^{13}C NMR による位置異性を含めたモノ・ジ・トリアシル グリセリン混合比の簡易測定法

堀 一之*・大能俊久*・大久長範*

Convenient Method for the Determination of Mono-, Di-, and Triacylglycerine Distribution Including Regioisomers by ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

Kazuyuki HORI*, Toshihisa OHNO* and Naganori OHISA*

* Akita Research Institute of Food and Brewing, 4-26, Aza-Sanuki, Araya-machi, Akita 010-1623

By using carbon-13 (^{13}C) nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometer, we have developed a easy quantitative method for determining the molar ratio of partial acylglycerines <1,2-diacylglycerine (DG), 1,3-DG, 1-monoacylglycerine (MG), and 2-MG> to triacylglycerine (TG) and/or glycerin. For refinement of some measurement conditions, we set the five kinds of palmitoyl acylglycerines (TG, 1,2-DG, 1,3-DG, 1-MG, and 2-MG) and glycerine as model compounds. After examining the solubility of these model compounds, we decided that pyridine- d_5 was suitable as an NMR measuring solvent. We also set the delay time of the pulse repeating at 15s, which is five times longer than the longest spin-lattice relaxation times (T_1) of proton (^1H) NMR signals of the glycerine moieties protons and ^{13}C NMR signals of the glycerine moieties carbons. Good agreement was observed between the result of the ^{13}C NMR and that of the reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) by the model compounds. When the characteristic peaks are quantitatively measured in ^{13}C NMR of the commercial diacylglycerins product, each molar ratio of the derivatives, such as TG, 1,2-DG and 1,3-DG, can easily be determined.

(Received Mar. 14, 2001 ; Accepted Jun. 7, 2001)

ジアシルグリセリンを主成分とする食用油は、特に1,3-ジアシルグリセリンが、体内で再吸収されにくく蓄積脂肪になりにくいこと¹⁾から、特定保健用食品として利用されている。一般に、酵素処理によってトリアシルグリセリンから1,3-ジアシルグリセリンを優先的に誘導する方法で製造されているが、アシル転移でより安定な、1,2-ジアシルグリセリンが非酵素的に生成しほぼ一定の比率の混合物となっていることが推測される。さらに分解反応が進んだ1-および2-モノアシルグリセリンなどが混合している可能性もある。

トリ、ジ、モノアシルグリセリンの定量分析としてはRI検出器を用いた逆相のHPLC分析²⁾があるが、位置異性体の分離には至っていない。最近、SOONによって

ヤシ油を研究対象とし炭素-13 (^{13}C) 核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance : NMR) スペクトル法を用いた報告³⁾がなされたが、脂肪酸部分についての混合物を対象とした論議が主たるもので定量的な論議としては不十分であった。

そこで、我々はパルミチン (16:0) 酸のトリ、1,2-および1,3-ジ、1-および2-モノアシルグリセリンとグリセリンをモデル化合物として用い、 ^{13}C NMRで定量分析を行い、HPLC分析と比較して、本方法の分析手法としての有用性を検討した。さらに、市販のジアシルグリセリン商品へ適用した。

* 秋田県総合食品研究所 (〒010-1623 秋田県秋田市新屋町字砂奴寄 4-26)

実験方法

1. 試料および試薬

トリパルミトイルグリセリン (1), 1,2-ジパルミトイル-*rac*-グリセリン (2), 1,3-ジパルミトイルグリセリン (3), 1-モノパルミトイル-*rac*-グリセリン (4), 2-モノパルミトイルグリセリン (5) はいずれも Sigma 社製試薬 (99% 以上) を用いた。またグリセリン (6) は東京化成工業製 FABMS マトリクス用グレード試薬を用いた。

評価用として用いた試料は Sigma 社製 標準脂質 (cat No. 178-3, lot No. 72H8419, 1:2+3:4 の重量比 1:1:1 の混合物, ただし 2 と 3 はおよそ半分づつ, また各化合物の純度はそれぞれ 99% 以上), また市販シアシルグリセリン商品の試料として花王(株)製エコナッキングオイルを使用した。

2. NMR 分析

NMR スペクトルの測定には, Varian 社製 Unity plus 400 型 NMR スペクトロメータ (9.4T , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, 5 mm 4 核 auto PFG プローブ) を用い 35°C で行った。

3. HPLC 分析

日本分光製 PU-980 型 HPLC (YMC, J'sphere ODS-M 80, 250 mm L x 10 mm i.d., $4\mu\text{m}$, $80\text{\AA}$) により 25°C で, アセトニトリル:クロロホルム:酢酸 (50:50:1, v/v) の混合溶媒を用い, 流量 3.0 ml/min で分析した。検出器はハイブリット HPLC 検出器 (島村計器製作所製 YRU-880 midget 型 RI/UV), データ処理は日本分光製 807-IT 型クロマトグラフデータ処理装置を用いた。

実験結果および考察

1. 標準試料の ^{13}C NMR スペクトル

(1) 測定溶媒の選択

油脂を対象とした NMR 測定では, 重クロロホルム (CDCl_3) が測定溶媒として用いられる事が多い。本研究ではトリアシルグリセリンからグリセリンまでが任意に混合している場合の各成分の存在比率を求めることを目的とするので, モデル化合物である 1-6 おおの 10 mg について CDCl_3 (1 ml), 重メタノール (CD_3OD , 0.75 ml), CDCl_3 - CD_3OD [1:1 (v/v), 1 ml] および重ピリジン ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 0.75 ml) の 4 種について溶解するかどうか検討した。 CDCl_3 , CD_3OD の単一溶媒では 35°C に加温しても前者では 4-6 が, 後者では 1 が全く溶解しなかった。両者の混合溶媒と $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ は, 35°C の加温で 1-

6 全てが溶解した。しかし, 後述するグリセリンユニット炭素の化学シフトの分離については, 混合溶媒系では一部が分離しなかったため, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ を測定溶媒として選択した。なお, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ が塩基性溶媒であるため, アシル転移の可能性があると推定されたので, モデル系および実商品サンプルについて, 溶解後すぐと, 室温で 10 日間保存し, 同じ条件で測定・比較したが, 有意な変化は認められなかった。すなわち, 非水系のサンプルの場合, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ を測定溶媒に用いても, アシル転移による変化はないことが判明した。

(2) NMR 測定条件の設定 (定量性確保のためのデカップリングモードと緩和時間の考慮)

^1H NMR においては現れるシグナルの面積 (積分値) は相当するプロトンの数と比例する。しかし, 一般的な ^{13}C NMR 測定条件 (コンプリートデカップリング) においては, プロトン共鳴周波数領域を常時ブロードバンド照射する為, ^1H - ^{13}C 間の交差緩和による核オーバーハウザー効果 (NOE) によりプロトンが結合している炭素シグナルの強度が最大で 200% まで増大することとなり定量性が確保できない。そこでデカップラーを, 待ち時間の間は切り ^{13}C 核のパルス励起と同時に作動させ自由誘導減衰 (FID) の取り込み終了とともに切ることにし, 交差緩和を発生させず, 強度への NOE の影響を無くしてシグナルを得る測定法を用いた (一般に逆ゲート付きデカップリング法と呼ばれる。Varian の装置においては, $\text{dm} = \text{'nny'}$ という設定がこれに相当する)。ただしこの測定では, 積算毎に ^{13}C 核のみならず交差緩和する対象の ^1H 核についても緩和が完全になされる待ち時間 ($d1$) を設定しなければならない。すなわち, パルス幅を 90° 相当とした際対象の ^{13}C 核とそれに結合している ^1H 核の縦 (スピン-格子) 緩和時間 T_1 をそれぞれ測定し, 得られた中での最長の時間の 5 倍以上の時間を求める必要がある。そこで, 1-6 それぞれ 20 mg について $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 溶液 (0.75 ml) を作成し, ^1H (90° パルス, $\text{pw} = 9.1\mu\text{s}$, $\text{tpwr} = 56\text{ dB}$) および ^{13}C (90° パルス, $\text{pw} = 9.5\mu\text{s}$, $\text{tpwr} = 58\text{ dB}$) の T_1 を反転磁化法で測定し, それらの結果を Table 1 (^1H) および Table 2 (^{13}C) に示した。すなわち, 6 (グリセリン) の 2 位炭素の T_1 が最長の 3 s であり, $d1$ を 15 s に設定することとした。

(3) 標準試料 (1-6) における ^{13}C NMR ケミカルシフトの分離

1-6 の標準試料について測定溶媒 $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ における δ 60-80 ppm 領域のスペクトルを Fig. 1 に示した。この結果は, 例えば ChemDraw (Chembridge Software) に

Table 1 ^1H -NMR chemical shifts and spin-lattice relaxation time (T_1) of 1-6

Compounds	Chemical shift (δ in ppm) ^{a)} / T_1 (s) ^{b)}		
	1-CH ₂	2-CH	3-CH ₂
1 (1,2,3-tripalmitoyl G ^{c)})	4.48/0.46 $\pm$ 0.01	5.60/1.21 $\pm$ 0.03	$\leftarrow$ 1-CH ₂
2 (1,2-dipalmitoyl G)	4.61/0.60 $\pm$ 0.01	5.62/1.44 $\pm$ 0.03	4.16/0.57 $\pm$ 0.01
3 (1,3-dipalmitoyl G)	4.55/1.48 $\pm$ 0.06	4.51/1.20 $\pm$ 0.01	$\leftarrow$ 1-CH ₂
4 (1-monopalmitoyl G)	4.67/1.25 $\pm$ 0.01	4.43/1.88 $\pm$ 0.01	4.12/1.12 $\pm$ 0.04
5 (2-monopalmitoyl G)	4.28/0.96 $\pm$ 0.01	5.61/2.37 $\pm$ 0.06	$\leftarrow$ 1-CH ₂
6 (G)	4.10/1.76 $\pm$ 0.02	4.27/2.66 $\pm$ 0.03	$\leftarrow$ 1-CH ₂

^{a)} Chemical shifts are referenced to TMS (tetramethylsilane) as 0.00 ppm.

^{b)} Spin-lattice relaxation times (T_1) were measured using the process employed in the inversion recovery experiments.

^{c)} G=glycerine

Table 2 Actual and simulated ^{13}C -NMR chemical shifts and spin-lattice relaxation time (T_1) of 1-6

Compounds	Chemical shift (δ in ppm) ^{a)} / T_1 (s) ^{b)}		
	Simulated chemical shift (δ in ppm) ^{c)}		
	1-CH ₂	2-CH	3-CH ₂
1	62.67/0.48 $\pm$ 0.07 67.2	69.79/0.33 $\pm$ 0.02 74.8	$\leftarrow$ 1-CH ₂
2	63.35/0.45 $\pm$ 0.01 67.0	73.26/0.80 $\pm$ 0.02 78.1	61.00/0.56 $\pm$ 0.01 63.5
3	66.08/0.58 $\pm$ 0.02 71.1	67.69/0.94 $\pm$ 0.05 70.5	$\leftarrow$ 1-CH ₂
4	66.78/0.96 $\pm$ 0.07 70.3	70.97/2.21 $\pm$ 0.02 74.4	64.34/1.25 $\pm$ 0.09 66.8
5	61.51/0.95 $\pm$ 0.03 63.3	77.01/1.80 $\pm$ 0.08 81.4	$\leftarrow$ 1-CH ₂
6	64.41/2.10 $\pm$ 0.01 66.6	73.69/3.01 $\pm$ 0.03 77.7	$\leftarrow$ 1-CH ₂

^{a)} Chemical shifts are referenced to TMS (tetramethylsilane) as 0.00 ppm.

^{b)} Spin-lattice relaxation times (T_1) were measured using the process employed in the inversion recovery experiments.

^{c)} CS Chem NMR version 5.0 (Chembridge Software Corp., Chembridge CA, USA)

添付している ^{13}C NMR のシミュレーションソフトの計算 (Table 2) 上は同一の位置となる 1 の 1,3 位炭素, 2 の 1 位炭素, 4 の 3 位炭素および 6 の 1,3 位炭素/3 の 1,3 位炭素と 4 の 1 位炭素/2 の 3 位炭素と 5 の 1,3 位炭素/2 の 2 位炭素と 6 の 2 位炭素のそれぞれが分離している。一方, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ (1:1) 混合溶媒を用いた場

合, 2 の 3 位炭素と 5 の 1,3 位炭素は δ 64 ppm 付近に, 1 の 1,3 位炭素, 2 の 1 位炭素および 6 の 1,3 位炭素は δ 67 ppm 付近に, そして 1 の 2 位炭素と 4 の 2 位炭素は δ 73 ppm 付近にそれぞれ重なって観測された。以上の結果は, $\text{C}_6\text{D}_6\text{N}$ を溶媒として選択したことが, 溶解性だけでなく溶媒効果によりシグナルを分離させるという点で

Fig. 1 Part of the ^{13}C NMR spectra of compounds 1-6 showing glycerine moieties (δ 60-80 ppm)

These spectra (100 MHz) were recorded in pyridine- d_5 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) at 35°C .

も、有利であることを示したものである。

2. ^{13}C NMR と HPLC による定量性の評価

(1) HPLC による 1-5 の分離条件および補正係数の検討

HPLC によりモデル試料の定量分析を行った。分離条件は既報²⁾に準じた。しかし既報²⁾では 2 と 3 および 4 と 5 は分離されておらず、同一のピークとして扱われている。そこで、より分離能を向上させるために、試料の注入量を少なくし、セミ分取用の内径 10 mm、長さ 250 mm の逆相 ODS カラムを用いたところ 1-5 を各々分離することが出来た。Table 3 に 1-5 の保持時間、絶対検量線、その相関係数および 1 を基準とした場合のそれぞれの質量 $10\mu\text{g}$ における RI 検出器の相対感度をそれぞれ示した。なお絶対検量線の作成については、1-5 それぞれについて 5 回づつ 2, 6 および $12\mu\text{g}$ 相当量を注入して得られた RI 信号の面積値をもとに作成した。

(2) 評価用試料の HPLC 分析

1-4 が一定量混合された標準脂質 $30\mu\text{g}$ を HPLC 分析し 1-4 を定量したところ、1: $10.12 \pm 0.30\mu\text{g}$, 2: $3.20 \pm 0.13\mu\text{g}$, 3: $6.60 \pm 0.26\mu\text{g}$ および 4: $9.73 \pm 0.31\mu\text{g}$ (平均値 $\pm$ 標準偏差, $n=5$) であった。1: 2: 3: 4 の重量比は 1: 0.316: 0.652: 0.961 (2 と 3 の和は 0.968, 平均値) であり、また 2 と 3 の比がおよそ 1: 2 であった。

(3) 評価用試料の ^{13}C NMR 分析

標準脂質 30 mg を 0.75 ml の $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ に溶解させ、 90° パルス幅 (pw: $9.5\mu\text{s}$), d1: 15 s, 測定範囲を δ 50~100 ppm でデジタルフィルターを用い、逆ゲート付きデカップリング法で測定した。測定は 1200 回積算し、化合物 2-4 の 2 位に帰属される炭素の面積値を 1 に対する比として求めた。1: 2: 3: 4 の比は 1: 0.483 ± 0.010 : 0.936 ± 0.021 : 2.423 ± 0.044 となった (平均値 $\pm$ 標準偏差, $n=5$)。得られた比率 (モル比) を重量比にすると分子量 (1: 807.3, 2 および 3: 568.9, 4: 330.5) >, 1: 0.340: 0.660: 1.012 (2 と 3 の和は 1, 平均値) となる。すなわち ^{13}C NMR (モル比) と HPLC (重量比) 間でほぼ一致した。

なお、検出限界は ^{13}C NMR が天然存在比 1% の炭素の安定同位体 (^{13}C) を測定しているため、感度が良くないので、個々の成分が絶対量として 0.75 ml の $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 溶液中に少なくとも 3 mg すなわち 4-8 μmol (S/N を考慮し、最大のシグナルがピリジン由来、既述の条件で 5 時間測定したとして) が必要であった。

3. ジアシルグリセリン商品の ^{13}C NMR 測定

表示上 80% (重量比) のジアシルグリセリンを含む商品の、異なるロット 3 種類について、200 mg/0.75 ml $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 溶液を調製し、各々 5 回づつ測定し、得られたスペクトルの一例を Fig. 2 に示した。先の標準試料は構成脂肪酸がパルミチン酸 (16:0) のみであったが、本実験で

Table 3 HPLC results of 1-5

Compounds	Retention time (min) ^{a)}	Regression line ^{b)}	Regression value (r)	Response factor ^{c)} (weight)
1	11.05±0.03	y=5602.2x+114	0.992	1
2	7.21±0.02	y=5001.1x+310	0.988	0.895
3	6.76±0.02	y=4701.4x+78	0.994	0.936
4	5.38±0.02	y=4924.5x+1210	0.989	1.072
5	5.02±0.02	y=5502.8x-88	0.991	1.088

^{a)} Errors as standard deviation (n=15).

^{b)} Regression lines were calculated by the method of least squares at 2, 6, and 12 mg injections.

y : peak area, x : sample weight (μg)

^{c)} Relative response factors=peak area/peak area of compound 1 (calculated 10 μg each)

Fig. 2 Part of the ^{13}C -NMR spectrum of commercial diacylglycerin (Econa Cooking Oil, Kao Corp.) showing glycerine moiety (δ 60–80 ppm)

This spectrum was recorded in pyridine- d_5 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) at 35°C ; spectral width and frequency offset were set at the δ 50–100 ppm region under 64 K data points.

TG : triacylglycerine, DG : diacylglycerine, MG : monoacylglycerine

用いた商品はリノール酸 [18:2 (9, 12)], オレイン酸 [18:1 (9)] およびパルミチン酸などの混合物である。脂肪酸の違いが、グリセリンシグナルの化学シフトを微妙に変化させ、シグナル半値幅が広がるのが懸念されたが、Fig. 2 に示した様に、例えば δ 67.60 ppm の 1,3-ジアシル体 2 位由来シグナルの半値幅は 2.215–2.703 Hz の範囲であり、1,3-ジパルミトイルグリセリン (2) の 5 回の測定 (2.042–2.311 Hz) と結果とほぼ同様であり、脂肪酸による影響は本測定法では無視できるものと判断し

た。

今回測定した 3 種について、Table 4 にそれぞれ 2 位の炭素シグナルの面積値によるジアシルグリセリン率 (モル比および構成脂肪酸が全てオレイン酸と仮定した場合の重量比) と、ジアシルグリセリン中の 1,3-異性体率を示した。すなわち、これらの商品ではモル構成比ではおよそ 6 割の 1,3-ジアシルグリセリン、3 割の 1,2-ジアシルグリセリンそして 1 割の 1,2,3-トリアシルグリセリンと痕跡程度の 1-モノアシルグリセリンが存在して

Table 4 ¹³C-NMR quantitative profiles of glycerines in some commercial diacylglycerines

Commercial DG ^{a)} Lot.	DG/DG+TG ^{a)} mole ratio ^{b)} (%)	DG/DG+TG weight ratio ^{c)} (%)	1,3-DG/total DG mole ratio ^{d)} (%)
A	87.4	82.3	64.5
B	91.1	87.3	57.1
C	90.6	86.5	58.8

^{a)} DG : diacylglycerine, TG : triacylglycerine

Commercial DG : Ekona cooking oil (Kao Corp. Tokyo JAPAN)

^{b)} Percent ratio : $\frac{\text{C-2 area of 1,2-DG } (\delta 73.3) + \text{C-2 area of 1,3-DG } (\delta 67.2)}{\text{total C-2 areas [1,2-, 1,3-DG and 1,2,3-triacylglycerin } (\delta 69.8)]} \times 100$

^{c)} Calculate using the molecular weight relationship (all ester is presumed to consist of oleate)
DG mol wt. : 595.0, TG mol wt. : 885.3

^{d)} Percent ratio : $\frac{\text{C-2 area of 1,3-DG}}{\text{total DG C-2 areas (1,2- and 1,3-DG)}} \times 100$

いることが確認された。

一方、HPLC 分析でこの商品を分析してみると保持時間 5.5-7.3 min にジアシルグリセリン由来のピークが 4 本、9.0-12.8 min にトリアシルグリセリン由来のピークが 3 本現れるなど極めて複雑で解析不能であった。

要 約

¹³C NMR 法を用いて、トリアシルグリセリン、1,2-, 1,3-ジアシルグリセリン、1-, 2-モノアシルグリセリンとグリセリンが混合している物質の定量分析を行った。それらの構成比（モル比）は脂肪酸の種類にかかわらず¹³C NMR のシグナルの積分値から容易に得られることを明らかにした。

終わりに、¹³C NMR を用いた定量手法につきご教示いただいた藤倉一繁氏（バリアンテクノロジーズジャパン）に深謝いたします。

文 献

- 1) 渡邊浩幸・長尾知紀・後藤直宏・福島陽子・鬼沢孝司・田口浩之・大町登志子・安川拓次・内藤幸雄・島崎弘幸・板倉弘重：油化学, 47, 369 (1998).
- 2) HAMPSON, J.W. and FOGLIA, T.A.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 539 (1998).
- 3) NG, SOON : *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 749 (2000).
(平成 13 年 3 月 14 日受付, 平成 13 年 6 月 7 日受理)