

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780138

研究課題名(和文)新規シス/トランス異性体分離法の開発とそれを利用したトランス脂肪酸の高精度分析

研究課題名(英文)Development of new analytical techniques for the separation of cis/trans isomers and its application for the precise determination of trans fatty acid contents in edible oils

研究代表者

稲垣 真輔 (Inagaki, Shinsuke)

独立行政法人産業技術総合研究所・計測標準研究部門・主任研究員

研究者番号：70423837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：トランス脂肪酸を分析するための公定法は既に定められているが、試料の前処理およびGC測定に時間を要する欠点がある。そこで、前処理の改良さらには高速GCを適用することによる迅速化を目指した。得られた成果としては、室温で約10分反応させるのみでGCへ直接注入が可能なメチルエステル化剤を見出し、高極性イオン液体のカラムを用いた高速GCと組み合わせることで、迅速なトランス脂肪酸測定法の開発に成功した。国内の市場で流通している様々な食用油脂の市販調査を行った結果、トランス脂肪酸含量は過去の報告と比較して明確に減少しており、流通している食品中のトランス脂肪酸の低減化は順調に進行していることが裏付けられた。

研究成果の概要(英文)：A simple and rapid methyl esterification technique for edible oils and a high-throughput procedure for the separation and quantification of fatty acid methyl esters including cis/trans isomers by fast GC using a highly polar ionic liquid column have been established. The developed method was successfully applied to the determination of trans fatty acid contents in commercially available edible oils, such as margarine, fat spread, shortening, olive oil, rapeseed oil, salad oil, and sesame oil. Combining the developed methyl esterification and fast GC techniques reduced the time required for the analysis of one edible oil specimen to less than 30 min; thus, the analysis time was shortened substantially to less than one-third that required in the existing official methods such as those of AOCS and JOCS. The contents determined by the developed method agreed with those determined by the existing official methods, thus confirming the reliability of the fast GC method.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 食品化学

キーワード：食品分析 トランス脂肪酸 クロマトグラフィー 高速GC メチルエステル化 質量分析

1. 研究開始当初の背景

近年、トランス脂肪酸の摂取がもたらす人体への悪影響について多数報告されている。トランス脂肪酸の過剰な摂取は、悪玉コレステロールとも呼ばれる LDL コレステロールの増加につながり、冠状動脈性心疾患のリスクを高めることが懸念されている。日本では諸外国と比較して、食生活におけるトランス脂肪酸の平均摂取量は低いため健康への影響は少ないとされるが、食の欧米化が進み、とりわけ成年男性では肥満率が大幅に増加している現状を考慮すると、決して無関係とはいえない。アメリカやカナダをはじめとする世界各国において、食品にトランス脂肪酸の含量を表示することが義務づけられており、また、その摂取を低減するための取り組みが進められている。しかしながら、厳格な法規制を行うためには、科学的な根拠はもろんのこと、信頼性の高い分析法もまた必要不可欠である。

トランス脂肪酸の測定には、ガスクロマトグラフィー (GC) あるいは赤外分光 (IR) 法が利用されている。IR 法は孤立トランス二重結合を検出する方法であり、前処理などが非常に簡便で迅速に孤立トランス脂肪酸の総量を測定可能といった長所を有するものの、一方で、検出感度が低く、また、総量のみでの測定であり、炭素鎖長やトランス二重結合の位置・数に関する情報は得られないなどの短所を有している。一方で、GC 法では、トランス脂肪酸を測定する際の公定分析法として、アメリカでは公的分析化学者協会 (AOAC) による AOAC 996.06、アメリカ油化学会 (AOCS) による AOCS Cs 1f-96 や Ce 1h-05 などが、また、我が国では日本油化学会 (JOCS) による基準油脂分析試験法 暫 17-2007 (その後、2013 年に暫定法から一般試験法 2.4.4.3-2013 に格上げされた) などが挙げられるが、これらではガスクロマトグラフィー - 水素炎イオン化検出法 (GC-FID) を利用している。しかしながら、炭素鎖の長さ、二重結合の数およびその位置を考慮すると、トランス脂肪酸の種類は膨大である。加えて、標準品もほとんど整備されておらず、市販されていない。ましてや、一次標準測定法の 1 つである同位体希釈質量分析法 (IDMS) による厳密な測定は、現状では不可能である。

また、GC による分析の際には、高極性カラムを用いて *cis/trans* 異性体の分離を行っているが、このような特殊なカラムを用いても分離は不完全であり、また、GC の検出器に質量分析計 (MS) を用いても位置異性体である *cis* 体と *trans* 体では分子量が等しいため、同定することが困難である。高極性カラムの場合、二重結合数が多い異性体の保持が強くなり、同一炭素数の異性体溶出時間範囲が広がり、より炭素数の大きな飽和成分、二重結合が 1 カ所の異性体と保持時間が重なり、分離を阻害する要因の 1 つとなる。なお、

天然の炭素数 18 の不飽和脂肪酸は 9 位付近に二重結合を持つ成分が多く見られるが、水素添加により二重結合位置が移動するため、硬化油では広い範囲に分布する。二重結合位置が 9 位から離れる成分ほど確率的に量は減少するが、メチル基末端側に二重結合を有する *trans* 体とカルボキシル基側に二重結合を有する *cis* 体が分離できないため、存在比によっては定量値の誤差が大きくなる。さらには、GC による分離後の検出に公定法では FID が利用されているが、得られる定量値は感度係数により補正したあくまで概算値であり、必ずしも正確な値ではない。事実、トランス脂肪酸の情報開示に関する指針 (消費者庁) で許容される誤差範囲は、分析精度にばらつきがあることを理由に、プラス 20% と極めて大きな値が設定されているゼログラム表示についても、原則として、食品 100 g 当たりの含有量が 0.3 g である場合にはゼログラムと表示しても差し支えないとしている。このようなことから、トランス脂肪酸分析の分析精度をさらに高めることは重要であり、必要に応じては公定分析法の改訂も求められることとなる。

また、トランス脂肪酸による心臓疾患のリスクの大きさは二重結合の位置によって異なるものと推測されている。乳脂肪などの天然油脂とマーガリンやショートニングなどの加工油脂では、含有するトランス脂肪酸の位置異性体の組成が異なることから、これまでのようにトランス脂肪酸の総量ばかりではなく、それぞれの位置異性体を定量的に評価することが重要視されてきている。しかしながら、油脂を構成する多種多様な脂肪酸を分離分析するのは非常に困難であり、新たな分析法の開発が求められている。

2. 研究の目的

食品からの過剰摂取が問題となっているトランス脂肪酸を測定するための公定法は、これまでに国内外で定められているが、トランス脂肪酸の種類が膨大なこともあり、必ずしも正確な分析法は確立されていない。本研究では、第 1 に、現行の公定分析法よりも迅速で高精度な分析法を確立することを目指す。さらには、トランス脂肪酸の総量のみではなく、位置異性体ごとの含有量を定量することが可能な分析法の開発に着手する。そして、現行の公定法との比較を行うことで、その整合性をはじめて明らかにする。さらには、実試料中に含まれるトランス脂肪酸の位置異性体ごとの含有量を明確にし、過剰摂取との関連が指摘されている心臓疾患のリスク評価などに役立てることを目指す。

3. 研究の方法

高速 GC-FID および通常の GC-FID 測定には Agilent 7890A GC (アジレント・テクノロジー製) を使用した。

高速 GC 測定の際には、SLB-IL111 (75 m

× 0.18 mm i.d., 膜厚 0.18 μm; スペルコ製) をカラムに用いた。キャリアガスにはヘリウムを用い、流速を 1.5 mL/min に設定した。カラム温度は 171°C に設定し、恒温分析による測定を行った。注入口および検出器の温度は 250°C に設定した。試料注入量は 0.5 μL、スプリット比は 50:1 である。

通常の GC 測定の際には、SP-2560(100 m × 0.25mm i.d., 膜厚 0.20 μm; スペルコ製) をカラムに用いた。カラム温度は 180°C に設定し、恒温分析による測定を行った。試料注入量は 1 μL、スプリット比は 100:1 であり、その他の測定条件は高速 GC の際と同じ条件である。

4. 研究成果

(1) 油脂試料の新規前処理法の開発と迅速化などに関する検討

食品中に含まれるトランス脂肪酸の分析には基準油脂分析試験法(JOCS法)やAOCS法などの公定分析法が広く用いられているが、これらの方法では試料の前処理(メチルエステル化)およびGC-FIDによる測定に時間を要するといった欠点がある。そこで、本研究では、メチルエステル化法の改良およびメチルエステル化に替わる新規誘導体化法の開発、さらには高速GCを適用することにより、脂肪酸類の測定の大規模な迅速化を目指した。

本研究により得られた成果としては、試料の誘導体化法を改良し、メチルエステル剤として、従来用いられているBF₃-メタノールに替え、3-(Trifluoromethyl)phenyltrimethylammonium hydroxide (*m*-TFPTAH)を適用することにより、室温で約 10 分反応させるのみでGCへの直接注入が可能な効果的なメチルエステル化剤を見出し、非常に簡便な前処理を実現した(図1)。

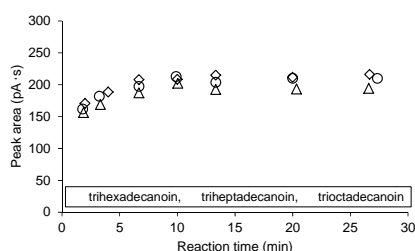


図1 *m*-TFPTAHによるメチルエステル化反応のタイムコース

また、*m*-TFPTAHによる誘導体化ばかりではなく、脂肪酸試料のメチルエステル化に替わる新規誘導体化に関する検討を行った。様々な方法を検討した結果、2-アミノ-2-メチルプロパノールを利用したジメチルオキサゾリン誘導体化法は、GCの検出器にMSを用いることで脂肪酸の不飽和位に関する情報まで得られるなど、優れた誘導体化法であることが確認された。しかしながら、BF₃-メタノール法などと比較して、誘導体化に要す

る反応時間、反応率、加熱温度の高さやその他の操作が非常に困難であり、飽和脂肪酸やトランス脂肪酸などの定量には至らず、今後、さらなる検討および改良が必要である。

さらには、GCばかりではなく、脂肪酸分析を目的としたLC/MS測定用のプロモキノリン誘導体化試薬の開発に成功している。これにより、LC/MS測定における検出感度を向上させるばかりではなく、脂肪酸の同定能力を高めることが可能であった。だが、残念なことに、食品中に多く含まれている炭素鎖が長い脂肪酸(炭素数が16~18個程度)の分析に適用することは、LCによる異性体分離の観点からも困難であり、研究期間内に測定法の確立には至らなかった。しかしながら、開発した誘導体化試薬は、以下の成果の一部に応用することが可能であったことを付け加えたい(Y. Mochizuki, S. Inagaki et al., J. Sep. Sci. 36 (2013) 1883.)

(2) 高極性イオン液体のカラムを利用した高速GCによる食用油中トランス脂肪酸の迅速な分析

m-TFPTAHによるメチルエステル化を高極性イオン液体のカラム(SLB-IL111)を使用した高速GCと組み合わせることで、脂肪酸メチルエステル類のcis/trans異性体を含む分離を達成することに成功した。図2にクロマトグラムの一例を示す。なお、これは従来のシアノプロピルシロキサンを固定相としたカラム(SP-2560やCP-Sil 88などが代表的)を用いた際よりも迅速な分離が達成されており、既存の方法よりも迅速なトランス脂肪酸測定法を開発することに成功した。

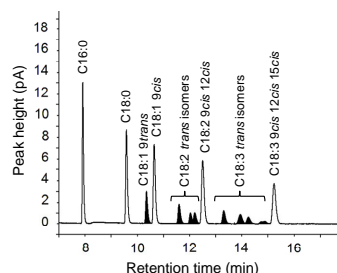


図2 高速GCによる脂肪酸メチルエステル類の迅速分析

本研究で開発した高速GC法による定量値は既存の公定法とほぼ同等であり、また、再現性も良好であった。高速GC法における1検体の測定に要する時間は、メチルエステル化の操作を含めて30分以内であり、従来の方法と比較して3分の1以下と大幅に時間を短縮することが可能であった。高速GC測定における脂肪酸メチルエステル類のピーク面積は、広い濃度範囲で良好な直線性を示し、また、検出感度も実試料の測定に十分耐えるものであった。

図3に、一例として、ショートニングおよびファットスプレッドの測定を行った際の

クロマトグラムを示す。

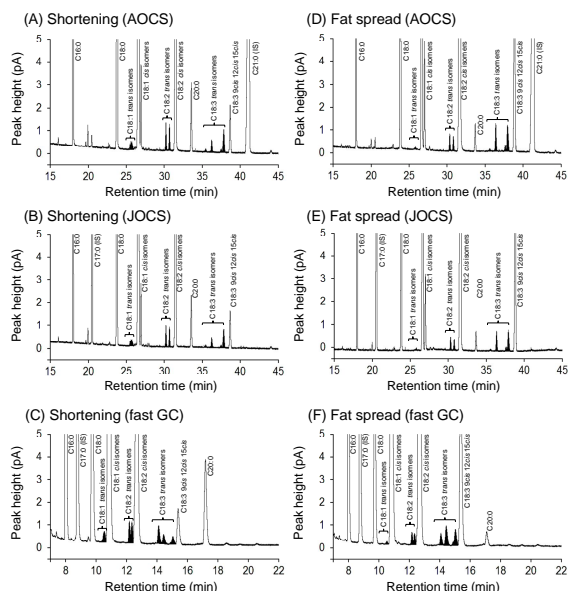


図3 高速GC法および既存の公定法による食用油中トランス脂肪酸の分析 (A-C) ショートニング、(D-F) ファットスプレッド

高速GC法により得られたトランス脂肪酸含量について、JOCS法およびAOCS法による値と比較したところ、ほぼ同等の値を得ることが可能であった(表1)。

これらの結果から、高速GC法は、食品中のトランス脂肪酸分析に有効であり、非常に簡便でかつ信頼性が高い分析法であると判断された。

表1 AOCS, JOCS および高速GC法による食用油中トランス脂肪酸含量の比較

	トランス脂肪酸含量 (g/100 g, mean ± SD, n = 3)		
	AOCS	JOCS	高速GC
ナタネ油	2.44 ± 0.03	2.53 ± 0.01	2.56 ± 0.02
オリーブ油	0.561 ± 0.003	0.571 ± 0.005	0.534 ± 0.013
サラダ油	2.10 ± 0.01	2.08 ± 0.03	2.08 ± 0.01
ゴマ油	0.924 ± 0.019	0.875 ± 0.015	0.866 ± 0.004
ショートニング	1.37 ± 0.02	1.40 ± 0.01	1.35 ± 0.01
ファットスプレッド	0.710 ± 0.010	0.743 ± 0.005	0.720 ± 0.011
マーガリン	1.84 ± 0.03	1.90 ± 0.05	1.85 ± 0.05

そこで、実際に、開発した方法により、国内の市場で流通しているマーガリンやファットスプレッド、ショートニング、サラダ油、ナタネ油、ゴマ油、オリーブ油など様々な食用油脂の市販調査を行った。

その結果、食用油中のトランス脂肪酸含量は過去の報告と比較して明確に減少していた。その要因として、油脂の製造工程でトランス脂肪酸が生じる部分水素添加に替わる技術の実用化をはじめとする食用油脂を製造する企業の自主的な努力が挙げられる。本研究による調査結果は、現在、国内で流通し

ている食用油脂中のトランス脂肪酸の低減化が順調に進行していることを裏付けるものであった。

本研究により開発された方法は、今後、油脂製品の品質管理や我々の日常におけるトランス脂肪酸摂取の迅速なスクリーニングなどに活用されることが期待される。

これらの成果は、研究期間内に学術論文として掲載されることはかなわなかったが、現在、投稿中であり、2014年中の受理および掲載が見込まれることを付け加えたい。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

稲垣真輔、沼田雅彦、イオン液体を液相に用いた高速GCによる脂肪酸分析の迅速化、日本油化学会第52年会、2013年9月4日、仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 真輔 (INAGAKI, Shinsuke)

研究者番号：70423837

(2) 研究分担者

特になし

(3) 連携研究者

特になし