報 文

スィ臓リパーゼによるグリセリドの分析 (第1報)

加水分解方法および $C_{10} \sim C_{18}$ 飽和トリグリセリドの加水分解

白 井 浩・桑山 英夫・長 倉 稔

日清製油株式会社研究所 (横浜市神奈川区千若町 1-3)

Studies on the Pancreatic Hydrolysis of Glycerides. I.

The method of Hydrolysis and the Hydrolysis of $C_{10} \sim C_{18}$ Saturated Glycerides

Yutaka USUI, Hideo KUWAYAMA and Minoru NAGAKURA

Research Laboratory, The Nisshin Oil Mills Ltd. (1-3, Chiwaka-chō, Kanagawa-ku, Yokohama)

In order to determine the position of individual fatty acid within triglyceride, hydrolysis by pancreatic lipase was carried out at 40°C, buffered at pH 8 by 1 M-phosphate solution and using PVA as an emulsifier. Hydrolyzed products of 2-myristo-1, 3-dilaurin showed that the 1, 3-positions of glyceride were preferentially hydrolyzed under above conditions. When the mixture of five simple triglycerides which consisted of C_{10} , C_{12} , C_{14} , C_{16} , or C_{18} saturated fatty acid was hydrolyzed, it was found that shorter chain fatty acid was split more rapidly than longer one. The order of ease splitting came as follows;

$$C_{10} \geq C_{12} > C_{14} \gg C_{16} > C_{18}$$

With the randomized triglyceride, the same order was observed.

It was found that the conditions described above were satisfactory for the hydrolysis with pancreatic lipase to determine the glyceride structure of natural fats when hydrolysis was carried out sufficiently.

1 緒 言

スィ臓リパーゼを用い、天然油脂 (トリグリセリド) の1位および3位 (α および α' 位) のエステル結合を選択的に加水分解し、グリセリド内の脂肪酸分布の分析については、すでに Desnuelle ら¹⁾, Mattson ら²⁾ をはじめ数多くの報告がある^{3)~18)}。しかし、これらの報告の多くは加水分解条件として Mattson ら²⁾ の方法、すなわち、グリセリドをアンモニアもしくはトリス緩衝液中で、胆汁酸、塩化カルシウムなどの存在下に加水分解する方法を用いており、他の系について検討した例は比較的少ない。単にグリセリドの分析のみを目的とする場合、上記 Mattson らの方法は、胆汁酸を使用すること、また反応系の pH を一定に保つため、反応中常にアルカリを補う必要があるなど、操作上やや不便な点がある。

以下の実験は、ポリビニルアルコールを乳化剤とし、リン酸緩衝液のみを用いる簡易な系において、グリセリ

ドの加水分解を行ない、脂肪酸鎖長の違いによる加水分解速度の差を調べると同時にこれを天然油脂の分析に用いることを目的とした。

2 実験および結果

2.1 試料の合成および性状

実験に用いた 2-ミリスト-1, 3-ジラウリンおよび単酸基トリグリセリドは、以下の方法により合成した。合成に用いた脂肪酸は市販試薬をあらかじめ再結晶、蒸留などにより精製した。

2.1.1 2-ミリスト-1, 3-ジラウリン

i) ラウリン酸クロリドの合成

Young ら¹⁹⁾の方法により合成した。すなわち、ラウリン酸 0.35 mol を四塩化炭素 1 l に溶解したのち、三塩化リン 0.36 mol を加え、85°C で 1 hr 還流する。溶液を室温まで冷却後、分液漏斗に移し、冷水で静かに2回洗う。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下に留去し、ラウリン酸クロリド 69 g を得た (収率 90%)。

ii) グリシジルラウレートの合成²⁰⁾

グリシドール 0.25 mol, ラウリン酸クロリド 0.23 mol およびトルエン 150 ml を混合し, 氷水で冷却する。混合液を激しくかきまぜながら, トリエチルアミン 0.27 mol を一滴ずつ 25 min を要して滴下し, さらに 35 min かきまぜる (この間液温を 10°C 以下に保つ)。室温にしばらく放置したのちブフナー漏斗を用いて生成した結晶 (トリエチルアミン塩) をこしわけ, 母液から溶媒を減圧下に加温留去し, グリシジルラウレートの粗結晶を得た。これを石油エーテル (bp 50~60°C) から再結晶し, 白色結晶 41 g を得た (収率 67%)。

iii) 1,3-ジラウリンの合成

Radlove ら²¹⁾の方法に準じて合成した。グリシジルラウレート 0.27 mol, ラウリン酸 0.15 mol およびキシレン 330 ml を混合して 20 hr 還流し, 析出した白色の結晶をろ別し, 粗生成物を得た。このものは薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略記する) で, 1,3-ジラウリンと 1,2-ジラウリンの混合物であることが認められた。粗生成物をエチルエーテルから 5 回繰り返し再結晶し, 1,3-ジラウリン 23 g を得た (収率 34%)。1,3-ジグリセリドとしての純度は TLC により測定した結果 99.5% 以上であった。

iv) 2-ミリスト-1,3-ジラウリンの合成

1,3-ジラウリン 0.0431 mol とミリスチン酸クロリド 0.0583 mol (ラウリン酸クロリドと同様に合成した) を精製クロロホルム 22 ml に溶解し, ついでピリジン 0.1 mol を加えた。室温で 72 hr 静置後, クロロホルムを減圧下に留去し, 残留物をエチルエーテルから再結晶した。ついでエチルアルコールから数回再結晶を繰り返して, 2-ミリスト-1,3-ジラウリン 14.8 g を得た (収率 52%)。

2.1.2 飽和脂肪酸単酸基トリグリセリドの合成

i) トリカプリン, トリラウリン, およびトリミリスチンの合成

グリセリン 0.1 mol, 脂肪酸 (純度 99% 以上) 0.33 mol を 5% (脂肪酸の重量に対し) *n*-ヘキサンで溶かし, 触媒とともにキシレン中で還流し, 検水管を用いて,

生成する水を系外に除きながら 8 hr 反応した。反応物を室温に冷却後, エチルエーテルに溶解し, 水, *N*/10 水酸化カルシウム, 水で順次洗い, 触媒および未反応脂肪酸を除去する。エーテル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥したのち, 溶媒を留去し, 残部をエタノールから再結晶した (収率 50~60%)。

ii) トリパルミチン, トリステアリンの合成

グリセリン 0.10 mol, 脂肪酸 0.33 mol を減圧下 200~300°C で 5 hr 反応させ, 生成物をエチルアルコールおよびアセトンから再結晶した (収率約 85%)。

2.1.3 標準物質の性状

上記方法により合成した試料の性状を Table-1 に示した。これらの合成グリセリドは以下の実験に十分な純度であると思われる。

2.2 スイ臓リパーゼによるグリセリドの加水分解方法

2.2.1 試 薬

i) ポリビニルアルコール溶液: 市販ポリビニルアルコール (平均分子量 200) 20 g を 1 l の蒸留水に溶解した。

ii) 1 *M*-リン酸緩衝液: 1 *M*-リン酸水素ナトリウム溶液 40 ml と, 1 *M*-リン酸二水素カリウム溶液 2.6 ml とを混合し, ガラス電極 pH 計で pH 8.0 に調整した。

iii) パンクレアチン溶液: パンクレアチン (和光純薬工業) 4.0 g を小ビーカーに採取し, 温水 (30°C) を少量加えてガラス棒ですりつぶしながら溶かし, メスフラスコに移す。水を加え 100 ml に希釈する。

2.2.2 操 作 法

試料 0.5 g およびポリビニルアルコール溶液 7 ml を乳化容器に入れ, ホモブレンダー (佐久間製作所製, 50 ml 乳化用カップおよびステンレス製カッター付) で 3 min ずつ, 2 回高速かくはん (11,000~14,000 rpm) して完全に乳化させる (試料が固体の場合は, あらかじめ加温し, 融解させたのち乳化させる)。

試料乳化液 5 ml と, 1 *M*-リン酸緩衝液 4 ml をホールピペットで 50 ml 容共セン三角フラスコにとり, よく混合し, 40°C の恒温水浴中で 10 min 予熱する。

Table-1 Properties of samples.

Samples	Melting point (°C)		Saponification value		Fatty acid compositions (%) [*]				
	Observed	Reference ²²⁾	Observed	Theoretical	10:0	12:0	14:0	16:0	18:0
Tricaprin	31.0~31.5	31.5~32.0 (α) (β') (β)	303.0	303.4	100	—	—	—	—
Trilaurin	42.0~43.0	14, 34, 43.9	263.7	263.7	—	99.9	0.1	—	—
Trimyristin	55.7~56.0	32, 44, 55.5	234.1	232.8	—	0.1	99.9	—	—
Tripalmitin	60.3~60.5	44, 55.5, 65.5	206.4	208.5	—	—	—	98.0	2.0
Tristearin	69.0~70.5	54, 64, 73.1	189.7	188.8	—	—	—	—	100
2-Myristo-1,3-dilaurin	49	37, 44, 48	—	—	—	64.8	35.2	—	—

* Analyzed by GLC

これにパンクレアチン溶液 4~10 ml を加え混合する。フラスコにせんをし、一定時間加水分解を行なったのち、アセトン-エタノール 1:1 (vol/vol) 混合溶媒 5 ml を注ぎ、反応を停止させ、ついで 1 N-塩酸で酸性にし、エーテル抽出を行なう。エーテル層を水洗、乾燥したのち TLC, GLC で分析した。

2.3 加水分解生成物の分析

2.3.1 薄層クロマトグラフィー

グリセリドの加水分解生成物中には、脂肪酸、モノグリセリド、ジグリセリド、および未分解トリグリセリドが存在するので、これらの分析には、TLC を用いた。分析条件は、常法により作製した 20×20 cm, 厚さ 0.5 mm のシリカゲル G プレートを使用し、*n*-ヘキサン:エチルエーテル:ギ酸 70:30:1 (vol/vol) の混合溶媒で展開した。2'-7' ジクロロフルオレセイン、ローダミン B のエタノール-エーテル溶液を発色剤とし²³⁾、紫外線照射下にスポットの位置を確認したのち、おのおののスポット（この場合帯状にプロットしたので各スポットは帯状となる）をかきとり、メタノールおよびエチルエーテルで抽出し、その重量から定量を行ない²⁴⁾、さらに GLC で脂肪酸組成を分析した。

2.3.2 ガスクロマトグラフィー

日立 KGL-2 A 形ガスクロマトグラフ（熱伝導度検出器付）を使用し、内径 3 mm, 長さ 3 m のステンレス製 U 字管を用いた。カラム充填剤は、Kacelite B（ガスクロ工業製担体、30~60 mesh）にエチレンジクロールサクシネートを 20% 含浸させたものを使用した。恒温ソウ温度: 225°C, 試料導入部温度: 270°C; キャリヤガス: ヘリウム, 流速は約 40 ml/min で分析を行なった。

TLC のプレートから抽出した脂肪酸は、ジアゾメタンでメチルエステル化²⁵⁾し、モノ-, ジ-, トリグリセリドは、おのおののケン化して脂肪酸としたのち、同様にメチルエステル化して GLC を行なった。

2.4 2-ミリスト-1,3-ジラウリンのリパーゼ分解

実験に用いたスイ臓リパーゼの、トリグリセリド中のエステル結合に対する位置特異性を調べるため、2.2.2 の加水分解法によって 2-ミリスト-1,3-ジラウリンを加水分解した。分解生成物を経時的に調べ、その結果を Fig.-1 および Table-2 に示した。

Fig.-1 から、加水分解時間約 90 min で残存するトリグリセリドおよび各生成物の割合は平衡に達することが認められた。

加水分解時間 20 min および 120 min 後のトリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、脂肪酸おのおのの脂肪酸組成を測定すると、Table-2 のようになり、いずれの時間においても、生成した脂肪酸中にはミリスチン酸がごくわずかしき認められず、また、モノグリセ

Fig.-1 Time course for the hydrolysis of 2-myristo-1, 3-dilaurin.

Table-2 Fatty acid composition of hydrolysis products.

Hydrolysis time (min)	20				120			
	Traction				Traction			
Fatty acid (mol%)	TG	DG	MG	FA	TG	DG	MG	FA
12:0	66.1	49.1	0.5	99.0	65.3	48.8	1.0	99.5
14:0	33.9	50.9	99.5	1.0	34.7	51.2	99.0	0.5

TG: triglyceride, DG: diglyceride, MG: monoglyceride, FA: fatty acid

リド中にラウリン酸は 1% 以下しか認められなかった。すなわち、本加水分解条件では、グリセリド中の 1,3 位のエステル基のみが選択的に加水分解されていることを認めた。

2.5 飽和単酸基トリグリセリドの加水分解

本実験条件において、脂肪酸鎖長の違いにより加水分解速度が異なるかどうかを調べるため、C₁₀ から C₁₈ の単酸基トリグリセリドの等モル混合物を用い、上記同様に加水分解し、生成物の組成を検討した。トリグリセリドの残存量、脂肪酸の生成量、モノグリセリドの生成量を炭素鎖別に経時的に求めた結果は Fig.-2~4 のようになる。

図中縦軸の値は、TLC で求めた生成物の重量割合と、それぞれの脂肪酸組成から算出したもので、Fig.-2 は、個々の単酸基トリグリセリドについて、加水分解されずに残っているトリグリセリドの割合を、また Fig.-3, 4 は、それぞれ生成脂肪酸および生成モノグリセリドの割合を各脂肪酸（グリセリド）ごとに求めた値である。

本実験では、用いた試料が等モル混合物で 5 成分あることから、もし、グリセリドのエステル結合が、いずれも同じ速度で加水分解されるなら、Fig.-2 (3, 4 も同様) 中縦軸の式内の脂肪酸組成 (mol%) は、どの脂肪酸についても 20 となり、鎖長別に異なった曲線とならないはずである。しかし、実際には、各脂肪酸基間で加

Fig.-2 Change of the amount of individual triglyceride during the pancreatic hydrolysis.

Fig.-4 Change of the amount of individual monoglyceride present in the pancreatic hydrolysis products.

水分解速度に差が認められた。すなわち、Fig.-2 では短鎖のトリグリセリドが長鎖のトリグリセリドに比べ、より速く減少し、一方加水分解により生成する脂肪酸、

Fig.-3 Change of the amount of individual fatty acid present in the pancreatic hydrolysis products.

モノグリセリドは、Fig.-3, 4 にみられるように、反応初期において、短鎖のものが長鎖のものより多く生成し、分解が進むにつれてその差が小さくなる傾向が認められた。以上のことから $C_{10} \sim C_{18}$ 飽和脂肪酸の単酸基トリグリセリドにおいては炭素鎖の短かいものほど加水分解されやすいことを認めた。

モノグリセリドの脂肪酸組成は、リパーゼ分解法により、グリセリドの 2-位置の脂肪酸を分析するうえに重要である。上記実験において、加水分解率と脂肪酸組成との関係は Fig.-5 のようになる。すなわち、加水分解初期においては、短鎖のモノグリセリドが相対的に多く生成しており、加水分解が進むにつれてその割合が均等

Fig.-5 Change of composition of monoglycerides with hydrolysis of simple glyceride mixture.

化され、分解率 47% 付近から理論値 20% にほぼ近い値をとることがわかる。

2・6 混酸基トリグリセリドの加水分解

以上は単酸基トリグリセリドについての実験結果であるが、混酸基トリグリセリドについても同様の実験を試みた。試料は、単酸基トリグリセリド等モル混合物を、ナトリウムメチラート触媒でランダム化（エステル基交換反応）し²⁵⁾、精製したものを用いた。このものについて

Column : 2.5 wt/wt% SE 30 on 60/80 mesh Chromosorb W, 2.2 mm I.D. × 750 mm, stainless steel tube
Column temp. : 200 → 335°C, program 4°C/min
Injection temp. : 330°C
Carrier Gas : N₂, flow rate 100 ml/min
Detector : HFID, temp. 340°C
Chart speed : 20 mm/min

Fig.-6 GLC of randomized triglyceride sample.

Table-3 Composition of the residual glycerides obtained by the pancreatic hydrolysis of randomized glyceride sample.

Hydrolysis time (min) (extent %)	Glyceride or fatty acid	Residual or produced (%)	Fatty acid (mol%)				
			10 : 0	12 : 0	14 : 0	16 : 0	18 : 0
0	Triglyceride	100	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
5 (38.8)	Triglyceride	27.6	16.8	18.5	20.4	21.8	22.5
	Diglyceride	14.7	18.0	18.8	19.5	21.7	22.0
	Monoglyceride	18.4	19.8	20.5	20.2	19.8	19.5
	Fatty acid	39.3	22.4	20.7	19.2	19.3	18.4
30 (55.5)	Triglyceride	8.5	12.2	13.8	19.2	25.1	29.8
	Diglyceride	8.2	18.8	21.0	20.5	21.1	19.1
	Monoglyceride	28.2	20.1	20.1	19.8	20.3	19.7
	Fatty acid	55.1	22.7	20.8	19.8	19.3	18.5
80 (65.4)	Triglyceride	4.8	3.1	9.2	15.0	33.3	39.4
	Diglyceride	5.6	23.4	22.7	19.8	18.4	15.7
	Monoglyceride	27.1	19.7	20.3	20.0	20.2	19.8
	Fatty acid	62.5	20.0	19.9	19.6	20.3	20.1

て昇温ガスクロマトグラフィーを行なった結果 Fig.-6 に示すクロマトグラムが得られたので、ランダム化反応が充分に行なわれていることを認めた。このようにランダム化した混酸基トリグリセリドを、前実験と同様に加水分解し、その組成を経時的に調べた結果を Table-3 に示した。Table-3 より、反応時間 5 min 分解率 38.8% において、トリグリセリド中の C₁₀, C₁₂ はすでに相対的に減少しており、この傾向は、加水分解が進むにつれて顕著になる。加水分解初期においては、短鎖の脂肪酸が長鎖のものよりも比較的多く生成している。以上から、混酸基トリグリセリドの場合も、単酸基トリグリセリドの場合と同様、アシル基の加水分解されやすさは鎖長 C₁₀~C₁₈ 間で異なり、本実験で扱った試料については、鎖長の短いもののほど、加水分解されやすいことが認められた。しかし、加水分解速度の鎖長による差は、単酸基トリグリセリドの場合ほど顕著ではない。

なお、モノグリセリドについては、加水分解率に関係なく一定な脂肪酸組成を示すことが予想されるが、実験結果もほぼそのとおりであった。

2・7 考 察

Entressangles ら⁶⁾によれば、スイ臓リパーゼによるトリグリセリドの加水分解速度は、単酸基トリグリセリドについてトリアセチン<トリプロピオン<トリブチリンの順にトリブチリンがもっとも速く分解を受け、またさらに鎖長が増すと、トリブチリン>トリカプロン>トリカプリル>トリカプリンの順に、逆に分解を受けにくくなり、また無差別分布した混酸基トリグリセリドを試料とした場合は C₁₂~C₁₈ アシル基の加水分解速度が同一であったとされている。本実験における各単酸基トリグリセリドの場合は、Fig.-2 から明らかなように、トリカプリン>トリラウリン>トリミリスチン>トリパル

ミチン>トリステアリンの順に鎖長が長くなるにつれて加水分解速度が遅くなる。混酸基トリグリセリドの場合は、単酸基トリグリセリドほど顕著ではないが、同様に鎖長の短い脂肪酸が先に遊離する傾向にあり、Entressangles らといくらか異なる結果となった。

アシル基の鎖長により加水分解速度が異なる原因の一つとしては、グリセリドの融点と加水分解温度の関係が考えられる。すなわち、C₁₀~C₁₂ トリグリセリドのエマルションは流動性が大きく、リパーゼと接触しやすいが、C₁₆~C₁₈ トリグリセリドのエマルションは流動性がほとんどなく、リパーゼ

と接触しにくい, C_{14} トリグリセリドはその中間である。したがって, このような状態でリパーゼが作用する場合は, 当然加水分解速度が異なるものと考えられ, 混酸基グリセリドの場合は, グリセリド間で融点の幅が狭くなるため, 脂肪酸鎖長の違いによる加水分解速度の差が顕著でなくなるものと考えられる。

以上の実験から, 前記加水分解条件により, グリセリドのスニ臓リパーゼ分解を充分に行ないうることが認められた。本実験で用いた系においては, カルシウム塩などを用いないため, グリセリドから遊離した脂肪酸は, そのまま系内に存在し, したがって所定時間後, 反応は平衡に達するが, この反応をグリセリドの分析に用いるためには何ら支障はない。分析上問題となるのは, 各グリセリド間で加水分解速度が異なること, もしくはアシル基の鎖長により加水分解速度が異なることで, 本実験に用いた単酸基トリグリセリド混合物のように, 極端なグリセリド組成をもつ試料を単にリパーゼ分解し, そのモノグリセリドの脂肪酸組成から, グリセリド内 2 位置の脂肪酸分布を調べることは適当でない。この場合は, 加水分解率が重要であり, 本実験結果によれば, 少なくとも, 加水分解率が 47% 以上のものについて, 生成したモノグリセリドを分析し, 2 位置および 1,3 位置の脂肪酸組成を求めたものでなければ正しい値は得られないと思われる。天然油脂を試料とする場合は, 特殊なものを除き, 炭素数の範囲も比較的狭く, また, おのおのの脂肪酸が極端に分布している試料は少ない。したがって, 加水分解速度の差はあまり分析値に影響しない場合が多いと考えられる。

昭和 44 年 4 月, 日本化学会第 22 年会 (東京) にて発表した。

(昭和 45 年 11 月 12 日受理)

文 献

- 1) P. Savary, P. Desnuelle, *Biochim. Biophys. Acta.*, **21**, 394 (1956)
- 2) F.H. Mattson, L.W. Beck, *J. Biol. Chem.*, **219**, 735 (1956)
- 3) Vander wal, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **37**, 18 (1960)
- 4) Vander wal, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **37**, 595 (1960)
- 5) M.H. Coleman, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **38**, 685 (1961)
- 6) B. Entressangles *et al.*, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **43**, 581 (1961)
- 7) M.H. Coleman, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **40**, 568 (1963) Rev.
- 8) P. Desnuelle, P. Savary, *J. Lipid Res.*, **4**, 369(1963)
- 9) H. Brockerhoff, *J. Lipid Res.*, **6**, 10 (1965)
- 10) H. Brockerhoff, *J. Lipid Res.*, **7**, 62 (1966)
- 11) H. Brockerhoff, *J. Lipid Res.*, **8**, 167 (1967)
- 12) A. Boudreau, J.M. Deman, *Can. J. Biochem.*, **43**, 1799 (1965)
- 13) A. Boudreau, J.M. Deman, *Biochim. Biophys. Acta.*, **98**, 47 (1965)
- 14) A. Boudreaw, J.M. Deman, *Milchwissenschaft*, **21**, 434 (1966)
- 15) E.L. Jack, C.P. Freeman *et al.*, *J. Dairy Sci.*, **46**, 284 (1963)
- 16) 寺田ら, 油化学, **10**, 399 (1961)
- 17) 野田ら, 農化, **36**, 1004 (1962)
- 18) C.N. Ansted, J.A. Hansen, *Chem. Phys. Lipids*, **2**, 343 (1968)
- 19) C.G. Youngs *et al.*, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **34**, 107 (1957)
- 20) E.B. Kester *et al.*, *J. Org. Chem.*, **8**, 550 (1943)
- 21) S.B. Radlove *et al.*, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **37**, 570 (1960)
- 22) 日本油化学協会編 “油脂化学便覧”
- 23) D. Jones *et al.*, *J. Chromatog.*, **23**, 172 (1966)
- 24) 白井, 油化学, **16**, 641 (1967)
- 25) 白井, 吉富 “最新ガスクロマトグラフィー” II, 舟阪, 池川編 p. 649, (1965) 広川書店