報 文

蛍光誘導体化によるアシル型ステロールグリコシド
の HPLC 分析

無類井 建夫・関 洋子

日清製油（株）研究所

〒221, 横浜市神奈川区千若町 1-3

Determination of Acylated Sterylglycosides by HPLC
with Fluorescence-Sensitive Derivatization

Tateo MURUI and Hiroko SEKI

Research Laboratory, The Nisshin Oil Mills, Ltd.

(1-3, Chiwaka-cho, Kanagawa-ku, Yokohama-shi, 〒221)

A sensitive HPLC method was developed for determining acylated sterylglycosides (ASG) in vegetable oil. ASG was concentrated by a silicagel cartridge and subsequently isolated by TLC from other glycosides. Derivatization of ASG with 1-anthrolynitrile was then carried out. Derivatized ASG was separated with HPLC in accordance with carbon number and degree of unsaturation of acyl and steryl groups. Data on an acyl/steryl combination of ASG species were obtained. ASG isolated from commercial soybean phospholipid was used as the standard substance. This method was applicable to extracts from oil seeds with polar solvent mixture. The limit of detection was about 5 ppm for edible oil.

1 緒 論

ステロールグリコシドはリン脂質と共に膜を構成する主要な成分として知られており、天然にはヒドロキシル基がアシル化されたアシルステロールグリコシド (ASG) とアシル化されていないステロールグリコシド (NASG) の 2 種類が存在する。これまで製油の分野でステロールグリコシドが注目されることは少なかったが、最近では油糧種子から油脂とともに抽出されるステロールグリコシドの製油プロセスにおける挙動¹⁾や油脂の物性に及ぼす影響について興味が集まりつつある。また ASG/NASG の比率やステロール、アシル基の組成はその植物の特徴を表すことが予想され、これらの正確な分析は油種の鑑別や配合推定への応用など、興味深いものがある。従来油糧種子等に含まれるステロールグリコシドは酸加水分解^{2),3)}してステロールとして定量する方法が多く用いられており、ASG または NASG を直接分析する方法についての報告⁴⁾は少ない。筆者らは先に糖部をアセチル化⁵⁾又は 1-アントロイルニトリル (1 AN) 化⁶⁾して HPLC で直接定量する方法を報告した。

連絡者：無類井 建夫

これらの方法では標準 ASG の入手が困難なことから化学合成した NASG を標準物質とし、ASG をあらかじめ NASG に変換して定量した。しかしこれらの方法には変換に長時間を要することと変換に伴う誤差の増加に加え、ASG のアシル基に関する知見を失う欠点があった。筆者らは先のアセチル化 ASG を光散乱検出器を備えた HPLC で定量する方法の報告において ASG を直接定量すると同時にステロール及びアシル基に関する知見が得られる可能性⁵⁾を示した。しかし光散乱検出器は濃度ピーク面積の間に直線性が得られず、また定量には ASG の標準物質が不可欠であることなど、日常の分析には不向きであった。そこで本報では ASG 定量法の簡略化と高感度化を目的として、濃縮大豆リン脂質に含まれる ASG を標準物質に用いること及び ASG を 1 AN 化^{7),8)}して蛍光検出器で検出することを検討したところ、実用に供し得る方法であることが判明したので報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

蛍光誘導体化試薬には 1 AN (和光純薬) のアセトニ

トリル溶液 (1 mg/1 mL) を、誘導体化反応の触媒にはキヌクリジン (フナコシ) のクロロホルム/ヘキサン (1 : 1, vol/vol) 溶液 (80 mg/50 mL) を用いた。標準 ASG は食品添加物用の濃縮大豆リン脂質を原料とし、2・2 の手順に従って調製し、クロロホルム/メタノール (1 : 1, vol/vol) に溶解して ASG 標準溶液 (約 2 mg/100 mL) とした。

2・2 標準物質の調製

2・2・1 ASG 及び NASG の濃縮

濃縮大豆リン脂質 100 g をアセトン約 1500 mL にかくはんしつつ滴下し、不溶物を汙過により集めた。室温、減圧下で脱溶剤した不溶物約 60 g を、ヘキサン約 700 mL に分散し、ヘキサンの調製したシリカゲルカラム (Wako gel C-100, 120 g) に注入し、続いてヘキサン 200 mL を流して区分 F 1 とした。さらにエタノールを流して最初の 200 mL を区分 F 2 とし、脱溶剤して ASG 濃縮物約 1.9 g を得た。ASG 濃縮物をシリカゲル TLC に供してクロロホルム/メタノール/ギ酸 (90 : 15 : 1, vol/vol) で展開後希硫酸を噴霧して加熱した時、ASG 以外のステロールに由来する呈色 (赤紫) を検出しないことを確認して標準 ASG とした。

なお区分 F 2 に続けてエタノールをさらに 100 mL (区分 F 3)、及び 200 mL を流して区分 F 4 とし、脱溶剤して NASG 濃縮物約 0.6 g を得た。これをシリカゲル TLC に供して ASG 濃縮物の場合と同じ条件で展開後希硫酸を噴霧して加熱した時、NASG 以外のステロールに由来する呈色 (赤紫) を検出しないことを確認して標準 NASG とした。

2・2・2 ASG 及び NASG の含有量の決定

標準 ASG 10 mg、コレステロール 5 mg を栓付き試験管にとり、2.5 % 塩酸メタノール (和光純薬) 2 mL を加え、密栓して 70℃ で 1 h 加熱した。冷却後ヘキサン 3 mL を加えて混合した後水 15 mL を加えて振とうした。ヘキサン層をシリカゲル薄層板に塗布し、ヘキサン/ジエチルエーテル/ギ酸 (70 : 30 : 1, vol/vol/vol) で展開した。ステロール及び脂肪酸メチルの区分をかきとり、それぞれをクロロホルムで抽出した。ステロール区分は窒素気流下で脱溶剤して TMS 化して Table-1 に示す条件で GLC に供してステロール含有量及び組成を、また脂肪酸メチル区分は Table-1 に示す条件で GLC に供して脂肪酸組成を求めた。ステロール及び脂肪酸の平均分子量から ASG の平均分子量を求め、ステロールから ASG への換算係数を算出し、それをステロール含有量に乗じて ASG 含有量とした。なお標準 NASG についても同様に操作してステロールの平均分子量及びステロールから NASG への換算係数を算出し、ステロール含有量に乗じて NASG 含有量とした。

Table-1 GLC conditions of sterol and fatty acid analysis.

Condition	Sterol	Fatty acid
Column		
Liquid phase	DB-1 ^{a)}	DB-23 ^{b)}
Diameter (mm)	0.32	0.25
Length (m)	15	15
Film thickness (μm)	0.1	0.1
Temperature (°C)	240	230
He flow rate (mL/min)	2.0	1.5
Injection mode	split	split
Split ratio	1/100	1/100

a) Methylsilicone

b) 50 % Cyanopropylmethylsilicone

2・3 試料溶液の調製

試料油脂 10~50 mg をヘキサン/イソプロピルアルコール (95 : 5, vol/vol) 5 mL に溶解した。これを固相抽出用シリカゲルカートリッジ (Sep-Pak, Waters) に注入してヘキサン/イソプロピルアルコール (95 : 5, vol/vol) 5 mL を自然流下して溶出する区分を集めた。30~40℃ の水浴中で加温しつつ窒素気流下で脱溶剤した。残分を少量の酢酸エチル溶液とした後、その全量と標準 ASG とを同一のシリカゲル薄層板に約 1 cm 離して塗布し、クロロホルム/メタノール/ギ酸 (90 : 15 : 1, vol/vol/vol) で展開した。ローダミン B を噴霧して濃くみえる ASG 区分を 15 mL 遠沈管にかきとり、クロロホルム/メタノール (1 : 1, vol/vol) 5 mL を加えて 60℃ で 10 min 加温した。遠心分離して上澄み液を試料溶液とした。なお油糧種子は、コーヒーマイルで粉碎した試料 1 g をクロロホルム/メタノール (1 : 1, vol/vol) 50 mL で 2 h 還流後汙過した。汙液を脱溶剤してヘキサン/イソプロピルアルコール (95 : 5, vol/vol) 5~50 mL に溶解し、その 5 mL をシリカゲルカートリッジに注入した。以下油脂と同様に操作して試料溶液とした。また市販の分離または濃縮リン脂質等の ASG を多く含む試料では 2~5 mg を直接シリカゲル薄層板に塗布して精製した。

2・4 誘導体化

試料溶液 1 mL または標準 ASG 溶液 1 mL を試験管 (16 mm×125 mm) にとり、窒素気流下で脱溶剤後蛍光誘導体化試薬 0.1 mL、触媒 1 mL を加え、90℃ で 40 min 遮光してアルミブロック製ヒーターで加熱した。酢酸エチル 1 mL を加えて反応物を溶解し、HPLC 用試験液とした。

2・5 HPLC の条件

ポンプユニット (CCPM, 東ソー) に、ODS カラム (Wakosil-II 5 C 18, 4.6×250 mm, 和光純薬)、蛍光検

出器 (12 μ L フローセルを装着した日立 650-10 S) を接続して使用した。移動相にはアセトニトリル/ジクロロメタン混合溶媒を用い、70 : 30~50 : 50, 30 min のグラジエント条件で溶出した。また検出波長は励起波長 : 370 nm, 発光波長 : 470 nm とした。

3 結果及び考察

3.1 標準 ASG の含有量確認

2.2.2 で得られたステロール及び脂肪酸の平均分子量 (410, 270) から標準 ASG の平均分子量を 824 とし、ステロールから ASG への換算係数を 2.01 とした。また標準 ASG をシリカゲル薄層板に塗布して展開したところ ASG に依る赤紫色の呈色のみが検出された。そして 2.2.2 による標準 ASG のステロール含有量 (48.2 %) から標準 ASG の含有量を 96.9 % とした。本濃縮法は ASG または NASG の分析に必要な標準物質を濃縮大豆リソ脂質を原料とした簡便な調製法であることが確認できた。

3.2 誘導体化

前報⁶⁾における NASG の 1 AN 誘導体化条件を基本にして、本報では温度条件のみを検討した。標準 ASG 5 μ g を 60~100°C で誘導体化し、HPLC で分析したときの ASG に由来する全ピーク (A~I, Fig.-2) の面積の合計から誘導体化反応の進行を調べた。反応温度が 60°C では安定した反応が得られなかったが、80°C 以上では 30 min の加熱でほぼ一定のピーク面積を示し、2 h 以上の加熱でも変化はなかった (Fig.-1)。本法では加熱条件を 90°C で 40 min とし、その条件下では良好な反応の再現性が得られた (変動係数 2.3 %, 繰り返し 6)。なお反応中及び反応後は分解を避けるため遮光または暗所での保管が必要であった。

Fig.-1 Effect of reaction temperature and time on 1 AN-derivatization of ASG.
1 AN : 1-anthroylnitrile

3.3 検量線の作成及び検出限界

濃度が 1~20 μ g/mL の標準 ASG 溶液各 1 mL を 1 AN 化して HPLC で定量した。大豆の ASG は複数の分子種から成り、本 HPLC 条件ではそれらが互いに分離するので、検量線の作成は全ピークの合計面積を ASG 濃度に対してプロットした。1~20 μ g/mL の範囲では濃度とピーク面積との間に良い直線関係が認められ、約 0.5 μ g/mL まで容易に検出できた。蛍光検出器は ASG をアセチル化して分析する方法で使った光散乱検出器と比べて高感度であり、食用油及びそれらの原油、さらに油糧種子からの抽出物にも適用できた。また応答が濃度に比例するため定量計算には便利であった。本法では ASG 含有量の計算には ASG に由来する全ピーク面積の合計を用い、ASG 分子種の組成は全ピーク面積に対する各分子種のピーク面積の割合から求めた。

3.4 分離性

標準 ASG の 1 AN 化物のクロマトグラムは主な 9 本の成分に分離した (Fig.-2)。各ピークの帰属は前報において得られたステロール及びアシル基の HPLC における挙動から推定した。すなわちステロールの 9-アントロイルニトリル化物⁹⁾ではステロールは炭素数が同じならば不飽和度の高い順に、不飽和度が同じならば炭素数の少ない順に溶出することが示され、この関係は FSG の 1 AN 化物⁶⁾及びアセチル化物⁵⁾についても成り立ち、さらに ASG のアセチル化物⁵⁾についてはステ

HPLC Conditions: column, Wakosil- II 5 C 18 ; eluent, acetonitrile/dichloromethane (70 : 30~50 : 50, 30 min); detection, Ex, 370 nm, Em. 470 nm Assignment of peaks is listed in Table-2.

Fig.-2 Chromatogram of acylated sterolglycosides from soybean derivatized with 1-anthroylnitrile.

Table-2 Peak assignment of acylated sterylglucoside species.

Peak	Group	
	Acyl	Steryl
A	Linolenoyl	Campe+Stigma-
B	Linolenoyl	Sito-
C	Linoleoyl	Campe+Stigma-
D	Linoleoyl	Sito-
E	Oleoyl	Campe+Stigma-
F	Oleoyl	Sito-
	Palmitoyl	Campe+Stigma-
G	Palmitoyl	Sito-
H	Stearoyl	Campe+Stigma-
I	Stearoyl	Sito-

ロールに加えてアシル基についても炭素数と不飽和度の間に同様の関係が成り立つことが確認され, ASG の 1 AN 化物についてもこの関係が適用できるものと考えられた。従って ASG の 1 AN 化物の溶出順はアセチル化物と同じになることが予想され, 結合するアシル基ごとにシト及びカンペ+スチグマステロールグリコシドの対になって分かれるものと推定された。標準 ASG について推定される各ピークのステロール/アシル基の組み合わせを Table-2 に示した。本分析条件ではパルミチン酸とオレイン酸を有する分子種にも分離できないピーク (F) があるが, 大豆等ではステロール/アシル基の組み合わせ及び主要な脂肪酸についての知見を得ることができた。しかしながら, ナタネではブラシカステロール

HPLC conditions are indicated in Fig.-2.
Assignment of peaks is listed in Table-2.

Fig.-3 Chromatograms of acylated sterylglucosides from rapeseed and safflower.

が, サフラワーやヒマワリではアベナ及び 7-スチグマステロールが比較的多く存在するため組成は複雑になった。特にナタネの ASG では充分な分離が得られず (Fig.-3), すべてのピークについて帰属することは困難であった。

3・5 回収率及び再現性

トリオレオイルグリセリンに標準 ASG を添加したモデル油を調製し, これを対象に本法における回収率を調べたところ, 高い回収率と再現性 (回収率 97.3 %, 変動係数 3.0 %, 繰り返し 6) が得られ, 充分実用に供し得る方法であることが確認された。また本法では試料採取

Table-3 Composition and content of acylated sterylglucoside species in oil sources.

Oil seed	Composition (%)									ASG
	peak*									content (mg/kg)
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
Soybean	4.8	5.9	24.1	28.7	3.4	15.0	13.9	1.8	2.4	660
Cottonseed	0.0	1.6	1.5	36.0	1.1	25.3	30.8	0.4	2.5	340
Sesame	0.0	3.3	4.4	19.4	5.9	27.7	21.6	2.9	8.6	160
Linseed	4.6	6.6	7.0	14.0	5.7	30.6	22.4	4.5	3.2	190
Peanuts	0.8	0.2	4.5	14.7	9.0	39.3	25.8	0.9	2.6	220
Rice bran	0.0	0.0	4.5	20.3	8.1	33.9	29.1	0.0	4.1	230
Soybean germ	4.2	12.6	8.1	36.7	1.4	9.6	23.1	0.7	3.6	990
Corn germ	1.0	0.3	7.5	17.2	4.6	26.9	37.6	0.5	1.8	2310
Sunflower	0.8	0.3	11.8	39.6	2.4	16.2	20.2	2.0	6.0	230
Safflower	—	—	—	—	—	—	—	—	—	123
Rapeseed	—	—	—	—	—	—	—	—	—	216

* : Assignment of peaks is listed in Table-2.

量を約 200 mg まで増やすことにより植物油では 5 ppm の分析が可能であった。

3・6 油糧原料の ASG 組成と含有量

本法を用いて主要な油脂原料について、ASG の含有量とその分子種組成を調べ Table-3 に示した。ASG はいずれもパルミチン酸とリノール酸を多く含む点で共通していた。脂肪酸は油脂の脂肪酸組成の特徴を必ずしも反映していないが、ステロール/アシル基の組み合わせに起原による特徴がみられた。大豆、ヒマワリはリノール酸が、トウモロコシはい(胚)芽、綿実、アマニはパルミチン酸が多く含まれていた。またこれらの脂肪酸に加えてゴマと落花生ではオレイン酸が、大豆胚芽とアマニはリノレン酸が多いことが特徴であった。綿実ステロールのほとんどがシトステロールのため組成は単純であった。前述したようにナタネ及びサフラワーはクロマトグラムは複雑となり十分な分離が得られず、ASG の分子種組成を求めることは困難であったのでクロマトグラム (Fig.-3) で示した。なおトウモロコシ及び大豆胚芽では ASG が他より数倍多く含まれていたが、同様に胚芽を主成分とするコメぬかでは他と同程度の含有量であった。

4 ま と め

ASG を直接 1-AN 化して HPLC に供し、蛍光検出

器でモニターすることにより高感度で迅速な定量が可能となった。ASG 分子種はステロール及びアシル基の炭素数及び不飽和度にしたがって分離し、ステロール/アシル基の組み合わせに関する知見が同時に得られた。市販の濃縮大豆リン脂質からシリカゲルカラムで分画した ASG を標準物質に用いることができた。

〔平成 5 年 (1993 年) 3 月 8 日受理〕

文 献

- 1) 無類井建夫, 福島朱美, 油化学, 42, 442 (1993)
- 2) H. Yoshida, G. Kajimoto, *Agric. Biol. Chem.*, 44, 183 (1980)
- 3) M. Yamaoka, P. Jaenvanitpanjakul, A. Tanaka, *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (YUKAGAKU)*, 37, 553 (1988)
- 4) J. Kesselmeier, W. Eichenberger, B. Urban, *Plant Cell Physiol.*, 26, 463 (1985)
- 5) 亀井ゆみ子, 無類井建夫, 生稲淳一, 油化学, 42, 106 (1993)
- 6) T. Murui, K. Wanaka, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 614 (1993)
- 7) J. Goto, N. Goto, J. Shamsa, M. Saito, S. Komatsu, K. Suzuki, T. Nambara, *Anal. Chim. Acta*, 147, 397 (1983)
- 8) J. Goto, M. Saito, T. Chikai, N. Goto, T. Nambara, *J. Chromatogr.*, 276, 289 (1983)
- 9) 和中 康, 無類井建夫, 油化学, 41, 306 (1992)