

食用油脂における脂肪酸結合位置の  
分析法に関する研究

吉永 和明

# 目次

第一章 緒言.....	1
第二章 トリアシルグリセロールにおける n-3 系高度不飽和脂肪酸の結合位置 と生理機能.....	8
第三章 食用油脂中のトランス脂肪酸位置異性体の分析法の開発	
第一節 SP-2560 カラムを用いたトランス脂肪酸分析 .....	29
第二節 SLB-IL111 カラムを用いたトランス脂肪酸分析 .....	45
第四章 トリアシルグリセロールにおけるトランス脂肪酸位置異性体結合位置 の解明 .....	59
第五章 乳脂肪トリアシルグリセロールの構造と食品中の乳脂肪含有量の迅速 分析方法の開発 .....	75
第六章 総合考察 .....	87
引用文献.....	91
謝辞.....	101

## 略語一覧

略語	日本名	英名
AOAC	公認分析化学者協会	Association of Official Analytical Chemists
AOCS	アメリカ油化学会	American Oil Chemists' Society
APCI	大気圧イオン化	Atmospheric pressure chemical ionization
CLA	共役リノール酸	Conjugated linoleic acid
CM	カイロミクロン	Chylomicron
FID	水素炎イオン化検出器	Flame ionization detector
GC	ガスクロマトグラフィー	Gas chromatography
HDL	高比重リポタンパク	High-density lipoprotein
HPLC	高速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	低比重リポタンパク	Low-density lipoprotein
MAG	モノアシルグリセロール	Monoacylglycerol
ME	メチルエステル	Methyl ester
MS	質量分析計	Mass spectrometry
PHVO	部分水素添加植物油	Partially hydrogenated vegetable oil
R <sub>F</sub>	レスポンスファクター	Response factor
SFA	飽和脂肪酸	Saturated fatty acid
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
VLDL	超低比重リポタンパク	Very low-density lipoprotein

略語	日本名	英名
C4:0 (Bu)	酪酸	Butyric acid
C16:0 (P)	パルミチン酸	Palmitic acid
C18:0	ステアリン酸	Stearic acid
<i>cis</i> -C18:1 (O)	オレイン酸	Oleic acid
C20:5 (E)	エイコサペンタエン酸	Eicosapentaenoic acid
C21:0	ヘンエイコサン酸	Heneicosanoic acid
C22:6 (D)	ドコサヘキサエン酸	Docosahexaenoic acid

## 第一章 緒言

脂質は、タンパク質、炭水化物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エネルギー源である。天然界に存在する脂質の大部分は、トリアシルグリセロール (TAG) の形態であり、食用油脂の主成分として広く知られている。TAG の構造は、グリセロールの 3 箇所の水酸基に 3 つの脂肪酸がそれぞれエステル結合した化学構造を有しており (Fig.1-1) <sup>1)</sup>、脂肪酸の結合位置は、Fischer の投影図に基づいた立体特異的番号によって *sn*-1、*sn*-2、*sn*-3 位と区別される。また、単純にグリセリンの両脇の水酸基を  $\alpha$  位、中心の水酸基を  $\beta$  位とも定義される。各結合位置に存在する脂肪酸は、ランダムに結合しているわけではなく、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おり、それぞれの生物種に固有のものである。例えば、パーム油の TAG は、飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (C16:0) やステアリン酸 (C18:0) が *sn*-1,3 位に結合し、不飽和脂肪酸であるオレイン酸 (C18:1) やリノール酸 (C18:2) が *sn*-2 位に結合している <sup>2,3)</sup>。このような傾向は、大豆油やココアバターなどの植物油に見られる共通の特徴である。一方、ウシを代表とする反芻動物の乳脂肪は、酪酸 (C4:0)、カプロン酸 (C6:0)、カプリル酸 (C8:0) などの短鎖脂肪酸を豊富に含んでおり、これらが *sn*-3 位に選択的に結合する特徴を持っている <sup>4-6)</sup>。これは、仔牛の Pregastric lipase が *sn*-3 位の短鎖脂肪酸に選択性を持っており、短鎖脂肪酸が仔牛への効率の良い栄養源として重要な意味を持っていると考えられる。

TAG の構造と栄養に関しては、今までに数多くの研究が行われてきており、*sn*-1,3 位と *sn*-2 位に結合している脂肪酸は、異なる消化・吸収経路を持つことが明らかとなってきた <sup>7)</sup>。一般に、TAG の *sn*-1,3 位に結合している脂肪酸は、

小腸内で加水分解を受け、遊離脂肪酸となるため、その一部がカルシウムと石鹼を作り、吸収されにくい<sup>8)</sup>。しかし、*sn*-2 位に結合している脂肪酸は、2-モノアシルグリセロール (2-MAG) として存在し、カルシウムと石鹼を作ることではないため、*sn*-1,3 位に結合している脂肪酸と比べ、吸収されやすい。ヒトにとって重要なエネルギー源である C16:0 は、ヒト母乳において *sn*-2 位に特異的に結合しており、乳児体内に効率良く吸収させることができる<sup>9,10)</sup>。また、TAG の構造は、食用油脂の物性にも大きな影響を与える。チョコレートの原料であるココアバター中の主要な TAG は、C16:0 や C18:0 などの飽和脂肪酸が *sn*-1,3 位に結合し、C18:1 などの不飽和脂肪酸が *sn*-2 位に結合している。チョコレートの清涼感のある口溶けは、これらの TAG がシャープな融解挙動をとることに起因する<sup>11)</sup>。さらに、近年では個々の脂肪酸が有する生理機能が、TAG の結合位置によって影響を受けることが明らかとなってきた。例えば、魚油や海獣油に含まれるエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などの *n*-3 系高度不飽和脂肪酸 (*n*-3HUFA) は、肝臓における TAG 合成阻害効果<sup>12)</sup> や  $\beta$ -酸化の亢進効果<sup>13)</sup>、また、これら効果に起因する血中および肝臓中の TAG およびコレステロール濃度の低下効果<sup>14-16)</sup>などの様々な生理機能を有することが知られている。この *n*-3HUFA の TAG における結合位置は、魚油と海獣油では異なっており、魚油の *n*-3HUFA は TAG の  $\beta$  (*sn*-2) 位に結合し、海獣油の *n*-3HUFA は TAG の  $\alpha$  (*sn*-1,3) 位に多く結合する<sup>17)</sup>。近年、これらの結合位置の違いが、*n*-3HUFA の機能性に大きな影響を与えることが様々な研究により明らかとなってきた<sup>18-21)</sup>。Yoshida および Ikeda らは、魚油または海獣油をラットに投与し、両者の生理機能の違いを比較した。その結果、海獣油投与群は、魚油投与群と比べ、血中および肝臓中 TAG 濃度が有意に低下することを報告した<sup>19-21)</sup>。このような研究は、TAG の構造と栄養機能の関係を評価するうえで価値

のある研究である。しかしながら、魚油と海獣油を直接比較したこれらの結果から、個々の EPA および DHA の生理機能が TAG 結合位置により、どのような影響を受けるのか判断することは困難である。このように、TAG における脂肪酸の結合位置と脂質代謝の関係性を調査した研究は、人体に良い効果をもたらす n-3HUFA について研究が進んでいるが、人体に悪影響を及ぼすと言われるトランス (型) 脂肪酸が TAG のどの位置に結合しているのかを精査した研究例は少ない。

トランス脂肪酸は、植物油等に水素添加して半固体または固体状の油脂に作り変える工程 (部分水素添加)、または、反芻動物 (ウシ、ヤギ、ヒツジなど) の第一胃内に存在する微生物による生体内水素添加反応 (Biohydrogenation) によって生成するため、部分水素添加油 (部分水添油) および反芻動物由来の油脂に含まれている。近年では、部分水添油由来のトランス脂肪酸の過剰摂取は、心疾患のリスクを高めることが明らかになってきており<sup>22,23)</sup>、世界中で関心が高まっている。トランス脂肪酸の結合位置を精査したいくつかの研究によると、ウシの乳脂肪中のトランス脂肪酸は、sn-2 位に結合すると報告されている<sup>24-26)</sup>。しかしながら、これらの研究は、乳脂肪中に存在するトランス脂肪酸の「位置異性体」を考慮していない。トランス脂肪酸には、炭素数と二重結合数が同じ脂肪酸であっても、トランス型二重結合の位置によって様々な「位置異性体」が存在する。例えば、部分水添油に含まれるオクタデセン酸 (C18:1) には、13 種類 (*trans*-4-C18:1 から *trans*-16-C18:1 まで) の位置異性体が存在する (Fig. 1-2)<sup>27)</sup>。この位置異性体は、部分水添油および乳脂肪ごとにその分布が異なり、部分水添油は、エライジン酸 (*trans*-9-C18:1) が主成分であり、次いで、*trans*-6~8、*trans*-10、*trans*-11-C18:1 などの位置異性体が多く含まれる<sup>28)</sup>。一方、乳脂肪中のトランス脂肪酸は、大部分がバクセン酸 (*trans*-11-C18:1) によって占め

られる<sup>29,30)</sup>。このようなトランス脂肪酸位置異性体は、異性体ごとに人体に異なる影響を及ぼすと考えられている。いくつかの疫学調査によると、部分水添油由来のトランス脂肪酸は心疾患と正の相関性を示すが、反芻動物由来のトランス脂肪酸は影響がないと報告している<sup>31-33)</sup>。これらの研究から、反芻動物由来のトランス脂肪酸は、部分水添油由来のトランス脂肪酸よりも健康への影響が小さいと考えられている。しかしながら、このような疫学調査は、部分水添油と乳脂肪を比較したものであり、これらの油脂に数多く存在するトランス脂肪酸の位置異性体のうち、どの異性体が人体に悪影響を及ぼすのかを評価した結果ではない。このようにトランス脂肪酸の研究が進まない原因として、従来のトランス脂肪酸分析法では、食用油脂に含まれる数多くの位置異性体の分離・定量が困難であることが挙げられる。

一般に、油脂の脂肪酸組成は、ガスクロマトグラフ-水素炎イオン化検出器 (GC-FID) によって分析されている。中でも、トランス脂肪酸の表示を行っている諸外国で広く利用されている分析方法は、「AOAC 996.06」<sup>34)</sup>と「AOCS Ce 1h-05」<sup>35)</sup>があり、日本では、日本油化学会が作成した「基準油脂分析試験法 2.4.4.3-2013」<sup>36)</sup>が知られている。これらの分析方法に使用されるカラムは、様々な種類が販売されており、分析用途によって使い分けられている。近年では、技術力の進展により、従来の分析カラムよりも優れた性能を持つカラムが開発されてきている。現在までに、数多くの研究者が、食用油脂に含まれる様々な種類の脂肪酸種を分離・定量する方法を検討してきたが、トランス脂肪酸のように数多くの異性体を持つ脂肪酸を分離することは困難であった。

一方、TAG における脂肪酸の結合位置の分析には、酵素 (リパーゼ) を用いた手法が広く用いられている<sup>37-39)</sup>。これは、リパーゼが TAG の *sn*-1,3 位に結合する脂肪酸を選択的に加水分解する特性を利用した方法であり、これによって、

TAG の *sn*-1,3 位と *sn*-2 位の脂肪酸組成を分析することができる。これらの手法を用いて、乳脂肪の TAG におけるトランス脂肪酸の結合位置について調査した研究がいくつか報告されているが<sup>25,26)</sup>、前述のとおり、トランス脂肪酸異性体を分離・定量する手法が確立されていないため、乳脂肪 TAG におけるトランス脂肪酸異性体の結合位置については研究が進んでいない。このように、油脂を構成する脂肪酸の種類およびそれらの TAG 結合位置に関する研究は、解決すべきいくつかの問題点を残していた。

そこで本研究では、従来の TAG 解析での種々の問題点を解決する新しい分析手法を構築するため、以下の実験を行った。第二章では、TAG 結合位置ごとの *n*-3HUFA の生理機能を明らかにするため、個々の EPA または DHA の機能が TAG の結合位置によって、どのような影響を受けるのかを精査した。第三章では、従来の分析技術では分離することが困難であったトランス脂肪酸位置異性体を分離・定量する分析手法を開発した。第四章では、第三章で開発した分析手法とリパーゼによる脂肪酸結合位置分析を組み合わせ、食用油脂におけるトランス脂肪酸位置異性体の結合位置を精査した。また、第五章では、乳脂肪に特異的に含まれている TAG を利用して、食品に使用されている乳脂肪含有量を迅速に測定する方法を開発した。

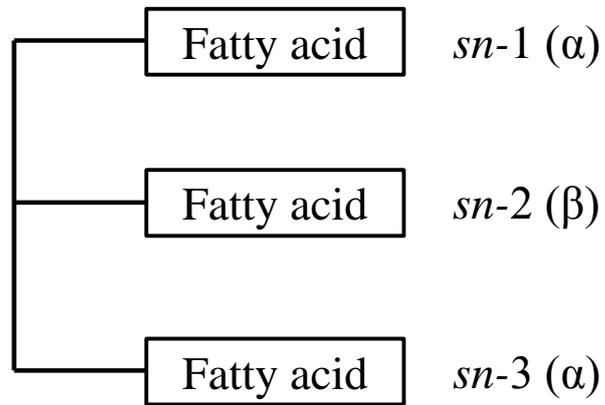


Figure 1-1  
Chemical structure of triacylglycerol.

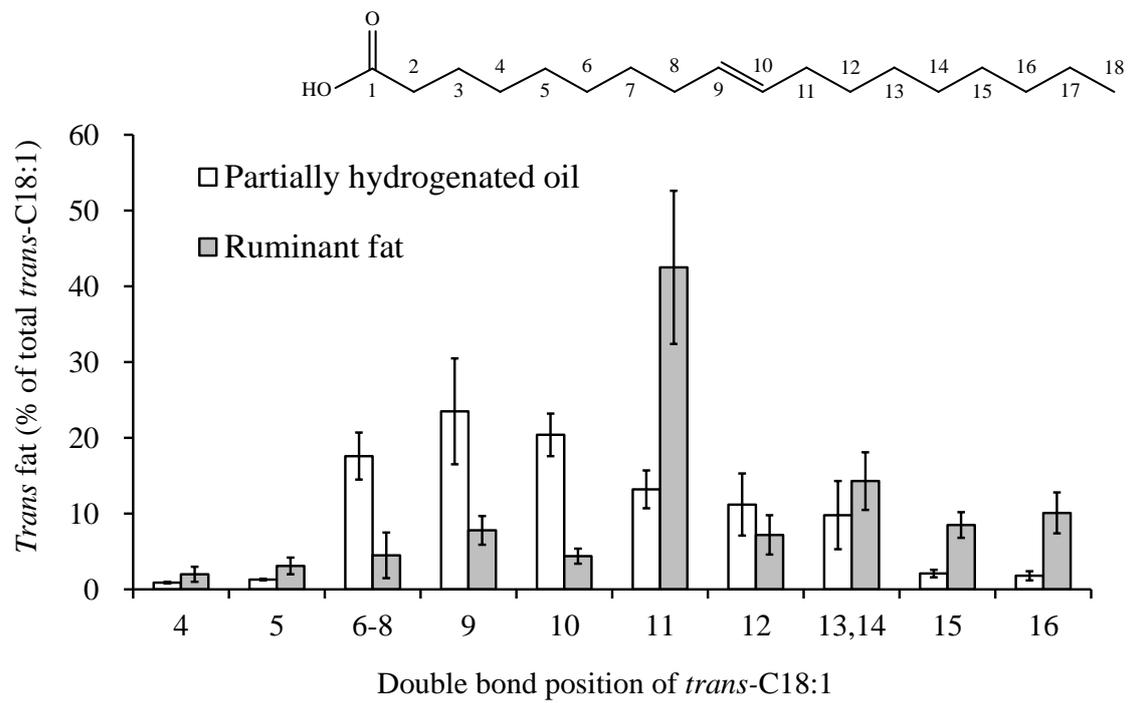


Figure 1-2  
Isomeric distribution of *trans*-octadecenoic acid (C18:1) in edible fats and oils.

## 第二章 トリアシルグリセロールにおける n-3 系高度不飽和脂肪酸の結合位置と生理機能

### 緒言

魚油や海獣油に多く含まれる n-3HUFA は、TAG における結合位置によってその生理機能が変化することが様々な研究により明らかとなってきた。Ikeda ら<sup>19)</sup>および Yoshida ら<sup>20, 21)</sup>は、魚油または海獣油をラットに投与し、TAG における結合位置ごとの n-3HUFA の生理機能を比較した。その結果、海獣油は、魚油と比べ血中および肝臓中 TAG 濃度を有意に低下させる効果を持つと報告した。さらに、Mayer ら<sup>40)</sup>および Mann ら<sup>41)</sup>は、海獣油をヒトに投与した場合においても血中 TAG 濃度の低下効果があることを確認した。魚油に含まれる n-3HUFA は TAG の sn-2 位に多く、一方、海獣油に含まれる n-3HUFA は TAG の sn-1,3 位に多く結合していることから、sn-1,3 位に結合した n-3HUFA は、sn-2 位に結合した n-3HUFA と比べ、優れた保健効果を有すると考えることができる。しかしながら、海獣油は、n-3HUFA の一つであるドコサペンタエン酸 (DPA) が、魚油と比べ豊富に含まれている<sup>40-43)</sup>。Gotoh らは、EPA、DPA、DHA の生理機能を比較した結果、DPA は EPA と DHA と同等の脂質代謝改善効果を有することを確認した<sup>44)</sup>。そのため、魚油と海獣油を比較する際、EPA や DHA の結合位置だけでなく、DPA の存在も考慮に入れなくてはならない。以上のことから、TAG 結合位置ごとの n-3HUFA の生理機能を評価するためには、TAG 標準品を用いるのが望ましいと考えられる。

本章では、TAG における EPA または DHA の結合位置が、それぞれの生理機能にどのような影響を及ぼすのかを精査するため、EPA または DHA を含む TAG 標準品を用いた C57BL/6J マウスへの投与試験を行った。

## 実験材料および方法

### 実験材料

投与試験には、脂肪酸の組成は同一であるが、脂肪酸の結合位置の異なる TAG (TAG 位置異性体) を用いた (Fig. 2-1)。EPA の生理機能の比較試料には、パルミチン酸 2 分子と EPA から構成される TAG 位置異性体ペアである 1,2(2,3)-Dipalmitoyl-3(1)-eicosapentaenoyl glycerol ( $\beta$ -PPE) および 1,3-Dipalmitoyl-2-eicosapentaenoyl glycerol ( $\beta$ -PEP) を用い、DHA の評価には、パルミチン酸 2 分子と DHA から構成される TAG 位置異性体ペアである 1,2(2,3)-Dipalmitoyl-3(1)-docosahexaenoyl glycerol ( $\beta$ -PPD) および 1,3-Dipalmitoyl-2-docosahexaenoyl glycerol ( $\beta$ -PDP) を用いた。また、全試料のコントロールとして、パルミチン酸 3 分子から構成される TAG (Tripalmitoyl glycerol, PPP) を採用した。これらの試薬は、月島食品工業株式会社にて合成し、NMR、GC、HPLC により構造確認を行っており、それぞれの化学純度は 99%以上である。

### 飼料の調製

試験食の組成を Table 2-1 に示す。TAG 標準品の添加量は食餌中 3%とした。また、マウスを高脂血症になりやすくするため、ラードを 12%添加し、食餌中の合計脂質量を 15%に調製した。食餌中の脂肪酸組成を Table 2-2 に示した。

### 動物試験

本実験は、「高知県立大学における動物実験等に関する規程」に従って試験計画を策定し、実施した。

試験動物は、4 週齢の雄 C57BL/6J マウス (日本クレア) を用いた。各マウス

は、室温 23±2°C、明暗サイクル (7:00-19:00) の環境下、CE-2 (日本クレア) を用いて 7 日間予備飼育を行った。予備飼育後、マウスを 6 匹ずつ 5 群 (PPP、β-PPE、β-PEP、β-PPD、β-PDP 投与群) に分け、ケージ内にて試験食を 6 週間自由摂取させた。

マウス体重は、飼育期間中毎週測定した。飼育最終日に 9 時間絶食させた後、終体重を測定し、エーテル麻酔下において心臓採血により屠殺を行った。肝臓および脂肪組織は、重量を測定した後、液体窒素にて凍結した。血液は、遠心分離 (1,750×g、15min、4°C) にかけて後、血清を回収した。すべての試料は、分析するまで、-80°Cにて保管を行った。

### 血清脂質分析

血清中の主要なリポタンパクであるカイロミクロン (CM)、超低比重リポタンパク (VLDL)、低比重リポタンパク (LDL)、高比重リポタンパク (HDL) 中の TAG およびコレステロール濃度は、TSKgel LipopropakXL カラム (300 mm × 7.8 mm; Tosoh, Tokyo, Japan) を二本連結させたゲル浸透クロマトグラフィーにて測定した (スカイライト・バイオテックへの依頼分析)。

### 肝臓脂質分析

肝臓脂質は、Folch 法に従って抽出を行った<sup>45)</sup>。肝臓中の TAG 濃度は、Fletcher らの方法<sup>46)</sup>によって測定し、リン脂質濃度は Rouser らの方法<sup>47)</sup>によって測定した。また、肝臓中のコレステロール濃度は、コレステロール E-テスト (和光純薬) を用いて測定した。

## 肝臓の脂質代謝関連酵素活性の測定

肝臓をホモジナイズ後、遠心分離にかけ、ミトコンドリア画分およびサイトゾル画分を得た。各画分のタンパク質量は、Lowry 法により測定した<sup>48)</sup>。脂肪酸合成酵素 (FAS) 活性およびグルコース 6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) 活性は、Kelly らの方法<sup>49,50)</sup>を用いて測定した。リンゴ酸酵素 (ME) 活性、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (CPT) 活性およびペルオキシソーム  $\beta$ -酸化活性は、Ochoa らの方法<sup>51)</sup>、Markwell らの方法<sup>52)</sup>、および Lazarow らの方法<sup>53)</sup>を用いて、それぞれ測定を行った。

## 肝臓の mRNA 発現量の測定

肝臓の総 RNA は、RNeasy lipid tissue kit (Qiagen) を用いて抽出した。Complementary DNA (cDNA) は、TaqMan Reverse-Transcription 試薬 (Applied Biosystems) を用いて調製した。mRNA 発現量は、ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) によるリアルタイム RT-PCR 法を用いて測定した。

## エイコサノイド産生量の測定

プロスタサイクリン ( $\text{PGI}_2$ ) 産生量は、約 15 mg の大動脈を Krebs-Henseleit bicarbonate 緩衝液 (pH 7.4) 中でインキュベート (25°C、30min) し、 $\text{PGI}_2$  の安定な代謝産物である 6-keto-prostaglandin  $\text{F}_{1\alpha}$  を 6-keto-prostaglandin  $\text{F}_{1\alpha}$  enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical) を用いて測定した。

血液 1 mL を遠心分離 (3,000rpm、4°C、10min) し、上清を得た。 тромбоキサン  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) 産生量は、その安定な代謝産物である Thromboxane  $\text{B}_2$  を Thromboxane  $\text{B}_2$  enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical) を用いて測定した。

## 肝臓および脂肪組織の脂肪酸組成分析

肝臓および脂肪組織からの脂質抽出は、Folch 法に従った<sup>45)</sup>。抽出した脂質は、三フッ化ホウ素メタノール溶液にてメチルエステル化を行った後、GC-FIDにて脂肪酸組成分析を行った。

### 【分析条件】

分析機器：GC-14B（島津製作所）

検出器：水素炎イオン化検出器

分析カラム：Omegawax320（30 m×0.25 mm i.d., 0.25 μm; Sigma-Aldrich）

注入口温度：250℃

検出器温度：260℃

カラム温度：175℃→（1℃/min）→225℃（20min 保持）

キャリアーガス：ヘリウム（1 mL/min）

スプリット比：80：1

### 統計解析

データは、平均値±標準誤差で示した。各項目の統計解析は、一元配置分散分析を行い、有意差（ $P<0.05$ ）が生じた場合、Tukey-Kramerの多重比較検定を行った。

## 結果

### 体重および組織重量

投与試験後の C57BL/6J マウスの体重、摂食量、および、各組織重量を Table 2-3 に示した。投与を行った 5 群間の体重、摂食量に有意な差は認められなかった。同様に、5 群間の各組織重量においても、有意差はなかった。

### n-3HUFA 投与による血清脂質および肝臓脂質への影響

投与試験後の C57BL/6J マウスの血清および肝臓脂質濃度を Table 2-4 に示した。PPP (コントロール) 投与群と比較すると、 $\beta$ -PDP (TAG の *sn*-2 位に結合した DHA) 投与群でのみ、血清 TAG 濃度が有意に減少した。これは、 $\beta$ -PDP 投与によって、VLDL の TAG 濃度が減少したことに起因した。TAG 結合位置間の生理機能を比較すると、TAG の *sn*-2 位に結合した DHA ( $\beta$ -PDP) は、*sn*-1,3 位に結合した DHA ( $\beta$ -PPD) よりも、血清 TAG 濃度を有意に減少させた。また、両 EPA 含有 TAG ( $\beta$ -PPE、 $\beta$ -PEP) 投与は、血清 TAG 濃度に影響を及ぼさなかった。血清コレステロール濃度は、すべての n-3HUFA 含有 TAG ( $\beta$ -PPE、 $\beta$ -PEP、 $\beta$ -PPD、 $\beta$ -PDP) 投与によって有意に減少した。結合位置間の生理機能を比較すると、血清 TAG 減少効果と同じく、TAG の *sn*-2 位に結合した DHA ( $\beta$ -PDP) は、*sn*-1,3 位に結合した DHA ( $\beta$ -PPD) よりも、血清コレステロール濃度を減少させた。一方、EPA 含有 TAG ( $\beta$ -PPE、 $\beta$ -PEP) 投与による血清コレステロール濃度低下能は、結合位置間に有意な差は認められなかった。

肝臓 TAG 濃度は、 $\beta$ -PDP (TAG の *sn*-2 位に結合した DHA) 投与群でのみ有意に減少した。肝臓コレステロール濃度は、 $\beta$ -PPE (TAG の *sn*-1,3 位に結合した EPA) および  $\beta$ -PDP (TAG の *sn*-2 位に結合した DHA) 投与群で有意に減少した。

### n-3HUFA 投与による脂質代謝関連酵素活性への影響

肝臓における脂質代謝関連酵素活性を Table 2-5 に示した。脂肪酸合成に関連する酵素 (FAS、ME、G6PDH) の活性は、すべての n-3HUFA 含有 TAG ( $\beta$ -PPE、 $\beta$ -PEP、 $\beta$ -PPD、 $\beta$ -PDP) 投与によって有意に減少した。また、n-3HUFA の結合位置間の生理機能に有意な差は認められなかった。

### n-3HUFA 投与による肝臓 mRNA 発現量への影響

肝臓の mRNA 発現量を Table 2-6 に示した。脂質代謝の転写因子である Sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) は、 $\beta$ -PDP (TAG の *sn*-2 位に結合した DHA) 投与群でのみ有意に減少した。脂肪酸合成酵素 (FAS、Stearoyl-CoA desaturase) の mRNA 発現量は、すべての n-3HUFA 含有 TAG ( $\beta$ -PPE、 $\beta$ -PEP、 $\beta$ -PPD、 $\beta$ -PDP) 投与によって有意に減少した。また、コレステロール関連酵素では、LDL receptor の mRNA 発現量が  $\beta$ -PPE、 $\beta$ -PDP 投与群で有意に減少した。一方、HMG-CoA reductase は、n-3HUFA 含有 TAG ( $\beta$ -PPE、 $\beta$ -PEP、 $\beta$ -PPD、 $\beta$ -PDP) 投与による影響は受けなかった。

### n-3HUFA 投与によるエイコサノイド産生量への影響

C57BL/6J マウスの PGI<sub>2</sub> および TXA<sub>2</sub> 産生量を Table 2-7 に示した。PGI<sub>2</sub> 産生量は、すべての n-3HUFA 含有 TAG ( $\beta$ -PPE、 $\beta$ -PEP、 $\beta$ -PPD、 $\beta$ -PDP) 投与によって有意に増加した。一方、TXA<sub>2</sub> 産生量は、 $\beta$ -PPE (TAG の *sn*-1,3 位に結合した EPA) 投与群でのみ有意に減少した。PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 比は、 $0.206 \pm 0.011$  (コントロール)、 $0.545 \pm 0.031$  ( $\beta$ -PPE)、 $0.367 \pm 0.013$  ( $\beta$ -PEP)、 $0.428 \pm 0.019$  ( $\beta$ -PPD)、 $0.382 \pm 0.012$  ( $\beta$ -PDP) であった。PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 比は、すべての n-3HUFA 含有 TAG ( $\beta$ -PPE、 $\beta$ -PEP、 $\beta$ -PPD、 $\beta$ -PDP) 投与によって有意に増加し、中でも  $\beta$ -PPE (TAG

の *sn*-1,3 位に結合した EPA) 投与群で最も高い値となった。

### n-3HUFA 投与による脂肪酸組成への影響

投与試験後の肝臓および脂肪組織の脂肪酸組成を Fig. 2-2、Fig. 2-3 に示した。コントロールと比較して、n-3HUFA 含有 TAG ( $\beta$ -PPE、 $\beta$ -PEP、 $\beta$ -PPD、 $\beta$ -PDP) 投与群の肝臓中 C18:1 およびアラキドン酸 (C20:4) 濃度は、有意に減少した。一方、肝臓中 C16:0 および n-3HUFA (EPA、DPA、DHA) 濃度は、n-3HUFA 含有 TAG ( $\beta$ -PPE、 $\beta$ -PEP、 $\beta$ -PPD、 $\beta$ -PDP) 投与により、増加した。同様の傾向は、脂肪組織でも確認された。

## 考察

海獣油 (*sn*-1,3 位に結合した n-3HUFA) と魚油 (*sn*-2 位に結合した n-3HUFA) の生理機能を比較した過去の研究では、海獣油は、魚油よりも優れた保健機能を有することが報告された<sup>19-21,40,41)</sup>。すなわち、n-3HUFA は、*sn*-1,3 位に結合した際に優れた効果を発揮すると考えることができる。しかしながら、海獣油には、n-3HUFA の一つである DPA が魚油と比べ豊富に含まれている<sup>40-43)</sup>。Gotoh らは、EPA、DPA、DHA を C57BL/KsJ-*db/db* マウスに投与し、それぞれの生理機能を比較した。その結果、DPA は、EPA や DHA と同等の脂質代謝改善効果を有することを明らかにした<sup>44)</sup>。以上のことから、魚油と海獣油を比較した研究から、n-3HUFA の生理機能が結合位置によって、どのような影響を受けるのか精査することは困難である。そこで本章では、n-3HUFA を含む TAG 標準品を用いて、TAG における EPA または DHA の結合位置が、それぞれの生理機能にどのような影響を及ぼすのかを精査した。

血清脂質および肝臓脂質の結果 (Table 2-4) より、TAG の *sn*-2 位に結合した DHA ( $\beta$ -PDP) は、*sn*-1,3 位に結合した DHA ( $\beta$ -PPD) よりも、血清および肝臓 TAG 濃度を減少させることが判明した。EPA、DHA などの n-3HUFA は、脂肪酸や TAG 合成の阻害効果、 $\beta$ -酸化の促進効果、および、肝臓からの VLDL 産生阻害効果を持つことが報告されており<sup>12,13,54,55)</sup>、本章においても、n-3HUFA 含有 TAG ( $\beta$ -PPE、 $\beta$ -PEP、 $\beta$ -PPD、 $\beta$ -PDP) 投与によって、脂肪酸合成酵素の活性および mRNA 発現量が低下した (Table 2-5、Table 2-6)。しかしながら、これらの低下能は、結合位置 (*sn*-1,3 位と *sn*-2 位) 間で有意な差が認められなかった。Ikeda ら<sup>19)</sup>は、魚油または海獣油の投与がラット肝臓の脂肪酸組成に及ぼす影響を比較した結果、*sn*-2 位に結合した n-3HUFA は、*sn*-1,3 位に結合した n-3HUFA よりも肝臓 TAG 中の n-3HUFA 濃度を増加させることを報告した。本

章においても、肝臓中の DHA 濃度は、 $\beta$ -PPD 投与よりも、 $\beta$ -PDP 投与によって増加する傾向が見られたが、有意差は認められなかった (Fig. 2-2)。以上のことから、本章では、*sn*-2 位に結合した DHA ( $\beta$ -PDP) は、*sn*-1,3 位に結合した DHA ( $\beta$ -PPD) よりも、血清および肝臓 TAG 濃度を減少させることが明らかとなった。しかしながら、そのメカニズムについて明確することは困難であり、今後さらなる研究が求められる。

血清コレステロール濃度 (Table 2-4) は、すべての n-3HUFA 含有 TAG ( $\beta$ -PPE、 $\beta$ -PEP、 $\beta$ -PPD、 $\beta$ -PDP) 投与によって有意に減少した。また、肝臓コレステロール濃度は、 $\beta$ -PPE (TAG の *sn*-1,3 位に結合した EPA) および  $\beta$ -PDP (TAG の *sn*-2 位に結合した DHA) 投与群で有意に減少した。しかしながら、肝臓におけるコレステロール関連酵素の mRNA 発現量 (Table 2-6) に大きな違いは見られなかった。Ikeda ら<sup>55)</sup>、Roach ら<sup>56)</sup>、Frøyland ら<sup>57)</sup>、Kim ら<sup>58)</sup>の研究によると、n-3HUFA は血清コレステロール濃度を減少させることが報告されているが、そのメカニズムについては明らかになっていない。そのため、コレステロールと n-3HUFA の関係については、今後さらなる研究が必要であると考えられる。

個々のエイコサノイド産生量 (Table 2-7) では、 $\text{PGI}_2$  産生量は、すべての n-3HUFA 含有 TAG 投与群において増加しており、これは Saito らの過去の報告<sup>59)</sup>と一致した。また、 $\text{TXA}_2$  産生量は、 $\beta$ -PPE (TAG の *sn*-1,3 位に結合した EPA) 投与によって減少した。Ikeda ら<sup>19)</sup>や Murphy ら<sup>60)</sup>の研究では、海獣油 (*sn*-1,3 位に結合した n-3HUFA) は、魚油 (*sn*-2 位に結合した n-3HUFA) と比べ、 $\text{TXA}_2$  産生量を低下させると報告している。このメカニズムとして、*sn*-1,3 位に結合した n-3HUFA は、組織中の C20:4 量を効果的に減少させると考えられている。本章では、n-3HUFA 投与は、C20:4 合成に関与する  $\Delta 6$ -desaturase 発現を阻害し (Table 2-6)、組織中の C20:4 量が減少することが確認できたが (Fig. 2-2、Fig.

2-3)、n-3HUFA 結合位置 (*sn*-1,3 位と *sn*-2 位) 間に有意差は認められなかった。PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 比の増加は、血小板凝集や血小板機能異常のリスクを低減させることが知られている。本章では、*sn*-1,3 位に結合した n-3HUFA は、*sn*-2 位に結合した n-3HUFA よりも、PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 比を増加させることが判明した (Table 2-7)。以上のことから、*sn*-1,3 位に結合した n-3HUFA は、*sn*-2 位に結合した n-3HUFA と比べ、血栓性疾患に有効であると考えられる。

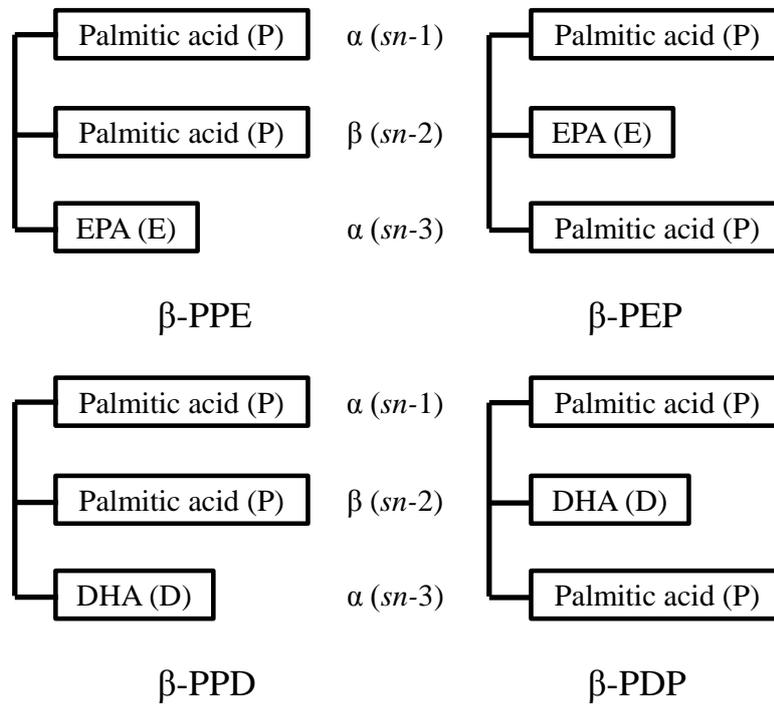


Figure 2-1  
Structure of triacylglycerol positional isomers.

Table 2-1

The composition of experimental diets (g/kg).

Ingredient	PPP	$\beta$ -PPE	$\beta$ -PEP	$\beta$ -PPD	$\beta$ -PDP
Cornstarch	449	449	449	449	449
Casein	200	200	200	200	200
Lard	120	120	120	120	120
Sucrose	100	100	100	100	100
Cellulose	50	50	50	50	50
AIN-93G-MIX	35	35	35	35	35
TAG standard	30	30	30	30	30
AIN-93G-VX	10	10	10	10	10
L-cystine	3	3	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
<i>tert</i> -butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014

Table 2-2

Fatty acid composition of dietary fats (wt%).

Fatty acid	PPP	$\beta$ -PPE	$\beta$ -PEP	$\beta$ -PPD	$\beta$ -PDP
C14:0	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
C14:1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
C15:1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
C16:0	41.4	34.8	34.8	34.8	34.8
C16:1	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
C17:0	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
C17:1	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
C18:0	9.7	9.7	9.7	9.7	9.7
C18:1n-9	34.0	34.0	34.0	34.0	34.0
C18:2n-6	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8
C18:3n-3	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
C20:0	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50
C20:1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
C20:4n-6	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
C20:5n-3	—	6.7	6.7	—	—
C22:6n-3	—	—	—	6.7	6.7

Table 2-3

Effect of experimental diets on growth parameters in C57BL/6J mice.

	PPP	$\beta$ -PPE	$\beta$ -PEP	$\beta$ -PPD	$\beta$ -PDP
Initial body weight (g)	17.4 $\pm$ 0.4	17.3 $\pm$ 0.2	18.0 $\pm$ 0.2	17.5 $\pm$ 0.3	18.0 $\pm$ 0.1
Final body weight (g)	25.6 $\pm$ 0.8	25.7 $\pm$ 0.4	25.9 $\pm$ 0.5	26.0 $\pm$ 0.2	26.0 $\pm$ 0.3
Average food intake (g/day)	3.00	2.99	2.98	3.01	2.98
Liver (g/100 g BW)	3.36 $\pm$ 0.12	3.35 $\pm$ 0.06	3.22 $\pm$ 0.10	3.43 $\pm$ 0.09	3.16 $\pm$ 0.11
Epididymal fat (g/100 g BW)	2.22 $\pm$ 0.22	2.18 $\pm$ 0.20	2.22 $\pm$ 0.21	2.51 $\pm$ 0.15	1.92 $\pm$ 0.18

Each value represents mean  $\pm$  SE of six mice.

Table 2-4

Effect of experimental diets on serum and hepatic lipid in C57BL/6J mice.

	PPP	β-PPE	β-PEP	β-PPD	β-PDP
Serum lipid concentration (mg/dL)					
Triacylglycerol					
Total	106 ± 8	88.8 ± 7.5 <sup>bc</sup>	105 ± 11 <sup>ab</sup>	130 ± 10 <sup>a</sup>	67.6 ± 6.0 <sup>c*</sup>
CM	3.49 ± 0.76	2.07 ± 0.47 <sup>b</sup>	4.90 ± 1.13 <sup>ab</sup>	5.80 ± 0.95 <sup>a</sup>	1.95 ± 0.48 <sup>b</sup>
VLDL	81.5 ± 6.6	63.2 ± 5.8 <sup>b</sup>	73.9 ± 9.2 <sup>abc</sup>	94.9 ± 8.0 <sup>a</sup>	46.5 ± 4.8 <sup>b*</sup>
LDL	19.0 ± 1.4	20.9 ± 1.5 <sup>ab</sup>	23.8 ± 2.4 <sup>ab</sup>	26.1 ± 2.3 <sup>a</sup>	17.2 ± 1.0 <sup>b</sup>
HDL	2.38 ± 0.24	2.65 ± 0.20 <sup>ab</sup>	2.59 ± 0.33 <sup>ab</sup>	3.58 ± 0.22 <sup>b*</sup>	1.96 ± 0.14 <sup>a</sup>
Cholesterol					
Total	126 ± 3	97.2 ± 2.0 <sup>a*</sup>	98.6 ± 4.3 <sup>a*</sup>	94.9 ± 4.2 <sup>a*</sup>	77.0 ± 2.6 <sup>b*</sup>
CM	0.243 ± 0.053	0.142 ± 0.024 <sup>a</sup>	0.328 ± 0.070 <sup>ab</sup>	0.383 ± 0.046 <sup>b</sup>	0.167 ± 0.027 <sup>a</sup>
VLDL	8.94 ± 0.48	7.25 ± 0.57 <sup>ab</sup>	8.27 ± 0.82 <sup>ab</sup>	9.98 ± 0.90 <sup>a</sup>	6.11 ± 0.37 <sup>b*</sup>
LDL	14.7 ± 0.9	13.0 ± 0.5 <sup>ab</sup>	12.6 ± 1.8 <sup>ab</sup>	11.4 ± 0.8	9.39 ± 0.60 <sup>*</sup>
HDL	102 ± 3.0	76.8 ± 1.2 <sup>a*</sup>	77.4 ± 3.6 <sup>a*</sup>	73.2 ± 3.0 <sup>a*</sup>	61.3 ± 2.4 <sup>b*</sup>
Hepatic lipid concentration (mg/g liver)					
Triacylglycerol	88.3 ± 7.5	85.1 ± 8.6 <sup>ab</sup>	79.4 ± 7.6 <sup>ab</sup>	94.3 ± 4.7 <sup>a</sup>	62.5 ± 2.5 <sup>b*</sup>
Cholesterol	4.14 ± 0.11	3.53 ± 0.15 <sup>*</sup>	3.76 ± 0.11	3.87 ± 0.12	3.49 ± 0.10 <sup>*</sup>
Phospholipid	31.2 ± 0.3	28.6 ± 1.6	28.7 ± 0.8	29.1 ± 0.8	29.9 ± 0.5

Each value represents mean ± SE of six mice. <sup>abc</sup>Different superscript letters show significant difference at  $P < 0.05$ .

\*  $P < 0.05$ . (PPP group vs. n-3HUFA group).

Table 2-5

Effect of experimental diets on activities of hepatic lipogenic and lipolytic enzymes.

	PPP	$\beta$ -PPE	$\beta$ -PEP	$\beta$ -PPD	$\beta$ -PDP
	(nmol/min mg protein)				
FAS	7.13 $\pm$ 0.68	1.69 $\pm$ 0.17 <sup>*</sup>	1.54 $\pm$ 0.23 <sup>*</sup>	2.09 $\pm$ 0.26 <sup>*</sup>	1.28 $\pm$ 0.20 <sup>*</sup>
ME	82.4 $\pm$ 8.5	48.2 $\pm$ 3.1 <sup>*</sup>	44.2 $\pm$ 6.7 <sup>*</sup>	48.5 $\pm$ 2.4 <sup>*</sup>	42.0 $\pm$ 3.4 <sup>*</sup>
G6PDH	8.91 $\pm$ 1.30	3.37 $\pm$ 0.14 <sup>*</sup>	3.44 $\pm$ 0.51 <sup>*</sup>	3.56 $\pm$ 0.10 <sup>*</sup>	2.93 $\pm$ 0.08 <sup>*</sup>
CPT	5.01 $\pm$ 0.25	5.59 $\pm$ 0.24 <sup>ab</sup>	4.98 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	6.46 $\pm$ 0.48 <sup>b*</sup>	5.80 $\pm$ 0.18 <sup>ab</sup>
Peroxisomal $\beta$ -oxidation	1.72 $\pm$ 0.10	1.78 $\pm$ 0.06	1.66 $\pm$ 0.04	1.94 $\pm$ 0.16	1.74 $\pm$ 0.03

Each value represents mean  $\pm$  SE of six mice. <sup>ab</sup>Different superscript letters show significant difference at  $P < 0.05$ . <sup>\*</sup> $P < 0.05$ . (PPP group vs. n-3HUFA group).

FAS, fatty acid synthase; ME, malic enzyme; G6PDH, glucose 6-phosphate dehydrogenase; CPT, carnitinepalmitoyl transferase.

Table 2-6

Effect of experimental diets on expression relative levels of hepatic mRNA in C57BL/6J mice.

	PPP	$\beta$ -PPE	$\beta$ -PEP	$\beta$ -PPD	$\beta$ -PDP
			(arbitrary unit)		
SREBP-1	100 $\pm$ 10	72.7 $\pm$ 8.7	67.2 $\pm$ 8.6	73.6 $\pm$ 10.3	56.6 $\pm$ 9.0*
FAS	100 $\pm$ 10	61.1 $\pm$ 6.5*	42.0 $\pm$ 5.9*	54.0 $\pm$ 4.9*	53.2 $\pm$ 7.4*
ACC-1	100 $\pm$ 13	72.6 $\pm$ 7.1	64.0 $\pm$ 6.3	101 $\pm$ 12	61.1 $\pm$ 10.2
ACC-2	100 $\pm$ 12	74.0 $\pm$ 15.0	55.0 $\pm$ 9.3*	57.4 $\pm$ 6.6	48.5 $\pm$ 6.5*
stearoyl-CoA desaturase	100 $\pm$ 14	21.5 $\pm$ 4.1*	19.9 $\pm$ 2.6*	30.1 $\pm$ 5.0*	16.8 $\pm$ 3.4*
$\Delta$ 6-desaturase	100 $\pm$ 4.6	53.4 $\pm$ 4.5 <sup>ab*</sup>	46.5 $\pm$ 6.1 <sup>ab*</sup>	71.5 $\pm$ 11.0 <sup>a*</sup>	37.4 $\pm$ 3.8 <sup>b*</sup>
CPT-1	100 $\pm$ 7.7	70.1 $\pm$ 7.9 <sup>a</sup>	67.8 $\pm$ 11.2 <sup>a</sup>	117 $\pm$ 9.1 <sup>b</sup>	64.1 $\pm$ 9.1 <sup>a</sup>
HMG-CoA reductase	100 $\pm$ 15	78.6 $\pm$ 5.0	88.8 $\pm$ 11.4	108 $\pm$ 16	69.9 $\pm$ 5.2
LDL receptor	100 $\pm$ 8.3	57.0 $\pm$ 5.9 <sup>b*</sup>	66.6 $\pm$ 9.6 <sup>b*</sup>	96.1 $\pm$ 12.1 <sup>a</sup>	54.0 $\pm$ 8.9 <sup>b*</sup>

Each value represents mean  $\pm$  SE of six mice. <sup>ab</sup>Different superscript letters show significant difference at  $P < 0.05$ . \*  $P < 0.05$ . (PPP group vs. n-3HUFA group).

SREBP-1, sterol regulatory element binding protein-1; FAS, fatty acid synthase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; CPT, carnitine palmitoyl transferase; HMG-CoA reductase, hydroxymethylglutaryl-CoA reductase.

Table 2-7

Effect of experimental diets on production of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) and thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)

	PPP	β-PPE	β-PEP	β-PPD	β-PDP
PGI <sub>2</sub> (ng/mg aorta)	1.98 ± 0.11	2.58 ± 0.15 <sup>ab*</sup>	3.02 ± 0.11 <sup>b*</sup>	2.51 ± 0.11 <sup>a*</sup>	2.45 ± 0.08 <sup>a*</sup>
TXA <sub>2</sub> (ng/mL serum)	9.62 ± 1.11	4.73 ± 1.01 <sup>*</sup>	8.24 ± 0.95	5.86 ± 1.18	6.41 ± 1.04

Each value represents mean ± SE of six mice. <sup>ab</sup>Different superscript letters show significant difference at  $P < 0.05$ . <sup>\*</sup> $P < 0.05$ . (PPP group vs. n-3HUFA group).

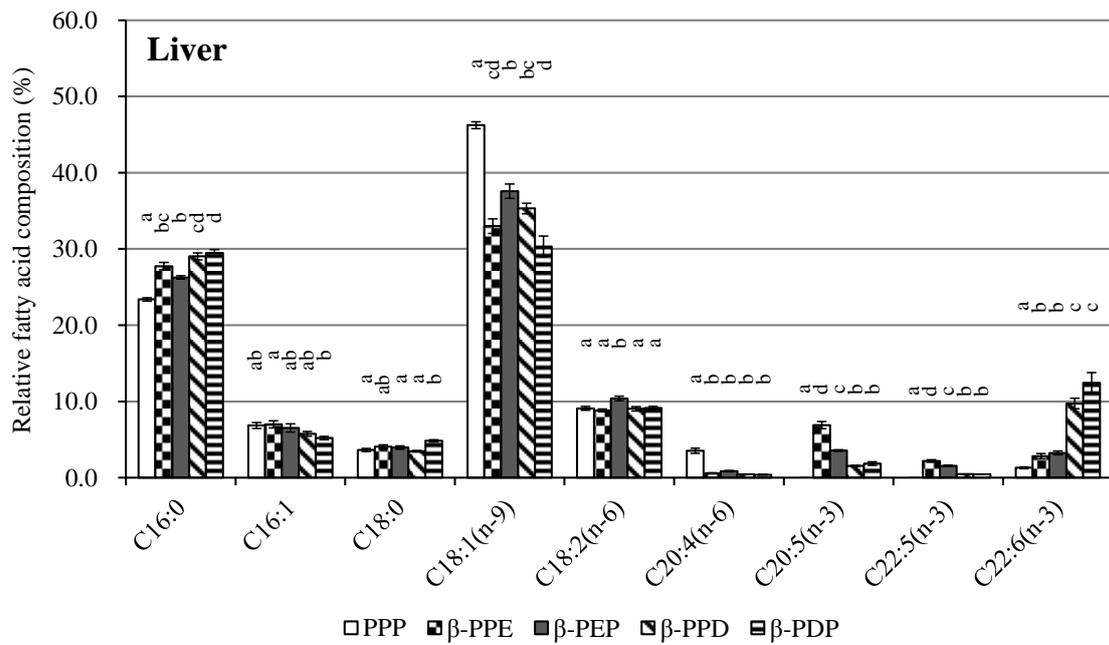


Figure 2-2

Comparison of the distribution of main fatty acids in liver. Values represent mean  $\pm$  SE.

<sup>abcd</sup>Different superscript letters show significant difference at  $P < 0.05$ .

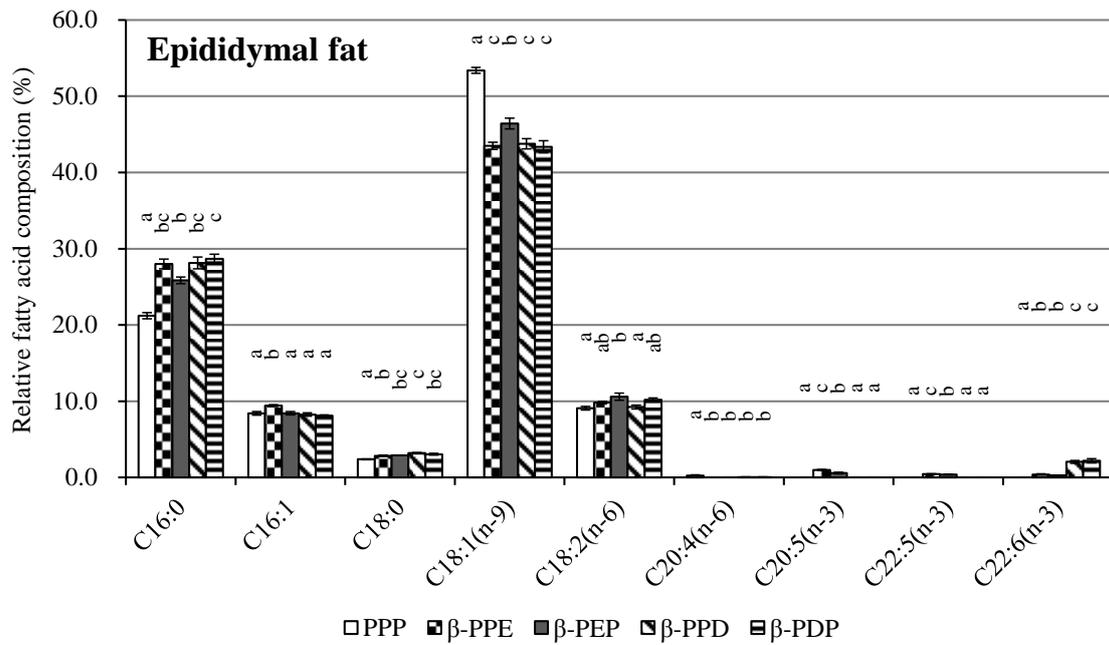


Figure 2-3

Comparison of the distribution of main fatty acids in epididymal fat. Values represent mean  $\pm$  SE. <sup>abcd</sup>Different superscript letters show significant difference at  $P < 0.05$ .

## 第三章 食用油脂中のトランス脂肪酸位置異性体の分析法 の開発

### 第一節 SP-2560 カラムを用いたトランス脂肪酸分析

#### 緒言

先述のとおり、TAG における脂肪酸の結合位置は、脂質の生理機能に大きな影響を及ぼす。第二章では、n-3HUFA 含有 TAG 標準品を用いることで、人体に良い効果を与える n-3HUFA の生理機能が、TAG 結合位置ごとにどのような影響を受けるのかを評価した。このような TAG 標準品を用いた試験は、従来の天然油脂同士を比較した試験では結論付けることが困難であった個々の脂肪酸の機能性を評価することができる。しかしながら、動物試験に使用する TAG 標準品を揃えることは容易ではない。また、トランス脂肪酸に関しても、標準品を用いて個々のトランス脂肪酸を評価した研究は少なく、部分水添油と乳脂肪を比較することで、部分水添油由来のトランス脂肪酸が人体に有害であると報告されている<sup>31-33)</sup>。そのため、これらの研究は油脂に存在するトランス脂肪酸の位置異性体を考慮していない。この原因の一つとして、トランス脂肪酸位置異性体の分離・定量が困難であったことが挙げられる。

現在、食品中のトランス脂肪酸を分析する方法には、「AOAC 996.06」<sup>34)</sup>、「AOCS Ce 1h-05」<sup>35)</sup>、「基準油脂分析試験法 2.4.4.3-2013」<sup>36)</sup>などが広く用いられている。これらの方法はすべて、シアノプロピル固定相を使用した長さ 50 m または 100 m のキャピラリーカラム（Sigma-Aldrich 製の SP-2560 や Agilent Technologies 製の CP-Sil88 など）を用いた GC-FID によって分析されている。このシアノプロピル固定相は、トランス型二重結合よりも、シス型二重結合を保持する特性を持つため、食品中に多く含まれるシス型脂肪酸であるオレイン

酸 (*cis*-9-C18:1) とトランス脂肪酸であるエライジン酸 (*trans*-9-C18:1) を分離するのに適している。しかしながら、シアノプロピル固定相を用いても、シス型脂肪酸とトランス脂肪酸の完全分離は困難であることから、トランス脂肪酸を正確に定量するためには、前処理として銀イオン薄層クロマトグラフィー<sup>30)</sup> または銀イオン固相抽出カートリッジ<sup>61)</sup>を用いて、油脂中のトランス脂肪酸を単離後に GC-FID にて分析する必要がある。また、シアノプロピル固定相は、分析温度によって、脂肪酸の保持傾向が大きく変動することから<sup>62)</sup>、個々のシス型およびトランス脂肪酸の位置異性体の溶出順を判定するのが困難という問題点もあった。

そこで本章では、シス型脂肪酸およびトランス脂肪酸の位置異性体の標準品を用いて、現在、世界中で広く利用されている分析公定法の一つである AOCS Ce 1h-05 法におけるシス型およびトランス脂肪酸位置異性体の分離特性を評価した。また、銀イオン固相抽出カートリッジによる前処理の有無によって食用油脂中のトランス脂肪酸の定量値がどのような影響を受けるのかを精査した。

## 実験材料および方法

### 実験材料

分析標準品には、シス型オクタデセン酸位置異性体のメチルエステル (*cis*-4～*cis*-16-C18:1-ME) およびトランス型オクタデセン酸位置異性体のメチルエステル (*trans*-4～*trans*-16-C18:1-ME) を用いた (Fig. 3-1-1)。また、内部標準物質には、ヘンエイコサン酸メチルエステル (C21:0-ME) およびトリヘンエイコサン (C21C21C21) を用いた。これらの試薬は、月島食品工業株式会社にて合成し、NMR、GC、HPLC により構造確認を行っており、それぞれの化学純度は 99% 以上である。食用油脂は、部分水添菜種油および乳脂肪を用いた。脂肪酸標準品および食用油脂は、自社製品 (月島食品工業株式会社) である。

### AOCS 1h-05 法における *cis*-/*trans*-C18:1 位置異性体の分離特性

各種 *cis*-C18:1-ME および *trans*-C18:1-ME をヘキサンにて希釈し、試料溶液を調製した。試料溶液には、内部標準物質として C21:0-ME を添加した。AOCS Ce 1h-05 法<sup>35)</sup>に準拠した分析条件にて、試料溶液を分析した。各種 *cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体のレスポンスファクター ( $R_F$ ) は、次式より算出した。

#### ●レスポンスファクター ( $R_F$ ) の計算式

$$R_F = P_S C_A / P_A C_S$$

$P_A$  : 分析対象のピーク面積、 $P_S$  : 内部標準物質のピーク面積

$C_A$  : 分析対象の濃度、 $C_S$  : 内部標準物質の濃度

**【分析条件】**

分析機器：TRACE GC ULTRA (Thermo Fisher Scientific)

検出器：水素炎イオン化検出器

分析カラム：SP-2560 (100 m×0.25 mm i.d., 0.20 μm; Sigma-Aldrich)

注入口温度：250℃

検出器温度：250℃

カラム温度：180℃ (定温分析)

キャリアーガス：ヘリウム (1 mL/min)

スプリット比：100 : 1

各種分析温度における *cis*-/*trans*-C18:1 位置異性体の溶出順

調製した *cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体の試料溶液を、170～190℃までの5つの分析温度にて分析し、それぞれの溶出順を精査した。

**【分析条件】**

分析機器：TRACE GC ULTRA (Thermo Fisher Scientific)

検出器：水素炎イオン化検出器

分析カラム：SP-2560 (100 m×0.25 mm i.d., 0.20 μm; Sigma-Aldrich)

注入口温度：250℃

検出器温度：250℃

カラム温度：170、175、180、185、190℃ (定温分析)

キャリアーガス：ヘリウム (1 mL/min)

スプリット比：100 : 1

## 食用油脂の分析

### 直接分析によるトランス脂肪酸分析

部分水添菜種油および乳脂肪は、内部標準物質である C21C21C21 を添加後、AOCS Ce 1b-89 法に従って、メチルエステル化を行った<sup>63)</sup>。誘導体化後は、AOCS Ce 1h-05 法の分析条件にて GC-FID 分析を行い、各種脂肪酸の定量を行った。

#### 【分析条件】

分析機器：TRACE GC ULTRA (Thermo Fisher Scientific)

検出器：水素炎イオン化検出器

分析カラム：SP-2560 (100 m×0.25 mm i.d., 0.20 μm; Sigma-Aldrich)

注入口温度：250℃

検出器温度：250℃

カラム温度：180℃ (定温分析)

キャリアーガス：ヘリウム (1 mL/min)

スプリット比：100 : 1

### 銀イオン固相抽出カートリッジを用いたトランス脂肪酸分析

調製した食用油脂メチルエステルを銀イオン固相抽出カートリッジ<sup>61)</sup>に負荷し、*cis*-C18:1 画分および *trans*-C18:1 画分に精製した。各画分は、AOCS Ce 1h-05 法の分析条件のもと、GC-FID 分析を行った。

### 【分析条件】

分析機器：TRACE GC ULTRA (Thermo Fisher Scientific)

検出器：水素炎イオン化検出器

分析カラム：SP-2560 (100 m×0.25 mm i.d., 0.20 μm; Sigma-Aldrich)

注入口温度：250℃

検出器温度：250℃

カラム温度：180℃ (定温分析)

キャリアーガス：ヘリウム (1 mL/min)

スプリット比：100 : 1

### 統計解析

分析は3回 (n=3) 実施し、分析値は平均値±標準偏差で示した。統計解析は、Student's *t*-test で行った ( $P<0.05$ )。

## 結果

### AOCS 1h-05 法における *cis*-/*trans*-C18:1 位置異性体の分離特性

AOCS Ce 1h-05 法の分析条件にて、*trans*-4~*trans*-16-C18:1 の 13 種類の位置異性体混合品および *cis*-4~*cis*-16-C18:1 の混合品を分析した (Fig. 3-1-2)。

*trans*-C18:1 位置異性体は、*trans*-4-C18:1 から *trans*-16-C18:1 の順で溶出した。

しかしながら、本分析条件では、*trans*-6-C18:1、*trans*-7-C18:1、*trans*-8-C18:1 の位置異性体の分離が困難であった。また、*trans*-13-C18:1、*trans*-14-C18:1 の位置異性体ペアも共に溶出した。一方、*cis*-C18:1 位置異性体の場合、*cis*-4-C18:1 と *cis*-5-C18:1 が共に溶出するほか、*cis*-6-C18:1、*cis*-7-C18:1、*cis*-8-C18:1 の位置異性体の分離が困難であった。

*cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体のレスポンスファクター ( $R_S$ ) を Fig. 3-1-3 に示した。*trans*-4~*trans*-16-C18:1 のレスポンスファクターの平均値は、 $1.031 \pm 0.040$  であり、*cis*-4~*cis*-16-C18:1 のレスポンスファクターの平均値は、 $0.990 \pm 0.032$  であった。*trans*-C18:1 のレスポンスファクターが *cis*-C18:1 よりも大きい値となったが、有意な差は認められなかった。

### 各種分析温度における *cis*-/*trans*-C18:1 位置異性体の溶出順

5 種類の分析温度 (170、175、180、185、190°C) における *cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体の溶出順を Table 3-1-1 に示した。今回採用した 5 種類の分析温度では、「*trans*-6-C18:1、*trans*-7-C18:1、*trans*-8-C18:1」、「*trans*-13-C18:1、*trans*-14-C18:1」、「*cis*-4-C18:1、*cis*-5-C18:1」、「*cis*-6-C18:1、*cis*-7-C18:1、*cis*-8-C18:1」の位置異性体は分離できなかった。また、分離することができない脂肪酸種は、Table 中の点線の枠で示した。

## 食用油脂中の *trans*-C18:1 位置異性体

銀イオン固相抽出カートリッジの有無による食用油脂中のトランス脂肪酸量の比較を Table 3-1-2、Table 3-1-3 に示した。分離することが困難な「*trans*-9-C18:1、*cis*-4-C18:1、*cis*-5-C18:1」および「*trans*-13-C18:1、*trans*-14-C18:1、*cis*-6-C18:1、*cis*-7-C18:1、*cis*-8-C18:1」は、トランス脂肪酸とみなした。一方、「*trans*-15-C18:1、*cis*-9-C18:1」は、シス型脂肪酸とみなした。前処理なしで直接分析した際のトランス脂肪酸量は、部分水添菜種油で 28.01 g/100 g 油脂、乳脂肪で 3.62 g/100 g 油脂であった。一方、前処理ありの場合は、部分水添菜種油で 23.03 g/100 g 油脂、乳脂肪で 2.78 g/100 g 油脂であり、直接分析よりも小さい値となった。

## 考察

食品中のトランス脂肪酸分析手法としては、「AOAC 996.06」<sup>34)</sup>、「AOCS Ce 1h-05」<sup>35)</sup>、「基準油脂分析試験法 2.4.4.3-2013」<sup>36)</sup>などが広く用いられている。トランス脂肪酸を定量するためには、脂肪酸ごとに異なるレスポンスファクターを用いて分析値を補正し、トランス脂肪酸量を算出する。このレスポンスファクターは、脂肪酸の構造から理論値を計算することが可能である。そのため、AOCS Ce 1h-05 法では、*cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 のレスポンスファクターとして、計算から求めた理論値 (1.0155) を採用している<sup>35)</sup>。しかしながら、仮に *cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体ごとにレスポンスファクターが異なる場合、食品中のトランス脂肪酸量を正しく測定できない危険性がある。本章では、脂肪酸標準品を用いてレスポンスファクターを実測した結果、*cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体ごとのレスポンスファクターは、わずかに異なることが判明した (Fig 3-1-3)。しかしながら、いずれの値も AOCS Ce 1h-05 法の理論値 (1.0155) と近い値であることが判明した。そのため、従来の理論値を使用する方法でも大きな問題はないと考えられる。

従来のトランス脂肪酸分析法<sup>34-36)</sup>は、シアノプロピル固定相を使用したキャピラリーカラム (Sigma-Aldrich 製の SP-2560 や Agilent Technologies 製の CP-Sil88 など) を使用するが、シアノプロピル固定相の極性は、分析温度によって大きく変動する。Thompson ら<sup>62)</sup>は、分析温度を変えることで、*cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体の溶出が変動することを確認したが、個々の *cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体がどのような分離挙動を持つのかについては不明な点が多かった。本章では、5 種類の分析温度 (170、175、180、185、190°C) における *cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体の溶出順を精査した結果 (Table 3-1-1)、各位置異性体の溶出順は、分析温度によって変動することが判明した。

中でも、トランス脂肪酸と比較して、シス型脂肪酸の保持時間は、分析温度による影響を受けやすいことが明らかとなった。また、本章で、用いた5種類の分析温度（170、175、180、185、190℃）では、「*trans*-6-C18:1、*trans*-7-C18:1、*trans*-8-C18:1」、「*trans*-13-C18:1、*trans*-14-C18:1」、「*cis*-4-C18:1、*cis*-5-C18:1」、「*cis*-6-C18:1、*cis*-7-C18:1、*cis*-8-C18:1」の位置異性体は分離できなかった。位置異性体の分離には、分析カラムの極性が求められる。そのため、すべての位置異性体を分離するためには、シアノプロピル固定相よりも高い極性を持つ分析カラムが必要と考えられる。

従来の分析手法<sup>34-36)</sup>は、*cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 のすべての位置異性体を分離することが困難であることから、トランス脂肪酸を正確に定量するためには、前処理として銀イオン薄層クロマトグラフィー<sup>30)</sup>または銀イオン固相抽出カートリッジ<sup>61)</sup>を用いて、油脂中のトランス脂肪酸を単離後に GC-FID にて分析する必要がある。そこで本章では、銀イオン固相抽出カートリッジによる前処理の有無によって食用油脂中のトランス脂肪酸の定量値がどのような影響を受けるのかを精査した。部分水添菜種油および乳脂肪中のトランス脂肪酸量の結果（Table 3-1-2）より、前処理を行った際のトランス脂肪酸量は、直接分析した際のトランス脂肪酸量よりも小さい値となった。これは、直接分析では、トランス脂肪酸のピークとオーバーラップするシス型脂肪酸を、トランス脂肪酸とみなして合算していることが原因と考えられる。例えば、本章では、*cis*-6-C18:1 から *cis*-8-C18:1 のピークを *trans*-13-C18:1、*trans*-14-C18:1 のピークと合わせて、トランス脂肪酸とみなしている。前処理を行って脂肪酸を個別定量した場合の *cis*-6-C18:1 から *cis*-8-C18:1 は、部分水添菜種油で 2.44 g/100 g 油脂、乳脂肪で 0.24 g/100 g 油脂であり、決して小さい値ではない。このため、直接分析では、トランス脂肪酸量が大きくなってしまったと考えられる。



Figure 3-1-1

Structures of *cis*- and *trans*-octadecenoic acid (C18:1) positional isomers.

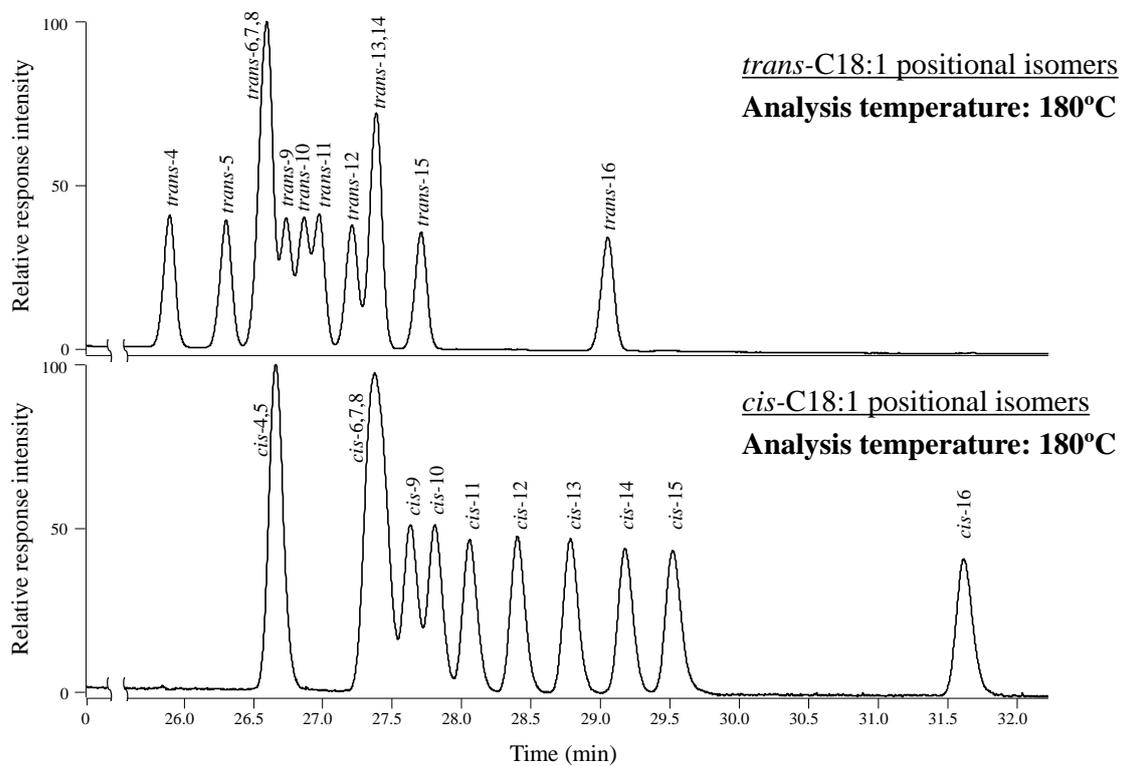


Figure 3-1-2  
 Resolution of *trans*- and *cis*-C18:1 isomers using an SP-2560 column.

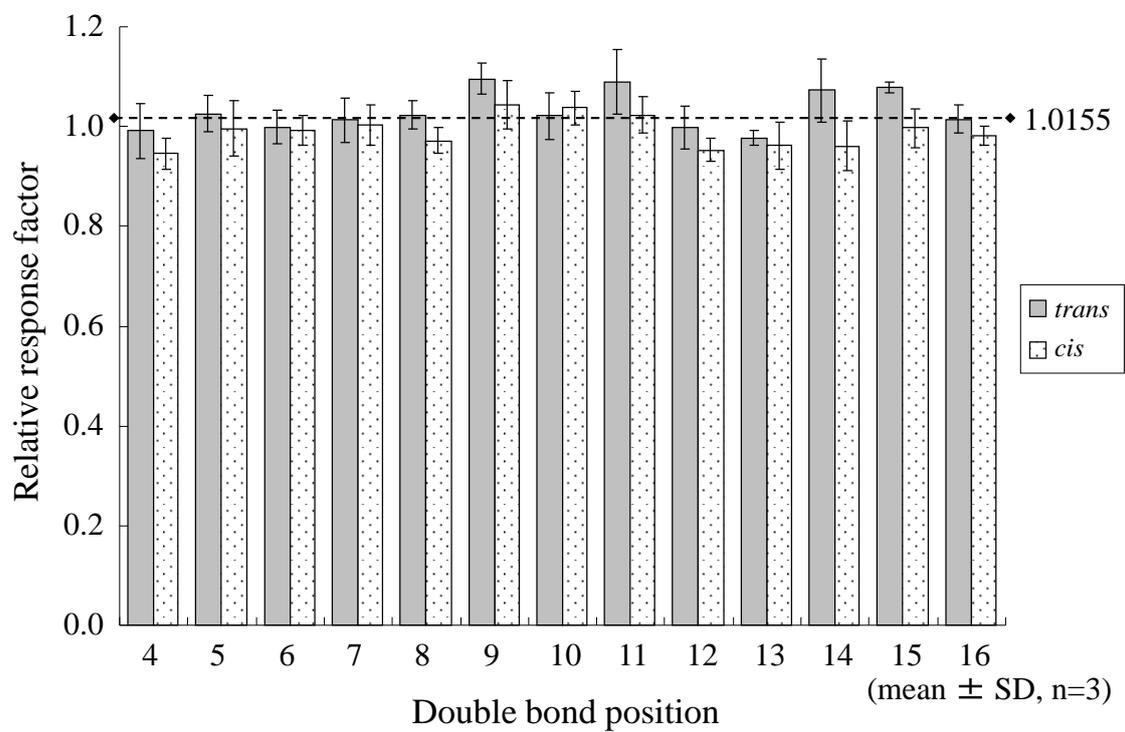


Figure 3-1-3

Response factors of *trans*- and *cis*-C18:1 isomers (mean ± SD, n=3). The dotted line (1.0155) shows the theoretical value obtained by the AOCS official method Ce 1h-05.

Table 3-1-1

Elution orders of *trans*- and *cis*-C18:1 isomers at 5 kinds of analysis temperatures.

170°C	175°C	180°C	185°C	190°C	
<i>trans</i> -4	<i>Earlier</i>  <i>Later</i>				
<i>trans</i> -5					
<i>trans</i> -6,7,8					
<i>cis</i> -4,5	<i>cis</i> -4,5	<i>cis</i> -4,5	<i>trans</i> -9	<i>trans</i> -9	
<i>trans</i> -9	<i>trans</i> -9	<i>trans</i> -9	<i>cis</i> -4,5	<i>cis</i> -4,5	
<i>trans</i> -10					
<i>trans</i> -11					
<i>trans</i> -12					
<i>cis</i> -6,7,8	<i>cis</i> -6,7,8	<i>trans</i> -13,14	<i>trans</i> -13,14	<i>trans</i> -13,14	
<i>trans</i> -13,14	<i>trans</i> -13,14	<i>cis</i> -6,7,8	<i>cis</i> -6,7,8	<i>cis</i> -6,7,8	
<i>cis</i> -9	<i>cis</i> -9	<i>cis</i> -9	<i>trans</i> -15	<i>trans</i> -15	
<i>cis</i> -10	<i>trans</i> -15	<i>trans</i> -15	<i>cis</i> -9	<i>cis</i> -9	
<i>trans</i> -15	<i>cis</i> -10	<i>cis</i> -10	<i>cis</i> -10	<i>cis</i> -10	
<i>cis</i> -11					
<i>cis</i> -12					
<i>cis</i> -13					
<i>trans</i> -16					
<i>cis</i> -14					
<i>cis</i> -15					
<i>cis</i> -16					

Table 3-1-2

Contents of *cis*- and *trans*-C18:1 in PHVO (g/100 g oil).

	PHVO		
	Without Ag	With Ag	
	Total	<i>trans</i>	<i>cis</i>
<i>trans</i> -4-C18:1	0.12 ± 0.00	0.13 ± 0.00	
<i>trans</i> -5-C18:1	0.23 ± 0.00	0.23 ± 0.00	
<i>trans</i> -6,7,8-C18:1	4.09 ± 0.01	3.75 ± 0.01	
<i>cis</i> -4,5-C18:1	5.34 ± 0.13		0.21 ± 0.00
<i>trans</i> -9-C18:1		4.42 ± 0.01	
<i>trans</i> -10-C18:1	5.13 ± 0.15	3.92 ± 0.00	
<i>trans</i> -11-C18:1	5.05 ± 0.08	3.43 ± 0.00	
<i>trans</i> -12-C18:1	2.62 ± 0.02	3.14 ± 0.01	
<i>trans</i> -13,14-C18:1	4.62 ± 0.01	2.52 ± 0.00	
<i>cis</i> -6,7,8-C18:1			2.44 ± 0.06
<i>cis</i> -9-C18:1	15.92 ± 0.01		24.27 ± 0.25
<i>trans</i> -15-C18:1		0.68 ± 0.00	
<i>cis</i> -10-C18:1	1.11 ± 0.01		1.53 ± 0.00
<i>cis</i> -11-C18:1	2.04 ± 0.01		2.29 ± 0.03
<i>cis</i> -12-C18:1	3.69 ± 0.00		3.69 ± 0.00
<i>cis</i> -13-C18:1	0.76 ± 0.00		0.69 ± 0.01
<i>trans</i> -16-C18:1	0.80 ± 0.01	0.80 ± 0.00	
<i>cis</i> -14-C18:1	0.46 ± 0.00		0.48 ± 0.01
<i>cis</i> -15-C18:1	0.47 ± 0.01		0.96 ± 0.03
<i>cis</i> -16-C18:1	0.54 ± 0.00		0.86 ± 0.00
$\sum$ <i>trans</i> -C18:1	28.01	23.03	

Each value represents mean ± SD (n=3). PHVO, partially hydrogenated vegetable oil.

Without Ag: Ag cartridge column was not used for the separation of *cis*- and *trans*-fatty acids before analysis.

With Ag: Ag cartridge column was used for the separation of *cis*- and *trans*-fatty acids before analysis.

Table 3-1-3

Contents of *cis*- and *trans*-C18:1 in milk fat (g/100 g oil).

	Milk fat		
	Without Ag	With Ag	
	Total	<i>trans</i>	<i>cis</i>
<i>trans</i> -4-C18:1	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	
<i>trans</i> -5-C18:1	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	
<i>trans</i> -6,7,8-C18:1	0.14 ± 0.01	0.08 ± 0.00	
<i>cis</i> -4,5-C18:1	0.19 ± 0.02		0.18 ± 0.03
<i>trans</i> -9-C18:1		0.08 ± 0.00	
<i>trans</i> -10-C18:1	0.15 ± 0.01	0.07 ± 0.00	
<i>trans</i> -11-C18:1	1.81 ± 0.05	1.23 ± 0.00	
<i>trans</i> -12-C18:1	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.00	
<i>trans</i> -13,14-C18:1	0.74 ± 0.00	0.56 ± 0.00	
<i>cis</i> -6,7,8-C18:1			0.24 ± 0.03
<i>cis</i> -9-C18:1	21.09 ± 0.03		19.23 ± 0.13
<i>trans</i> -15-C18:1		0.19 ± 0.00	
<i>cis</i> -10-C18:1	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00
<i>cis</i> -11-C18:1	0.48 ± 0.01		0.43 ± 0.02
<i>cis</i> -12-C18:1	0.18 ± 0.01		0.18 ± 0.00
<i>cis</i> -13-C18:1	0.07 ± 0.01		0.07 ± 0.00
<i>trans</i> -16-C18:1	0.36 ± 0.00	0.36 ± 0.00	
<i>cis</i> -14-C18:1	0.00 ± 0.01		0.02 ± 0.01
<i>cis</i> -15-C18:1	0.12 ± 0.01		0.08 ± 0.00
<i>cis</i> -16-C18:1	0.08 ± 0.01		0.07 ± 0.00
$\sum$ <i>trans</i> -C18:1	3.62	2.78	

Each value represents mean ± SD (n=3).

Without Ag: Ag cartridge column was not used for the separation of *cis*- and *trans*-fatty acids before analysis.

With Ag: Ag cartridge column was used for the separation of *cis*- and *trans*-fatty acids before analysis.

### 第三章 食用油脂中のトランス脂肪酸位置異性体の分析法 の開発

#### 第二節 SLB-IL111 カラムを用いたトランス脂肪酸分析

##### 緒言

前節では、トランス脂肪酸分析に広く用いられているシアノプロピル固定相における *cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体の分離挙動を精査した。その結果、シアノプロピル固定相を使用した分析法では、どのような分析条件においても、分離困難な位置異性体が存在することが判明した。この位置異性体を分離するためには、シアノプロピル固定相より性能の高いカラムが必要と考えられる。そのような背景のもと、我々は、近年開発されたカラム (Sigma-Aldrich 製の SLB-IL111) に注目した。SLB-IL111 カラムは、イオン液体を固定相に使用しており、これは、シアノプロピル固定相よりも高い極性を持つと言われている。このカラムを用いて、これまでに部分水添油<sup>64)</sup>、乳脂肪<sup>65)</sup>、魚油<sup>66)</sup>が分析されており、イオン液体固定相は、シアノプロピル固定相よりも優れた位置異性体の分離能を持つことが判明しているが、個々のシス型脂肪酸およびトランス脂肪酸位置異性体の分離挙動については精査されていなかった。

そこで本章では、*cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体の位置異性体の標準品を用いて、新しく開発されたイオン液体固定相 (SLB-IL111) カラムにおける位置異性体分離能を精査した。また、SLB-IL111 カラムを用いて、食用油脂中のトランス脂肪酸位置異性体の定量を行った。

## 実験材料および方法

### 実験材料

分析標準品は、前章で使用したシス型およびトランス型オクタデセン酸位置異性体のメチルエステルを用いた (Fig. 3-1-1)。食用油脂には、AOCS 標準品の部分水添大豆油を購入し、乳脂肪は自社製品 (月島食品工業株式会社) を用いた。

### SLB-IL111 カラムでの *cis*-/*trans*-C18:1 位置異性体の分離特性

SLB-IL111 カラムの分析温度における *cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体の分離特性を評価するため、Ackman らの方法<sup>67)</sup>に従って、*cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体の Equivalent chain length (ECL) 値を測定した。分析温度は、120~170°Cまでの5つの条件を検討した。

#### 【分析条件】

分析機器：TRACE GC ULTRA (Thermo Fisher Scientific)

検出器：水素炎イオン化検出器

分析カラム：SLB-IL111 (100 m×0.25 mm i.d., 0.20 μm; Sigma-Aldrich)

注入口温度：250°C

検出器温度：250°C

カラム温度：120、140、150、160、170°C (定温分析)

キャリアーガス：ヘリウム (1 mL/min)

スプリット比：100 : 1

## 食用油脂の分析

### 直接分析によるトランス脂肪酸分析

部分水添大豆油および乳脂肪は、内部標準物質である C21C21C21 を添加後、AOCS Ce 1b-89 法に従って、メチルエステル化を行った<sup>63)</sup>。誘導体化後は、GC-FID 分析を行い、各種脂肪酸の定量を行った。

#### 【分析条件】

分析機器：TRACE GC ULTRA (Thermo Fisher Scientific)

検出器：水素炎イオン化検出器

分析カラム：SLB-IL111 (100 m×0.25 mm i.d., 0.20 μm; Sigma-Aldrich)

注入口温度：250℃

検出器温度：250℃

カラム温度：170℃ (定温分析)

キャリアーガス：ヘリウム (1 mL/min)

スプリット比：100 : 1

## 銀イオン固相抽出カートリッジを用いたトランス脂肪酸分析

調製した食用油脂メチルエステルを銀イオン固相抽出カートリッジ<sup>61)</sup>に負荷し、*cis*-C18:1 画分および *trans*-C18:1 画分に精製した。その後、GC-FID 分析を行った。

### 【分析条件】

分析機器：TRACE GC ULTRA (Thermo Fisher Scientific)

検出器：水素炎イオン化検出器

分析カラム：SLB-IL111 (100 m×0.25 mm i.d., 0.20 μm; Sigma-Aldrich)

注入口温度：250℃

検出器温度：250℃

カラム温度：120℃および 160℃ (定温分析)

キャリアーガス：ヘリウム (1 mL/min)

スプリット比：100 : 1

### 統計解析

分析は3回 (n=3) 実施し、分析値は平均値±標準偏差で示した。

## 結果

### SLB-IL111 カラムでの *cis*-/*trans*-C18:1 位置異性体の分離特性

5 種類の分析温度（120、140、150、160、170℃）における *cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体の ECL 値を Fig. 3-2-1 に示した。各位置異性体における ECL 直線は、高い直線性を持つことが判明した ( $r^2 > 0.999$ )。全 *cis*-C18:1 位置異性体の ECL 直線の傾きは、 $2.39 \times 10^{-3}$  から  $9.17 \times 10^{-3} \text{°C}^{-1}$ 、全 *trans*-C18:1 位置異性体の ECL 直線の傾きは、 $0.90 \times 10^{-3}$  から  $4.04 \times 10^{-3} \text{°C}^{-1}$  の範囲であったことから、*cis*-C18:1 位置異性体は、*trans*-C18:1 位置異性体と比べ、分析温度による影響を受けやすいことが判明した。

従来から使用されている SP-2560 カラムと比較すると、SLB-IL111 カラムは、170℃にて分析を行った際、*cis*-C18:1 と *trans*-C18:1 の分離に優れることが判明した。前節にて、SP-2560 カラム (AOCS Ce 1h-05 法) では、「*trans*-15-C18:1 と *cis*-9-C18:1」が分離困難であることが確認できたが、SLB-IL111 カラムでは、分離可能であった。

本研究では、様々な分析温度にて、*trans*-4~*trans*-16-C18:1 の 13 種類の位置異性体混合品および *cis*-4~*cis*-16-C18:1 の混合品を分析した。その結果、SLB-IL111 カラムは、分析温度 120℃で *cis*-C18:1 異性体 13 種類をすべて分離することができた (Fig. 3-2-2)。また、*trans*-C18:1 に関しても *trans*-6, 7-C18:1 ペアを除く異性体の分離が可能であった。また、*trans*-6, 7-C18:1 ペアは分析温度 160℃において部分的に分離を達成した (Fig. 3-2-3)。つまり、分析温度 120℃と 160℃を併用することで、食用油脂中のすべての *trans*-C18:1 位置異性体の分離が可能であることが判明した。

## 食用油脂中の *trans*-C18:1 位置異性体

銀イオン固相抽出カートリッジによる前処理なしで、部分水添大豆油と乳脂肪を直接分析した際の脂肪酸組成を Table 3-2-1 に示した。分析温度は、*cis*-C18:1 と *trans*-C18:1 のピーク重複が抑えられる 170°Cにて行った。直接分析の総 *trans*-C18:1 量は、部分水添大豆油で 38.02 g/100 g 油脂、乳脂肪で 3.90 g/100 g 油脂であった。一方、前処理を用いた際の総 *trans*-C18:1 量は、部分水添大豆油で 37.25 g/100 g 油脂、乳脂肪で 2.48 g/100 g 油脂であった。SLB-IL111 カラムを用いても、直接分析では、トランス脂肪酸量が多くなったが、その差は SP-2560 カラムを用いた場合よりも小さい値となった。

また、今回確立した *cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 の全位置異性体の分離条件（120、160°Cの併用）を用いて、部分水添大豆油および乳脂肪中の *trans*-C18:1 位置異性体を定量した（Table 3-2-2）。部分水添大豆油の主要な *trans*-C18:1 位置異性体は、*trans*-10-C18:1、*trans*-11-C18:1、*trans*-9-C18:1 であり、一方、乳脂肪の主要な *trans*-C18:1 位置異性体は、*trans*-11-C18:1 であった。

## 考察

従来のトランス脂肪酸分析法である「AOAC 996.06」<sup>34)</sup>、「AOCS Ce 1h-05」<sup>35)</sup>、「基準油脂分析試験法 2.4.4.3-2013」<sup>36)</sup>では、シアノプロピル固定相を用いた分析カラムを用いる。ところが、Thompson ら<sup>62)</sup>、Sidisky ら<sup>68)</sup>、Martin ら<sup>69)</sup>の報告では、シアノプロピル固定相は分析温度によって、その極性が大きく変動することが確認された。本章では、シアノプロピル固定相よりも高い極性を持つ SLB-IL111 カラムの温度依存性を評価した。ECL は、脂肪酸の分析条件を評価するのに最適のツールである。そこで、SLB-IL111 カラムを用いて、5 種類の分析温度における *cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体の ECL 値を測定した結果、*cis*-C18:1 位置異性体は、*trans*-C18:1 位置異性体と比べ、分析温度による影響を受けやすいことが判明した (Fig. 3-2-1)。これは、過去に確認されたシアノプロピル固定相の特徴と一致した<sup>62,68,69)</sup>。シアノプロピル固定相の極性は、分析温度により変化することから、SLB-IL111 カラムのイオン液体固定相も分析温度によって極性が変化すると考えられる。

Delmonte らは、*cis*-C18:1 と *trans*-C18:1 のピーク重複を最小化するためには、分析温度 168°C が最適であると報告した<sup>64)</sup>。本章では、*cis*-C18:1 と *trans*-C18:1 のピークの重なりを抑えるためには、170°C が最も好ましいことが判明し、Delmonte らの報告と同様の結果となった。しかしながら、170°C にて分析した場合においても、いくつかの *cis*-C18:1 と *trans*-C18:1 のピークが重複するため、正確なトランス脂肪酸の定量のためには、銀イオン固相抽出カートリッジなどを使用することが好ましいと考えられる。

シアノプロピル固定相を用いた従来のトランス脂肪酸分析法<sup>34-36,70)</sup>では、「*trans*-6-C18:1、*trans*-7-C18:1、*trans*-8-C18:1」、「*trans*-13-C18:1、*trans*-14-C18:1」、「*cis*-4-C18:1、*cis*-5-C18:1」、「*cis*-6-C18:1、*cis*-7-C18:1、*cis*-8-C18:1」の位置異

性体の分離が困難であった。分離を改善するために、Precht らは、分析温度を 120°C に下げた条件下にて SP-2560 カラムを用いて、「*trans*-13-C18:1、*trans*-14-C18:1」の位置異性体を分離しているが<sup>30)</sup>、その他の位置異性体の分離は報告されていない。本章では、SLB-IL111 カラムを用いて、分析温度 120°C と 160°C を併用することで、すべての *cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体の分離が可能となった。SLB-IL111 カラムに使用されているイオン液体固定相は、シアノプロピル固定相よりも高い極性を持つため、すべての *cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体を分離することができたと考えられる。しかしながら、SLB-IL111 カラムを用いても、すべての *cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体のピークをきれいに分離することは困難であることから、今後、さらに高い極性を持った分析カラムが必要であると考えられる。

本分析法を用いて、部分水添大豆油および乳脂肪を分析した結果、従来の分析法では分離できなかった「*trans*-6-C18:1、*trans*-7-C18:1、*trans*-8-C18:1」、  
「*trans*-13-C18:1、*trans*-14-C18:1」は、部分水添大豆油および乳脂肪中に異なる比率で存在することが判明した。また、部分水添大豆油の主な *trans*-C18:1 の位置異性体は、*trans*-10-C18:1、*trans*-11-C18:1、*trans*-9-C18:1 であった (Fig. 3-2-3)。本結果は、Wolff が報告した部分水添油の *trans*-C18:1 組成と近い値であった<sup>28)</sup>。部分水素添加は、植物油中の不飽和脂肪酸に水素を添加することで、飽和脂肪酸またはトランス脂肪酸を生成する工程であるため、植物油中の不飽和脂肪酸含有量が多いほど、生成されるトランス脂肪酸の位置異性体の種類は多岐に渡る<sup>71)</sup>。本研究で用いた部分水添大豆油の原料である大豆油は、リノール酸を多く含むため、様々な種類のトランス脂肪酸位置異性体が生成したと考えられる。一方、乳脂肪の主要な *trans*-C18:1 位置異性体は *trans*-11-C18:1 であり、次いで、*trans*-16-C18:1 であった (Fig. 3-2-3)。Precht らも、乳脂肪の主要なトランス脂

脂肪酸として *trans*-16-C18:1 を検出した<sup>30)</sup>。しかしながら、*trans*-16-C18:1 は、*trans*-11-C18:1 と比べるとあまり注目されていないトランス脂肪酸である。今後、これらの位置異性体の生理機能を精査する必要があると考えられる。

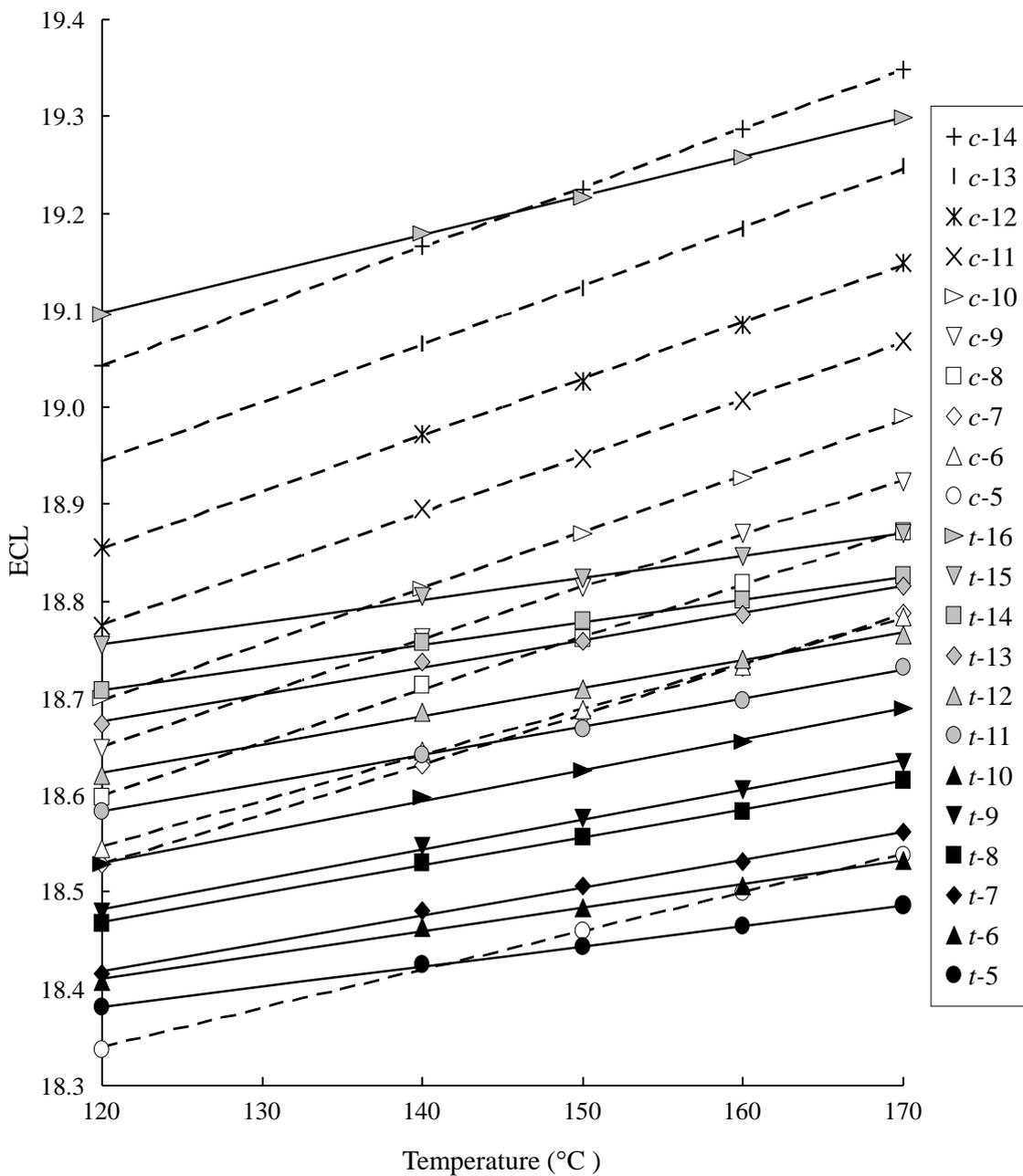


Figure 3-2-1

Equivalent chain length (ECL) values of *cis*- and *trans*-C18:1 positional isomers on an SLB-IL111 column at different column temperatures. ECL values of *trans*-4, *cis*-4, *cis*-15, and *cis*-16-C18:1 are not shown because these are eluted as single peaks.

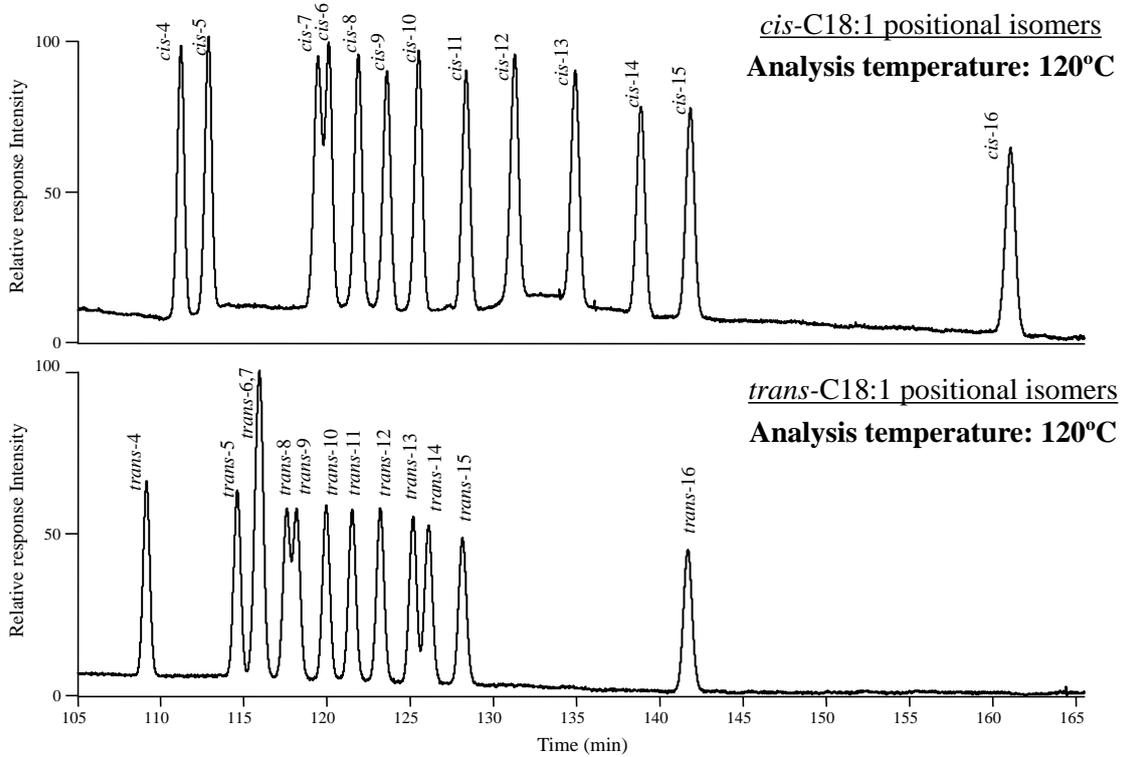


Figure 3-2-2

Resolution of *trans*- and *cis*-C18:1 isomers using an SLB-IL111 column at 120°C.

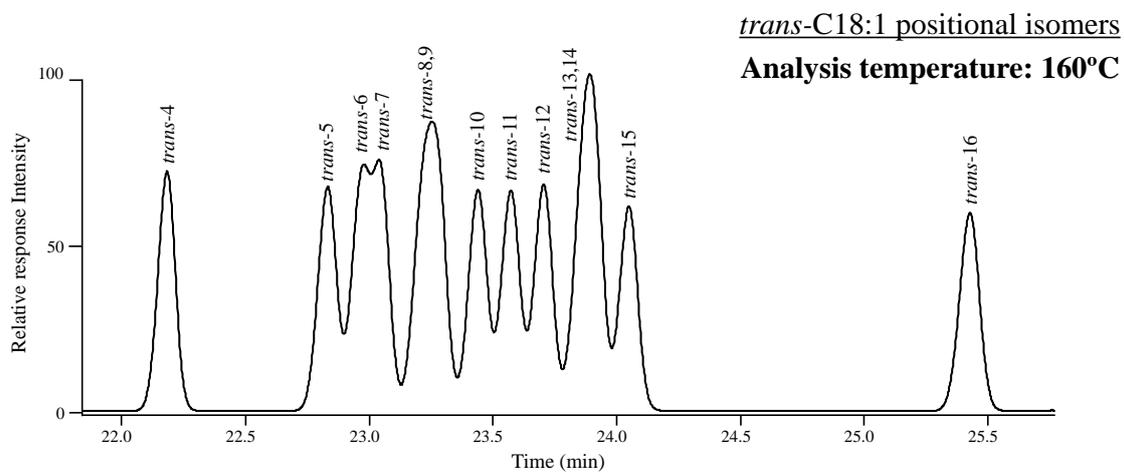


Figure 3-2-3

Resolution of *trans*- and *cis*-C18:1 isomers using an SLB-IL111 column at 160°C.

Table 3-2-1

Fatty acid composition of PHVO and milk fat (g/100 g oil).

Fatty acids	PHVO	Milk fat
$\Sigma$ C4:0–8:0	n.d.	3.30 $\pm$ 0.17
C10:0	0.02 $\pm$ 0.00	2.96 $\pm$ 0.10
C12:0	0.19 $\pm$ 0.01	3.55 $\pm$ 0.18
C14:0	0.19 $\pm$ 0.03	11.19 $\pm$ 0.63
C16:0	12.45 $\pm$ 0.62	28.74 $\pm$ 1.10
<i>cis</i> -C16:1	0.05 $\pm$ 0.00	1.45 $\pm$ 0.11
C17:0	0.17 $\pm$ 0.01	0.78 $\pm$ 0.05
C18:0	7.92 $\pm$ 0.41	10.22 $\pm$ 0.51
<i>cis</i> -C18:1	30.43 $\pm$ 2.51	20.44 $\pm$ 1.76
<i>trans</i> -C18:1	38.02 $\pm$ 1.91	3.90 $\pm$ 0.19
<i>cis</i> -C18:2	2.66 $\pm$ 0.18	1.32 $\pm$ 0.04
<i>trans</i> -C18:2	1.12 $\pm$ 0.08	0.70 $\pm$ 0.04
<i>cis</i> -C18:3	0.15 $\pm$ 0.01	0.50 $\pm$ 0.02
<i>trans</i> -C18:3	0.20 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01
C20:0	0.33 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.01
<i>cis</i> -C20:1	0.08 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.01
C22:0	0.31 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.00

Each value represents mean  $\pm$  SD (n=3). n.d., not detected (<0.01/100 g oil).

PHVO, partially hydrogenated vegetable oil.

Table 3-2-2

Contents of *cis*- and *trans*-C18:1 in PHVO and milk fat (g/100 g oil).

Double bond position	<i>cis</i> -X-C18:1		<i>trans</i> -X-C18:1	
	PHVO	Milk fat	PHVO	Milk fat
X = 4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.02 ± 0.01
5	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.02 ± 0.00
6	0.38 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.45 ± 0.01	0.02 ± 0.01
7	0.89 ± 0.02	0.03 ± 0.00	1.10 ± 0.03	0.02 ± 0.02
8	1.28 ± 0.01	0.11 ± 0.00	3.73 ± 0.00	0.04 ± 0.00
9	16.35 ± 0.07	19.50 ± 0.12	4.33 ± 0.01	0.10 ± 0.01
10	1.33 ± 0.02	0.00 ± 0.00	8.45 ± 0.08	0.21 ± 0.05
11	1.78 ± 0.01	0.36 ± 0.02	7.30 ± 0.02	0.89 ± 0.01
12	3.40 ± 0.01	0.13 ± 0.00	4.24 ± 0.01	0.19 ± 0.00
13	0.57 ± 0.00	0.04 ± 0.01	3.60 ± 0.00	0.22 ± 0.00
14	0.34 ± 0.00	0.07 ± 0.02	1.80 ± 0.01	0.26 ± 0.03
15	0.82 ± 0.01	0.10 ± 0.00	0.95 ± 0.00	0.18 ± 0.00
16	0.91 ± 0.01	0.60 ± 0.00	0.88 ± 0.01	0.30 ± 0.00
Total	28.04	20.55	37.25	2.48

Each value represents mean ± SD (n=3). PHVO, partially hydrogenated vegetable oil.

## 第四章 トリアシルグリセロールにおけるトランス脂肪酸 位置異性体の結合位置の解明

### 緒言

第二章で述べたとおり、TAGにおける結合位置は脂肪酸の生理機能に異なる影響を及ぼすと考えられる。しかしながら、食用油脂におけるトランス脂肪酸の結合位置はあまり知られていない。Woodrowらは、乳脂肪におけるトランス脂肪酸の結合位置を調査し、乳脂肪から調製した2-MAGにはトランス脂肪酸がほとんど含まれていないことを確認した<sup>24)</sup>。同様に、Barbonoら<sup>25)</sup>およびParodi<sup>26)</sup>らは、乳脂肪中のトランス脂肪酸はsn-1,3位に結合することを報告している。これらの研究は、トランス脂肪酸の位置異性体まで言及しておらず、トランス脂肪酸をより詳細に研究するためには、まず位置異性体の分析法が必要であった。そこで、第三章では、部分水添植物油および乳脂肪に含まれるすべてのトランス脂肪酸位置異性体を分析する手法を確立した。

TAGにおける脂肪酸の結合位置分析は、sn-1,3位特異的加水分解能を有するリパーゼを用いた手法が一般的である<sup>37,38)</sup>。しかしながら、リパーゼの有する基質特異性のため、リパーゼによる分析手法は、短鎖脂肪酸やHUFAを含むTAGに利用することができなかった。ところが近年、Watanabeらによって、上記TAGにも利用可能な固定化*Candida Antarctica* Lipase B (CALB)を用いた新しい分析手法が確立された<sup>39)</sup>。

そこで本章では、第三章で確立したトランス脂肪酸位置異性体分析法とCALBを用いたsn-2位脂肪酸組成分析法を併用し、食用油脂におけるトランス脂肪酸異性体の結合位置の総合的な分析法の確立について検討した。

## 実験材料および方法

### 実験材料

食用油脂として、菜種油、部分水添菜種油、乳脂肪、牛脂（月島食品工業株式会社製）を用いた。固定化 CALB（Chirazyme L-2 C4）は、和光純薬より購入した。

## 食用油脂における総脂肪酸の位置特異的分析

### 総脂肪酸組成分析

菜種油、部分水添菜種油、乳脂肪、牛脂は、内部標準物質である C21C21C21 を添加後、AOCS Ce 1b-89 法に従って、メチルエステル化を行った<sup>63)</sup>。AOCS Ce 1h-05 法<sup>35)</sup>に準拠した分析条件にて GC-FID 分析を行い、各種脂肪酸の定量を行った。

#### 【分析条件】

分析機器：TRACE GC ULTRA（Thermo Fisher Scientific）

検出器：水素炎イオン化検出器

分析カラム：SP-2560（100 m×0.25 mm i.d., 0.20 μm; Sigma-Aldrich）

注入口温度：250℃

検出器温度：250℃

カラム温度：180℃（定温分析）

キャリアーガス：ヘリウム（1 mL/min）

スプリット比：100：1

## *sn*-2 位置の脂肪酸組成分析

CALB による TAG の *sn*-1,3 位特異的加水分解反応は、Watanabe らの方法<sup>39)</sup> に従って行った。反応液中の 2-MAG は、Sep-Pak Silica cartridge (Waters Corporation) にて精製した後に、メチルエステル化を行い、GC-FID にて分析を行った。

### 【分析条件】

分析機器：TRACE GC ULTRA (Thermo Fisher Scientific)

検出器：水素炎イオン化検出器

分析カラム：SP-2560 (100 m×0.25 mm i.d., 0.20 μm; Sigma-Aldrich)

注入口温度：250°C

検出器温度：250°C

カラム温度：180°C (定温分析)

キャリアーガス：ヘリウム (1 mL/min)

スプリット比：100 : 1

## 食用油脂における *trans*-C18:1 位置異性体の位置特異的分析

### *trans*-C18:1 位置異性体分析

調製した食用油脂メチルエステルを銀イオン固相抽出カートリッジ<sup>61)</sup>に負荷し、*trans*-C18:1 を精製した。その後、GC-FID にて *trans*-C18:1 位置異性体分析を行った。

### 【分析条件】

分析機器：TRACE GC ULTRA (Thermo Fisher Scientific)

検出器：水素炎イオン化検出器

分析カラム：SLB-IL111 (100 m×0.25 mm i.d., 0.20 μm; Sigma-Aldrich)

注入口温度：250℃

検出器温度：250℃

カラム温度：120、160℃ (定温分析)

キャリアーガス：ヘリウム (1 mL/min)

スプリット比：100 : 1

### *sn*-2 位置の *trans*-C18:1 位置異性体分析

調製した 2-MAG メチルエステルを銀イオン固相抽出カートリッジ<sup>61)</sup>に負荷し、*trans*-C18:1 を精製した。その後、実験 2.3.1 と同様に GC-FID にて *trans*-C18:1 位置異性体分析を行った。

### 【分析条件】

分析機器：TRACE GC ULTRA (Thermo Fisher Scientific)

検出器：水素炎イオン化検出器

分析カラム：SLB-IL111 (100 m×0.25 mm i.d., 0.20 μm; Sigma-Aldrich)

注入口温度：250℃

検出器温度：250℃

カラム温度：120、160℃ (定温分析)

キャリアーガス：ヘリウム (1 mL/min)

スプリット比：100 : 1

## TAG における脂肪酸結合位置の評価方法

脂肪酸の *sn*-2 位への結合しやすさは、次式より算出した。本章では、「*sn*-2 位への結合傾向」が 33.3 mol% であった場合、脂肪酸が *sn*-1,2,3 位に均等に分散すると定義した。そのため、対象脂肪酸の「*sn*-2 位への結合傾向」が 33.3 mol% よりも高い場合は、対象脂肪酸は *sn*-2 位に結合しやすく、33.3 mol% よりも低い場合は、*sn*-1,3 位に結合しやすいと判断した。

### ●*sn*-2 位への結合傾向の計算式

$$\textit{sn}\text{-2 位への結合傾向 (mol\%)} = FA_{\textit{sn}\text{-2}} / (3 \times FA_{\textit{Total}}) \times 100$$

$FA_{\textit{Total}}$  : 総脂肪酸組成分析による対象脂肪酸の含有量 (g/100 g 油脂)

$FA_{\textit{sn}\text{-2}}$  : *sn*-2 位脂肪酸組成分析による対象脂肪酸の含有量 (g/100 g 油脂)

## 統計解析

分析は 3 回 (n=3) 実施し、分析値は平均値±標準誤差で示した。統計解析は、Student's *t*-test で行った ( $P < 0.05$ )。

## 結果

### 食用油脂における総脂肪酸の位置特異的分析

菜種油、部分水添菜種油、乳脂肪、牛脂の総脂肪酸組成分析および *sn*-2 位脂肪酸組成分析の結果を Table 4-1、Table 4-2 に示した。食用油脂中の *trans*-C18:1、*trans*-C18:2、*trans*-C18:3 含有量は、すべての位置異性体の合算値として算出した。分析の結果、菜種油には、トランス脂肪酸がほとんど含まれていなかった。また、総脂肪酸組成分析の結果より、食用油脂中の主要なトランス脂肪酸である *trans*-C18:1 の含有量は、部分水添菜種油で 46.1 g/100 g 油脂、乳脂肪で 3.0 g/100 g 油脂、牛脂で 1.5 g/100 g 油脂であった。一方、*sn*-2 位脂肪酸組成分析の *trans*-C18:1 含有量は、部分水添菜種油で 50.5 g/100 g 油脂、乳脂肪で 2.0 g/100 g 油脂、牛脂で 0.7 g/100 g 油脂であった。このように、部分水添油は *sn*-2 位にトランス脂肪酸が多く、反芻動物脂は *sn*-2 位にトランス脂肪酸が少ない傾向が見られた。

食用油脂における各種脂肪酸の *sn*-2 位への結合傾向を Fig. 4-1 に示した。菜種油の主要な脂肪酸である *cis*-9-C18:1 (51.0 g/100 g 油脂) の「*sn*-2 位への結合傾向」は 32.7 mol% (33.3 mol% と有意差なし) であることから、*cis*-9-C18:1 は *sn*-1,2,3 位に均等に結合することが判明した。また、*cis*-C18:2 および *cis*-C18:3 の「*sn*-2 位への結合傾向」は、それぞれ 48.96 mol% および 46.55 mol% ( $P < 0.05$ , vs. 33.3 mol%) であるため、これらは *sn*-2 位に多く結合することが明らかとなった。部分水添菜種油に多く含まれる脂肪酸である *trans*-9-C18:1 (46.1 g/100 g 油脂) の「*sn*-2 位への結合傾向」は、36.51 mol% ( $P < 0.05$ , vs. 33.3 mol%) であったが、33.3 mol% と大きな差がないため、*trans*-9-C18:1 は *sn*-2 位に多く結合するが、*sn*-1,3 位にもある程度結合することが判明した。

反芻動物脂における脂肪酸の *sn*-2 位への結合傾向 (Fig. 4-1) を見てみると、

乳脂肪の短鎖脂肪酸 (<C10:0)、C18:0、*trans*-C18:1 は、*sn*-1,3 位に結合した ( $P < 0.05$ , vs. 33.3 mol%)。一方、牛脂の C16:0、C18:0、*trans*-C18:1 は、*sn*-1,3 位に結合した ( $P < 0.05$ , vs. 33.3 mol%)。さらに、共役リノール酸 (CLA) であるルーメン酸 (*cis*-9,*trans*-11-C18:2) は、乳脂肪および牛脂では、その結合位置が異なっており、乳脂肪では *sn*-1,3 位に結合し、牛脂では *sn*-2 位に結合することが判明した ( $P < 0.05$ , vs. 33.3 mol%)。

### 食用油脂における *trans*-C18:1 位置異性体の位置特異的分析

今回分析を行った部分水添菜種油、乳脂肪、牛脂における *trans*-C18:1 位置異性体の分布を Fig. 4-2 (A) に示した。部分水添菜種油の主要なトランス脂肪酸位置異性体は、*trans*-9-C18:1 (21.4%) であり、次いで、*trans*-10-C18:1 (21.3%)、*trans*-8-C18:1 (15.3%)、*trans*-11-C18:1 (13.2%) であった。このような位置異性体比率は、部分水添菜種油の *sn*-2 位における *trans*-C18:1 位置異性体の分布と一致した (Fig. 4-2 (B))。一方、乳脂肪では、*trans*-11-C18:1 (37.2%) が主要なトランス脂肪酸であり、その他少量ではあるが、*trans*-16-C18:1 (11.1%)、*trans*-14-C18:1 (10.0%)、*trans*-10-C18:1 (8.5%) が含まれていた (Fig. 4-2 (A))。また、牛脂中のトランス脂肪酸の半数を占める位置異性体は、*trans*-11-C18:1 (31.5%) と *trans*-10-C18:1 (22.8%) であった。興味深いことに、牛脂の *sn*-2 位における主要なトランス脂肪酸は、*trans*-10-C18:1 (35.7%) であり、*trans*-11-C18:1 よりも多く含まれていた (Fig. 4-2 (B))。

食用油脂における *trans*-C18:1 位置異性体の *sn*-2 位への結合傾向を Fig. 4-3 に示した。部分水添菜種油の主要な脂肪酸である *trans*-9-C18:1 と *trans*-11-C18:1 は、33.3 mol% よりも有意に高く、*sn*-2 位に主に結合することが判明した。一方、反芻動物脂中のほとんどの *trans*-C18:1 位置異性体は、33.3 mol% よりも有意に

低い値となり、中でも反芻動物脂の主要なトランス脂肪酸である *trans*-11-C18:1 は、*sn*-1,3 位に結合することが判明した。また、反芻動物脂では、*trans*-C18:1 位置異性体ごとに *sn*-2 位への結合傾向が異なっており、脂肪酸のカルボシキル基から奇数番目に二重結合があるトランス脂肪酸は、*sn*-1,3 位に優先的に結合する傾向が見られた。

## 考察

食用油脂の脂肪酸組成 (Table 4-1) および *sn*-2 位への結合傾向 (Fig. 4-1) の結果では、部分水添油は *sn*-2 位にトランス脂肪酸が多く、反芻動物脂は *sn*-1,3 位にトランス脂肪酸が多い傾向が見られた。本章で使用した部分水添菜種油は、菜種油を原料に製造したため、両者の脂肪酸組成 (Table 4-1) を比較することで、部分水素添加によってどの脂肪酸が変化したのかを知ることができる。今回、部分水素添加によって増加した脂肪酸は *trans*-C18:1、*trans*-C18:2、*trans*-C18:3、C18:0 であり、一方、減少した脂肪酸は *cis*-C18:1、*cis*-C18:2、*cis*-C18:3 であった。すなわち、シス型脂肪酸が部分水素添加によって、飽和脂肪酸およびトランス脂肪酸に変化したと考えられる。また、脂肪酸の結合傾向を分析した結果 (Fig. 4-1)、菜種油中の *cis*-C18:2 および *cis*-C18:3 は、*sn*-2 位に結合する傾向があり、このシス型脂肪酸がトランス脂肪酸へと変化したため、部分水添菜種油の *trans*-C18:1 も *sn*-2 位に多く存在すると示唆された。一方、反芻動物脂の *sn*-1,3 位にトランス脂肪酸が多い理由としては、反芻動物体内における TAG 合成経路が関与していると考えられる。一般に、反芻動物体内の TAG は、グリセロール-3-リン酸経路によって合成されることが知られている<sup>72,73)</sup>。この際、脂肪酸は、様々な酵素の働きによって、*sn*-1 位、*sn*-2 位、*sn*-3 位の順に結合されるが、これらの酵素には脂肪酸選択性があると言われている。以上のことから、トランス脂肪酸は、TAG 合成経路における *sn*-1 位または *sn*-3 位に脂肪酸を結合させる際に、優先的に使用されると考えられる。

反芻動物脂における脂肪酸の結合位置に関しては、今までに様々な研究が行われている。Parodi らは、乳脂肪の脂肪酸結合位置を分析した結果、C18:0 は *sn*-1 位、ミリスチン酸 (C14:0) は *sn*-2 位、そして、短鎖脂肪酸は *sn*-3 位に結合すると報告した<sup>26)</sup>。一方、Brockerhoff らの報告によると、牛脂は *sn*-1 位に

C16:0、*sn*-2 位に *cis*-9-C18:1、*sn*-3 位に C18:0 が選択的に結合すること明らかとなった<sup>74)</sup>。また、トランス脂肪酸の結合位置についても、いくつかの報告例があり、Woodrow ら<sup>24)</sup>、Barbano ら<sup>25)</sup>、Parodi ら<sup>26)</sup>は、乳脂肪中のトランス脂肪酸は *sn*-1,3 位に結合すると報告した。残念ながら、本章で用いた分析手法は、*sn*-1 位と *sn*-3 位を区別することはできないが、本章における脂肪酸の結合位置は、過去の研究と同様の傾向が見られた。興味深いことに、本章では、CLA の一つである *cis*-9,*trans*-11-C18:2 は、乳脂肪では *sn*-1,3 位に結合し、牛脂では *sn*-2 位に結合することが判明した。CLA は、反芻動物の第一胃内に存在する微生物によって、不飽和脂肪酸が水素添加されることで生成するため、乳脂肪には 0.3 ~1.0 g/100 g 油脂、牛脂には 0.1~0.7 g/100 g 油脂含まれると言われている<sup>75)</sup>。CLA は、様々な生理機能を有することが知られており、Chardingny らは、TAG の *sn*-1,3 位に結合する CLA は、*sn*-2 位に結合した CLA と比べ、体内への吸収速度が速く、 $\beta$ -酸化されやすいと報告している<sup>76)</sup>。牛脂と乳脂肪の存在意義を推察すると、牛脂は蓄積脂質としての TAG、乳脂肪は仔牛への栄養源としての TAG と考えることができる。このことから、乳脂肪において CLA が *sn*-1,3 位に結合する理由は、CLA には仔牛への栄養源としての役割があると考えられる。

食用油脂における *trans*-C18:1 位置異性体分布 (Fig. 4-2) および *sn*-2 位への結合傾向 (Fig. 4-3) の結果では、部分水添菜種油の主要なトランス脂肪酸である *trans*-9-C18:1 と *trans*-11-C18:1 は、*sn*-2 位に主に結合することが判明した。また、*trans*-4-C18:1 を除く、その他の位置異性体も *sn*-2 位に主に結合する傾向が見られた。一方、乳脂肪および牛脂の主要なトランス脂肪酸である *trans*-11-C18:1 は、*sn*-1,3 位に多く結合することが判明した。また、乳脂肪および牛脂では、*trans*-C18:1 位置異性体ごとに *sn*-2 位への結合傾向が異なっていた。以上のことより、反芻動物体内では、各 *trans*-C18:1 位置異性体を区別して TAG

合成を行っている可能性が考えられる。Lawson らは、二重結合が偶数位に存在する *trans*-C18:1 は、二重結合が奇数位に存在する *trans*-C18:1 よりも、肝臓のミトコンドリアにおいて、迅速に  $\beta$ -酸化されると報告している<sup>77)</sup>。また、Gunstone らは、二重結合が偶数位に存在する *trans*-C18:1 は、二重結合が奇数位に存在する *trans*-C18:1 よりも、融点が高いと報告している<sup>78)</sup>。このような *trans*-C18:1 位置異性体ごとの代謝能および物性の違いが、反芻動物体内の TAG 合成に影響を及ぼすと考えられる。

Table 4-1

Total fatty acid composition in edible fats and oils (g/100 g oil).

	Total fatty acid			
	CO	PHCO	MF	BT
<C10:0	—	—	7.7 ± 0.2	—
C10:0	—	—	4.2 ± 0.1	—
C12:0	—	—	4.3 ± 0.2	—
C14:0	—	—	12.2 ± 0.5	2.8 ± 0.1
C16:0	4.6 ± 0.1	5.0 ± 0.1	30.3 ± 0.9	24.6 ± 0.9
C16:1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	1.5 ± 0.1	2.8 ± 0.0
C18:0	2.0 ± 0.1	11.0 ± 0.3	9.6 ± 0.3	16.5 ± 0.6
<i>trans</i> -C18:1	—	46.1 ± 1.8	3.0 ± 0.3	1.5 ± 0.1
<i>cis</i> -9-C18:1	51.0 ± 1.8	22.0 ± 0.9	17.9 ± 0.6	40.8 ± 1.2
<i>cis</i> -11-C18:1	4.0 ± 0.1	2.4 ± 0.2	0.5 ± 0.1	1.8 ± 0.1
<i>trans</i> -C18:2	0.2 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.1 ± 0.0
<i>cis</i> -C18:2	20.2 ± 1.0	0.1 ± 0.0	1.3 ± 0.1	1.9 ± 0.0
<i>trans</i> -C18:3	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	—	—
<i>cis</i> -C18:3	9.2 ± 0.8	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.1 ± 0.0
CLA	—	—	0.5 ± 0.0	0.2 ± 0.0
C20:0	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
C20:1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0

Value shows mean ± SE (n=3). Contents lower than 0.1 g/100 g oil are not shown.

CO, canola oil; PHCO, partially hydrogenated canola oil; MF, milk fat; BT, beef tallow.

Table 4-2

Fatty acid composition at *sn*-2 position of edible fats and oils (g/100 g oil).

	<i>sn</i> -2 position			
	CO	PHCO	MF	BT
<C10:0	—	—	1.3 ± 0.0	—
C10:0	—	—	3.5 ± 0.0	—
C12:0	—	—	5.5 ± 0.1	—
C14:0	—	—	20.4 ± 0.6	4.1 ± 0.2
C16:0	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	36.0 ± 0.9	7.3 ± 0.1
C16:1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	2.1 ± 0.1	4.3 ± 0.0
C18:0	0.4 ± 0.1	7.7 ± 0.1	5.2 ± 0.2	5.5 ± 0.3
<i>trans</i> -C18:1	—	50.5 ± 1.5	2.0 ± 0.1	0.7 ± 0.0
<i>cis</i> -9-C18:1	50.0 ± 1.3	24.2 ± 0.1	15.1 ± 0.5	64.4 ± 1.8
<i>cis</i> -11-C18:1	1.6 ± 0.1	2.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	1.6 ± 0.1
<i>trans</i> -C18:2	0.2 ± 0.0	0.9 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0
<i>cis</i> -C18:2	29.6 ± 0.9	0.2 ± 0.0	1.5 ± 0.1	4.2 ± 0.2
<i>trans</i> -C18:3	—	—	—	—
<i>cis</i> -C18:3	12.7 ± 0.5	—	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0
CLA	—	—	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0
C20:0	—	—	—	—
C20:1	—	—	—	0.1 ± 0.0

Value shows mean ± SE (n=3). Contents lower than 0.1 g/100 g oil are not shown.

CO, canola oil; PHCO, partially hydrogenated canola oil; MF, milk fat; BT, beef tallow.

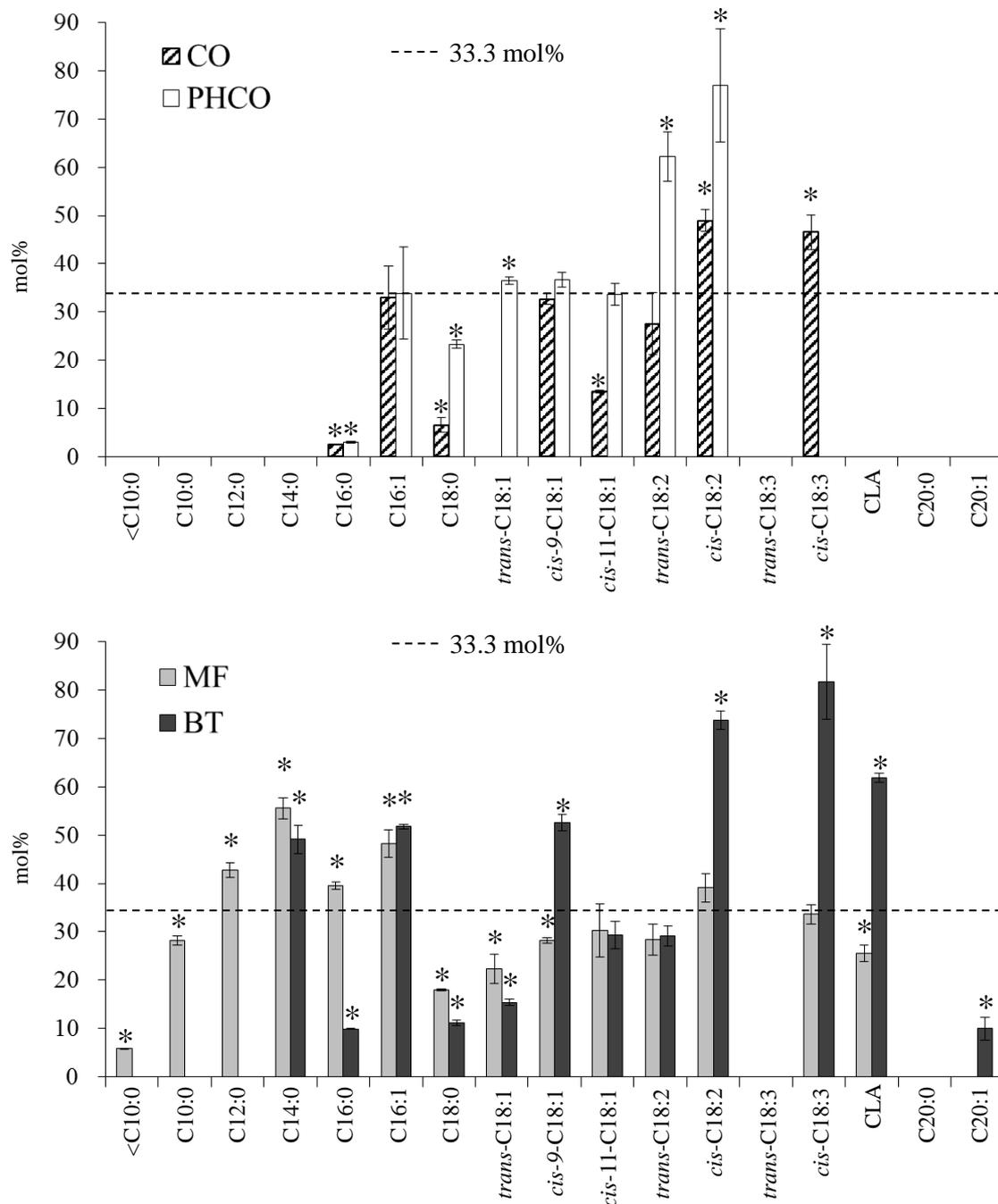


Figure 4-1

Regiospecificity of fatty acids at the *sn*-2 position of triacylglycerol (mean  $\pm$  SE) in canola oil (CO), partially hydrogenated canola oil (PHCO), milk fat (MF), and beef tallow (BT). The dotted line at 33.3 mol% indicates the regiospecific value at which the fatty acid is equally distributed. \*Significant difference from 33.3 mol% ( $P < 0.05$ ).

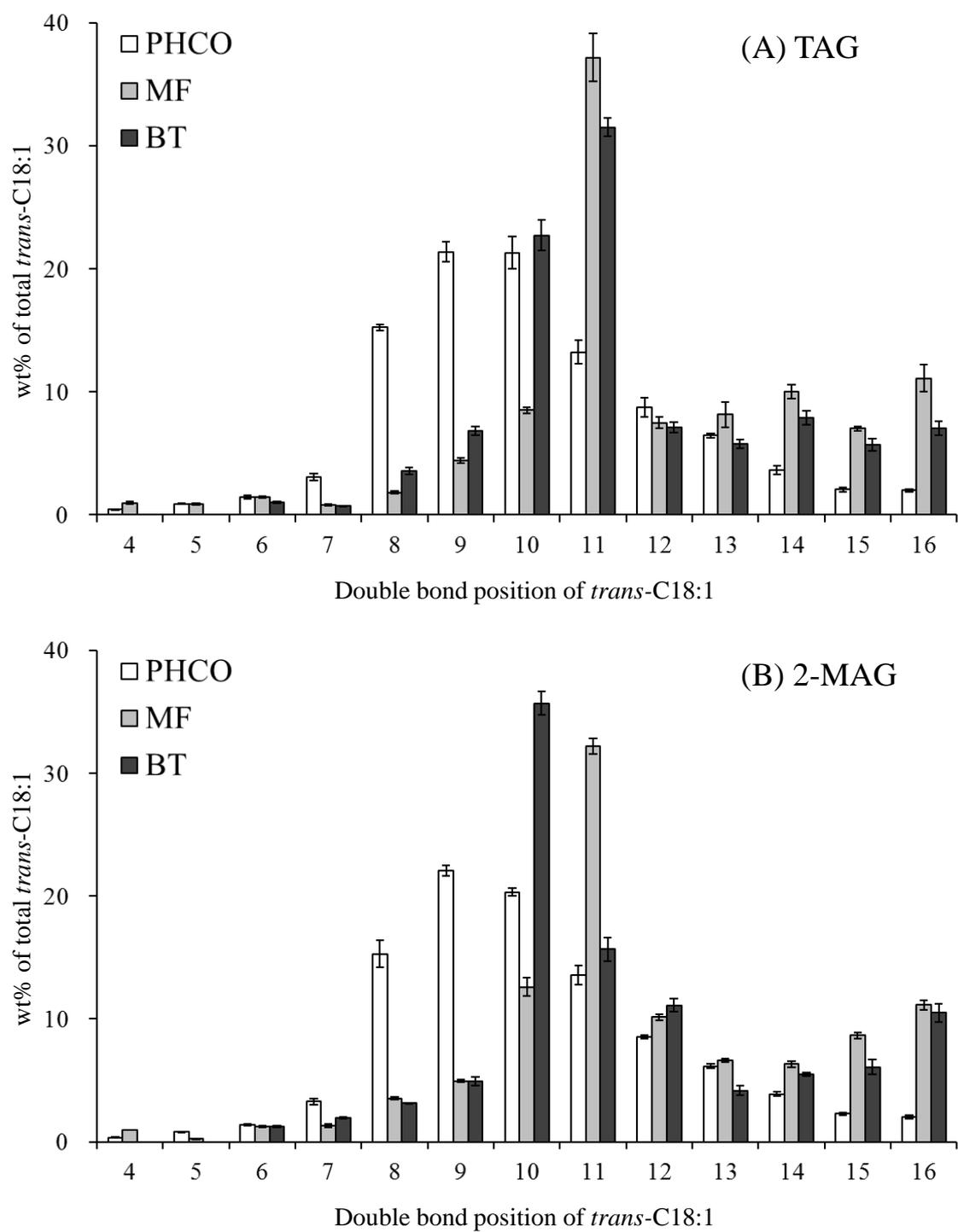


Figure 4-2

Relative proportion of *trans*-octadecenoic acid (*trans*-C18:1) positional isomers (wt% of total *trans*-C18:1) in (A) triacylglycerol (TAG) and (B) 2-monoacylglycerol (2-MAG) for PHCO, MF, and BT.

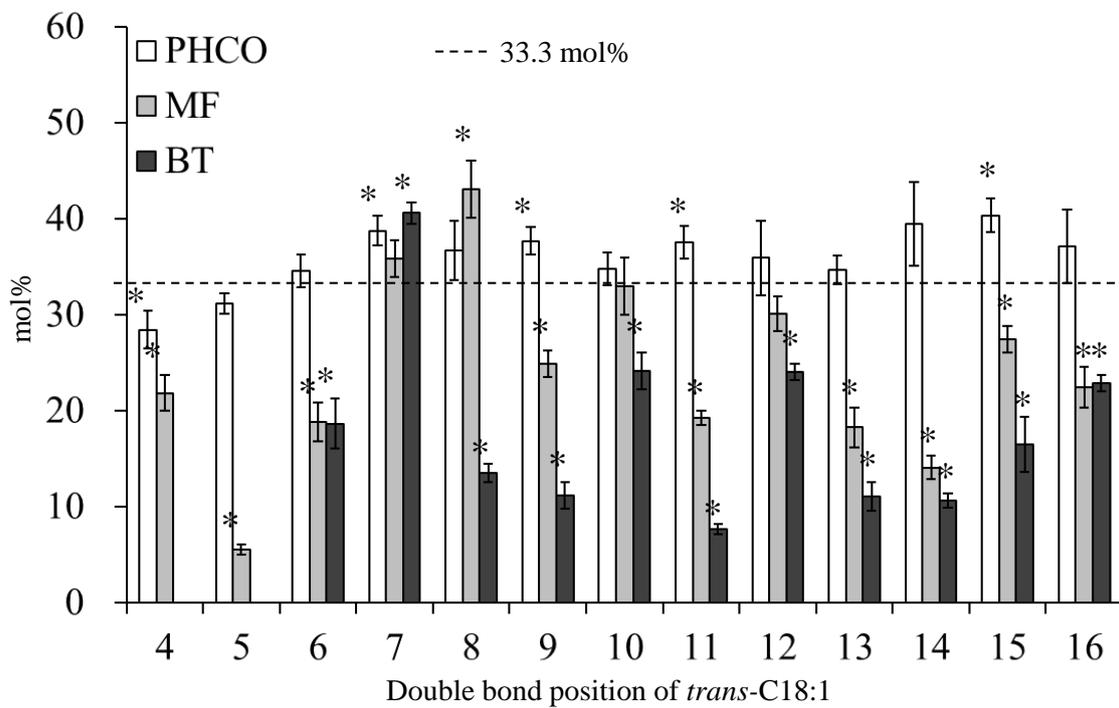


Figure 4-3

Regiospecificity of *trans*-octadecenoic acid (*trans*-C18:1) positional isomers at the *sn*-2 position of triacylglycerol (mean  $\pm$  SE) in PHCO, MF, and BT. The dotted line at 33.3 mol% indicates the regiospecific value at which the fatty acid is equally distributed. \*Significant difference from 33.3 mol% ( $P < 0.05$ ).

## 第五章 乳脂肪トリアシルグリセロールの構造と食品中の 乳脂肪含有量の迅速分析方法の開発

### 緒言

第三章および第四章において、部分水添油および乳脂肪に含まれるトランス脂肪酸位置異性体の分布を精査した結果、両者は各位置異性体の存在割合が異なっているが、構成するトランス脂肪酸位置異性体は同じであることが判明した。このことから、仮に食品中にトランス脂肪酸が多く含まれていた場合、これが部分水添油由来または乳脂肪由来なのかを判断し、部分水添油または乳脂肪がどの程度使用されているのかを評価することは困難であると考えられる。

食品中の乳脂肪含有量を測定する方法としては、乳脂肪に特異的に含まれる酪酸（C4:0）を GC-FID にて分析する手法がある<sup>79)</sup>。しかしながら、酪酸は、水溶性や揮発性が高いため、油脂中の酪酸量を正確に測定するためには、試料の前処理時に繊細な操作が必要となる。このような問題点を解決するため、Buchgraber らは、脂肪酸の誘導體化を必要としない簡便な乳脂肪の定量法を開発した<sup>80)</sup>。この分析法は、乳脂肪に特異的に含まれる TAG を指標として、これを GC-FID にて測定する手法であり、現在、AOCS の分析公定法となっている<sup>81)</sup>。しかしながら、GC-FID にて高沸点の TAG を分析する際には、TAG が GC 内に正しく導入されているのか、分析中に TAG が分解していないかを精査する必要がある。GC-FID と比較すると、HPLC は試料を揮発させる必要がないため、乳脂肪の分析に適していると考えられる。

そこで本章では、LC-MS/MS を用いて、乳脂肪に特徴的に含まれる TAG を測定する方法を確立し、食品中に乳脂肪がどの程度使用されているのかを評価する方法について検討を行った。

## 実験材料および方法

### 実験材料

乳脂肪の指標として、パルミチン酸 2 分子と酪酸から構成される TAG である 1,2-Dipalmitoyl-3-butyroyl-glycerol (PPBu) を採用した (Fig. 5-1)。また、PPBu の TAG 位置異性体である 1,3-Dipalmitoyl-2-butyroyl-glycerol (PBuP) と内部標準物質としてトリデカン酸 3 分子からなる TAG (C13C13C13) を用いた。これらの試薬は、月島食品工業株式会社にて合成し、NMR、GC、HPLC により構造確認を行っており、化学純度は 99% 以上である。乳脂肪を含む食品としては、バター、バター含有マーガリン (乳脂肪 15% 使用)、バタークッキー (乳脂肪 10% 使用) をスーパーマーケットにて購入した。

### PPBu および PBuP の分析

PPBu および PBuP を等量ずつ混合した後、2-プロパノールにて溶解させ、試料溶液とした。試料溶液には、内部標準物質として C13C13C13 を添加した。試料溶液は、下記条件にて LC-MS/MS にて分析を行った。

#### 【分析条件】

分析機器：Alliance e2695 (Waters Corporation)

分析カラム：Sunrise C28 (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm; ChromaNik Technologies)

カラム温度：15°C

移動相：アセトン/アセトニトリル = 80/20 (v/v)、流速：1.0 mL/min

質量分析計：Quattro micro API (Waters Corporation)

イオン化方法：大気圧化学イオン化法 (APCI)

モニタリングモード：選択反応モニタリング (SRM) モード

## バター中の PPBu 含有量の測定

バターからの脂質抽出は、Folch 法に従って行った<sup>45)</sup>。抽出した油脂は、2-プロパノールにて希釈し、5 mg/mL の濃度に調製した。また、試料溶液には、内部標準物質として C13C13C13 を 10 µg/mL の濃度で添加した。調製した試料溶液は、下記の条件にて、LC-MS/MS 分析を行った。

### 【分析条件】

分析機器：Alliance e2695 (Waters Corporation)

分析カラム：Sunrise C28 (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 µm; ChromaNik Technologies)

カラム温度：15°C

移動相：アセトン/アセトニトリル = 80/20 (v/v)、流速：1.0 mL/min

質量分析計：Quattro micro API (Waters Corporation)

イオン化方法：大気圧化学イオン化法 (APCI)

モニタリングモード：選択反応モニタリング (SRM) モード

## PPBu を指標とした乳脂肪含有食品の分析

バター含有マーガリンおよびバタークッキーからの脂質抽出は、Folch 法に従って行った<sup>45)</sup>。抽出した油脂は、2-プロパノールにて希釈し、5 mg/mL の濃度に調製した。また、試料溶液には、内部標準物質として C13C13C13 を 10 µg/mL の濃度で添加した。調製した試料溶液は、前項と同様の条件にて、LC-MS/MS 分析を行った。

## 従来の C4:0 分析法と本 PPBu 分析法の比較

### 乳脂肪混合油脂の調製

バターから抽出した油脂 (BO) およびマーガリンから抽出した油脂 (MO) を任意の割合 (BO/MO = 100/0、80/20、50/50、20/80、5/9、50/100) で混合した。

### PPBu 分析法による乳脂肪含有量の測定

乳脂肪混合油脂を、2-プロパノールにて希釈し、5 mg/mL の濃度に調製した。また、試料溶液には、内部標準物質として C13C13C13 を 10 µg/mL の濃度で添加した。調製した試料溶液は、下記条件にて、LC-MS/MS 分析を行った。

#### 【分析条件】

分析機器：Alliance e2695 (Waters Corporation)

分析カラム：Sunrise C28 (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 µm; ChromaNik Technologies)

カラム温度：15°C

移動相：アセトン/アセトニトリル = 80/20 (v/v)、流速：1.0 mL/min

質量分析計：Quattro micro API (Waters Corporation)

イオン化方法：大気圧化学イオン化法 (APCI)

モニタリングモード：選択反応モニタリング (SRM) モード

### C4:0 分析法による乳脂肪含有量の測定

乳脂肪混合油脂は、反応溶液をメタノールからブタノールに変更した AOCS Ce 1b-89 法に従って、ブチルエステル化を行った<sup>63)</sup>。その後、下記分析条件にて GC-FID 分析を行った。

### 【分析条件】

分析機器：HP6890 (Agilent Technologies)

検出器：水素炎イオン化検出器

分析カラム：CP-WAX 52 CB (30 m×0.25 mm i.d., 0.25 μm; Agilent Technologies)

注入口温度：250°C

検出器温度：250°C

カラム温度：80°C (5 min 保持) → (5°C/min) → 150°C → (10°C/min) → 250°C

キャリアーガス：ヘリウム (1 mL/min)

スプリット比：50 : 1

### 統計解析

分析は3回 (n=3) 実施し、分析値は平均値±標準偏差で示した。統計解析は、Student's *t*-test で行った ( $P < 0.05$ )。

## 結果

### PPBu および PBU<sub>P</sub> の分析

PPBu および PBU<sub>P</sub> の分析結果を Fig. 5-2 に示した。本分析条件により、PPBu とその TAG 位置異性体である PBU<sub>P</sub> を分離することが可能であった。また、それぞれの検量線は、1~250 µg/mL の範囲で高い直線性をもつことが判明した ( $r^2 > 0.99$ )。シグナル/ノイズ比 (s/n) より、検出限界 (LOD, s/n>3) および定量下限 (LOQ, s/n>10) を求めた結果、PPBu の LOD は 0.11 µg/mL、LOQ は 0.33 µg/mL であり、PBU<sub>P</sub> の LOD は 0.11 µg/mL、LOQ は 0.34 µg/mL であった。

### バターおよび乳脂肪含有食品の分析

LC-MS/MS にてバターを分析した結果、乳脂肪中には PBU<sub>P</sub> が含まれていないことが判明した (Fig. 5-2)。また、PPBu を定量した結果、乳脂肪中の PBU<sub>P</sub> 含有量の平均値は、3.9 g/100 g 油脂であった。この値を基準として、食品中の PBU<sub>P</sub> 含有量の分析値から、食品中の乳脂肪含有量を推定した結果を Table 5-1 に示した。本実験にて使用した食品中の乳脂肪含有量は、包装箱の表示を参照にすると、バター含有マーガリンで 15%、バタークッキーで 10% であり、PPBu 含有量から推定した値と一致した。

### 従来の C4:0 分析法と本 PBU<sub>P</sub> 分析法の比較

バター抽出油脂およびマーガリン抽出油から調製した乳脂肪混合油脂を試料として用いて、従来の C4:0 を指標とした乳脂肪含有量の測定法 (C4:0 分析法) と今回開発した PBU<sub>P</sub> を指標とした乳脂肪含有量の測定法 (PBU<sub>P</sub> 分析法) を比較した (Table 5-2)。その結果、両分析法は、正確に乳脂肪含有量を測定できることが判明した。

## 考察

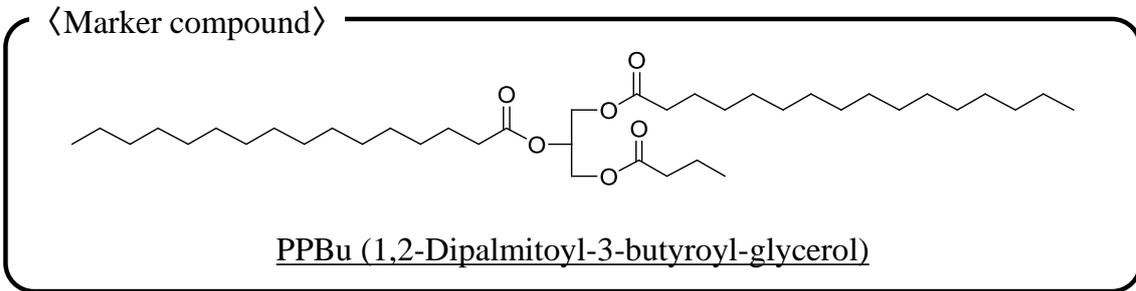
食品中の乳脂肪含有量の測定には、乳脂肪に特異的に含まれる脂肪酸または TAG を指標として、これらを GC-FID を用いて分析する方法が用いられている。脂肪酸を指標とする場合は、酪酸などの短鎖脂肪酸を分析するが<sup>79)</sup>、これらは水溶性や揮発性が高いため、誘導体化の際に損失する危険性がある。そのため、Buchgraber らは、脂肪酸の誘導体化を必要としない TAG を指標とした分析法を開発した<sup>80,81)</sup>。しかしながら、GC-FID にて高沸点の TAG を分析する際には、TAG が GC 内に正しく導入されているのか、分析中に分解していないかを精査する必要がある。そこで本章では、HPLC を用いて、食品中の乳脂肪含有量を測定する方法について検討を行った。

本研究では、乳脂肪に特徴的に含まれるパルミチン酸 2 分子と酪酸 1 分子からなる TAG である PPBu および P BuP を指標として LC-MS/MS 分析を行った。我々は、過去の研究において、飽和脂肪酸 2 分子、不飽和脂肪酸 1 分子からなる TAG 位置異性体同士を、C28 カラムを用いた逆相 HPLC にて分離する条件を検討し、1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol (POP) および 1,2-dipalmitoyl-3-oleoyl glycerol (PPO) の分離を達成した<sup>82,83)</sup>。本研究においても、その条件をもとに分析条件を検討した。その結果、C28 カラムを用いることで、TAG 位置異性体同士である PPBu と P BuP を分離することが可能となった (Fig. 5-2)。Kalo ら<sup>84)</sup>は、順相条件下の LC-ESI-MS/MS を用いて、これらの TAG 位置異性体を分離した。彼らの方法と比較すると、本分析法は LOD や LOQ の結果が優れていることから、本分析法は、高い感度で乳脂肪の検出が可能であると考えられる。

バター含有マーガリンおよびバタークッキーの乳脂肪含有量を PPBu 値から推定した結果、本分析法は、高い精度で食品中の乳脂肪含有量を推定できることが示唆された (Fig. 5-3)。また、乳脂肪混合油脂を用いて、従来の C4:0 分

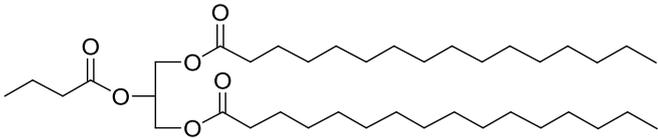
析法と今回開発した PPBu 分析法を比較した結果 (Table 5-2)、PPBu 法は、従来の方法と同様に、食品中の乳脂肪含有量を正確に測定できることが判明した。従来の食品中の乳脂肪含有量を GC-FID を用いて測定する方法は、酪酸を指標とする場合は酪酸を損失しない操作が必要であり、また、TAG を指標とする場合は TAG を損失しない操作が必要となる<sup>79-81)</sup>。本方法は、HPLC を使用しているため、従来法よりも指標を損失するリスクは小さいと考えられる。

本研究では、バター中には PBuP が含まれていないことが判明した (Fig. 5-2)。バターの脂肪酸結合位置を調査した過去の研究においても、酪酸は、そのほとんどが TAG の *sn*-3 位に結合しており、*sn*-2 位には結合していない<sup>26)</sup>。そのため、仮に、酪酸が *sn*-2 位に結合していた場合、バターにエステル交換反応が行われている可能性が高いと考えられる。エステル交換反応は、油脂の物性や栄養機能を調製するために使用される油脂加工技術であり、TAG の脂肪酸結合位置を意図的に変えることができる。すなわち、天然のバターに存在しない PBuP は、乳脂肪のエステル交換の有無を判断する指標として用いることが可能であると考えられる。



TAG positional isomer

Bu: Butyric acid (C4:0)  
P: Palmitic acid (C16:0)



PBPu (1,3-Dipalmitoyl-2-butyroyl-glycerol)

Figure 5-1  
Chemical structure of triacylglycerol.

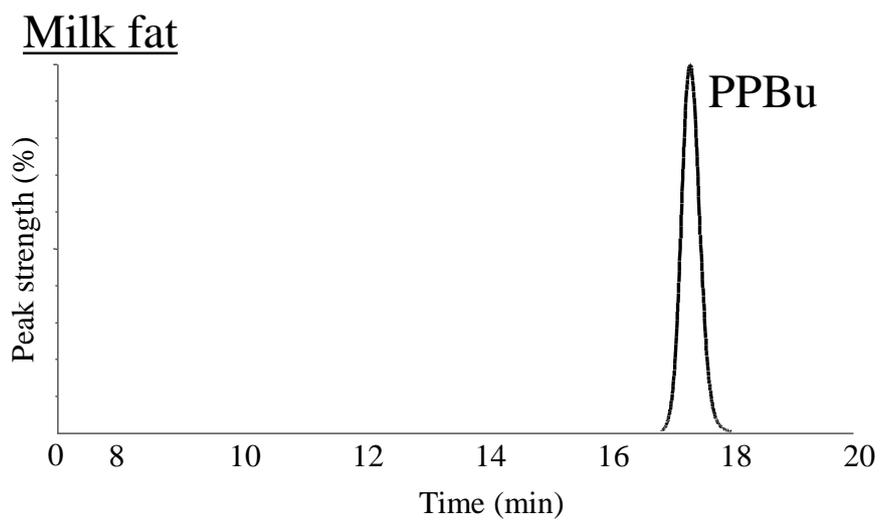
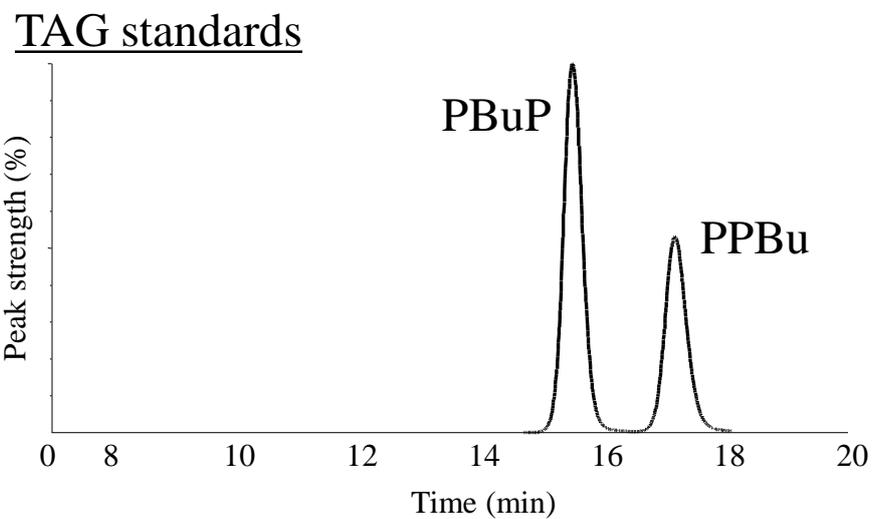


Figure 5-2

Chromatograms of triacylglycerol (TAG) standards and milk fat. Separation of P Bu P (r.t., 15.7min) and P P Bu (r.t., 17.4min) using a C28 column with LC-APCI-MS/MS ( $[M+NH_4]^+$  at  $m/z$  656 and  $[M-ROOO]^+$  at  $m/z$  383).

Table 5-1

Milk fat contents in butter-blended foods.

	Milk fat content
Butter-blended margarine (Milk fat content 15%)	14.76 ± 0.26%
Butter cookies (Milk fat content 10%)	9.64 ± 0.42%

Each value shows mean ± SD (n=3).

Table 5-2

Comparison of milk fat contents in blends of butter and margarine determined by the PPBu and C4:0 methods.

Actual milk fat content (%)	Experimental milk fat content (%)	
	PPBu method	C4:0 method
5%	4.92 ± 0.12	4.74 ± 0.05
20%	19.15 ± 0.58	19.76 ± 0.09
50%	50.16 ± 0.86	49.80 ± 0.12
80%	80.28 ± 1.25	79.88 ± 0.40

Each value shows mean ± SD (n=3).

PPBu method: method developed using LC-APCI-MS/MS in this study.

C4:0 method: conventional method using GC-FID.

## 第六章 総合考察

油脂における脂肪酸結合位置は、ランダムではなく、油脂種によって異なっている。過去の知見では、脂肪酸の機能性は TAG の結合位置によって影響を受けることが明らかとなってきた。しかしながら、従来の研究は天然油脂を比較したものが多く、個々の脂肪酸の機能性を厳密に評価したわけではなかった。そこで本研究では、TAG および脂肪酸の標準品を用いて、個々の脂肪酸の生理機能を評価し、従来の分析手法では困難であった脂肪酸の分離条件を検討するため、次のような研究を行った。

第二章では、TAG における結合位置が n-3HUFA の生理機能にどのような影響を及ぼすのかを精査した。海獣油と魚油を比較した過去の研究では、sn-1,3 位に結合した n-3HUFA は、sn-2 位に結合した n-3HUFA と比べ、優れた保健効果を有すると考えられてきた<sup>19-21,40,41)</sup>。しかしながら、海獣油には、EPA や DHA と同等の脂質代謝改善効果を有する DPA が含まれている<sup>44)</sup>。そのため、本章では TAG 標準品を用いて、脂肪酸の生理機能を厳密に評価することにした。その結果、TAG の sn-2 位に結合した DHA は、sn-1,3 位に結合した DHA と比較して、マウス血清および肝臓中の TAG およびコレステロール濃度が減少させることが明らかとなった。一方、EPA は、TAG の sn-1,3 位に結合した際に、肝臓のコレステロール濃度を有意に減少させることが判明した。これは、TAG における n-3HUFA の結合位置は、これらの生理機能に大きな影響を及ぼすと考えられる。しかしながら、n-3HUFA 投与によるコレステロール濃度減少のメカニズムについては不明な点が多く、今後さらなる研究が求められる。

第三章では、cis-C18:1 および trans-C18:1 位置異性体の標準品を用いて、シアノプロピル固定相 (SP-2560) カラムの性能を評価した。シアノプロピル固定相

は、トランス脂肪酸分析公定法である「AOAC 996.06」<sup>34)</sup>、「AOCS Ce 1h-05」<sup>35)</sup>、「基準油脂分析試験法 2.4.4.3-2013」<sup>36)</sup>などで広く用いられているが、*cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体の標準品を用いて、それらの分離挙動を検討した研究は、ほとんど存在しなかった。本章では、シアノプロピル固定相を用いて、様々な分析温度で位置異性体の分離を試みたが、シアノプロピル固定相では、いくつかのシス型脂肪酸およびトランス脂肪酸位置異性体が分離できないことが判明した。また、このようにシス型脂肪酸とトランス脂肪酸のピークが重なることで、食用油脂中のトランス脂肪酸量を大きく見積もってしまうリスクがあることが判明した。これらの結果を踏まえて、シアノプロピル固定相よりも極性の高いイオン液体固定相 (SLB-IL111) カラムの性能を評価した。その結果、SLB-IL111 カラムは、分析温度 120°C および 160°C を併用することで、*cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 のすべての位置異性体を分離できることが判明した。また、今回確立した *cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 の全位置異性体の分離条件を用いて、部分水添大豆油および乳脂肪中の *trans*-C18:1 位置異性体を分析した結果、従来の手法では分析不可能であった食用油脂中の *trans*-6, 7, 8-C18:1 位置異性体および *trans*-13, 14-C18:1 位置異性体の組成を明らかにすることができた。今後は、本分析手法を利用して、これらの位置異性体の生理機能を評価する必要がある。また、SLB-IL111 カラムを用いても、すべての *cis*-C18:1 および *trans*-C18:1 位置異性体のピークをきれいに分離することは困難であることから、今後、さらに高い極性を持った分析カラムの開発が期待される。

第四章では、*sn*-1,3 位特異的リパーゼを用いた *sn*-2 位脂肪酸組成分析法とトランス脂肪酸分析法を併用し、食用油脂 TAG におけるトランス脂肪酸異性体の結合位置を精査した。その結果、部分水添菜種油の主要なトランス脂肪酸である *trans*-9-C18:1 と *trans*-11-C18:1 は *sn*-2 位に結合し、反芻動物脂の主要なトラ

ンス脂肪酸である *trans*-11-C18:1 は、*sn*-1,3 位に結合することが判明した。すなわち、TAG におけるトランス脂肪酸位置異性体の結合位置は、油脂の種類によって異なり、また位置異性体ごとに TAG への結合傾向が異なると考えられる。Woodrow ら<sup>24)</sup>、Barbano ら<sup>25)</sup>、Parodi ら<sup>26)</sup>は、乳脂肪中のトランス脂肪酸は *sn*-1,3 位に結合すると報告しているが、個々のトランス脂肪酸位置異性体の結合位置を解明したのは本研究が初めてである。TAG における脂肪酸の結合位置は、脂質代謝に影響を及ぼすことが第二章でも明らかとなっていることから、トランス脂肪酸も TAG の結合位置によって、何らかの影響を受けると考えられる。トランス脂肪酸が人体に及ぼす影響を明らかにするため、今後、さらなる研究が求められる。

第五章では、LC-MS/MS を用いて、乳脂肪に特徴的に含まれる TAG を測定することで、食品中の乳脂肪含有量を簡便に測定する方法を確立した。その結果、PPBu を指標として用いることで、高い精度で食品中の乳脂肪含有量を推定することが可能となった。また、PBuP は、エステル交換の有無を判断する指標として利用できると考えられる。従来から用いられている食品中の乳脂肪含有量の測定法には、乳脂肪に特異的に含まれる脂肪酸<sup>79)</sup>または TAG<sup>80,81)</sup>を指標として、これらを GC-FID を用いて分析する方法が用いられているが、誘導体化や分析条件の最適化を行う必要があった。そのため、PPBu を指標とした本分析法は、従来法よりも簡便に乳脂肪含有量を測定できる方法であると考えられる。

本研究で得られた知見は、真に人体に悪影響を及ぼすトランス脂肪酸位置異性体を特定し、食用油脂の安全性を保障するための重要な基盤となると考えられる。今後は、食用油脂 TAG におけるトランス脂肪酸位置異性体の分布をより詳細に解明し、TAG におけるトランス脂肪酸位置異性体の結合位置を考慮に入れた動物試験の実施が必要である。今回、構築した分析技術を利用し、油脂業

界および乳業業界の発展に役立てていきたい。

## 引用文献

1. Murray, R. K., Granner, D. K., Rodwell, V. W. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 27th ed., McGraw-Hill Companies, New York. (2006).
2. Brockerhoff, H., Yurkowski, M. Stereospecific analyses of several vegetable fats. *J. Lipid Res.* 7, 62–64 (1966).
3. 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).
4. 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).
5. Christie, W. W., Clapperton, J. L. Structures of the triglycerides of cow's milk, fortified milks (including. Infant formulae), and human milk. *J. Soc. Dairy Technol.* 35, 22–24 (1982).
6. Christie, W. W. The composition and structure of milk lipids. *Advanced Dairy Chemistry-2: Lipids*, 2nd ed., Chapman & Hall, London. (1995).
7. Iwasaki, Y., Yamane, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 90, 151–171 (2004).
8. Carnielli, V. P., Luijendijk, I. H. T., van Goudoever, J. B., Sulkers, E. J., Boerlage, A. A., Degenhart, H. J., Sauer, P. J. 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).
9. Breckenridge, W. C.; Marai, L.; Kuksis, A. Triglyceride structure of human milk fat. *Can. J. Biochem.* 47, 761–769 (1969).

10. 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).
11. 日本油化学会編 第4版油化学便覧 丸善 (2001).
12. Kajikawa, S, Harada, T, Kawashima, A, Imada, K, Mizuguchi, K. Highly purified eicosapentaenoic acid prevents the progression of hepatic steatosis by repressing monounsaturated fatty acid synthesis in high-fat/ high-sucrose diet-fed mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **80**, 229–238 (2009).
13. Madsen, L., Rustan, A. C., Vaagenes, H., Berge, K., Dyrøy, E., Berge, R. K. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid affect mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in relation to substrate preference. *Lipids.* **34**, 951–963 (1999).
14. Tran, K., Sun, F., Cui, Z., Thorne-Tjomsland, G., St Germain, C., Laperre, L. R., McLeod, R. S., Jamieson, J. C., Yao, Z. Attenuated secretion of very low density lipoproteins from McA-RH7777 cells treated with eicosapentaenoic acid is associated with impaired utilization of triacylglycerol synthesized via phospholipid remodeling. *Biochim. Biophys. Acta.* **1761**, 463–473 (2006).
15. Ikeda, I., Kumamaru, J., Nakatani, N., Sakono, M., Murota, I., Imaizumi, K. Reduced hepatic triglyceride secretion in rats fed docosahexaenoic acid-rich fish oil suppresses postprandial hypertriglyceridemia. *J. Nutr.* **131**, 1159–1164 (2001).
16. Yokoyama, M., Origasa, H., Matsuzaki, M., Matsuzawa, Y., Saito, Y., Ishikawa, Y., Oikawa, S., Sasaki, J., Hishida, H., Itakura, H., Kita, T., Kitabatake, A., Nakaya, N., Sakata, T., Shimada, K., Shirato, K. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomized open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet.* **369**, 1090–1098 (2007).
17. 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).
18. Christensen, M. S., Mortimer, B. C., Høy, C. E, Redgrave, T. G. Clearance of chylomicrons following fish and seal oil feeding. *Nutr. Res.* **15**, 359–368 (1995).
  19. Ikeda, I., Yoshida, H., Tomooka, M., Yosef, A., Imaizumi, K., Tsuji, H., Seto, A. Effects of long-term feeding of marine oils with different positional distribution of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on lipid metabolism, eicosanoid production, and platelet aggregation in hypercholesterolemic rats. *Lipids*. **33**, 897–904 (1998).
  20. Yoshida, H., Kumamaru, J., Mawatari, M., Ikeda, I., Imaizumi, K., Tsuji, H., Seto, A. Lymphatic absorption of seal and fish oils and their effect on lipid metabolism and eicosanoid production in rats. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 1293–1298 (1996).
  21. Yoshida, H., Mawatari, M., Ikeda, I., Imaizumi, K., Seto, A., Tsuji, H. Effect of dietary seal and fish oils on triacylglycerol metabolism in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **45**, 411–421 (1999).
  22. Teegala, S. M., Willett, W. C., Mozaffarian, D. Consumption and health effects of *trans* fatty acids: a review. *J. AOAC Int.* **92**, 1250–1257 (2009).
  23. Mozaffarian, D. *Trans* fatty acids – effects on systemic inflammation and endothelial function. *Atheroscler. Suppl.* **7**, 29–32 (2006).
  24. Woodrow, I. L., Deman, J. M. Distribution of *trans*-unsaturated fatty acids in milk fat. *Biochim. Biophys. Acta.* **152**, 472–478 (1968).
  25. Barbano, D. M., Sherbon, J. W. Stereospecific analysis of high melting triglycerides of bovine milk fat and their biosynthetic origin. *J. Dairy Sci.* **58**, 1–8 (1974).

26. Parodi, P. W. Positional distribution of fatty acids in the triglyceride classes of milk fat. *J. Dairy Res.* **49**, 73–80 (1982).
27. 吉永和明, 後藤直宏. トランス脂肪酸位置異性体分析技術の進展. *ミルクサイエンス*. **63**, 71–81 (2014).
28. Wolff, R. L., Combe, N. A., Destailats, F. D., Boué, C., Precht, D., Molkentin, J., Entressangles, B. Follow-up the  $\Delta 4$  to  $\Delta 16$  *trans*-18:1 isomers profile and content in French processed foods containing partially hydrogenated vegetable oils during the period 1995–1999. Analytical and nutritional implications. *Lipids*. **35**, 815–825 (2000).
29. Precht, D., Molkentin, J. Rapid analysis of the isomers of *trans*-octadecenoic acid in milk fat. *Int. Dairy J.* **6**, 791–809 (1996).
30. Precht, D., Molkentin, J., Destailats, F., Wolff, R. L. Comparative studies on individual isomeric 18:1 acids in cow, goat, and ewe milk fats by low-temperature high-resolution capillary gas-liquid chromatography. *Lipids*. **36**, 827–832 (2001).
31. Willett, W. C., Stampfer, M. J., Manson, J. E., Colditz, G. A., Speizer, F. E., Rosner, B. A., Sampson, L. A., Hennekens C. H. Intake of *trans* fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *Lancet*. **341**, 581–585 (1993).
32. Ascherio, A., Hennekens, C. H., Buring, J. E., Master, C., Stampfer, M. J., Willett, W. C. *Trans*-fatty acids intake and risk of myocardial infarction. *Circulation*. **89**, 94–101 (1994).
33. Pietinen, P., Ascherio, A., Korhonen, P., Hartman, A. M., Willett, W. C., Albanes, D., Virtamo, J. Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men. The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *Am. J. Epidemiol.* **145**, 876–887 (1997).

34. AOAC International. *AOAC International, Method 996.06*. (2001).
35. American Oil Chemists' Society. *AOCS, Official Method Ce 1h-05*. (2005).
36. 日本油化学会編 基準油脂分析試験法 2.4.4.3-2013 トランス脂肪酸含量 (キャピラリーガスクロマトグラフィー) . (2013).
37. Luddy, F. E., Barford, R. A., Herb, S. F., Magidman, P., Riemenschneider, R. W. Pancreatic lipase hydrolysis of triglycerides by a semimicro technique. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 41, 693–696 (1964).
38. Kosugi, Y., Oshima, A., Koike, S., Fukatsu, M., Minami, K., Miyake, Y., Masui, K. Determination of fatty acid composition at *sn*-2 acyl position in triacylglycerol by capillary gas chromatography with lipase from *Rhizopus delemar*. *J. Oleo Sci.* 51, 599–605 (2002).
39. Watanabe, Y., Sato, S., Sera, S., Sato, C., Yoshinaga, K., Nagai, T. Enzymatic analysis of positional distribution of fatty acids in solid fats by 1,3-selective transesterification with *Candida antarctica* lipase B. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 91, 1323–1330 (2014).
40. Mayer, B. J., Lane, A. E., Mann, N. J. Comparison of seal oil to tuna oil on plasma lipid levels and blood pressure in hypertriglyceridaemic subjects. *Lipids.* 44, 827–835 (2009).
41. Mann, N. J., O'Connell, S. L., Baldwin, K. M., Singh, I., Mayer, B. J. Effects of seal oil and tuna-fish oil on platelet parameters and plasma lipid levels in healthy subjects. *Lipids.* 45, 669–681 (2010).
42. Dubey, P., Jayasooriya, A. P., Cheema, S. K. Diets enriched in fish-oil or seal-oil have distinct effects on lipid levels and peroxidation in BioF1B hamsters. *Nutr. Metab. Insights.* 4, 7–17 (2011).

43. Wanasundara, U. N., Shahidi, F. Positional distribution of fatty acids in triacylglycerols of seal blubber oil. *J. Food Lipids*. **4**, 51–64 (1997).
44. Gotoh, N., Nagao, K., Onoda, S., Shirouchi, B., Furuya, K., Nagai, T., Mizobe, H., Ichioka, K., Watanabe, H., Yanagita, T., Wada, S. Effects of three different highly unsaturated fatty acids on lipid metabolism in C57BL/KsJ-*db/db* mice. *Agric. Food Chem.* **57**, 11047–11054 (2009).
45. Folch, J., Less, 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).
46. Fletcher, M. J. A colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clin. Chim. Acta.* **22**, 393–397 (1968).
47. Rouser, G., Siakotos, A. N., Fleischer, S. Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots. *Lipids*. **1**, 85–86 (1965).
48. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
49. Kelly, D. S., Nelson, G. J., Hunt, J. E. Effect of prior nutritional status on the activity of lipogenic enzymes in primary monolayer cultures of rat hepatocytes. *Biochem. J.* **235**, 87–90 (1986).
50. Kelly, D. S., Kletzien, R. F. Ethanol modulation of the hormonal and nutritional regulation of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem. J.* **217**, 543–549 (1984).
51. Ochoa, S. *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York. (1955).
52. Markwell, M. A. K., McGroarty, E. J., Bieber, L. L., Tolbert, N. E. The subcellular

- distribution of carnitine acyltransferases in mammalian liver and kidney. *J. Biol. Chem.* **248**, 3433–3440 (1973).
53. Lazarow, P. B. Assay of peroxisomal-oxidation of fatty acids. *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York. (1981).
54. Nestel, P. J., Connor, W. E., Reardon, M. F., Connor, S., Wong, S., Boston, R. Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man. *J. Clin. Invest.* **74**, 82–89 (1984).
55. Ikeda, I., Cha, J. Y., Yanagita, T., Nakatani, N., Oogami, K., Imaizumi, K., Yazawa, K. Effects of dietary  $\alpha$ -linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on hepatic lipogenesis and  $\beta$ -oxidation in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 675–680 (1998).
56. Roach, P. D., Kambouris, A.M., Trimble, R. P., Topping, D. L., Nestel, P. J. The effects of dietary fish oil on hepatic high density and low density lipoprotein receptor activities in the rat. *FEBS Lett.* **222**, 159–162 (1987).
57. Frøyland, L., Vaagenes, H., Asiedu, D. K., Garras, A., Lie, Ø., Berge, R. K. Chronic administration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid as ethyl esters reduced plasma cholesterol and changed the fatty acid composition in rat blood and organs. *Lipids.* **31**, 169–178 (1996).
58. Kim, H. J., Takahashi, M., Ezaki, O. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver: A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. *J. Biol. Chem.* **274**, 25892–25898 (1999).
59. Saito, J., Terano, T., Hirai, A., Shiina, T., Tamura, Y., Saito, Y. Mechanisms of enhanced production of PGI<sub>2</sub> in cultured rat vascular smooth muscle cells enriched

- with eicosapentaenoic acid. *Atherosclerosis*. 131, 219–228 (1997).
60. Murphy, M. G., Wright, V., Scott, J., Timmins, A., Ackman, R. G. Dietary menhaden, seal, and corn oils differentially affect lipid and exo vivo eicosanoid and thiobarbituric acid-reactive substances generation in the guinea pig. *Lipids*. 34, 115–124 (1999).
  61. Goto, H., Shionoya, N., Sugie M., Tominaga, M., Shimelis, O., Taniguchi, M., Igarashi, T., Hirata, Y. Novel Pre-fractionation Method of *Trans* Fatty Acids by Gas Chromatography with Silver-Ion Cartridge Column. *J. Oleo Sci.* 61, 49-56 (2012).
  62. Thompson, R. H. Direct Measurement of Total *trans*- and *cis*-Octadecenoic Fatty Acids Based on a Gas-Liquid Chromatographic Class Separation of *trans*-18:1 and *cis*-18:1 Fatty Acid Methyl Esters. *J. Chromatogr. Sci.* 35, 536-544 (1997).
  63. American Oil Chemists' Society. *AOCS, Official Method Ce 1b-89* (1997).
  64. Delmonte, P., Fardin Kia, A. R., Kramer, J. K. G., Mossoba, M. M., Sidisky, L., Rader, J. I. Separation characteristics of fatty acid methyl esters using SLB-IL111, a new ionic liquid coated capillary gas chromatographic column. *J. Chromatogr. A.* 1218, 545–554 (2011).
  65. Delmonte, P., Fardin Kia, A. R., Kramer, J. K. G., Mossoba, M. M. Sidisky, L., Tyburczy, C., Rader, J. I. Evaluation of highly polar ionic liquid gas chromatographic column for the determination of the fatty acids in milk fat. *J. Chromatogr. A.* 1233, 137–146 (2012).
  66. Fardin Kia, A. R., Delmonte, P., Kramer, J. K. G., Jahreis, G., Kuhnt, K., Santercole, V., Rader, J. I. Separation of the fatty acids in menhaden oil as methyl esters with a highly polar ionic liquid gas chromatographic column and

- identification by time of flight mass spectrometry. *Lipids*. **48**, 1279–1295 (2013).
67. Ackman, R. G. The analysis of fatty acids and related materials by gas liquid chromatography. *Prog. Chem. Fats Other Lipids*. **12**, 165–284 (1972).
68. Sidisky, L. M., Ridley, H. J. Temperature dependence of equivalent chain length values on capillary columns of different polarity. *J. High Resolut. Chromatogr.* **3**, 191–195 (1991).
69. Martin, C. A., de Oliveira, C. C., Visentainer, J. V., Matsushita, M., de Souza, N. E. Optimization of the selectivity of a cyanopropyl stationary phase for the gas chromatographic analysis of *trans* fatty acids. *J. Chromatogr. A*. **1194**, 111–117 (2008).
70. Ratnayake, W. M. N., Plouffe, L. J., Pasquier, E., Gagnon, C. Temperature-sensitive resolution of *cis*- and *trans*-fatty acid isomers of partially hydrogenated vegetable oils on SP-2560 and CP-Sil 88 capillary columns. *J. AOAC Int.* **85**, 1112–1118 (2002).
71. Hui, Y. H. *Bailey's industrial oil and fats products volume 4*, 5th ed., Wiley, New York. (1995).
72. Emery, R. S. Biosynthesis of milk fat. *J. Dairy Sci.* **56**, 1187–1195 (1973).
73. Kresge, N., Simoni, R. D., Hill, R. L. The Kennedy pathway for phospholipid synthesis: the work of Eugene Kennedy. *J. Biol. Chem.* **280**, 22–24 (2005).
74. 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).
75. Dhiman, T. R., Nam, S. H., Ure, A. L. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 463–482 (2005).
76. Chardigny, J. M., Masson, E., Sergiel, J. P., Darbois, M., Loreau, O., Noël, J. P.,

- Sébédio, J. L. The position of rumenic acid on triacylglycerols alters its bioavailability in rats. *J. Nutr.* **133**, 4212–4214 (2003).
77. Lawson, L. D., Holman, R. T.  $\beta$ -Oxidation of the geometric positional isomers of octadecenoic acid by rat heart and liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **665**, 60–65 (1981).
78. Gunstone, F. D. Some physical, chemical, and biological properties of natural and synthetic unsaturated C18 acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **50**, 486–490 (1973).
79. American Oil Chemists' Society. *AOCS, Official Method Ca 5c-87.* (1987).
80. Buchgraber, M., Androni, S., Anklam, E. Quantification of milk fat in chocolate fats by triacylglycerol analysis using gas-liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 3275-3283 (2007).
81. American Oil Chemists' Society. *AOCS, Official Method Ce 11a-07.* (2007).
82. Nagai, T., Gotoh, N., Mizobe, H., Yoshinaga, K., Kojima, K., Matsumoto, Y., Wada, S. Rapid separation of triacylglycerol positional isomers binding two saturated fatty acids using octacocyl silylation column. *J. Oleo Sci.* **60**, 345-350 (2011).
83. Gotoh, N., Matsumoto, Y., Nagai T., Mizobe, H., Yoshinaga, K., Kojima, K., Kuroda, I., Kitamura Y., Shimizu T., Ishida H., Wada, S. Actual ratio of triacylglycerol positional isomers in milk and cheese. *J. Oleo Sci.* **61**, 173-180 (2012).
84. Kalo, P., Kempainen, A., Ollilainen, V., Kuksis, A. Regiospecific determination of short-chain triacylglycerols in butterfat by normal-phase HPLC with on-line electrospray-tandem mass spectrometry. *Lipids.* **39**, 915-928 (2004).

## 謝辞

本研究を学位論文にまとめるにあたり、多くのご指導、ご鞭撻、そしてご支援を賜りました主査の東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻 食品機能健康科学講座 動物資源化学分野の齋藤忠夫教授に拝謝申し上げます。

また、本博士論文の副査をお引き受けいただき、査読の労を取られました同講座 食品化学分野の池田郁男教授、ならびに同講座 栄養学分野の駒井三千夫教授に深謝申し上げます。

そして、本審査の委員としてご参加いただきました同専攻 微生物機能開発科学講座 応用微生物学分野の阿部敬悦教授、同専攻 微生物機能開発科学講座 動物微生物学分野の磯貝恵美子教授、資源生物科学専攻 水圏生物生産科学講座 水産資源化学分野の落合芳博教授に深く感謝申し上げます。

実際の研究について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 食機能保全科学専攻 食品保全化学分野の後藤直宏准教授、別府史章助教に厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行にご協力を賜りました東京海洋大学 食品保全化学研究室の皆様にも深く感謝申し上げます。

本研究と学位取得の機会を与えていただきました月島食品工業株式会社 戸田信之社長、同社 鶴見幸市顧問、同社 研究所 石田英明所長、小島浩一次長、同研究所 基礎研究室 吉田明彦室長に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行だけでなく、日々の業務においても大変お世話になりました月島食品工業株式会社 研究所の皆様にも深く感謝申し上げます。

最後に、終始変わらぬ支えとなり、応援してくれた妻 絢に深い感謝の意を表して謝辞といたします。

平成 27 年 10 月 22 日 吉永 和明