ノ ー ト

ひ ま し 油 に 関 す る 研 究 (第1報)

ひまし油からのグリセリン=トリリシノ
レアートの単離

磯部 次男・清野 肇・渡辺昭一郎

北里大学衛生学部(相模原市北里 1-15-1)

Study on Castor Oil. I.

Isolation of Glycerol Triricinoleate from Castor Oil

Tsugio ISOBE, Hajime SEINO, and Shōichirō WATANABE

Faculty of Hygienic Science, Kitasato University
(Kitasato 1-15-1, Sagamihara-shi, Kanagawa)

Enzymatic hydrolysis is a useful method for obtaining fatty acids from fats and oils. It was reported that the enzymatic hydrolysis of castor oil could not be effected completely. The reason for this phenomenon was assumed to be the formation of estlides between ricinoleic acid molecules liberated from the castor oil. It was also observed by TLC that there were a number of substances other than estlides in the reaction mixture.

The authors are trying to perform further examination of the mechanism of the enzymatic hydrolysis of castor oil. It is desirable to use pure glycerol triricinoleate for more detailed study on the hydrolysis mechanism. So, an effective isolation procedure of glycerol triricinoleate from castor oil was investigated. It was found that pure glycerol triricinoleate could be isolated readily in high yield by a repeated distribution of castor oil between polar and nonpolar solvents.

1 緒 言

リパーゼの酵素作用を利用した油脂の加水分解は、脂肪酸を得る方法として極めて有力な手段である。

リパーゼは動物のすい液中や植物の種子中に存在する酵素で、最近では微生物中にも見いだされている。すい液中に存在するリパーゼは、トリアシルグリセリンの1,3位のエステル結合を選択的に加水分解する作用を有し、トリアシルグリセリンの構造解析等に利用されている¹⁾。

また、微生物中に存在するリパーゼの中には、トリアシルグリセリンのすべてのエステル結合を加水分解するものが見いだされている^{2)~4)}。この微生物が産出する非選択的リパーゼを用いて通常の油脂の加水分解を行った結果、反応混合物の酸価はトリアシルグリセリンが完全に加水分解された場合の理論酸価の90%以上の値が得られた。

一方、微生物の産出したリパーゼでひまし油の加水分解を行うと、グリセリン濃度の測定からは90%程度の

分解率に達するにもかかわらず、反応混合物の酸価は、理論酸価に対し約60%の値しか得られないことが知られている⁵⁾。この原因として、一般に加水分解によって遊離したリシノール酸分子中のヒドロキシル基と、カルボキシル基とがエストリドを形成するために反応混合物中の遊離脂肪酸の量が増加しないと考えられている。

また、岩井らは、ひまし油をリパーゼで加水分解し、その反応生成物をTLCにより展開したところ、2-モノグリセリド、1,2-ジグリセリド、トリシノール酸以外に多くの生成物が認められたと報告している⁶⁾。これらの反応生成物中には前述のエストリド以外の生成物も含まれているものと考えられる。

著者らは、ひまし油をリパーゼによる加水分解の反応機構を詳細に調べ、完全に加水分解させる条件を検討することにした。そのために試料としてひまし油の主成分であるグリセリン=トリリシノレアートの高純度のものを使用することが望ましい。そこで、リシノール酸とグリセリンの間で通常の条件下でグリセリン=トリリシノレアートの合成を試みたが、リシノール酸同士のエステ

ル化物が副生するために困難であった。

以上のことから、ひまし油中に存在するグリセリントリリシノレートを効率よく分離することを目的として実験を行った。その結果、極性溶媒と非極性溶媒との間でひまし油の成分を分散させる操作を繰り返すことにより濃縮し、純度 99% 以上のグリセリン=トリリシノレートが得られた。

2 実験及び結果

2.1 実験材料及び装置

2.1.1 実験材料

ひまし油

物 性

けん化価 181.6

ヨウ素価 87.45

ヒドロキシル価 164.3

脂肪酸組成

ひまし油から基準油脂分析試験法 (2-4-20-71) に従い脂肪酸メチルエステルを調製し、さらにトリフルオロ酢酸無水物によりヒドロキシル基をトリフルオロアセチル化したものを試料として GC 分析した。

脂肪酸組成については Table-1 に示す。

Table-1 Fatty acid composition of castor oil.

Fatty acid	Content (%)
Palmitic acid	1.2
Stearic acid	1.0
Oleic acid	4.0
Linoleic acid	5.4
Ricinoleic acid	88.4

2.1.2 装置

(1) ガスクロマトグラフ

日立 163 型ガスクロマトグラフに島津 Chromatopac-E1A を接続して使用した。

(2) TLC-FID

ヤトロン製 IATROSCAN TH 10 (以後、イアトロスキャンと略称)。

2.2 グリセリン=トリリシノレートの単離

2.2.1 ひまし油成分の溶媒分別

リシノール酸は炭素鎖中にヒドロキシル基を有することに着目し、極性溶媒と非極性溶媒の間でひまし油の成分を分配させることにより、グリセリン=トリリシノレート (以後 GTR と略称) を単離することができると考えた。数種類の溶媒系を検討した結果、ヘキサン：メタノール：水=40：40：2 (vol/vol/vol) の溶媒系にひまし油を分配させるのが最も効果的であると認められたので以下のように GTR の単離を行った。

メタノール 400 ml と水 20 ml の混合物を 2 l 分液漏斗に入れ、これにひまし油 35 g を加え激しく振りま

ぜた。分液漏斗内が均一層になったならばヘキサン 400 ml を加え再び激しく振とうした。分液漏斗内の上下層が共に透明になるまで静置した後、下層を分取し溶媒を留去し残留物 30 g を得た。ここで得られた残留物を以後濃縮物-1 とする。濃縮物-1 について同様な条件で再び分配を行い濃縮物-2 を得た。

原料のひまし油、濃縮物-1 及び濃縮物-2 について TLC を行った結果を Fig.-1 に示す。

Fig.-1 TLC of castor oil and concentrates.

Fig.-1 に示した A 及び B を以後それぞれ成分 A、成分 B と呼ぶ。最大のスポットである成分 A が GTR によるものと推定された。TLC の結果より、濃縮物-2 は原料ひまし油及び濃縮物-1 に比較し、成分 B が減少し成分 A が濃縮されており溶媒分別が効果的であることが認められた。

2.2.2 ケイ酸カラムクロマトグラフィーによる成分 A 及び成分 B の単離

濃縮物-2 には GTR と推定される成分 A が高濃度で存在しているものと考えられるが、わずかに成分 B 及びその他の成分の存在が認められた。そこで濃縮物-2 についてケイ酸カラムクロマトグラフィーを行い成分 A の単離を試みた。

内径 6 cm 長さ 100 cm のガラス製カラムにイソプロピルエーテル及びアセトンで洗浄した後、110°C で 2 h 加熱活性化したワコーゲル C-200 を 500 g 充てんした。

このように調製されたカラムに、濃縮物-2 (20 g) を展開溶媒としてイソプロピルエーテル：ベンゼン：アセトン=10：10：1 (vol/vol/vol) の混合物を用いて展開した。溶出液はフラクションコレクターを使用し 15 g ずつ採集した。各フラクションを TLC で調べた結果、溶出液が 1.2 l に達したとき溶出液中に成分 B の存在が

認められなくなり成分Aのみとなった。以後展開溶媒をイソプロピルエーテルのみに変え更に 1.2 l 溶出させた。

全フラクションについて TLC を行った結果、フラクションを 5 つの画分とした。この 5 画分についての TLC の結果を Fig.-2 に示す。

Fig.-2 TLC of the fractions from silicic acid column chromatography.

Fig.-2 に示したように画分3及び4はほぼ成分Aのみであったのでこれらを合わせて濃縮物-3とした。濃縮物-3はまだ若干の不純物を含むので再びカラムクロマトグラフィーを行った。カラムの調整及び展開溶媒は先と同様に行った。

以上の操作により、136gの濃縮物-2より18.0gの成分Aが得られた。この成分Aの脂肪酸組成をGCにより調べた結果、99.5%がリシノール酸であった。したがって成分Aはほぼ純粋なGTRと考えられた。

2.2.3 イアトロスキャンによるひまし油トリアシルグリセリンの分析

2.2.1 及び 2.2.2 で述べたように、溶媒分別とケイ酸カラムクロマトグラフィーを行うことにより、ひまし油からはほぼ純粋にGTRを単離することができた。しかしこの方法は極めて時間がかかりまたGTRの収率も低い。そこでより効果的な分離法を検討することにした。

分離法の検討にあたっては、分離の各段階におけるGTRの濃度を迅速かつ正確に測定する必要がある。試料からメチルエステルを調製し、さらにトリフルオロアセチル化してGC分析を行う方法では、時間がかかる上、トリアシルグリセリン組成を直接測定することは不可能である。そこでイアトロスキャンを利用することにした。

イアトロスキャンは近年開発された装置で、水素炎検

出器を薄層クロマトグラムのスポットの検出に応用したものである。定量上問題の多い発色操作を必要とせずシリカゲルロード上に分離されたスポットを直接定量的に検出測定できるので、最近油脂、脂質の分野にも応用されはじめている。しかし、グリセリン=トリリシノレートの分析に応用された例はまだ無い。そこでまず分析条件について検討した。

まず、ひまし油を原料としてTLCを行ったときと同様な展開溶媒で分析を行った。その結果この溶媒系ではGTRと他の成分との分離が充分ではなかった。

展開溶媒の混合比を検討した結果、イソプロピルエーテル：ベンゼン：アセトン=10：5：1のとき最も良い分離が得られた。

この条件でひまし油及び成分A(GTR)の分析を行った結果をFig.-3に示す。図中に示した百分率は、ピーク面積百分率であり同一試料について3回の分析を行って得られた分析値の平均値である。同一試料についての3回の分析値間の変動係数は0.2%程度で極めて良い繰り返し精度が得られた。

Fig.-3 Chromatograms of castor oil and component A obtained by Iatroscan.

2.2.4 連続溶媒分別法によるひまし油からのグリセリン=トリリシノレートの分離

次にひまし油からGTRを効率よく分離するために、溶媒分離法について検討した。

ひまし油 15g をメタノール 170 ml に溶かし、水 8.6 ml を加え分液漏斗中で振とうした。次にヘキサン 170 ml を加え再び振とうした後上層、下層共に透明になるまで放置した。次に下層を他の分液漏斗に取り新たにヘキサン 170 ml を加え、再び振とうした。この操作を繰り返し行い各回ごとに少量の試料を採取し、2.3.3 で述べたイアトロスキャンにより試料中のGTRの濃度の分析を行った。各回の試料中のGTRの濃度をTable-2に示す。

Table-2 Concentration of GTR from castor oil by solvent fractionation.

Concentrate	Concentration of GTR (%)
Caster oil	80.8
E-1	89.1
E-2	93.6
E-3	95.0
E-4	97.8
E-5	99.1

Table-2 に示したとうり第 1 回の分別で、極性溶媒中にヘキサンが飽和しているために分別効果が低下することなく、4 回の分別でほぼ 100% に近い純度で GTR が得られた。15g のひまし油に対し、得られた GTR は 5.87g であった。

3 考 察

リパーゼによるひまし油の加水分解は 60% 程度しか進行しない。この原因として、反応混合物中にエストリドが形成されるためと報告されている。また、反応生成物にはエストリド以外にも多くの生成物が認められたと報告されている。

そこで、リパーゼによる加水分解機構を詳細に調べ、加水分解反応が完了するような条件を調べるための第 1 段階として、ひまし油からその主成分であるグリセリン=トリリシノレートを高純度で分離する方法を検討した。

まず、極性溶媒（メタノール・水）と非極性溶媒（ヘキサン）との間でひまし油を分配させ、グリセリン=トリリシノレートを濃縮した。更に、ケイ酸カラムによる濃縮を行った結果、ひまし油中に存在していたグリセリン=トリリシノレートに対し 12.7% 割合で、純度 99.5% のものが得られた。

次に、イアトロスキヤンによるひまし油中のグリセリン=トリリシノレートの分析法を検討した。その結果極めて良い精度で分析が可能であることを認めた。

更に、溶媒分別を繰り返し行い、ひまし油からグリセリン=トリリシノレートを濃縮した。その結果、5 回の分別操作により、99.1% のグリセリン=トリリシノレートが収率 52.6% で得られた。

本研究に用いた機器の一部は、財団法人北里環境科学センターが、日本自転車振興会の機器整備補助事業により購入したものである。また、実験材料として使用したひまし油は、日清製油株式会社より提供されたものである。ここに記して感謝の意を表する。

(昭和 55 年 1 月 30 日受理)

文 献

- 1) Willstatten, Krant, *Ber.*, **56**, 149 (1923)
- 2) K. Yamada, *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 351 (1966)
- 3) K. Yamada, *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 567 (1966)
- 4) K. Yamada, *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 1030 (1966)
- 5) “リパーゼ MY による油脂分解” 名糖産業株式会社発行
- 6) 岩井美枝子, 奥村 普, 辻阪好夫, 日本農芸化学会 講演要旨集 3C-18 (昭和 54 年大会)