸組成がどのようになっているのかを調べることは非常に興味深く、今後の研究課題としたい。

表5.1 分析に用いたTAG異性体

<i>sn</i> -PPD: 1,2-dipalmitoyl-3-docosahexaenoyl- <i>sn</i> -glycerol	β -PDP: 1,3-dipalmitoyl-2-docosahexaenoyl- <i>sn</i> -glycerol
<i>rac</i> -PPD: 1,2-dipalmitoyl-3-docosahexaenoyl- <i>rac</i> -glycerol	<i>sn</i> -PPE: 1,2-dipalmitoyl-3-eicosapentaenoyl- <i>sn</i> -glycerol
β -PEP: 1,3-dipalmitoyl-2-eicosapentaenoyl- <i>sn</i> -glycerol	<i>rac</i> -PPE: 1,2-dipalmitoyl-3-eicosapentaenoyl- <i>rac</i> -glycerol
<i>sn</i> -DDP: 1,2-didocosahexaenoyl-3-palmitoyl- <i>sn</i> -glycerol	β -DPD: 1,3-didocosahexaenoyl-2-palmitoyl- <i>sn</i> -glycerol
<i>rac</i> -DDP: 1,2-didocosahexaenoyl-3-palmitoyl- <i>rac</i> -glycerol	<i>sn</i> -EEP: 1,2-dieicosapentaenoyl-3-palmitoyl- <i>sn</i> -glycerol
β -EPE: 1,3-dieicosapentaenoyl-2-palmitoyl- <i>sn</i> -glycerol	<i>rac</i> -EEP: 1,2-dieicosapentaenoyl-3-palmitoyl- <i>rac</i> -glycerol

(注) ‘ β -’は*sn*-2位の脂肪酸のみを固定した表記法である。例えば、 β -PPDと表記した場合は*sn*-PPDと*sn*-DPPの任意の比の混合物を表す。

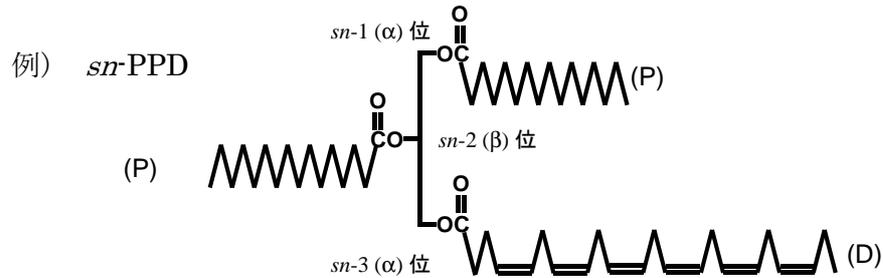


表5.1にしめしたTAGを構成する脂肪酸の略記

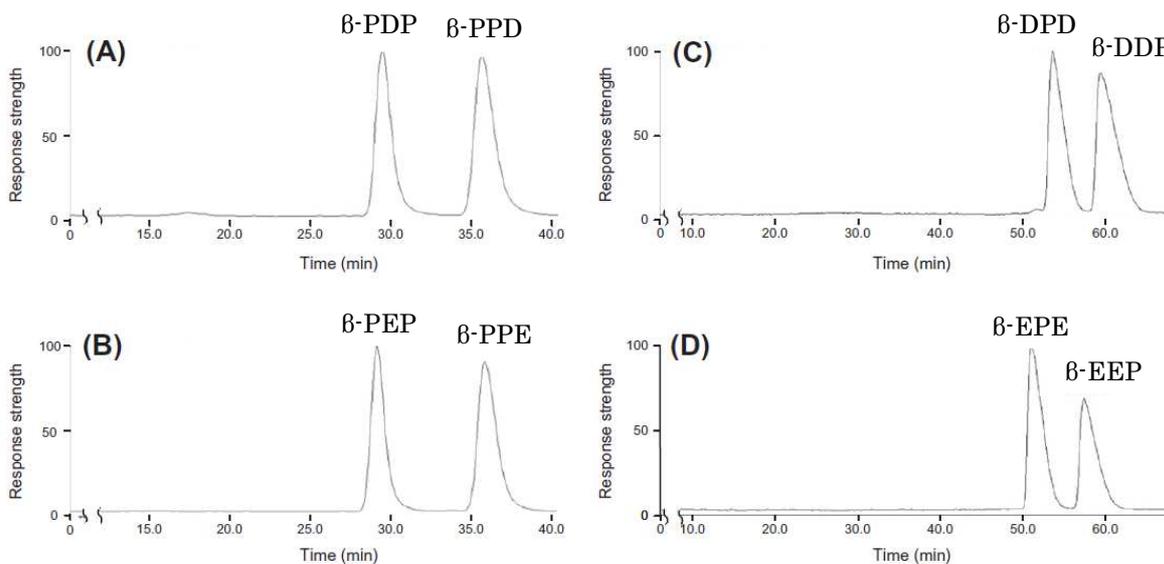


図5.1 TAG位置異性体ペアのマスクロマトグラム (APCI-MS, SIMモード)
 (A) β -PDP/ β -PPD, (B) β -PEP/ β -PPE, (C) β -DPD/ β -DDP, (D) β -EPE/ β -EEP

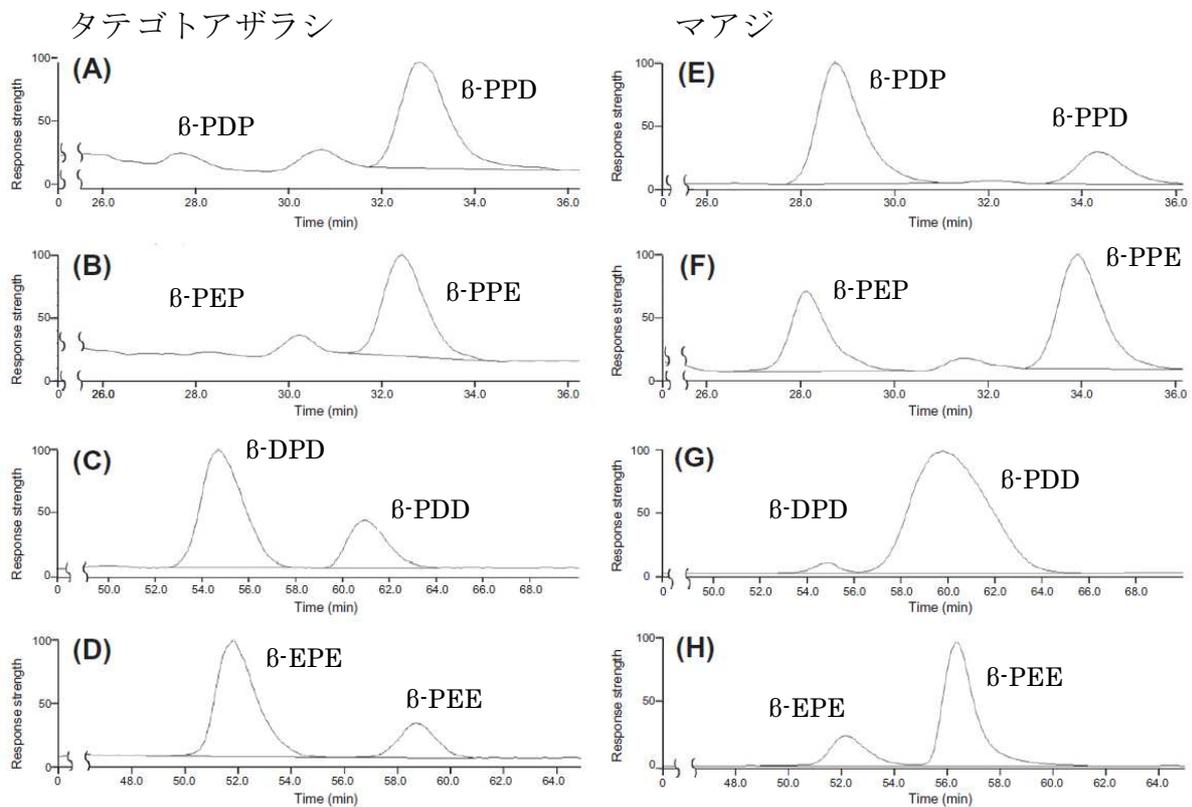


図5.2 タテゴトアザラシ(A)~(D)とマアジ(E)~(H)に含まれるTAG位置異性体ペアのマスクロマトグラム (APCI-MS, SIMモード)

表5.2 TAG位置異性体の検量線と傾きの比

	検量線 (#R ²)	傾きの比
β-PDP	y=401.9x (0.99)	β-PDP / β-PPD =0.80
β-PPD	y=505.2x (0.99)	
β-PEP	y=391.8x (0.99)	β-PEP / β-PPE =0.81
β-PPE	y=484.4x (0.99)	
β-DPD	y=356.6x (0.94)	β-DPD / β-PDD =0.92
β-PDD	y=389.4x (0.95)	
β-EPE	y=329.1x (0.98)	β-EPE / β-PEE =0.98
β-PEE	y=336.0x (0.98)	

#R²: 相関係数

表5.3 魚類、海獣類の2分子のパルミチン酸と1分子のHUFAをもつTAG位置異性体の存在比 (%)

	トド	タテコトアザラシ	キハダマグロ	カツオ	ゴマサバ	サケ	サンマ	イワシ	マアジ
β -PDP/ β -PPD	0/100	0/100	33.9/66.1	43.8/56.2	45.3/54.7	70.6/29.4	89.7/10.3	64.9/35.1	64.8/35.2
β -PEP/ β -PPE	0/100	0/100	42.2/57.8	26.6/73.4	28.8/71.2	48.6/51.4	66.9/33.1	49.0/51.0	33.6/66.4

(Average Value, n=3)

表5.4 魚類、海獣類の1分子のパルミチン酸と2分子のHUFAをもつTAG位置異性体の存在比 (%)

	トド	タテコトアザラシ	キハダマグロ	カツオ	ゴマサバ	サケ	サンマ	イワシ	マアジ
β -DPD/ β -PDD	89.2/10.8	70.5/29.5	5.8/94.2	5.9/94.1	3.0/97.0	5.5/94.5	10.8/89.2	6.6/93.4	2.8/97.2
β -EPE/ β -PEE	84.1/15.9	77.8/22.2	15.9/84.1	17.3/82.7	15.2/84.8	15.2/84.8	8.8/91.2	17.8/82.2	21.2/78.8

(Average Value, n=3)

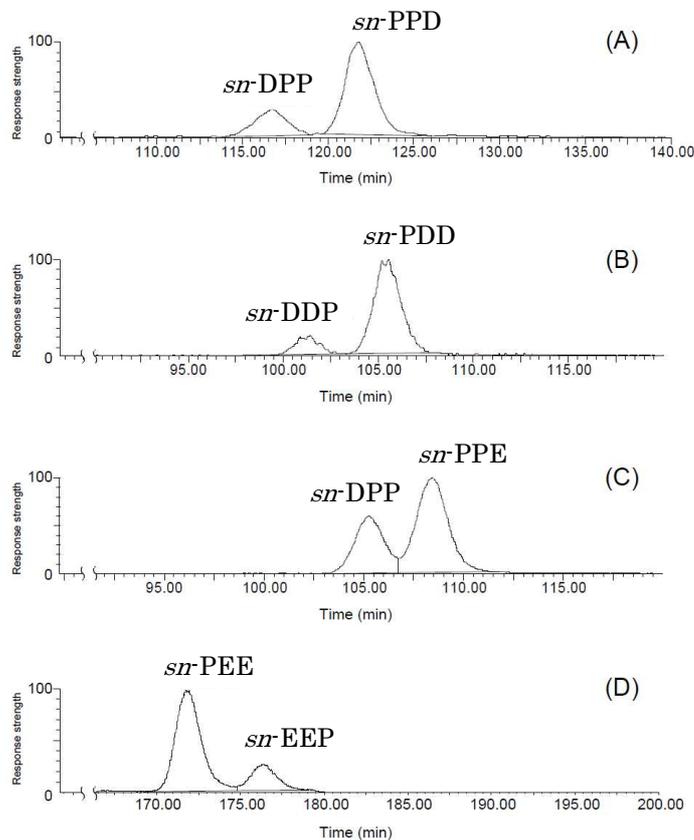


図5.3 イワシ油中のTAG鏡像異性体のマスクロマトグラム (APCI-MS, SRMモード)

表5.5 魚類、海獣類の2分子のパルミチン酸と1分子のHUFAをもつTAG位置異性体および鏡像異性体の存在比 (%)

	海獣類		魚類	
	トド	タテコトアザラシ	カツオ	イワシ
<i>sn</i> -DPP / PDP / <i>sn</i> -PPD	13.6 / 0 / 86.4	13.6 / 0 / 86.4	2.8 / 43.8 / 53.4	8.6 / 64.9 / 26.5
<i>sn</i> -EPP / PEP / <i>sn</i> -PPE	0 / 0 / 100	15.3 / 0 / 84.7	11.2 / 26.6 / 62.2	18.1 / 49.0 / 32.9

(Average Value, n=3)

表5.6 魚類、海獣類の1分子のパルミチン酸と2分子のHUFAをもつTAG位置異性体および鏡像異性体の存在比 (%)

	海獣類		魚類	
	トド	タテコトアザラシ	カツオ	イワシ
<i>sn</i> -DDP / DPD / <i>sn</i> -PDD	0 / 89.2 / 10.8	5.3 / 70.5 / 24.2	4.6 / 5.9 / 89.5	13.5 / 6.6 / 79.9
<i>sn</i> -EEP / EPE / <i>sn</i> -PEE	0 / 84.1 / 15.9	0 / 77.8 / 22.2	4.7 / 17.3 / 78.0	9.8 / 17.8 / 72.4

(Average Value, n=3)

第六章 乳脂肪中のトリアシルグリセロールの位置異性体分析

第一節 緒言

牛乳は 100 g あたり 3.5–5 g 程度の脂質を含んでおり、その主成分はトリアシルグリセロール (TAG) である⁵⁰⁾。牛乳の TAG には短鎖、中鎖脂肪酸 (C4:0~C10:0) が含まれている特徴があり、これらは主にグリセロール骨格の *sn*-3 位 (α 位) に結合していることが知られている。ヒトの母乳の場合も、*sn*-3 位に中鎖脂肪酸であるカプリン酸 (C10:0) が存在する。栄養学的観点から見た場合、この結合位置は重要な意味がある。新生児の舌リパーゼは、遊離型の短鎖、中鎖脂肪酸を得るために *sn*-3 位 (α 位) のアシル基を *sn*-1 位 (α 位) の場合の 2 倍の速度で加水分解できる^{51,52)}。この短鎖、中鎖脂肪酸は直ちに口腔粘膜に吸収され、細胞内でアシル-CoA に変換される。長鎖脂肪酸と異なり短鎖、中鎖脂肪酸のアシル-CoA はアシルカルニチンに変換されなくともミトコンドリア内膜を通過できるため迅速にエネルギーとなる^{53,54)}。新生児は乳脂から効率的にエネルギーを得られるのはこのような巧妙な仕組みを持っているからである。さらに、ヒトの母乳は *sn*-2 位 (β 位) にパルミチン酸を持つという特徴があることが知られている⁵⁵⁾。この結合位置は小腸における脂質の消化吸收の際に有利である⁵⁶⁾。これは舌リパーゼにより加水分解される α 位の脂肪酸は消化管内で乳に含まれるカルシウムと塩 (石鹼) を形成し、吸収されにくくなるからである⁵⁷⁾。このように乳脂の脂肪酸の結合位置は乳児栄養に重要な役割を果たしているが、TAG を構成する脂肪酸の組合せ、すなわち、TAG 分子種もまた乳脂の物性に影響を及ぼしている。TAG 分子種は乳脂の物性、特に融点に影響を及ぼし、乳中の乳脂の安定分散に寄与している。Brown らは乳脂の平均的な融点は 27°C である報告している⁵⁸⁾。Winter らによりヒトの乳脂を構成する主な TAG 分子種は Dipalmitoyloleoylglycerol (PPO, 脂肪酸の組合せのみを表記している)11.8%、Linoleoyloleoylpalmitoylglycerol (LOP)10.0%、Dioleoylpalmitoylglycerol (OOP)4.4%で

あると報告されており⁵⁹⁾、これらの TAG 分子種が乳脂の融点に影響していると考えられる⁶⁰⁾。乳脂 TAG を構成する脂肪酸の組合せのみならずその結合位置は栄養や物性に大きな影響を及ぼしているが、脂肪酸結合位置を考慮した TAG 分子種分析、すなわち、位置異性体に関する研究はない。例えば、ヒトの母乳の中で PPO は主要な TAG 分子種であるが、1,2 (or 2,3)-Dipalmitoyl-3 (or 1)-oleoyl-*sn*-glycerol (β -PPO)と 1,3-Dipalmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol (β -POP)の存在比について報告がない。第二章、第三章では、ポリメリック ODS カラムや C28 カラムを用いた TAG 位置異性体分析法を開発した。本章では、これらの手法を用いて、ウシ等の反芻動物、ヒト、ラット乳中の TAG 位置異性体を分析した。対象とした TAG は、ヒトの母乳中にも存在する中鎖脂肪酸であるカプリン酸が 1 分子とパルミチン酸 2 分子が結合する β -PPC₁₀、 β -PC₁₀P、およびオレイン酸とパルミチン酸から構成される β -PPO、 β -POP、 β -POO、 β -OPO である。第五章と同様に補正係数を求めるための検量線を作成した後、TAG 位置異性体の相対存在比を求めた。

第二節 材料と方法

第一項

a 試薬

以下の標準品 TAG 位置異性体 β -PC₁₀P、 β -PPC₁₀、 β -POP、 β -PPO、 β -OPO、 β -POO は自社製品を使用した (表 6.1)。オキシトシンは Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, Mo) より購入した。HPLC の移動相には国産化学 (株)、和光純薬工業(株)の HPLC グレード以上の規格のものを用いた。

b 試料乳脂

牛乳、水牛由来のイタリアンモッツァレラチーズ、ヤギ由来のシェブルチーズ、羊由来のオッソー・イラティチーズ、乳牛由来の日本のプロセスチーズは東京都内のスーパーマーケットにて購入した。ヒトの母乳は本研究への協力を承諾していただいた授乳期の

日本人女性から提供していただいた。ラット乳は日本エスエルシー(株)から購入した 12 週齢の初産の F344/N ラットから採取した。ラットを用いた実験は東京海洋大学の倫理委員会が定める東京海洋大学動物実験等取扱規則に従って実施した。ラットは AIN-93G 飼料（オリエンタル酵母工業(株)）で自由摂食下で飼育した。ラットはおがくずを敷いたプラスチックケージで個飼いとし、 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、12 時間の明暗サイクルで飼育した。全てのラットは妊娠 21 日目で出産した。出産から 2 日後に新生仔ラットを母ラットから離した。仔ラットを離してから 4.5 時間後に、母ラットに 2 I.U.のオキシトシンを皮下注射し、セボフルラン（Mylan Inc., Canonsburg, PA）吸入による麻酔をかけた。オキシトシン注射から 15 分後に乳を採取した。

第二項 TAG の分画

a 牛乳、ヒトの母乳

牛乳とヒトの母乳は Folch 法にて脂質を抽出した⁶¹⁾。試料を水で 10 倍に希釈し、クロロホルム：メタノール=2:1 (v/v)溶液を 2 倍量加えよく攪拌し、遠心分離 ($1,500 \times g$, 10 min) を行った。同様に 2 回繰り返す、クロロホルム-メタノール層を丸底フラスコに移してエバポレーターで溶媒を除去し全脂質とした。これをヘキサンで希釈後、シリカゲルの薄層クロマトグラフィー (TLC) にスポットし、石油エーテル/ジイソプロピルエーテル/酢酸 (80:20:1, v/v/v) で展開した。TAG に相当するスポットをかき取り、クロロホルム-メタノール (20:1, v/v) で抽出した。

b ラット乳

ラット乳を 4°C で $1,500 \times g$, 10 min 遠心分離して、浮遊してきた脂質をラット乳脂とした。これを a と同様に TLC で TAG 画分を精製した。

c 水牛、ヤギ、羊のチーズ

Bligh & Dyer 法⁴⁵⁾により脂質の抽出を行った。方法は第五章第二項と同様である。

a、b で得られた各 TAG 画分はロータリーエバポレーターで減圧乾固し、秤量後、2-プロパノールに溶解させ、濃度を 2 mg/mL に調整した。試料溶液は分析を実施するまでの間アルゴンガスを封入したスクリーキャップバイアル瓶に入れて-40°C で保存した。

第三項 LC/MS による TAG 位置異性体分析

パルミチン酸が 1 分子結合した TAG 位置異性体はポリメリック ODS カラムとリサイクル HPLC を併用して TAG 位置異性体の相対存在比を求めた。パルミチン酸 2 分子が結合した TAG では C28 カラムで TAG 位置異性体の相対存在比を求めた。

a β-OPO、β-POO の分析

第四章第三節第四項 b と同じポリメリック ODS カラムとリサイクル HPLC システムを使用した。初めに β-OPO, β-POO の標準品を用いて UV 205 nm のクロマトグラムをモニターしながらリサイクル運転時の分離挙動を確認し、リサイクル運転の開始時間と終了時間を決定した（リサイクル終了と共に試料は MS/MS へ導入される）。リサイクルは 4 回に設定した（カラム通過回数：5 回）。第二項で調製した試料溶液 20 μL を同システムに注入し、APCI-MS/MS の SRM モードにて検出した。SRM はプレカーサーイオンに TAG のアンモニウムイオン付加分子 $[M+NH_4]^+$ を、プロダクトイオンには TAG からアシル基がイオン源で 1 つ脱離した DAG イオンを用いた。分析を 3 回繰り返した。

APCI-MS/MS のイオン源の条件

コロナ電流：3.0 μA、ソースブロック温度：120°C

脱溶媒温度：450°C、コーンガス流量：50 L/h、

脱溶媒ガス流量：200 L/h

SRM トランジション

β -OPO, β -POO : m/z 877>578 [OOP+NH₄]⁺>[PO]⁺

b β -POP、 β -PPO、 β -PC₁₀P、 β -PPC₁₀、 β -PDP、 β -PPD の分析

第三章第二節に示したものと同一 C28 カラムと HPLC システムを使用した。HPLC にカラム温度 15°C、移動相はアセトン 100%、流速は 1.0 mL/min の条件で分析を行った。第二項で調製した試料溶液 20 μ L を同システムに注入し、APCI-MS/MS の SRM モードにて検出した。SRM はプレカーサーイオンに TAG のプロトン化分子を、プロダクトイオンに TAG からアシル基がイオン源で1つ脱離した DAG イオンを用いた。分析を3回繰り返した。

APCI-MS/MS のイオン源の条件

コロナ電流：3.0 μ A、ソースブロック温度：120°C

脱溶媒温度：450°C、コーンガス流量：50 L/h、脱溶媒ガス流量：200 L/h

SRM トランジション

β -PC₁₀P, β -PPC₁₀ : m/z 724>468 [PC₁₀P+H]⁺>[PC₁₀]⁺

β -POP, β -PPO : m/z 834>578 [POP+H]⁺>[PO]⁺

β -PDP, β -PPD : m/z 880>552 [PPD+H]⁺>[PP]⁺

第四項 それぞれの TAG 位置異性体の検量線の作成

TAG 位置異性体 (例 β -OPO と β -POO) を等量ずつ混合し 2-プロパノールで標準溶液の濃度を 50、100、200、400 $\mu\text{L}/\text{mL}$ に調整した。前項と同様にそれぞれの HPLC システムに標準溶液を 20 μL 注入し、濃度を x 軸に、得られた SRM クロマトグラムのピーク面積を y 軸にプロットして検量線を作成した。検量線は原点を通過する一次式とした。試料の乳脂の TAG 位置異性体存在比をそれぞれの SRM クロマトグラムと検量線から求めた。検出限界と定量限界はシグナル/ノイズ比 (S/N 比) で定義し、それぞれ S/N=3, 10 とした⁶²⁾。

第三節 結果と考察

本章では、反芻動物の乳の中鎖脂肪酸、ヒトの母乳の DHA のような特徴的な脂肪酸を持つ ABA/AAB 型 TAG 位置異性体を分析対象とした。さらにパルミチン酸、オレイン酸からなる主要な TAG 位置異性体も対象とした。図 6.1~6.4 にそれぞれの TAG 位置異性体ペア (標準品) 代表的な SRM クロマトグラムを示した。全ての TAG 位置異性体の分離は達成できたが、 β -OPO/ β -POO を分離するためにはポリメリック ODS カラムによるリサイクル運転が必要であった (カラム通過回数: 5 回)。また、いずれの TAG も検出限界、定量限界はおよそ 4 ng、12 ng であった。 β -ABA/ β -AAB 型 TAG 位置異性体の検量線の傾きとその比を表 6.2 に示した。この比を補正係数として、SRM クロマトグラムのピーク面積比から、各乳脂 TAG 位置異性体の存在比を求めた (表 6.3)。本研究を実施するにあたり、水牛、ヤギ、羊の乳については、日本で乳の状態での入手が困難だったため、チーズを試料として使用した。チーズの乳脂は一部がリパーゼにより加水分解を受けるはずであるが^{51,52,63,64)}、牛乳とそのチーズとの間でそれぞれの TAG 位置異性体存在比はほぼ同一であった (表 6.3)。この結果から、今回用いたチーズのリパーゼによる脂肪酸の加水分解は、TAG 位置異性体存在比に影響する程のものではないことが示唆された。故に、乳とチーズから得られた他の結果も、その形態を考慮せずに直接的に比較できるものと考えられる。

短鎖、中鎖脂肪酸は反芻動物の乳脂の *sn*-3 位 (α 位) に存在し、新生仔の口腔内に特異

的にみられる舌リパーゼにより加水分解されると報告されてきた^{53,54)}。これらは短鎖、中鎖脂肪酸が新生仔のエネルギー源として重要であることを意味している。本研究において、中鎖脂肪酸であるカプリン酸 (C10:0) を分析対象としたのは、ヒトの乳に C8:0 よりも短い脂肪酸が含まれないからである⁵⁵⁾。ヒトの母乳の β -PC₁₀P/ β -PPC₁₀ 存在比は反芻動物と異なり、 β -PC₁₀P が半分以上を占める結果となった (表 6.3)。中鎖脂肪酸は *sn*-3 位に存在する^{55,65)}と報告されてきたが、我々の結果とは一致していない。

乳脂 TAG は乳腺組織内でグリセロール-3-リン酸経路 (第五章 第三節第一項を参照) により生合成される^{66,67)}。このためグリセロール骨格上での脂肪酸の分布も各段階のアシルトランスフェラーゼの基質特異性を反映していると考えられる。TAG 分子種もこれらの影響を強く受けるはずである。ヒトと反芻動物の乳脂における β -PC₁₀P/ β -PPC₁₀ 存在比の差もこうした点に帰するはずであるが、何故異なる結果となったかについては現在のところ不明である。

2 分子のオレイン酸と 1 分子のパルミチン酸からなる TAG 位置異性体では、パルミチン酸は主に β 位に存在し、異性体内での β -OPO の存在比はヒトの母乳の場合は 73%、ラット乳の場合は 73%であった。この結果は Breckenridge⁶⁸⁾らの報告に一致しており、 α 位のオレイン酸が非常に重要であるとも解釈することができる。これは、 β -POP/ β -PPO 存在比を見たときに、種を超えて β -PPO が主な位置異性体であることとも一致している。実際、 β 位のパルミチン酸の重要性は多くの乳児栄養の研究者らに提唱されていることである^{56,57)}。結果的に、 β -OPO が主な異性体であるという結果は彼らの仮説を裏付けるものであるが、 α 位のオレイン酸というものはその副次的な影響なのかもしれない。TAG はルーメンで腓リパーゼにより 2 つの遊離脂肪酸と 2-モノアシルグリセロール (MAG) に加水分解される。遊離脂肪酸と 2-MAG はミセルを形成し、小腸で吸収される⁶⁹⁾。ここで 2-MAG として存在する脂肪酸は遊離脂肪酸よりも効率良く小腸から吸収される。つまり、重要なエネルギー源であるパルミチン酸は、効率的に吸収されるようにヒトの母乳の TAG の β 位に存在して

いるのである。ヒトはパルミチン酸を生合成できるが、反芻動物のようにカプリン酸のような中鎖脂肪酸を多く生合成することはできない。こうした点を考慮すると、ヒト、反芻動物などの乳脂では効率的なエネルギー源となるような脂肪酸が選択されているのではないかと考えられる。

反芻動物の乳の TAG 中の β -OPO/ β -POO 存在比は、 β -POO が水牛で 65%、ヤギで 80%、羊で 63%となっており、非反芻動物とは逆である。これは反芻動物の β 位のオレイン酸が重要なのではないかと解釈できるが、全ての動物種で β -POP/ β -PPO の中では β -PPO が主要な位置異性体であった。これらの結果を考えると、反芻動物の β 位のオレイン酸は、ヒトの β 位のパルミチン酸や反芻動物の α 位の短鎖、中鎖脂肪酸ほどの意義はないのかもしれない。こうした可能性を検証していくにはさらなる研究が必要である。DHA の結合位置も調べたが、ヒトとラット大きな差は認められなかった。

新生仔の栄養にとって、乳脂の脂肪酸結合位置は非常に重要であると考えられる。特にヒトの母乳のパルミチン酸、反芻動物の乳の短鎖、中鎖脂肪酸は特徴的に重要なエネルギー源である。本研究では、*sn*-1,3 位を区別したキラル HPLC による鏡像異性体分離は行っていないが、乳脂の TAG もグリセロール-3-リン酸経路で生合成されることを考えると、こうした酵素の基質特異性や乳脂の構造を TAG 分子種レベルでより良く理解するためには、TAG 位置異性体分析と鏡像異性体分析を同時に分析する必要があるだろう。

表6.1 分析対象とした乳脂中のTAG位置異性体

β -PPC ₁₀	β -PPO	β -POO	β -PPD
β -PC ₁₀ P	β -POP	β -OPO	β -PDP

例)

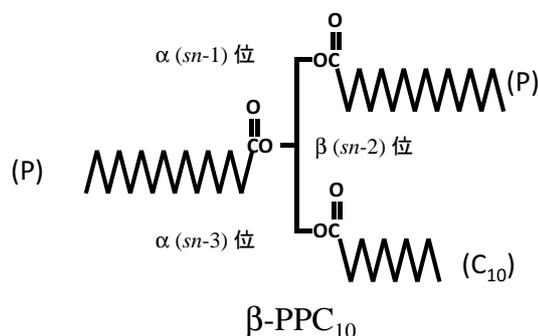


表 6.1に記載されたTAGの構成脂肪酸の略記

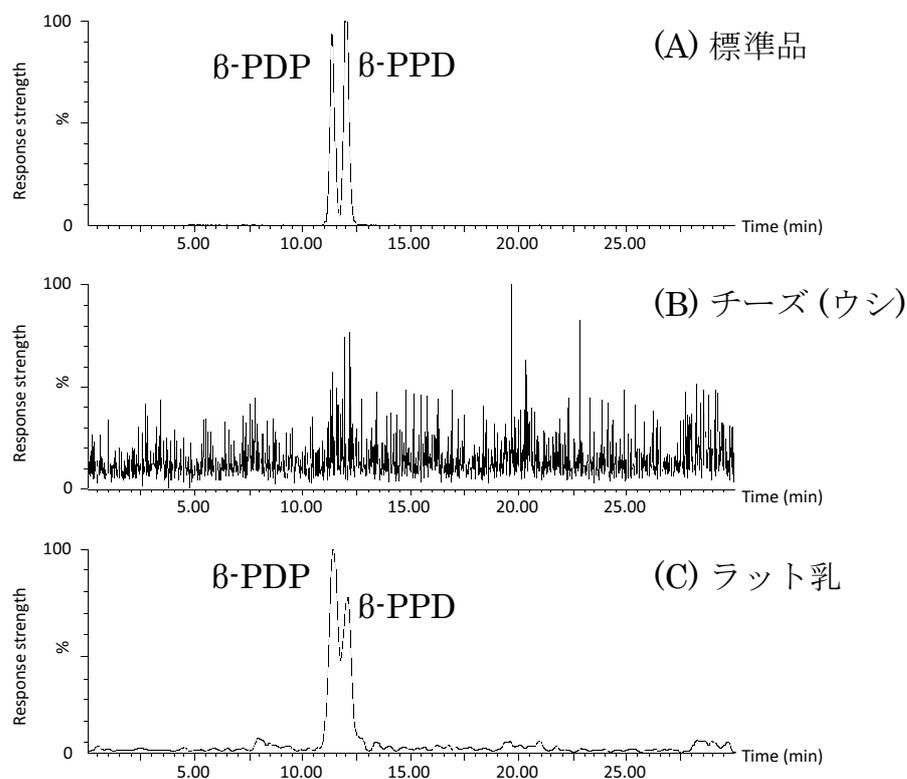


図6.1 β -PDPと β -PPDのマスキロマトグラム (APCI-MS/MS, SRMモード)

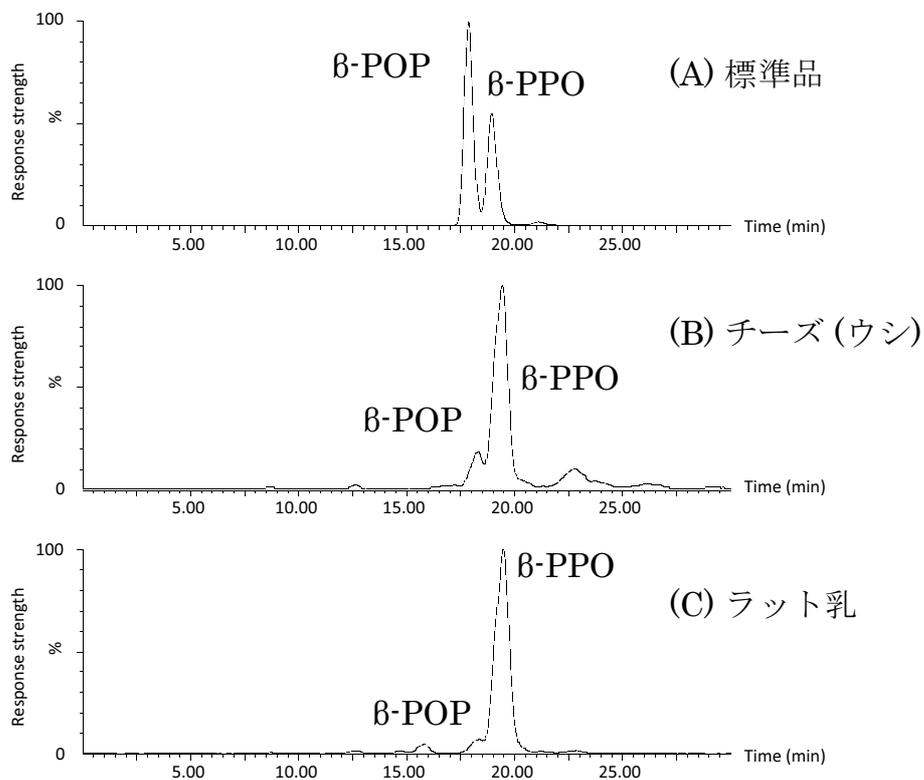


図6.2 β -POPと β -PPOのマスクロマトグラム (APCI-MS/MS, SRMモード)

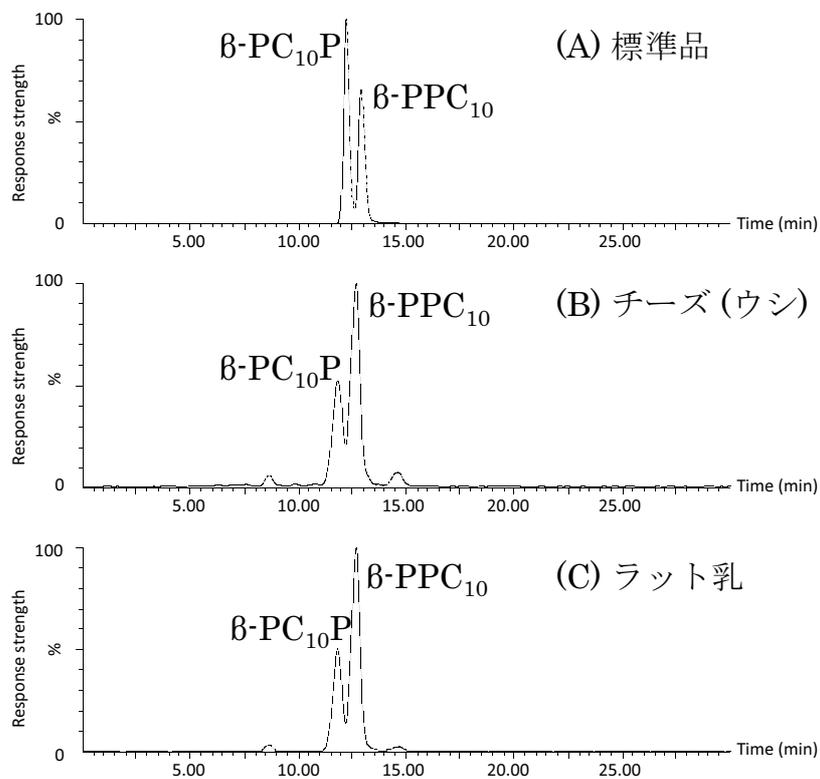


図6.3 β -PC₁₀Pと β -PP C₁₀のマスクロマトグラム (APCI-MS/MS, SRMモード)

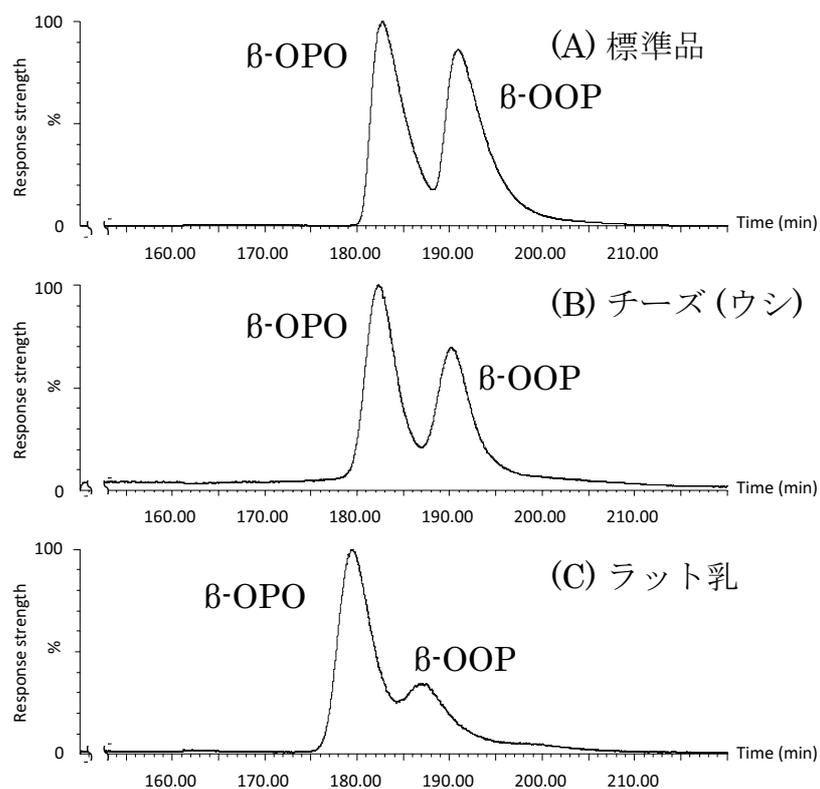


図6.4 β -OPOと β -OOPのマスクロマトグラム (APCI-MS/MS, SRMモード)

表6.2 TAG位置異性体の検量線と傾きの比

TAG	SRMトランジション	検量線 (#R)	傾きの比
β -PC ₁₀ P	722.6 > 467.4	$y = 130.5x$ (0.89)	β -PCP/ β -PPC = 1.28
β -PPC ₁₀		$y = 101.6x$ (0.95)	
β -POP	833 > 577.5	$y = 364.9x$ (0.94)	β -POP/ β -PPO = 1.49
β -PPO		$y = 244.5x$ (0.96)	
β -PDP	878.7 > 552	$y = 223.4x$ (0.98)	β -PDP/ β -PPD = 0.82
β -PPD		$y = 183.1x$ (0.99)	
β -OPO	876.8 > 577.5	$y = 3069x$ (0.99)	β -OPO/ β -POO = 1.78
β -POO		$y = 1723x$ (0.99)	

#R: 相関係数

表6.3 乳およびチーズ中のTAG位置異性体の存在比 (%)

	乳			
	ウシ	ヒト	ラット	
β -PC ₁₀ P/ β -PPC ₁₀	28.9 ± 2.1 / 71.1 ± 2.1	67.4 ± 0.7 / 32.6 ± 0.7	16.2 ± 1.2 / 83.8 ± 1.2	
β -OPO/ β -POO	56.8 ± 1.1 / 43.2 ± 1.1	74.9 ± 0.5 / 25.1 ± 0.5	73.4 ± 1.2 / 26.6 ± 1.2	
β -POP/ β -PPO	12.4 ± 2.6 / 87.6 ± 2.6	2.7 ± 0.6 / 97.3 ± 0.6	2.9 ± 0.4 / 97.1 ± 0.4	
β -PDP/ β -PPD	N.D.	55.6 ± 3.6 / 44.4 ± 3.6	43.5 ± 1.3 / 56.5 ± 1.3	
	チーズ			
	ウシ	バツファロー(水牛)	ヤギ	ヒツジ
β -PC ₁₀ P/ β -PPC ₁₀	29.2 ± 0.6 / 70.8 ± 0.6	30.7 ± 1.6 / 69.3 ± 1.6	16.4 ± 1.0 / 83.6 ± 1.0	29.0 ± 1.1 / 71.0 ± 1.1
β -OPO/ β -POO	58.4 ± 1.5 / 41.6 ± 1.5	34.8 ± 0.5 / 65.2 ± 0.5	20.0 ± 0.5 / 80.0 ± 0.5	37.0 ± 0.4 / 63.0 ± 0.4
β -POP/ β -PPO	9.0 ± 0.6 / 91.0 ± 0.6	15.6 ± 0.5 / 84.4 ± 0.5	8.6 ± 0.3 / 91.4 ± 0.3	23.2 ± 0.3 / 76.8 ± 0.3
β -PDP/ β -PPD	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

総括

油脂の主成分は TAG であるが、これまでの多くの分析例は脂肪酸組成、あるいは、立体特異的分析によるグリセロール骨格上での脂肪酸分布により行われたものであった。TAG 分子種分析も GC、HPLC の種々の分離モードで検討されてきたが、脂肪酸の結合位置を区別した TAG 位置異性体、鏡像異性体の分離を達成できているものはほとんどなかった。そこで本研究では、このような TAG 異性体分析法を確立するとともに、天然油脂分析への応用を試みた。その結果、以下の分離モードを確立し、天然油脂中に実在する TAG 位置異性体・鏡像異性体の存在比を明らかにすることができた。

1. ポリメリック型 ODS カラムを用いた逆相 HPLC により、少なくとも 1 つ C12 以上の鎖長の飽和脂肪酸を持つ TAG 位置異性体ペアを分離することが可能となった。また、 β -SUS/ β -SSU、 β -USU/ β -UUS 型 TAG 位置異性体ペアの分離が可能であった (S : 飽和脂肪酸、U : 不飽和脂肪酸)。(第二章)
2. C28 カラムを用いた逆相 HPLC により、パルミチン酸 (P)、ステアリン酸 (St) のような長鎖飽和脂肪酸 2 分子と不飽和脂肪酸 1 分子が結合した TAG 位置異性体ペア (β -SUS/ β -SSU) を短時間で分離することが可能となった。 β -PC₁₀P/ β -PPC₁₀ (C₁₀ : カプリン酸) のような飽和脂肪酸同士でも鎖長差のある TAG 位置異性体にも適用することが可能であった。(第三章)
3. 多糖誘導体型キラルカラムとリサイクル HPLC により、*sn*-1,3 位に C16-18 の飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸をもつ TAG 鏡像異性体のペアを初めて分離することが可能となった。(第四章)
4. ポリメリック ODS カラムによる逆相 HPLC と多糖誘導体型キラルカラムを用いたりリサイクル HPLC により、パルミチン酸と HUFA を含む魚油、海獣油の TAG 位置異性

体、鏡像異性体存在比を初めて明らかにした。海獣油は HUFA を *sn*-3 位に、魚油は HUFA を *sn*-2 位に結合させる傾向が強いことが明らかになり、立体特異的分布による脂肪酸分布の結果と一致していた。(第五章)

5. C28 カラムとポリメリック ODS カラムを用いたそれぞれの逆相 HPLC により、乳脂の中でエネルギー源として重要なパルミチン酸を含む TAG 位置異性体の存在比を求めた。ヒトの母乳ではパルミチン酸は β 位に存在し、カプリン酸はラット、反芻動物で α 位に結合している傾向が強いことが明らかとなった。(第六章)

本研究で開発した TAG 位置異性体、鏡像異性体分析法は、分離可能な TAG 分子種に制約はあるものの、油脂全体の構造を代表しているような脂肪酸から構成される TAG 分子種に注目して、その異性体存在比を解明することができた。これにより、TAG の生合成経路であるグリセロール-3-リン酸経路の中の各段階のアシルトランスフェラーゼがどのような基質特異性を持つかについても考察することができた。まだ分離が達成できていない脂肪酸の組合せからなる TAG 位置異性体、鏡像異性体の分離法を確立していくことが課題であるが、我々の開発した TAG 異性体分析法は、他の様々な生物や食品等に含まれる TAG 分子種の構造と機能の関係を解明するために有用であると考えられ、今後、油脂産業、脂質栄養等の分野の発展に役立てていきたい。

引用文献

1. Botham, K.M.; Mayes, P.A. Lipids of physiologic significance. in *Harper's Illustrated Biochemistry*. 29th ed. (Murray, R.K.; Bender, D.A.; Botham, K.M.; Kennelly, P.J.; Rodwell, V.W.; Weil, P.A. ed.) McGraw-Hill Companies, New York, pp. 140-150 (2012).
2. Nawar, W.W. Lipid. in *Food chemistry*. 3rd ed. (Owen, R.F. ed.) Marcel Dekker Inc., New York, pp. 230-231 (1996).
3. 第4版油化学便覧(日本油化学会編) pp.331 丸善(2001).
4. Brockerhoff, H. A stereospecific analysis of triglycerides. *J. Lipid Res.* 6, 10-15 (1965).
5. Itabashi, Y.; Takagi, T. High performance liquid chromatographic separation of monoacylglycerol enantiomers on a chiral stationary phase. *Lipids* 21, 413-416 (1986).
6. Itabashi, Y.; Kuksis, A.; Myher, J.J. Determination of molecular species of enantiomeric diacylglycerols by chiral phase high performance liquid chromatography and polar capillary gas-liquid chromatography. *J. Lipid Res.* 31, 2119-2126 (1990).
7. Brockerhoff, H.; Yurkowski, M. Stereospecific analyses of several vegetable fats. *J. Lipid Res.* 7, 62-64 (1966).
8. Christie, W.W.; Nikolova-Damyanova, B; Laakso, P; Herslof, B. Stereospecific analysis of triacyl-*sn*-glycerols via resolution of diastereomeric diacylglycerol derivatives by high-performance liquid chromatography on silica. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 695-701 (1991).

9. Brockerhoff, H.; Hoyle, R.J.; Wolmark, N. Positional distribution of fatty acids in triglycerides of animal depot fats. *Biochim Biophys Acta*. 116, 67-72 (1966).
10. Parodi, P.W. Positional distribution of fatty acids in triglycerides from milk of several species of mammals. *Lipids* 17, 437-442 (1982).
11. Brockerhoff, H.; Hoyle, R.J.; Hwang, P.C.; Litchfield, C. Positional distribution of fatty acids in depot triglycerides of aquatic animals. *Lipids* 3, 24-29 (1968).
12. Ando, Y.; Nishimura, K.; Aoyanagi, N.; Takagi, T. Stereospecific analysis of fish oil triacyl-sn-glycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 417-424 (1992).
13. GAS CHROMATOGRAPHY AND LIPIDS, The AOCS Lipid Library. http://lipidlibrary.aocs.org/GC_lipid/08_molsp/index1.htm (参照 2013 年 12 月 5 日).
14. Lin, J.T.; McKeon, T.A. Separation of intact molecular species of acylglycerols by HPLC. in *HPLC of Acyl Lipids* (Lin, J.T.; McKeon, T.A. ed.) HNB Publishing, New York, pp. 199-220 (2005).
15. Wada, S.; Koizumi, C.; Nonaka, J. Analysis of triglycerides of soybean oil by high-performance liquid chromatography in combination with gas liquid Chromatography. *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)* 26, 95-99 (1977).
16. Jayasinghe, C.; Gotoh, N.; Tokairin, S.; Ehara, H.; Wada, S. Inter species changes of lipid compositions in liver of shallow-water sharks from the Indian Ocean. *Fish. Sci.* 69, 644-653 (2003).
17. Aoki, T.; Otake, I.; Gotoh, N.; Noguchi, N.; Wada, S. Quantification method for triglyceride molecular species in fish oil with high performance liquid chromatography-ultraviolet detector. *J. Oleo Sci.* 53, 285-294 (2004).
18. Gotoh, N.; Aoki, T.; Nakayasu, K.; Tokairin, S.; Noguchi, N.; Wada, S. Quantification

- method for triglyceride molecular species in fish oil with high performance liquid chromatography - ultraviolet detector - evaporative light scattering detector. *J. Oleo Sci.* 55, 457-463 (2006).
19. Byrdwell, W.C. Qualitative and quantitative analysis of triacylglycerols by atmospheric pressure ionization (APCI and ESI) mass spectrometry techniques. in *Modern methods for lipid analysis by liquid chromatography/mass spectrometry and related techniques* (Byrdwell, W.C. ed.) AOCS PRESS, Champaign, pp.298-412 (2005).
 20. Byrdwell, W.C. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids* 36, 327-346 (2001).
 21. Mottram, H.R.; Evershed, R.P. Structure analysis of triacylglycerol positional isomers using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Tetrahedron Lett.* 37, 8593-8596 (1996).
 22. Mottram, H.R.; Woodbury, S.E.; Evershed, R.P. Identification of triacylglycerol positional isomers present in vegetable oils by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11, 1240-1252 (1997).
 23. Mottram, H.R.; Crossman, Z.M.; Evershed, R.P. Regiospecific characterization of the triacylglycerols in animal fats using high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analyst* 126, 1018-1024 (2001).
 24. Jakab, A.; Jablonkai, I.; Forgács, E. Quantification of the ratio of positional isomer dilinoleoyl-oleoyl glycerols in vegetable oils. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17,

- 2295-2302 (2003).
25. Nikolova-Damyanova, B. Silver-ion HPLC of fatty acids and triacylglycerols. in *HPLC of Acyl Lipids* (Lin, J.T.; McKeon, T.A. ed.) HNB Publishing, New York, pp. 221-267 (2005).
 26. Momchilova, S.; Itabashi, Y.; Nikolova-Damyanova, B.; Kuksis, A. Regioselective separation of isomeric triacylglycerols by reversed-phase high performance liquid chromatography: Stationary phase and mobile phase effects. *J. Sep. Sci.* 29, 2578-2583 (2006).
 27. Kuroda, I.; Nagai, T.; Mizobe, H.; Yoshimura, N.; Gotoh, N.; Wada, S. HPLC separation of triacylglycerol positional isomers on a polymeric ODS column. *Anal. Sci.* 24, 865-869 (2008).
 28. Fevrier, P.; Binet, A.; Dufosse, L.; Gree, R.; Yvergnaux, F. Separation of glyceride positional isomers by silver ion chromatography. *J. Chromatogr. A* 923, 53-57 (2001).
 29. Adolf, R.; List, G. Analysis of triglyceride isomers by silver-ion high-performance liquid chromatography. Effect of column temperature on retention times. *J. Chromatogr. A* 1046, 109-113 (2004).
 30. Dugo, P.; Kumm, T.; Presti, M.L.; Chiofalo, B.; Salimei, E.; Fazio, A.; Cotroneo, A.; Mondello, L. Determination of triacylglycerols in donkey milk by using high performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 28, 1023-1030 (2005).
 31. Laakso, P. Characterization of α - and γ -linolenic acid oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 1291-1300 (1997).

32. Jakab, A.; H'eberger, K.; Forg'acs, E. Comparative analysis of different plant oils by high-performance liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 976, 255-263 (2002).
33. Segall, S.D.; Artz, W.E.; Raslan, D.S.; Ferraz, V.P.; Takahashi, J.A. Analysis of triacylglycerol isomers in Malaysian cocoa butter using HPLC-mass spectrometry. *Food Res. Int.* 38, 167-174 (2005).
34. Duffin, K.L.; Henion, J.D.; Shieh, J.J. Electrospray and tandem mass spectrometric characterization of acylglycerol mixtures that are dissolved in nonpolar solvents. *Anal. Chem.* 63, 1781-1788 (1991).
35. Hvattum, E. Analysis of triacylglycerols with non-aqueous reversed-phase liquid chromatography and positive ion electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15, 187-190 (2001).
36. Momchilova, S.; Tsuji, K.; Itabashi, Y.; Nikolova-Damyanova, B.; Kuksis, A. Resolution of triacylglycerol positional isomers by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 27, 1033-1036 (2004).
37. Standard Reference Material® 869b (Column selectivity test mixture for liquid chromatography), Certificate of Analysis (National Institute of Standards and Technology).
https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/view_certPDF.cfm?certificate=869b
(参照 2013 年 12 月 6 日)
38. Iwasaki, Y.; Yasui, M.; Ishikawa, T.; Irimescu, R.; Hata, K.; Yamane, T. Optical resolution of asymmetric triacylglycerols by chiral-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 905, 111-118 (2001).

39. Fraser, B.H.; Perlmutter, P.; Wijesundera, C. Practical syntheses of triacylglycerol regioisomers containing long-chain polyunsaturated fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84, 11-21 (2007).
40. Sonnet, P.E. Synthesis of triacylglycerols. in *Lipid Synthesis and Manufacture* (Gunstone, F.D. ed.), Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. 162-184. (1999).
41. Dalgliesh, C.E. The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms. *J. Chem. Soc.* 47, 3940-3942 (1952).
42. Pirkle, W.H.; Pochapsky, T.C. Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatography separation of enantiomers. *Chem. Rev.* 89, 347-362 (1989).
43. Harris, W.S. Fish oils and plasma lipid and lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. *J. Lipid Res.* 30, 785-807 (1989).
44. Lopez-Huertas, E. The effect of EPA and DHA on metabolic syndrome patients: a systematic review of randomised controlled trials. *Br. J. Nutr.* 107 Suppl. S2, S185-S194 (2012).
45. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. Rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917 (1959).
46. Botham, K.M.; Mayes, P.A. Metabolism of acylglycerols. in *Harper's Illustrated Biochemistry*. 29th ed. (Murray, R.K.; Bender, D.A.; Botham, K.M.; Kennelly, P.J.; Rodwell, V.W.; Weil, P.A. ed.) McGraw-Hill Companies, New York, pp. 229-236 (2012).
47. Botham, K.M.; Mayes, P.A. Lipid transport and storage. in *Harper's Illustrated Biochemistry*. 29th ed. (Murray, R.K.; Bender, D.A.; Botham, K.M.; Kennelly, P.J.; Rodwell, V.W.; Weil, P.A. ed.) McGraw-Hill Companies, New York, pp. 237-249

- (2012).
48. Okamoto, Y.; Yashima, E. Polysaccharide derivatives for chromatographic separation of enantiomers. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, 1020-1043 (1998).
 49. Botham, K.M.; Mayes, P.A. Biosynthesis of fatty acids and eicosanoids. in *Harper's Illustrated Biochemistry*. 29th ed. (Murray, R.K.; Bender, D.A.; Botham, K.M.; Kennelly, P.J.; Rodwell, V.W.; Weil, P.A. ed.) McGraw-Hill Companies, New York, pp. 216-228 (2012).
 50. Kontkanen, H.; Rokka, S.; Kemppinen, A.; Miettinen, H.; Hellström, J.; Kruus, K.; Marnila, P.; Alatossava, T.; Korhonen, H. Enzymatic and physical modification of milk fat: A review. *Int. Dairy J.* 21, 3-13 (2011).
 51. Hamosh, M.; Scow, R.O. Lingual lipase and its role in the digestion of dietary lipid. *J. Clin. Invest.* 52, 88-95 (1973).
 52. Staggers, J.E.; Fernando-Warnakulasuriya, G.J.P.; Wells, M.A. Studies on fat digestion, absorption, and transport in the suckling rat. II. Triacylglycerols: molecular species, stereospecific analysis, and specificity of hydrolysis by lingual lipase. *J. Lipid Res.* 22, 675-679 (1981).
 53. Babayan, V.K. Medium chain triglycerides and structured lipids. *Lipids* 22, 417-420 (1987).
 54. Nagao, K.; Yanagita, T. Medium-chain fatty acids: Functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome. *Pharmacol. Res.* 61, 208-212 (2010).
 55. Jensen, R.G.; Ferris, A.M.; Lammi-Keefe, C.J.; Henderson, R.A. Lipids of bovine and human milks: A comparison. *J. Dairy Sci.* 73, 223-240 (1990).

56. Filer, L.J. Jr.; Mattson, F.H.; Fomon, S.J. Triglyceride configuration and fat absorption by the human infant. *J. Nutr.* 99, 293-298 (1969).
57. Carnielli, V.P.; Luijendijk, I.H.T.; van Goudoever, J.B.; Sulkers, E.J.; Anneke, A. Feeding premature newborn infants palmitic acid in amounts and stereoisomeric position similar to that of human milk: effects on fat and mineral balance. *Am. J. Clin. Nutr.* 61, 1037-1042 (1995).
58. Brown, J.B.; Orlans, B.M. The fatty acids of human milk fat. *Arch. Biochem.* 9, 201-219 (1946).
59. Winter, C.H.; Hoving, E.B.; Muskiet, F.A. Fatty acid composition of human milk triglyceride species: possible consequences for optimal structures of infant formula triglycerides. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 616, 9-24 (1993).
60. Jensen, R.G.; Patton, S. The effect of maternal diets on the mean melting points of human milk fatty acids. *Lipids* 35, 1159-1161 (2000).
61. Folch, J.; Lees, M.; Sloane-Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509 (1957).
62. Hernandez, M.J.; Garcia-Moreno, M.V.; Duran, E.; Guillen, D.; Barroso, C.G. Validation of two analytical methods for the detection of ochratoxin A by reversed-phased high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia. *Anal. Chim. Acta* 566, 117-121 (2006).
63. Collins, Y.F.; McSweeney, P.L.H.; Wilkinson, M.G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy J.* 13, 841-866 (2003).

64. Chen, L.; Daniel, R.M.; Coolbear, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *Int. Dairy J.* 13, 255–275 (2003).
65. Christie, W.W.; Clapperton, J.L. Structures of triglycerides of cow's milk, fortified milks (including infant formulae), and human milk. *Int. J. Dairy Technol.* 35, 22-24 (1982).
66. Emery, R.S. Biosynthesis of milk fat. *J. Dairy Sci.* 56, 1187-1195 (1973).
67. Kresge, N.; Simoni, R.D.; Hill, R.L. The Kennedy pathway for phospholipid synthesis: The work of Eugene Kennedy. *J. Biol. Chem.* 280, e22–e24 (2005).
68. Breckenridge, W.C.; Marai L.; Kuksis A. Triglyceride structure of human milk fat. *Can. J. Biochem.* 47, 761-769 (1969).
69. Bender, D.A.; Mayes, P.A. Nutrition, digestion, and Absorption. in *Harper's Illustrated Biochemistry*. 29th ed. (Murray, R.K.; Bender, D.A.; Botham, K.M.; Kennelly, P.J.; Rodwell, V.W.; Weil, P.A. ed.) McGraw-Hill Companies, New York, pp. 517-524 (2012).

謝辞

本研究を行うにあたり、研究全般にわたりご指導賜りました東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科 食品保全機能学専攻 食品保全化学分野の後藤直宏准教授、和田 俊教授（現：日本食品油脂検査協会 専務理事）に厚く御礼申し上げます。また、本論文をご高覧頂きました東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻 天然物生物機能科学講座の宮澤陽夫教授、桑原重文教授、山下まり教授、仲川清隆准教授に心より御礼申し上げます。

共同研究で、東京海洋大学の学生として熱心に一緒に研究を行っていただきました湯地裕美様（現：日本たばこ産業株式会社）、松本有美子様（現：日本たばこ産業株式会社）、石川桂子様、渡邊菜採子様（大学院生）、また、分析用のリサイクル HPLC システムを開発していただきましたジーエルサイエンス株式会社の黒田育磨様、キラルカラムスクリーニングを手伝っていただきました株式会社ダイセルの皆様には大変にお世話になりました。

本研究を遂行するにあたり、ご理解、ご支援いただきました当社の鶴見幸市顧問（当時 研究所所長）、当研究所の石田英明所長、小島浩一次長（兼 現：新規素材研究室室長）、また、トリアシルグリセロール研究の開始、研究室の立ち上げ時期を、当時の新規素材研究室の室長として支えてくださいました市岡建司（執行役員）生産本部部長（当時室長）、東海林茂様（当時室長）に心より御礼申し上げます。また、共に研究を進めてきた新規素材研究室の溝部帆洋係長、吉永和明様、大竹育子様、そして、研究所の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、研究に専念できるように多方面から支えてくれた友人、そして、家族に心より御礼申し上げます。