成を比較した結果、澱粉、キシラン、乾草粉末から生成された酸の割合は反芻胃内に存在する酸の割合に近い値であったが、セルロースとキシロースでは反芻胃における組成よりプロピオン酸の割合が大きく、醋酸の割合が小さかった。

本研究の概要は昭和 34 年 4 月、日本農芸化学会大会にて講演した。

(1) 神立 誠, 糸野文雄 : 本誌, 33, 255(1959).	J., 37, 148 (1943).
(2) 糸野文雄, 神立 誠 : 本誌, 33, 740(1959).	(7) M. L. McNaught : <i>ibid.</i> , 49, 325 (1951).
(3) H. R. Marston : <i>Biochem. J.</i> , 42, 564 (1948).	(8) 糸野文雄, 神立 誠 : 本誌, 33, 737(1959).
(4) J. G. Louw et al. : <i>Science</i> , 110, 478(1948).	(9) T. V. Hershberger, O. G. Bentley : <i>Agr. and Food Chem.</i> , 4, 952 (1956).
(5) W. Burroughs et al. : <i>J. Animal Sci.</i> , 9, 513 (1950).	(10) S. R. Elsdon : <i>J. Exptl. Biol.</i> , 22, 51 (1945).
(6) R. M. Pearson, J. A. B. Smith : <i>Biochem.</i>	

[農化 第 35 巻, 第 4 号, p. 367~371, 1961]

脂質のクロマトグラフィーとその生化学的応用 (第 4 報)*

ペーパークロマトグラフィーによるトリグリセリドの簡易分析

平 山 修 (京都府立大学農学部), 井 上 吉 之 (東京農工大学)

昭和 35 年 10 月 11 日 受 理

グリセリドの分別には臭化法, 低温分別結晶法, 酸化法等の諸方法があるが, これらはいずれも分離性及び操作の簡易性等の諸点に欠点をもっており, 油脂の鑑別, グリセリド組成の検索あるいはグリセリドに関連する生化学的研究等に利用するにはなお困難な方法である。この分野にクロマトグラフィー法が期待されるところは大きい, 天然油脂を構成するグリセリドが複雑かつ構造が類似しているため種々の難点があり, これに関する報告も少い。最近に至り小数の研究者⁽¹⁻⁶⁾によってこの面の研究が開拓され, トリグリセリドの相互分離がある程度可能な方法が発表されている。

著者らはさきに酢酸水銀付加法によるトリグリセリドのペーパークロマトグラフィー⁽⁷⁾およびカラムクロマトグラフィー⁽⁸⁾を発表したが, これらの方法では高度不飽和トリグリセリドの分離が不完全であり, またジフェニルカルバゾン呈色が不安定であるため定量化が困難である。本報ではトリグリセリドを直接試料とし, シリコーン・オイルを固定相とするペーパークロマトグラフィーを新しく試み, 高度不飽和トリグリセリドの分離に好結果を得ると同時に, 安定な過マンガン酸カリウム呈色を利用することによって, 近似定量をも可能にしたのでその結果を報告する。

実験および結果

1. トリグリセリドの合成 トリオレイン, トリリノレイン及びトリリノレニン⁽⁹⁾は Wheeler らの方法⁽⁹⁾にほぼ従ってそれぞれオレイン酸, リノール酸, リノレン酸をグリセリンと反応させて合成した。即ちグリセリン

第 1 表 合成グリセリドの性状

グリセリド	I. V.		A. V.
	実測値	理論値	
トリオレイン	86.5	86.0	0.1
トリリノレイン	171.3	173.3	0.3
トリリノレニン	259.5	261.6	0.2

と計算量より 6% 過剰の脂肪酸とをカトルエンスルホン酸触媒 (グリセリン, 脂肪酸合計量の 1%) の存在の下に, 窒素気流中減圧下 110° で 2 時間加熱した。反応生成物をエーテル抽出し, 抽出液を水洗, 乾燥, エーテルを溜去の後, ベンゼン溶液として珪酸カラム⁽¹⁰⁾によるクロマト精製を行い第 1 表の如き純粋なトリグリセリドを得た。

* Chromatography of Lipids and its Biochemical Applications. Part IV. A Simple Method for Analysis of triglycerids by Paper Chromatography.

By Osamu HIRAYAMA (College of Agriculture, Kyoto Prefectural University) and Yoshiyuki INOUE (Tokyo University of Agriculture and Technology)

第 3 報 (牛脂脂質成分の分別と構成脂肪酸分布) 平山 修 : 京都府立大学学術報告・農学, 12, 139 (1960).

第2表 合成混酸基グリセリドの種類

出 発*	トリグリセリド**			
脂肪酸				
O, P	OOO	OOP	OPP	PPP
O, S	OOO	OOS	OSS	SSS
Le, O	LeLeLe	LeLeO	LeOO	OOO
Le, P	LeLeLe	LeLeP	LePP	PPP
Le, S	LeLeLe	LeLeS	LeSS	SSS
Le, Ln	LeLeLe	LeLeLn	LeLnLn	LnLnLn

* P: パルミチン酸, S: ステアリン酸, O: オレイン酸, Le: リノール酸, Ln: リノレン酸

** 構成脂肪酸の種類を示すのみでその結合位置は示さない。

第1図 合成トリグリセリドのクロマトグラム

溶媒系: 固定相 シリコン・オイル, 移動液 アセトン-酢酸

呈色: 0.2% 過マンガン酸カリウム水溶液

スポット記号: P パルミチン酸, S ステアリン酸, O オレイン酸, Le リノール酸

Ln リノレン酸, 右肩の数字は脂肪酸数

試料記号: 混合グリセリドの構成脂肪酸, ST 標準混合グリセリド

第3表 合成トリグリセリドの R_F 値と PC 値

トリグリセリド	略号	R_F 値	PC 値
ジパルミト・オレイン	PPO	0.29	48
パルミト・ジオレイン	POO	0.30	48
ジステアロ・オレイン	SSO	0.20	52
ステアロ・ジオレイン	SOO	0.23	50
ジパルミト・リノレン	PPLn	0.32	46
パルミト・ジリノレン	PLnLn	0.39	44
ジステロ・リノレン	SSLn	0.24	50
ステアロ・ジリノレン	SLeLn	0.34	46
トリオレイン	OOO	0.31	48
ジオレオ・リノレン	OOLn	0.35	46
オレオ・ジリノレン	OLnLn	0.41	44
トリリノレン	LeLeLe	0.47	42
ジリノレオ・リノレン	LeLeLn	0.52	40
リノレオ・ジリノレン	LeLnLn	0.57	38
トリリノレン	LnLnLn	0.61	36

3. R_F 値と PC 値 合成トリグリセリドの R_F 値を第3表に示す。 R_F 値とグリセリド構造との関係から、本ペーパークロマトグラフィーにおけるグリセリドの分離性は、その構成脂肪酸の炭素数および不飽和度によって支配されていることが判る。

既報⁽¹¹⁾に示した遊離脂肪酸の R_F 値から、各脂肪酸のクロマトグラム上の挙動を直鎖飽和酸の炭素数を規準にして「PC 値***」なる値で表すとミスチン酸 14, パルミチン酸 16, ステアリン酸 18, オレイン酸 16, リノ

混酸基トリグリセリドは等モルの2種の脂肪酸とグリセリンとを上述と同様の操作で反応させ、クロマト精製することによって得た。ただしこの場合生成物がそれぞれ4種のグリセリドから成っていることは、そのペーパークロマトグラムのスポットの脂肪酸組成を調べることによって確認した。得られた合成混酸基トリグリセリドの種類を第2表に示す。これらはいずれも混合グリセリドとして使用した。

2. ペーパークロマトグラフ

イー

a. シリコン・オイル固定濾紙の調製: 東洋濾紙 No. 2 を8%シリコン・オイル*-ベンゼン溶液に浸漬し室温に風乾して調製した。

b. 展開: シリコン・オイル固定濾紙の一端から5cmのところに原線を取り、試料は5%ベンゼン溶液として1~10 μ l つけ、アセトン-酢酸(1:4, v/v)の混液で2重展開する。即ち最初7時間展開し次に室温で20分乾燥** 後同溶媒で再び14時間展開した。ただし展開温度は20°, 2回目の展開距離は約

29cmである。

c. 呈色: 展開後クロマトグラムは室温で20分、つづいて80°で10分乾燥し、0.2%過マンガン酸カリウム水溶液中に30°で5分浸漬、次に流水で20分水洗すると不飽和グリセリドが淡黄色地に茶褐色ないし黒褐色のスポットとして表れる。合成トリグリセリドのクロマトグラムの1例を第1図に示す。この図から判る如く、本ペーパークロマトグラフィーではジステアロ・オレイン, ステアロ・ジオレイン, トリオレイン, ジオレオ・リノレン, オレオ・ジリノレン, トリリノレン, ジリノレオ・リノレン, リノレオ・ジリノレンおよびトリリノレンがよく相互分離した。

* 信越化学製品 KF96 10 CS

** 厳密を要するときは窒素気流中減圧下で乾燥する。

*** Paper chromatographic value

第 4 表 トリグリセリドの critical partner

PC 値	トリグリセリド*					
36						LnLnLn
38						LeLnLn
40						LeLeLn
42						LeLeLe
		SLnLn		PLnLn	OLnLn	
				PLeLn	OLeLn	
				PLeLe		
44		SLeLn	PPLn	POLn	OOLn	OLeLe
		SLeLe				
46		SPLn	SOLn	PPLe	POLe	OOLe
				PPO	POO	OOO
48	SSLn	SPLe	SOLe	PPP		
			SOO			
50	SSLe	SPP	SPO			
52	SSO	SSP				
54	SSS					

* P: パルミチン酸, S: ステアリン酸, O: オレイン酸, Le: リノール酸, Ln: リノレン酸

ール酸 14, リノレン酸 12 となる。この PC 値なる概念をさらにトリグリセリドにも応用し、構成脂肪酸の PC 値の和をトリグリセリドの PC 値と仮定して、各グリセリドの PC 値を示すと第 3 表の如くなる。この表において PC 値の等しいグリセリドがほぼ等しい R_F 値をもつことから、上記仮定の正しいことが判る。PC 値の等しいグリセリドは従ってクロマトグラム上で

は互いに同一スポットに重りいわゆる critical partner を形成することになる。今、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、およびリノレン酸の 5 種脂肪酸からつくられ得る種々のグリセリドを想定し、critical partner を形成すると考えられるグリセリドをその PC 値から推定すると第 4 表の如くなる。

4. 吸光度測定による定量 クロマトグラムの吸光度測定は東洋濾紙直読型デンストメーターを使用し、青色フィルター、スリット 2×20 mm で行なった。吸光度曲線は試料を展開しない空試験の部分の相当する位置の吸光度を差引いて作製した。その 1 例を第 2 図に示す。次に吸光度曲線下の面積を求めることによって第 3 図の検量線を作製した。ただしトリオレイン、トリリノレンおよびトリリノレン以外の検量線は算出値によって作製した。これは過マンガン酸カリウム呈色による呈色度がグリセリド分子中の二重結合の数にほぼ比例することがトリオレイン、トリリノレンおよびトリリノレンの吸光度曲線から確認できたからである。

試料中の脂肪酸組成および第 3 表, 第 4 表に基いてグリセリドのスポットを同定すれば検量線を使用してグリセリド量を求めることができる。

5. 天然油脂構成グリセリドの分離 試料油脂としてオリーブ油、ゴマ油、棉実油、菜種油、大豆油およびアマニ油を脱酸精製して使用した。各油脂の恒数および脂肪酸組成は第 5 表に示している。

第 2 図 不飽和トリグリセリドクロマトグラムの吸光度曲線

溶媒系: 固定相 シリコン・オイル, 移動液 アセトン-酢酸
呈色: 0.2% 過マンガン酸カリウム水溶液 (30°, 5 分)
吸光度測定: 東洋濾紙株式会社製直読型デンストメーター
青色フィルター, スリット 2×20 mm
OOO: トリオレイン, LeLeLe: トリリノレン,
LnLnLn: トリリノレン

第 3 図 トリグリセリドの検量線

クロマトグラムの作製条件および吸光度測定条件は第 2 図と同じ。ただし吸光度曲線は吸光度 0.1 を 2 cm として作製した。
S: 飽和酸, O: オレイン酸, Le: リノール酸, Ln: リノレン酸

第5表 油脂の恒数および脂肪酸組成 (モル%)*

	オリーブ油	ゴマ油	棉実油	菜種油	大豆油	アマニ油
沃素価	86.7	111.3	99.4	107.7	190.0	183.1
ケン化価	190.1	192.9	191.2	174.7	130.3	193.1
ミリスチン酸	1.6	1.1	1.5		1.0	1.1
パルミチン酸	14.8	11.6	27.4	5.1	11.4	8.9
ステアリン酸	3.8	2.7	4.4	1.5	3.6	4.7
アラキジン酸		1.0	1.2	1.4	2.0	1.6
ベヘニン酸				2.0	1.4	
オレイン酸	62.0	35.7	22.8	14.9	19.0	15.3
エイコセン酸				9.5		
エルシン酸				31.8		
テトラコセン酸				4.3		
リノール酸	17.8	46.9	42.7	24.0	47.9	15.9
リノレン酸		1.0		5.5	13.7	52.5

* プロマゾン法^(12,13)で定量

第4図 天然油脂構成グリセリドのクロマトグラム

溶媒系, 呈色およびスポット記号は第1図と同じ。

試料記号: ST 標準混合グリセリド, LI アマニ油, STO 梓油, SO 大豆油, CO 棉実油, SE ゴマ油, RA 菜種油, OL オリーブ油, SA イワン油

び操作の簡易性の諸点において既報の方法より一段と優れている。また脂肪酸、モノグリセリドおよびジグリセリドはフロント近くに移動しトリグリセリドと完全に分離するためトリグリセリドの同定が容易になる。過マンガン酸カリウム呈色は浸漬温度によって影響され、20°以下では低度不飽和グリセリドの呈色が不完全になり35°以上になると濾紙が着色して定量誤差が大きくなる。従って20~30°で5~10分浸漬するのが適当である。また展開温度は20~25°が適している。

試料の展開量は円形にスポットする場合50~500 μgが適当であり、さらに大量を展開させる場合はバンド状に試料液をつける。半乾性油および乾性油は試料の比較的多い場合もよく分離するが、不乾性油の場合は試料が少ないときのみ相互分離する。吸光度測定による定量誤差はそれぞれのスポットが単一のグリセリドから成っているときは約3%以下である。

第4表から判る如くパルミチン酸とオレイン酸とからなるグリセリドはいずれもPC値が48となり、互いにcritical partnerを形成するため、これらグリセリドを主成分とする固体脂および不乾性油のスポットの同定は不完全となる。これに反し乾性油および半乾性油の構成グリセリドはPC値が広範囲に亘り主スポットに重なるグリセリドの数が少なくなるため、スポットの同定が比較的容易となり従って定量値もより正確になる。第6表に示した各油脂の構成グリセリドはその全脂肪酸組成およびPC値から想定したものである。構成グリセリドの種

上述の方法に従って得た各油脂のクロマトグラムを第4図に示す。クロマトグラムの吸光度曲線に基く油脂の近似グリセリド組成の算出法は次の方法によった。即ちクロマトグラムの吸光度曲線下の面積から得られる各グリセリド量を、すべてそのPC値に相当するトリ不飽和グリセリド(即ちトリオレイン, ジオレオ・リノレイン, オレオ・ジリノレイン, トリリノレイン, ジリノレオ・リノレニン, リノレオ・ジリノレニンおよびトリリノレニン)の量として検量線から求め、その全量を当油脂の全脂肪酸組成(モル%)からパルミチン酸以下の低級飽和酸を除いた残りの全%値*に相当させて各スポットのグリセリド%値を求める。次に全脂肪酸組成からrandom分布値を算出し、この値に比例させて同一スポット内に存在するグリセリド量を配分する。そしてパルミチン酸以下の低級飽和酸を含むグリセリドには呈色度低下による補正**を行なって各構成グリセリドをモル%として求める。このようにして得られた各油脂のグリセリド組成の近似値は第6表に示すとおりである。

考 察

本ペーパークロマトグラフィーはスポットの分離性、 R_F 値の再現性およ

* 第5表から、例えばゴマ油の場合87.3, アマニ油の場合90.0

** 例えばPC値42のPLeLnの場合得られた値をAモルとするとその補正值は $A \times 6/5$ モルとなる。

第6表 天然油脂の近似グリセリド組成 (モル%)

PC 値	棉実油	ゴマ油	大豆油	アマニ油
36				LnLnLn 21
38			LeLnLn 2.5	LeLnLn 14
40			LeLeLn10	LeLeLn 3
			OLnLn 1	OLnLn 12
			PLnLn 0.5	PLnLn 6.5
42	LeLeLe 12.5	LeLeLe14 OLeLn 1.5	LeLeLe14.5 OLeLn 10 PLeLn 6	LeLeLe 0.5 OLeLn 7.5 PLeLn 4 SLnLn 4
				OLeLe 1.5 OOLn 4
44	OLeLe 15 PLeLe 18.5	OLeLe 18 PLeLe 6	OLeLe 16.5 OOLn 2 POLn 1.5 PLeLe 10 PPLn 0.5 SLeLn 2	POLn 4.5 PLeLe 1 PPLn 1.5 SLeLn 2.5
				OOLe 1 POLe 1.5 PPLe 0.5 SOLn 2.5 SLeLe 0.5
46	OOLe 5 POLe 12 PPLe 7	OOLe 15.5 POLe 2 PPLe 10	OOLe 4 POLe 5 PPLe 1.5 SOLn 0.5 SLeLe 2	OOLe 1 POLe 1.5 PPLe 0.5 SOLn 2.5 SLeLe 0.5
				S ₁ OLe 1.5 OOO 0.5 S _T OO 2 S _T S _T O 2 S _T S _T S _T 0.5
48	S ₁ OLe 4.5 OOO 1.5 S _T OO 7 S _T S _T O 10 S _T S _T S _T 5	S ₁ OLe 7 OOO 8 S _T OO 11 S _T S _T O 5 S _T S _T S _T 0.5	S ₁ OLe 4 OOO 0.5 S _T OO 2.5 S _T S _T O 2.5 S _T S _T S _T 0.5	S ₁ OLe 1.5 OOO 0.5 S _T OO 2 S _T S _T O 2 S _T S _T S _T 0.5

註 S_T: 飽和酸, S₁: ステアリン酸以上の高級飽和酸, S: ステアリン酸, P: パルミチン酸, O: オレイン酸
Le: リノール酸, Ln: リノレン酸

類をより正確に知る
には各スポットの脂
肪酸組成を調べる必
要があるが, 向流分
配法によって得られ
た大豆油⁽¹⁴⁾ および
アマニ油⁽¹⁵⁾ の構成
グリセリドの部分的
分析結果とも比較的
よく一致し, かなり
信頼のおける値と考
えられる。
本ペーパークロマ
トグラフィーはその
クロマトグラムから
容易に各油脂の特性
を知ることができ,
従って油脂の鑑別お
よびその偽和物の検

出などに応用ができる。また本法は, 油脂のグリセリド組成の近似値が簡易に得られるため, 油脂の生化学的研究その他にも有用な方法と考えられる。

要 約

ペーパークロマトグラフィーによってトリグリセリドを簡易に分離, 定量する方法を考案した。シリコーン・オイル固定濾紙を使用しアセトン・酢酸 (1:4, v/v) 混液を展開溶媒として 20° で 2 重展開し, 0.2% 過マンガン酸カリウム水溶液で呈色させた。トリグリセリドはその構成脂肪酸の不飽和度および炭素鎖の長さによって分離し, ジステアロ・オレイン, ステアロ・ジオレイン, トリオレイン, ジオレオ・リノレイン, オレオ・ジリノレイン, トリリノレイン, ジリノレオ・リノレニン, リノレオ・ジリノレニンおよびトリリノレニンが相互によく分離した。クロマトグラムの吸光度測定によってスポットのグリセリド量を定量し, 数種の天然油脂のグリセリド組成を調べた。本法は油脂の鑑別, その偽和物の検出およびその生化学的研究に有用であり, とくに半乾性油および乾性油の分析に適している。

本報の一部は昭和 35 年 4 月の日本農芸化学会大会で講演した。終りにシリコーン・オイルを提供して戴いた信越化学株式会社に対し深甚の謝意を表する。

- (1) J. G. Hamilton, R. T. Holmann: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 4107 (1954).
- (2) H. Schlenk, J. L. Gellerman, J. A. Tillotson, H. K. Mangold: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 34, 377 (1957).
- (3) M. Jáky: *Fette-Seifen-Anstrichmittel*, 61, 6 (1959).
- (4) H. P. Kaufmann, H. Schnurbusch: *ibid.*, 61, 523 (1959).
- (5) H. P. Kaufmann, Z. Makus: *ibid.*, 61, 631 (1959).
- (6) H. P. Kaufmann, M. Aparicio: *ibid.*, 61, 768 (1959).
- (7) 井上吉之, 野田万次郎: 本誌, 23, 452 (1959).
- (8) 平山 修: 京都府立大学学術報告・農学, 11, 176 (1959).
- (9) D. H. Wheeler, R. W. Riemenschneider, C. E. Sando: *J. Biol. Chem.*, 132, 687 (1940).
- (10) P. Quinein, H. J. Weiser, Jr.: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 35, 325 (1958).
- (11) 平山 修, 井上吉之: 本誌, 35, 138 (1961).
- (12) 平山 修: 西京大学学術報告・農学, 10, 23 (1958); 井上吉之, 平山 修, 野田万次郎: 農化, 31, 568 (1957).
- (13) 平山 修, 井上吉之: 本誌, 35, 135 (1961).
- (14) C. R. Scholfield, M. A. Hichs: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 34, 77 (1957).
- (15) H. J. Dutton, J. A. Cannon: *ibid.*, 33, 46 (1956).