[農化 第35巻, 第5号, p. 437~441, 1961]

脂質のクロマトグラフィーとその生化学的応用 (第6報)*

珪酸カラムクロマトグラフィーによる混合トリグリセリドの分離

平 山 修 (京都府立大学農学部)

昭和35年10月25日受理

前報に報告^(1,2)したトリグリセリドのペーパークロマトグラフィーは乾性油および半乾性油の分析には好結果を与えるが、固体脂および不乾性油の完全な分析は期待できない。そこで著者は先に報告した珪酸カラムによるクロマトグラフィー⁽³⁾を再検討し、固体脂および不乾性油の構成グリセリドの分離に適するように改良を行った。

本報ではこの改良珪酸カラムクロマトグラフィーの詳細を述べるため、オリーブ油および支那産植物脂(皮油, Chinese Vegetable Tallow)の構成グリセリド組成の分析例をもって示した。

実 験 方 法

1. 試料 オリーブ油は小豆島産オリーブの種子を粉碎した後、エーテル抽出によって採取した。

皮油はナンキンハゼ (*Sapium sebiferum* Roxb.) の種皮表面に脂肪層を形成して存在しており、これの採取には次の方法をとった。即ち種子を水と共に煮沸して脂肪層を部分的に遊離させた後、アセトンおよびエーテルを用いて種皮表面の脂肪層を完全に抽出し、次に抽出液の溶媒を溜去後その残渣をさらに再エーテル抽出することによって白色固形状の固体脂を得た。得られた両油脂の性状は第1表の通りである。

試料油脂は脱酸精製を行った後、次に述べる如く酢酸第二水銀付加処理を行ってクロマトグラフィーの試料に供した。

第1表 試料油脂の性状

	オリ ブ油	皮油
A. V.	2.1	3.3
S. V.	196.3	204.9
I. V.	82.1	29.5
m. p. °C	—	31.5~34.5

2. クロマトグラフ用試料の調製 (グリセリドの酢酸第二水銀付加処理) 試料グリセリド500mg前後を精秤してナス型フラスコにとり、これにベンゼン2mlを加えて溶解する。次に計算量より20%過剰*の酢酸第二水銀-メタノール溶液(容量を約5mlとし酢酸2%を含ませる)を添加し、60°で30分反応させた。反応液にはシリカゲル1gを添加し、減圧下で溶媒を完全に溜去の後、残渣を石油エーテル6mlに懸濁させてカラムクロマトグラフ用試料液を調製した。なおペーパークロマトグラフ用試料液の調製は次の如く行った。即ち試料グリセリド約30mgを試験管にとり上述の如く酢酸第二水銀付加反応を行い、反応液に直ちに過剰の蒸留水および酢酸1滴を加えて、得られる上層のベンゼン溶液を試料液とした。

3. クロマトグラフィー カラム(21×300mm)に予め石油エーテルを加え、その底部にガラスウールをつめる。次に吸着剤としてシリカゲル***15gを石油エーテルの泥状物として充填する。カラム中の石油エーテルを下部から滴下させ、その表面がシリカゲル表面に達したとき溶媒の滴下を中止し、吸着剤表面を乱さないように上記調製試料液を注入する。その際試料は少量のベンゼンを用いて定量的にカラムに移し、試料液表面が吸着剤表面に達したとき、溶出溶媒を流し始める。流出初速度は約0.5ml/分である。溶出溶媒としては、石油エーテル、10%ベンゼン含有石油エーテル、20%エーテル含有石油エーテル、40%エーテル含有石油エーテル、70%エーテル含有石油エーテル、5%メタノール含有エーテル、20%メタノール含有エーテル、40%メタノール含有エーテルおよびメタノールを順次使用した。溶出液はドロップカウンター式フラクションコレクターを用いて100滴ごとに分取し、得られる各画分の小量を毛細管にて4×30cmの濾紙に一定間隔にスポットし、これに0.2%ジフェニルカルバゾーン-アルコール溶液を噴霧し各スポットの呈色度を測定することによってクロマトグラフィーの溶出曲線を作製した。なおスポットの呈色度の測定は東洋濾紙直読型デンシトメーターを使用し、フィルターは緑色、スリットは5×5mmにし露光面がスポット内に完全に入るような条件で測定した。

* Chromatography of Lipids and its Biochemical Applications. Part VI. Chromatographic Separations of Mixed Triglycerides on Silicic Acid Column.

By Osamu HIRAYAMA (College of Agriculture, Kyoto Prefectural University)

** 試料グリセリドの沃素価から算出する。

*** 関東化学製品クロマト用シリカゲル。

4. 水銀付加グリセリドのペーパークロマトグラフィー カラムクロマトグラフィーによって得られる各画分のグリセリド組成を調べるため、水銀付加グリセリドのペーパークロマトグラフィーを既報⁽⁸⁾にほぼ従って行った。即ち東洋濾紙 No. 2 の原線に上記の如く調製した水銀付加グリセリド試料液を滴下し、固定相としてケロシン溜分 (b. p. 185~215°) を濾紙に噴霧 (0.08 g/dm² 濾紙) 後、酢酸メチル-メタノール-酢酸-水-ケロシン (20:20:8:1:4)* あるいはメタノール-酢酸-ケロシン (10:2:0.8)** を展開溶媒として 30° で約 4 時間展開させた。展開後クロマトグラムは暗所で一夜風乾するか、または 80° で 20 分加熱乾燥し、0.2% ジフェニルカルバゾーン-アルコール溶液を噴霧して発色させた。

5. 脂肪酸の分析 改良プロマゾン法によるペーパークロマトグラフィー⁽⁴⁾で定量した。

結果および考察

第 1 図 珪酸カラムによるオリーブ油酢酸水銀付加物の溶出曲線

溶媒 P: 石油エーテル, B: ベンゼン, E: エーテル, M: メタノール
溶出液を濾紙上にスポットし、ジフェニルカルバゾーンによって呈色後、その呈色度を測定。

第 2 図 珪酸カラム分別によって得たオリーブ油酢酸水銀付加物の各画分のペーパークロマトグラム

T: Total, 数字は各画分番号, F は二重結合数。

1. オリーブ油構成グリセリド

の分離 脱酸精製したオリーブ油 500mg を精秤し、上述の方法に従ってクロマトグラフ分別を行い、第 1 図の溶出曲線を得た。ただし各種溶媒の量は溶出液のジフェニルカルバゾーン呈色の呈色度に基づいて適宜決めていった。次に溶出曲線を基礎にして第 1 図の如く溶出液を 7 画分に大別した。各画分のグリセリド組成を概括的に調べるため、それぞれを適当な濃度に濃縮後上記ペーパークロマトグラフィーを行った。そのペーパークロマトグラムを第 2 図に、またクロマトグラムの吸光度曲線を第 3 図に示す。各画分を常法に従って加水分解し、得られる脂肪酸を改良プロマゾン法によって分析した。また改良プロマゾン法を行う際得られる、各画分脂肪酸の 0.1N 苛性カリアルコール溶液による滴定値から、各画分のグリセリド量をモル%として求めた。ただし、各画分脂肪酸の滴定値の総和およびオリーブ油混合脂肪酸の中和価から算出したグリセリド回収率が 78 モル%であったので、各画分のグリセリド量の総和を 78 モル%になるように配分した。これらの結果を第 2 表に示す。なお第 2 表には比較のため

* 固体脂構成グリセリドの分離に適している。

** 不乾性油構成グリセリドの分離に適している。

第 3 図 オリーブ油酢水銀付加物を珪酸カラム
分別した各画分のペーパークロマトグラム
の吸光度曲線

第 2 表 珪酸カラムクロマト分別によるオリーブ油各画分の分析値 (モル%)

グリセリド	画 分 番 号							回収 油脂	原油 脂
	1	2	3	4	5	6	7		
	1.3	8.7	0.3	31.6	32.0	1.7	2.4		
ミリスチン酸	9.1	7.2		2.5	1.3	3.6	0.2	2.6	1.6
パルミチン酸	68.1	40.6		26.5	6.0	15.6	2.2	19.5	14.8
ステアリン酸	15.1	12.6		6.9	2.1	12.9	1.2	5.7	3.8
オレイン酸	7.7	39.6		54.7	81.0	62.5	63.9	63.4	62.0
リノール酸				9.4	9.6	5.4	32.5	8.8	17.8
パルミトオレイン酸									

第 3 表 珪酸カラムクロマト分別によるオリーブ油各画分のグリセリド組成
(モル%)

グリセリド	画 分 番 号						
	1	2	3	4	5	6	7
トリ飽和 (SSS)	1.0						
ジ飽和・オレイン (SSO)	0.3	8.9					
ジ飽和・パルミトオレイン (SSH)							
ジ飽和・リノレイン (SSLe)				8.0			
飽和・ジオレイン (SOO)					23.6	0.6	
トリオレイン (OOO)			0.1		23.1		
飽和・オレオ・リノレイン (SOLe)					8.9	0.8	
飽和・ジリノレイン (SLeLe)							0.1
ジオレオ・リノレイン (OOLe)						0.3	2.3

ジン酸およびペヘニン酸 0.6, オレイン酸 27.8, リノール酸 1.4 モル%。なお第 4 表にはオリーブ油および皮油の構成脂肪酸組成から算出した random 分布値および restricted random 分布値を比較のため示した。

め、改良ブロマゾン法で分析した原油脂の脂肪酸組成、ならびに各画分のグリセリド量およびその脂肪酸組成から算出した回収グリセリドの脂肪酸組成をともに示した。

水銀付加トリグリセリドのペーパークロマトグラフィーは、グリセリド分子内の水銀付加数、即ち二重結合の数によって分離する。この特徴および標準物との対比から、第 2 図の如くグリセリド内の不飽和数を決定し、さらにその脂肪酸組成およびクロマトグラムの吸光度曲線下の面積から各画分のグリセリド組成を算出した。その結果は第 3 表に示す通りである。ただし全グリセリド量は 78 モル%として示している。

第 2 表における回収油脂と原油脂との脂肪酸組成を比較するとき、回収油脂ではリノール酸、ついでオレイン酸が相対的に減少している。これは未回収のグリセリドがリノール酸およびオレイン酸から成っていることを示すものであり、第 2 図からこれら未回収グリセリドの分子内における二重結合の数は 4 個以上であることが推定できる。この未回収グリセリドの補正を行うため、既報⁽¹⁾のシリコン・オイル固定濾紙法によるオリーブ油の分析を行った。その結果はジオレオ・リノレイン、オレオ・ジリノレインおよびトリノレインがそれぞれ 19.7, 5.3 および 1.2 モル%であった。

この値を基礎にして第 3 表の値を補正し、オリーブ油の全グリセリド組成として第 4 表の結果を得た。

2. 皮油グリセリドの

分離 皮油を 508mg 精秤し、上述と同様の方法で珪酸カラムクロマト分別を行った。第 4 図にその溶出曲線を示す。この場合のグリセリド回収率は 98 モル%であった。上述と同様、各画分のペーパークロマトグラフィーおよび脂肪酸分析を行って得た最終結果を第 4 表に示す。ただし皮油の脂肪酸組成は次の通りである。ミリスチン酸 5.0, パルミチン酸 61.7, ステアリン酸 3.5, アラキ

第 4 表 オリーブ油および皮油のグリセリド組成 (モル%)

オリーブ油			皮油			油		
グリセリド	分析値	random分析	グリセリド	分析値	random分布	グリセリド	分析値	restricted random分布
SSS	1.0	0.8	SSS	33.0	35.5	SSS	33.0	33.0
SSO	9.2	7.3	SSO	51.8	41.8	SSU	51.8	48.7
SOO	24.2	23.3	SOO	8.6	16.4	SUU	11.1	16.3
SSLe	8.0	2.2	OOO	5.6	3.8	UUU	4.1	2.0
SSH			SOLe					
OOO	23.2	23.8	OOLe	1.0	0.3			
SOLe	9.7	13.4						
SLeLe	0.4	1.9						
OOLe	18.2	20.5						
OLeLe	5.0	5.9						
LeLeLe	1.1	0.6						

註 S: 飽和酸, O: オレイン酸, H: パルミトオレイン酸, Le: リノール酸, U: 不飽和酸

第 4 図 珪酸カラムによる皮油酢酸水銀付加物の溶出曲線

溶媒記号: 第 1 図と同じ。飽和グリセリドは重量曲線, 酢酸水銀付加グリセリド (不飽和グリセリド) はジフェニルカルバゾン呈色度の吸光度曲線にて示す。
S: 飽和酸, O: オレイン酸, Le: リノール酸

って本法はリノール酸以上の高度不飽和酸を含まない固体脂あるいは不乾性油の分析に適している。また本法は飽和グリセリドと不飽和グリセリドとの分離が完全であるため、飽和グリセリドの定量法としても有用である。

二重結合数 3 以上のグリセリドが試料油中に少量含まれている場合は、上述の如くシリコン・オイル、または流動パラフィン固定濾紙によるペーパークロマトグラフィーによって未回収グリセリドの補正をすることができるが、グリセリド回収率が 75% 以下になるとその結果は不正確となる。なおグリセリド回収率の算出において、溶出曲線の作製およびペーパークロマトグラフ用試料として回収グリセリドの一部を使用した、その総量は微量であり、上記算出のグリセリド回収率の値に大きな影響は与えない。

第 4 表の結果からオリーブ油および皮油のグリセリド分布を考察するとき、オリーブ油は random 分布値とかなりよく一致しているが、皮油は random 分布よりむしろ Kartha の restricted random 分布⁽⁵⁾により類似した値を示しており、両油脂のグリセリド分布様式が明らかに異なっていることが推定できる。

要 約

珪酸を吸着剤とするカラムクロマトグラフィーによって混合トリグリセリドの分離を行った。混合グリセリドは酢酸第二水銀付加処理を行ってクロマトグラフ用試料に供し、石油エーテル、石油エーテル-ベンゼン、石油エーテル-エーテル、エーテル-メタノール、およびメタノールの各種混液を溶出溶媒として順次使用した。グリセリドはその分子中の不飽和結合の数によって、トリ飽和、ジ飽和・オレイン、飽和・ジオレイン、トリオレインおよびジオレオ・リノレインの順に溶出された。不飽和結合数が 4 以上のグリセリド水銀付加物は珪酸カラムに強く吸着され、定量的溶出が不可能であるが、シリコン・オイル固定濾紙法によってこの欠点を補正することができる。本法は固体脂および不乾性油構成グリセリドの分離に有用である。

本クロマトグラフィーによってオリーブ油および支那産植物脂の構成グリセリド組成を分析した結果、オリーブ油のグリセリド組成は random 分布にかなりよく一致した値を示し、支那産植物脂のグリセリド組成は res-

第 2 図、第 4 図等から判る如く、本法による珪酸カラムクロマトグラフィーでは、トリ飽和グリセリド、ジ飽和・オレイン (二重結合数 1) および飽和・ジオレイン (二重結合数 2) はそれぞれ 20% エーテル含有石油エーテル、40% エーテル含有石油エーテルおよび 70% エーテル含有石油エーテルによって定量的に溶出される。しかし二重結

合数 3 のグリセリド (例えばトリオレイン) になるとシリカゲルによる不可逆的吸着を多少おこし、さらに二重結合数 4 以上のグリセリドになると不可逆的吸着が一段と強くなり、定量的溶出が困難になってくる。従

tricted random 分布に近い値を示した。

- (1) 平山 修, 井上吉之: 本誌, 35, 377(1961).
 (2) 平山 修, 井上吉之: 本誌, 35, 382(1961).
 (3) 平山 修: 京都府大学術報告・農学, 11, 176 (1959).
 (4) 平山 修, 井上吉之: 本誌, 35, 135(1961).
 (5) A. R. S. Kartha: Studies on the Natural Fats, Vol. I, Published by the Author, Ernakulam, India 1949; J. Am. Oil Chemists' Soc., 30, 280 (1953).

[農化 第35巻, 第5号, p. 441~444, 1961]

脂質のクロマトグラフィーとその生化学的応用 (第7報)*

ペーパークロマトグラフィーによる大豆油および ナンキンハゼ油グリセリド組成の分析

平 山 修 (京都府立大学農学部)

昭和35年10月25日受理

著者は先に, シリコーン・オイルまたは流動パラフィン固定濾紙によるトリグリセリドのペーパークロマトグラフィー^(1,2)を発表したが, 本法では同法によるペーパークロマトグラムの各バンドの脂肪酸組成を分析することによって大豆油およびナンキンハゼ油 (梓油, *Stillingia Oil*) の構成グリセリド組成を詳細に調べた。

実 験 方 法

1. 試料の調製 大豆油は, 大豆種子を粉碎後アセトン抽出し, アセトンを溜去の後残渣を再エーテル抽出することによって得た。梓油はナンキンハゼ (*Sapium sebiferum* Roxb.) の種子を前報⁽³⁾の如く処理して種子核表面の皮油を完全に除き, つづいて種子核を粉碎しアセトン抽出, さらに抽出物を再エーテル抽出することによって製取した。両油脂は脱酸処理の後分析に供した。脱酸油脂の性状を第1表に示す。

2. ペーパークロマトグラフィー 主としてシリコーン・オイル固定濾紙を使用し, 展開溶媒, 展開条件および呈色操作はすべて既報⁽¹⁾の通りに行った。ただし濾紙は東洋濾紙 No. 2 の 20×45 cm, 55×45 cm の2種を使用した。試料は5%ベンゼン溶液とし, その5μlを小型の濾紙にスポットして展開させる場合と, 大型濾紙にバンド状に多量つけて展開させる場合との2方法によってクロマトグラムを作成した。前者のクロマトグラムは吸光度測定用に供し, 後者のクロマトグラムは各バンドの脂肪酸組成の分析に用いた。

クロマトグラムの吸光度の測定は東洋濾紙株式会社製直読型デンストメーターを使用し, 既報⁽¹⁾と同条件で測定した。

3. 脂肪酸の分析 改良ブロマゾン法⁽⁴⁾および鉛塩-硫化アンモニウム法⁽⁵⁾によるペーパークロマトグラフィーを用いて分析した。

結果および考察

1. 試料油脂の脂肪酸組成 大豆油および梓油を常法によって加水分解し, 得られる混合脂肪酸の分析結果をモル%として第2表に示す。

2. 吸光度曲線からのグリセリドの定量 大豆油および梓油のクロマトグラムを作成し, 上述の条件で測定して得た吸光度曲線を第1図に示す。吸光度曲線下の各面積を測定し, 既報の如く各スポットのグリセリド量をすべてトリ不飽和グリセリド**として検量線から求め, その全量を当油脂構成脂

第1表 試料油脂の性状

	大豆油	梓油
ケン化価	190.7	200.5
沃素価	130.3	156.9

第2表 大豆油および梓油の脂肪酸組成 (モル%)

脂 肪 酸	大豆油	梓油
ミリスチン酸	1.0	1.2
パルミチン酸	11.4	7.4
ステアリン酸	3.6	3.1
アラキジン酸	2.0	0.1
ベヘニン酸	1.4	0.1
オレイン酸	19.0	11.7
リノール酸	47.9	32.0
リノレン酸	13.7	34.7
2,4-デカジエン酸	—	10.0

註 改良ブロマゾン法で分析

* Chromatography of Lipids and its Biochemical Applications. Part VII. Paper Chromatographic Analyses of Component Glycerides in Soybean Oil and *Stillingia* Oil.

By Osamu HIRAYAMA (College of Agriculture, Kyoto Prefectural University)

** 3個の不飽和酸から成るトリグリセリド。