リパーゼ加水分解および高速液体クロマトグラフィーによる 食用油の脂肪酸、特に不飽和脂肪酸組成の簡易分析法

市川 和昭・近藤 美恵・小山 吉人

名古屋文理短期大学 (〒451-0077 名古屋市西区笹塚町 2-1)

Simple Determination of Fatty Acid Compositions of Edible Oils by Lipase Hydrolysis and High-Performance Liquid Chromatography

Kazuaki ICHIKAWA, Mie KONDO, and Yoshito KOYAMA

Nagoya Bunri College

(2-1, Sasazukacho, Nishi-ku, Nagoya-shi 451-0077)

Abstract : High-performance liquid chromatography (HPLC) using a 205 nm UV detector was evaluated for usefulness in determining fatty acid compositions, especially unsaturated fatty acid compositions, of edible oils such as perilla, soybean and safflower oils, which mainly consist of triglycerides that contain mono and polyunsaturated fatty acids. Fatty acids were obtained by lipase-hydrolysis followed by petroleum ether extraction. Sample fatty acids were analyzed by HPLC without conversion to the derivatives. Butyric acid served as the internal standard for determination of fatty acids. The results showed close agreement with those of GC. The present method is applicable to the simple determination of fatty acid compositions, especially unsaturated fatty acid compositions, of edible oils without degradation due to heating and/or the oxidative deterioration of unsaturated fatty acids.

Key words : fatty acid composition, edible oils, HPLC analysis, lipase hydrolysis, Perilla oil

1 緒 言

荳の油(えごま油)や月見草種子油などは、魚油と同様にその不飽和脂肪酸の栄養学および生理学的役割の重要性が注目されているが、その一方でこれらの不飽和脂肪酸は酸化的劣化や加熱劣化を受けやすく、脂肪酸分析においてもこれらの劣化の影響を受けにくい分析法が求められている。高温での化学的加水分解法による脂肪酸分析では、不飽和脂肪酸部分の酸化的劣化などによる減少が懸念される。また脂肪酸組成分析は従来から脂肪酸をメチルエステル化してガスクロマトグラフィー(GC)により行われている^{1)~4)}が、メチルエステル化処理やGC分析中高温にさらされることにより不飽和脂肪酸の酸化的劣化等が懸念されるので、低温で脂肪酸の形のまま分析することが望ましい。そこで比較的温和な条件で行うことのできるリパーゼによる加水分解法を利用して、生成した脂肪酸をそのままの形で高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析して食用油の構成脂肪酸組成、特に不飽和脂肪酸組成を求めることを試み

た。

2 実 験

2.1 試料油および試験

試料油は荳の油(えごま油) A (オリザ油化(株)、商品名シソ油, PV*, 0.5; CV, 2.2; AV, 0.20; SV, 194.2, 入手時添加物なし) および荳の油(えごま油) B (太田油脂(株)、商品名食用しそ油, PV*, 1.8; CV, 3.2; AV, 0.76; SV, 193.2, 入手時添加物なし), 大豆白絞油(味の素(株), PV*, 1.2; CV, 2.8; AV, 0.24; SV, 206.3), ハイリノールサフラワー油(味の素(株), PV*, 1.0; CV, 10.9; AV, 0.14; SV, 203.0), 月見草種子油(オリザ油化(株), PV*, 4.3; CV, 6.1; AV, 0.74; SV, 193.5, 酸化防止剤添加品), 不二製油(株)より提供のカカオ脂(PV*, 3.1; CV, 0.7; AV, 3.89; SV, 186.4) およびパーム油(PV*, 1.4; CV, 5.5; AV, 0.22; SV, 205.4) を用いた。リパーゼは、名糖産業(株)製リパーゼ OF (*Candida cylindracea* 由来, E.C. 3.1.1.3 : 360000 u/g, non-specific lipase) を用いた。なお試料油のGC分析値は油脂会社より提供して戴い

連絡者: 市川和昭

た。

2・2 操作方法

油脂加水分解法および分解生成物の回収の標準操作を次に示す。油脂 2 g, 水 0.9 g および 1% リパーゼ OF 水溶液 0.3 g を 20 mL 栓付きバイアル瓶に採取して, 37℃ の電気恒温器中で 2 h スタラーで攪拌した (2 cm 回転子, 1000 rpm)。その後 90℃ 水浴中に 10 min 浸漬してかきまぜて酵素を失活させた。2 mL の 90℃ 水を加えてかきまぜた後, 80℃ 水浴中で約 10 min 静置して油層と水層に分離した。水層を抜き取り石油エーテル 15 mL を油層に加えた。無水硫酸ナトリウム 2 g を添加し 1 昼夜脱水した後, 硫酸ナトリウムを汙別した。汙液の石油エーテルをロータリーエバポレーターにより 40℃ で減圧留去したのち, 生成物を分析に供した。

油脂のケン化価 (SV) を基準油脂分析試験法⁵⁾に準拠して測定した後, ケン化分解脂肪酸を次のように回収し分析に供した。0.5 M HCL を加えて pH=1 にして分液ロート中で石油エーテル 50 mL を加えて脂肪酸を抽出した後, 水 25 mL 加えて水洗・下層の水の除去を行い, 下層の水が中性になるまで水洗を繰り返した。下層の水を除去した後, 石油エーテル層を三角フラスコに移し無水硫酸ナトリウムを添加して 1 昼夜静置して脱水した。硫酸ナトリウムを汉別した後, ロータリーエバポレーターにより 40℃ で溶媒を減圧で留去した。

過酸化物質価は鉄チオシアネート新法⁶⁾により測定し, これを $PV^*(\text{meq/kg})$ で示した。カルボニル価 (CV) は熊沢の方法⁷⁾により求めた。酸価 (AV) は基準油脂分析試験法 2.3.1-1996 を参考に改変し, 試料採取量を試料油 1 g および生成物 (脂肪酸) 0.1 g に定めてエタノール/エーテル (1/1 v/v) 40 mL に溶解し電位差滴定法により測定した。分析には京都電子(株)製電位差自動滴定装置 AT-400 を用いた。

リパーゼ OF による荏の油およびカカオ脂の加水分解生成物の薄層クロマトグラフィーを常法⁸⁾により行い, 加水分解生成物の抽出油分が脂肪酸のみのスポットであったことから, ほぼ完全に加水分解されていることを確認した。

2・3 高速液体クロマトグラフィー分析

アセトニトリル/5 mM リン酸 $aq=90/10$ v/v (270 mL/30 mL) を混合して超音波洗浄機中でアスピレーターを用いて約 5 分間脱気したものを HPLC 溶媒 (移動相) に用いた。内部標準溶液は, 10 mL メスフラスコに特級酪酸 (和光純薬工業(株)) を 1 g 精秤し HPLC 溶媒 (アセトニトリル/5 mM リン酸 $aq=90/10$ v/v) で 10 mL にメスアップした酪酸溶液 100 mg/mL を用いた。分解脂肪酸 0.012 g をふた付きバイアル瓶に採取し HPLC 溶媒 2.7 mL および内部標準溶液 0.3 mL を加えて均一に混合し試料溶液とした。この試料溶液および

酪酸の濃度はそれぞれ 4 mg/mL および 10 mg/mL となる。通常これらの試料溶液をマイクロシリンジで 1 μ L 注入した。HPLC 測定条件を以下に示す: 流速 0.8 mL/min, カラム恒温槽 50℃, UV 検出器 205 nm, 高速液体クロマトグラフィー本体機器は, Shimadzu LC6A Liquid Chromatograph, 検出器は, Shimadzu SPD-6A UV Spectrophotometric Detector を用いた。カラム恒温槽は, Shimadzu CTO-6A Column Oven を用いた。カラムは, Inertsil ODS-3 5 μ m 4.6(i.d) $\times$ 250 mm (ジーエルサイエンス(株)) 1 本を用いた。データ処理は, Shimadzu Chromatopac C-R1A による。

各脂肪酸と酪酸とのピーク面積比に補正係数 k を乗じ重量比に変換し, 試料溶液の酪酸重量 30 mg を乗じて試料中の脂肪酸の重量を算出した。脂肪酸組成は, リノレン酸 (18:3), リノール酸 (18:2), オレイン酸 (18:1), パルミチン酸 (16:0), ステアリン酸 (18:0) 等の合計重量を求め, 各脂肪酸の重量を合計重量で除した wt% で示した。また試料重量に対する検出した脂肪酸の合計重量% を total(%) で示した。本 HPLC でのピークは酪酸, α -リノレン酸, γ -リノレン酸, リノール酸, パルミチン酸, オレイン酸, ステアリン酸の順に溶出され, ステアリン酸の検出までに 25 min 程度かかった。脂肪酸組成の分析結果 (各 Table) はこの順で記載した。

3 結果と考察

3・1 HPLC による脂肪酸組成分析法の検討

油脂の脂肪酸組成の分析は, 通常脂肪酸を前処理して GC や HPLC で行われている¹⁾。例えば脂肪酸をメチルエステルとして水素イオン検出器 (FID) を備えた恒温または昇温ガスクロマトグラフィーにより分離定量して脂肪酸組成を求めているが, 高温に保った状態で分析を行うため, 熱に対して不安定である高度不飽和脂肪酸を含む魚油などの試料には適当でないとされている^{2)~4)}。一方比較的低温で分析を行うことのできる HPLC では検出器に対する脂肪酸の感度を充分なものとするために, UV 検出器に高感度な p -プロモフェナシルなどの脂肪酸誘導体⁹⁾や蛍光検出器に高感度な誘導体にして分析する¹⁾が, その場合誘導化率や前処理中の変質などの問題が付随する。本研究では, リパーゼ処理後 HPLC を用いて脂肪酸形態のまま低温で分析することを試みた。

3・2 HPLC 分析における脂肪酸の検出感度の補正係数の決定

今回脂肪酸の形で定量するにあたり UV 検出器を用いた。検出に用いた波長 205 nm は, 遊離 C=C 結合, エステル基の C=O の吸収波長とされている^{10), 11)}。この短波長領域の UV 検出器での検討の結果, 脂肪酸の

Table 1 Correction Factor for Fatty Acid in the HPLC Analysis.

Fatty acid		Weight ratio ^{a)}	Area ratio ^{b)}	Correction Factor ^{c)}
Lauric acid	12:0	0.49	4.0	0.12
		0.99	7.9	
Palmitic acid	16:0	0.05	0.39	0.11
		0.10	1.0	
Oleic acid	18:1	0.10	11	0.010
		0.49	45	
Linoleic acid	18:2	0.10	59	0.0018
		0.49	270	
α -Linolenic acid	18:3	0.10	170	0.00062
		0.20	310	

a) [weight of fatty acid]/[weight of internal standard] ratio

b) [peak area of fatty acid]/[peak area of internal standard] ratio

c) [fatty acid/internal standard] weight ratio= $k \times$

[fatty acid/internal standard] peak area ratio

k : Correction factor ; mean value of two measurements

検出感度は脂肪酸の不飽和度により著しく異なること^{1),10)}を確認した。そこで脂肪酸の標準品および内部標準としての酪酸を用いて、脂肪酸の検出感度の相違を補正する補正係数 k を求め Table 1 の結果を得た。補正係数 k は、次式により算出した。

[脂肪酸/酪酸]重量比= $k \times$ [脂肪酸/酪酸]ピーク面積比
脂肪酸の二重結合の数に対して $[-\text{Log } k]$ をプロットするとほぼ直線的相関となり、このことから 205 nmUV での脂肪酸の吸収は二重結合の濃度の寄与が大きいと推定される (Fig. 1)。

飽和脂肪酸の炭素数の相違による検出感度の差異は不飽和度の相違による場合に比較して著しく小さいことがわかったので、パルミチン酸より求めた $k=0.11$ をステアリン酸にも適用した。脂肪酸標品には、和光純薬工業(株)製の化学用リノレン酸 (純度 60% GC), 1 級リノール酸 (純度 88% GC), 1 級オレイン酸 (純度 60% GC), 1 級ラウリン酸 (純度 95% GC), 特級パルミチン酸 (純度 95% GC) を用いた。

3・3 本法 HPLC 脂肪酸組成分析の精度

α -リノレン酸を 58.1% (GC) 含む荳の油 A および 65.1% (GC) 含む荳の油 B について、リパーゼ OF による加水分解脂肪酸を HPLC で分析し本法の精度を評価した。荳の油 B の分解脂肪酸の試料溶液 (試料濃度 5.0 および 1.45 mg/mL, 内部標準濃度 15.0 および 9.1 mg/mL) について注入量 (0.3~3 μ L) および測定日をかえて 8 回測定し Table 2 の結果を得た。本分析値は GC 値に比較的好く一致した。 α -リノレン酸% は平均値 66.4%, 変動率 (CV) 3.4% となり、荳の油の α -リノレン酸% を比較的精度よく本法により分析できると判断された。リノール酸% が GC 値に比較して幾分大きく

Fig. 1 Plot of $[-\text{Log } k]$ vs. Number of Double Bond of Fatty Acid : k =correction Factor

なった理由として、GC 法ではメチルエステル化処理や高温分析中の酸化的劣化や分解などによりリノール酸が減少するのに対し、メチルエステル化処理がなく穏和な条件の本法では、その減少が少ないことが考えられた。しかし、より酸化しやすいリノレン酸で明確な傾向が認められなかったことから、今後詳細に検討を行う予定である。HPLC で試料濃度、注入量を一定にして分析した場合、リノレン酸、リノール酸およびパルミチン酸% の変動率を小さくできることが確認できた (Table 2, Perilla oil A)。また荳の油の A と B との製品間の脂肪酸組成の差を確認できる精度があることがわかった。すなわち統計解析の分散分析の結果、荳の油の A と B でリノレン酸% およびオレイン酸% がそれぞれ危険率 1% で、リノール酸% が危険率 5% で有意差があると認められた。

Table 2 Accuracy of the HPLC Analysis of Fatty Acid Composition Using 205nm UV Detector.

Fatty acid	HPLC wt% ^{a)}										GC wt%	
	Number of measurements								mean	s ^{b)}	C.V. ^{c)}	wt%
	1	2	3	4	5	6	7	8	value		%	
Sample mg/L	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3				
Is mg/L ^{d)}	10	10	10	10	10	10	10	10				
Inject. μ L	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0				
Perilla oil A												
18:3	56.7	56.0	55.9	60.0	59.7	59.4	60.8	59.2	58.5	1.8	3.1	58.1
18:2	19.3	18.6	18.8	20.1	20.8	20.1	20.3	19.4	19.7	0.7	3.7	12.6
16:0	5.0	nd	5.5	5.1	5.3	5.7	nd	7.4	4.3	2.6	60.0	6.8
18:1	13.8	18.6	13.7	14.8	14.9	14.8	18.8	13.9	15.4	2.0	12.7	20.0
18:0	5.2	6.7	6.1	nd ^{f)}	nd	nd	0.1	nd	2.3	2.9	129.0	1.8
total ^{e)}	99.6	80.1	76.4	69.5	94.3	88.7	80.0	89.5	84.8	9.3	11.0	
Sample mg/L	5.0	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45	1.45				
Is mg/L ^{d)}	15.0	9.1	9.1	9.1	9.1	9.1	9.1	9.1				
Inject. μ L	2.0	3.0	0.3	2.0	1.0	0.5	0.5	3.0				
Perilla oil B												
18:3	64.7	64.8	68.0	65.4	64.8	69.7	69.7	63.7	66.4	2.3	3.4	65.1
18:2	20.5	18.4	18.5	18.4	18.0	18.8	18.7	15.7	18.4	1.2	6.7	13.9
16:0	nd	5.0	nd	4.5	nd	nd	nd	5.6	1.9	2.5	129.9	5.6
18:1	13.6	11.8	11.8	11.7	10.6	11.6	11.6	9.5	11.5	1.1	9.4	13.4
18:0	nd	nd	1.8	nd	nd	nd	nd	5.5	0.9	1.8	200.7	1.6
total ^{e)}	81.3	50.6	78.4	83.8	97.5	80.9	42.2	28.5	67.9	22.6	33.3	

a) Fatty acid (wt%)=Weight of fatty acid $\times$ 100/Sum of weight of 18:3, 18:2, 16:0, 18:1 and 18:0 fatty acids

b) Standard deviation

c) Coefficient of variation (%)

d) Is (Internal standard):Butyric acid

e) total(%)=Sum of weight of 18:3, 18:2, 16:0, 18:1 and 18:0 fatty acids detected $\times$ 100/Weight of sample oil injected

f) not detected

本 HPLC 分析では内部標準に分析対象の脂肪酸とは分子量、炭素鎖長が大きく異なる酪酸を用いた。内部標準には脂肪酸ピークや他ピークに重ならず、移動相溶媒に充分溶解し、酸化劣化などのない安定な物質であることが求められるが、現時点では酪酸の他には見いだすことができなかった。より適切な内部標準物質の検索は今後も継続して行う予定である。また Table 2 において、分析条件が同じでも total% が大きく異なった。total% の変動は、飽和脂肪酸の検出感度が低いこと、内部標準物質の選定の問題などの要因が複合的に影響しているように思われるが、変動の原因はまだ明確にはなっていない。そこで脂肪酸組成は絶対量での表記は避けて、検出した脂肪酸の合計量に対する重量%で示した。total% の変動は、試料溶液の濃度が低い場合に大きかったため、溶解性が確保できる範囲で高濃度に試料溶

液を調製し適量の 1~2 μ L を注入するのがよいと思われる (Table 2 の Perilla oil A の分析条件)。

飽和脂肪酸が少なく 1 価および多価不飽和脂肪酸が多い荳の油、大豆油、月見草種子油などは、飽和脂肪酸の検出感度が低いために飽和脂肪酸% にバラツキが生じて、脂肪酸組成の表記結果への影響は少なく分析が可能であった。しかし、ステアリン酸などの検出しにくい飽和脂肪酸が主体の油脂については、信頼性が低下すると思われる。これらの結果から本 HPLC 脂肪酸分析法は 1 価および多価不飽和脂肪酸を主な構成脂肪酸とする油脂の脂肪酸、特に不飽和脂肪酸の組成を求めるのに必要な精度を有すると判断し、種々の油脂の脂肪酸組成分析にも適用を試みた。ただし脂肪酸の酸化的劣化による微量の減少を充分に検出できる程の精度はなく、本分析試料中の酸化的劣化の範囲内では、酸化的劣化は分析値に

影響しなかった。すなわち試料油として、荳の油 PV* 0.5, CV 2.2 を用いた場合と、この荳の油を自動酸化により PV* 68.3, CV 15.7 とした荳の油を用いた場合とで脂肪酸組成分析値はほとんど同じであった (Table 3)。

3・4 リパーゼ加水分解条件の検討

荳の油の加水分解条件の影響、すなわちリパーゼ加水分解 (油 2 g と 20 g) およびケン化分解について、生成脂肪酸を本 HPLC 法により分析し脂肪酸組成値への影響を検討した。ケン化分解に比較して、リパーゼ加水分解の場合は分解生成物の PV* および CV が低いこと、また油が 20 g と多い方が酸化的劣化が少ないことがわかったが、これらの酸化的劣化の影響は各脂肪酸組成% へほとんど影響しなかった (Table 4)。しかし、荳の油でも高温での化学的加水分解中にかなりの酸化的劣化を引き起こすことが確認されたので、特に高度不飽和脂肪酸を多く含む魚油などはさらに酸化されやすいことが推

測される。従って試料調製はリパーゼ加水分解法が好ましいと思われた。

標準の反応では、油脂および水の量を重量比で 1:0.6 とした。これはリパーゼ OF を用いた加水分解における最適範囲のうちの水分量の下限である。リパーゼは、1%水溶液として油脂に対して粉末重量換算で 0.15% (リパーゼ OF 540 u/g oil) 添加した。酵素の不活性化による反応の停止を回避するために通常の使用量より多く使用した。反応温度は 37℃で行ったが、カカオ脂のみ粘性の強いペーストとなり回転子による攪拌ができなくなったため 45℃で 24 h 加水分解を行った。荳の油について、リパーゼ OF を使用して加水分解率の時間変化を調査した (Fig. 2)。

本条件下で、リパーゼ OF による荳の油の加水分解で

Table 3 Influence of PV* and CV in the Analysis of Fatty Acid Composition of Perilla Oil.

	Lipase Hydrolysis ^{a)} (2)	(3)
Perilla oil : PV*	0.5	68.3
CV	2.2	15.7
AV	0.20	0.98
SV	194.2	187.7
Fatty acid (Product)		
AV	167.4	165.7
PV*	4.5	19.7
CV	5.8	18.8
Fatty acid (wt%) ^{b)}		
18:3	59.9	56.8
18:2	19.5	16.7
16:0	5.7	6.7
18:1	15.0	19.9
18:0	nd ^{c)}	nd ^{c)}
total	93.5	47.5

a) The mixture of perilla oil A (20 g), 1% Lipase OF (3 g) and water (9 g) was stirred at 37℃ for 2 h. Fatty acids were extracted with petroleum ether. Perilla oil of (3) was obtained by the autoxidation of Perilla oil A of (2).

b) Fatty acid (wt%) = Weight of fatty acid × 100 / Sum of weight of 18:3, 18:2, 16:0, 18:1 and 18:0 fatty acids
total (wt%) = Sum of weight of 18:3, 18:2, 16:0, 18:1 and 18:0 fatty acids detected × 100 / Weight of sample oil injected

c) not detected

Table 4 Comparison of the Hydrolysis Methods in the Analysis of Fatty Acid Composition of Perilla Oil^{a)}.

Fatty acid (Products)	Lipase Hydrolysis ^{b)} (1)	(2)	Saponification ^{c)}
AV	187.8	167.4	168.0
PV*	10.3	4.5	22.6
CV	3.6	5.8	12.9
Fatty acid (wt%) ^{d)}			
18:3	58.5±1.8	59.8±1.7	58.0±0.5
18:2	19.7±0.7	19.5±0.6	21.0±0.2
16:0	4.3±2.6	5.7±0.9	6.3±0.7
18:1	15.4±2.0	15.0±2.1	14.7±0.1
18:0	2.3±2.9	nd ^{e)}	nd ^{e)}
total	84.8±9.3	93.5±2.8	75.6±7.1

a) Perilla oil A: PV*, 0.5; CV, 2.2; AV, 0.2; SV, 194.2

b) (1) The mixture of Perilla oil A (2 g), 1% Lipase OF (0.3 g) and water (0.9 g) was stirred at 37℃ for 2 h. Mean value of eight measurements by HPLC

(2) The mixture of Perilla oil A (20 g), 1% Lipase OF (3 g) and water (9 g) was stirred at 37℃ for 2 h. Mean value of three measurements by HPLC

c) The mixture of Perilla oil A (1.6 g) and 0.5 M KOH ethanol was refluxed at 85℃ for 30 min. Mean value of three measurements by HPLC

d) Mean value ± standard deviation

Fatty acid (wt%) = Weight of fatty acid × 100 / Sum of weight of 18:3, 18:2, 16:0, 18:1 and 18:0 fatty acids

total (wt%) = Sum of weight of 18:3, 18:2, 16:0, 18:1 and 18:0 fatty acids detected × 100 / Weight of sample oil injected

e) not detected

Fig. 2 Time Conversion in the Lipase Hydrolysis of Perilla oil.

は2 hが必要であることがわかった。大豆油の場合も2 hではほぼ100%の加水分解率に達していた。酸化劣化をうけて過酸化値が高くなった油脂はリパーゼを不活性化するために、加水分解率が低下することが報告されている¹²⁾。しかし今回の条件では、PV*の高い荳の油(PV* 68.3, CV 15.7)の場合でもPV*の低い荳の油(PV* 0.5, CV 2.2)に比較してほぼ同じ加水分解速度を示した。このことから、本条件では加水分解完了までの時間は、PV*が70以下でCVが16以下の液体油であれば2 hでよいといえる。

3・5 食用油脂の構成脂肪酸の組成分析

本法で求めた各食用油脂の脂肪酸組成(wt%)をTa-

ble 5に示した。大豆油、サフラワー油、カカオ脂およびパーム油の場合、ケン化分解とリパーゼ加水分解による分析値に大きな差はなく、幾分リノール酸が多くなったがGC分析値ともよく一致した。月見草種子油では、ケン化分解の場合に比較して、リパーゼ加水分解の場合に γ -リノレン酸の量が少なかった。リパーゼOFは、TGの γ -リノレン酸結合部位に作用しにくいことが知られている¹³⁾ので、ほかの脂肪酸に比較して充分加水分解できなかったことが考えられる。カカオ脂やパーム油などの固体脂でも本法によりGC値に比較的良好一致した結果が得られたが、検出感度の低いステアリン酸やパルミチン酸の含有量が多いため飽和脂肪酸の定量誤差が全脂肪酸組成に影響することが考えられる。また固体脂では移動相溶媒への溶解性が低いため固体が析出しやすく分析が困難であった。今回は液体油の場合の10分の1程度に試料溶液の濃度を下げ、HPLCへの注入量を増やすことで測定を可能にした。固体脂の脂肪酸組成分析については、信頼性を確保するために更に検討が必要と考えられる。

本法は、熱的劣化を与えない脂肪酸組成分析法、特に酸化劣化を受けやすい不飽和脂肪酸を多く含む油脂の脂肪酸特に不飽和脂肪酸の組成を求めるのに有用な簡易分析法になると思われる。なお、リパーゼ加水分解および本HPLC分析法を利用した各種油脂の脂肪酸位置分

Table 5 Fatty Acid Compositions of Edible Oils by the New Method.

Edible oil	Sybean oil			Safflower oil			Evening primrose oil			Cacao butter			Palm oil		
	Sap. ^{a)}	Lip. ^{b)}	GC	Sap.	Lip.	GC	Sap.	Lip.	GC ^{c)}	Sap.	Lip.	GC ^{c)}	Sap.	Lip.	GC ^{d)}
Oil g	1.6	2		1.5	2		1.5	2		1.5	2		1.5	2	
Temp. °C	85	37		85	37		85	37		85	45		85	37	
Time h	0.5	2		0.5	2		0.5	2		0.5	24		0.5	2	
Product AV	197.5	186.1		189.1	190.1		169.1	165.6		209.0	190.5		154.1	176.0	
Rate of hydrolysis % ^{e)}	95.7	90.2		93.2	93.6		87.4	85.6		112.1	102.2		75.3	85.7	
Fatty acid wt% ^{f)}															
α -18:3	7.7	6.0	7.0	0.1	0.2	0.4									
γ -18:3							9.0	3.8	9.5						
14:0												0.1			1.0
18:2	62.2	62.5	53.3	81.9	82.5	74.2	80.4	84.0	70.6	5.7	4.5	3.3	13.7	12.4	7.0
16:0	9.4	9.6	10.9	4.8	5.1	6.9	4.5	4.6	6.2	23.4	25.4	25.6	44.0	46.2	45.5
18:1	20.7	21.8	24.6	11.5	12.2	15.2	5.7	6.1	11.9	35.6	35.0	34.7	42.4	41.4	41.5
18:0	nd ^{g)}	nd	3.7	1.6	nd	2.5	nd	nd	1.8	35.3	35.1	34.6	nd	nd	4.5
total	58.7	52.5		107.0	93.2		41.3	86.8		64.6	80.1		66.7	66.1	

a) Saponification

b) Lipase hydrolysis (Lipase OF)

c) JOCS, Yusikagakubinran (3rd ed.), Maruzen Co. (1992) p 104~106

d) JOCS, Yusikagakubinran (2nd ed.), Maruzen Co. (1980) p 20

e) [AV of Product×100]/[SV of edible oil] (%)

f) Fatty acid (wt%)=Weight of fatty acid×100/Sum of weight of 18:3, 18:2, 16:0, 18:1 and 18:0 fatty acids

total (wt%)=Sum of weight of 18:3, 18:2, 16:0, 18:1 and 18:0 fatty acids detected×100/Weight of sample oil injected

g) not detected

布分析について現在検討中である。

謝 辞

本研究に当たり、試料油を御提供くださいました各油脂会社およびリパーゼ試料を御提供くださいました名糖産業株式会社にお礼申し上げます。またリパーゼについての御教示を賜りました大阪市立工業研究所の島田裕司氏に感謝いたします。

(受付：1998年10月29日，受理：1999年1月21日)

文 献

- 1) 和田 俊，白井展也，油化学，47，937 (1998).
- 2) 日本油化学会編，“基準油脂分析試験法” 2.4.2.1-1996.
- 3) 梶島俊樹，青島 滋，西本ゆかり，長谷川栄治，森好栄子，永山裕美，油化学，45，335 (1996).
- 4) 梶島俊樹，加藤博史，端本謙一，和田 俊，油化学，45，351 (1996).
- 5) 日本油化学会編，“基準油脂分析試験法” 2.3.2.1-1996.
- 6) 市川和昭，石井貴子，小山吉人，油化学，45，355 (1996).
- 7) 熊沢 恒，大山 保，油化学，14，167 (1965).
- 8) 日本油化学協会編，“油脂化学便覧” 丸善 (1992) p. 317.
- 9) H.C. Jordi, *J. Liquid Chromatography*, 1, 215 (1978).
- 10) 高木 徹，“油脂・脂質の機器分析” 幸書房 (1984) p. 204.
- 11) 島津高速液体クロマトグラフ応用データ集 (1992) p. 10.
- 12) 小杉佳次，油化学，44，713 (1995).
- 13) Y. Shimada, A. Sugihara, K. Maruyama, T. Nagao, S. Nakayama, H. Nakano, Y. Tominaga, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, 1323 (1995).

[報文] 植物油添加煮取法/吸着カラムクロマトグラフ
法によるホタテガイ中腸腺脂質の高濃度 EPA
含有トリアシルグリセリンの分離・精製

林 賢 治

北海道大学水産学部 (〒041-8611 函館市港町 3-1-1)

なたね油添加煮取法/ケイ酸カラムクロマトグラフ法の組合せにより、ホタテガイ中腸腺粗脂質から高濃度イコサペンタエン酸 (EPA) 含有トリアシルグリセリン (TG) を分離・精製した。中腸腺粗脂質から、1% 及び 2% アセトン/ヘキサンで溶離液により不飽和度の異なる TG が分画され、画分 TG の不飽和度指数はそれらの溶出順にほぼ直線的に増加した。結果、少量のなたね油を含む暗緑色の中腸腺粗脂質から、ケイ酸カラムクロマトグラフ法により直接に淡黄色の高濃度 EPA (34~52%) 含有 TG が 8~38% の収率で得られた。

(連絡者: 林 賢治) Vol. 48, No. 4, 325 (1999)

[報文] リパーゼ加水分解および高速液体
クロマトグラフィーによる食用油の脂肪酸、
特に不飽和脂肪酸組成の簡易分析法

市川 和昭・近藤 美恵・小山 吉人

名古屋文理短期大学 (〒451-0077 名古屋市西区笹塚町 2-1)

荳の油、大豆油やサフラワー油のような一価および多価不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として多く含有する食用油の脂肪酸組成を測定する手段として、リパーゼ加水分解による試料の調製および 205 nmUV 検出器による高速液体クロマトグラフィーの利用法を検討した。生成した脂肪酸は石油エーテルで抽出し、誘導体に処理することなく酸の形のまま分析した。内部標準に酪酸を用いた。結果は従来のガスクロマトグラフィーによる分析値によく一致した。この方法は、加水分解および HPLC 分析とともに穏やかな条件で行うことができるので、不飽和脂肪酸の酸化劣化や加熱劣化による誤差を少なくして、食用油の脂肪酸、特に不飽和脂肪酸の組成を求めるのに有用な簡易分析法になると考えられる。

(連絡者: 市川和昭) Vol. 48, No. 4, 331 (1999)