トリグリセリド脂肪酸構成の分析法^{*1}

松居正己・渡辺 武・河端俊治

(1975年11月5日受理)

Analysis of Fatty Acid Structures of Triglycerides
by Preparative Gas-Liquid ChromatographyMasami MATSUI,^{*2} Takeshi WATANABE,^{*3}
and Toshiharu KAWABATA^{*4}

Analytical method for triglyceride (TG) structures has been studied by using preparative gas-liquid chromatography (GLC) in order to apply the method to fish lipids, and the results obtained may be summarized as follows:

1. A column of 6 mm i.d. × 50 cm, packed with 0.5% OV-1 (methyl silicone) on Shimalite W (80-100 mesh) was found suitable for the present purpose. The column temperature was programmed from 180° to 350°C with a rate of 6°C/min.

2. The efficiencies of 3 different sample collectors, each having 3 differenters, were compared. It was found that a simple glass tubing type of 3 mm i.d. gave the highest recoveries.

3. Triglycerides in soybean oil was separated by preparative GLC. The TG fractions were hydrolyzed with ethanol-potassium hydroxide to fatty acids, followed by conversion of fatty acids to methyl esters with diazomethane, which were then analyzed by GLC. It was found that the TG of C-50 and C-52 in the oil were composed of palmitic, stearic and oleic acids, and those of C-54, of stearic, oleic, linoleic and linolenic acids, respectively.

魚油を構成するグリセリドは数十種類におよび脂肪酸から構成されていることが知られている。グリセリドは化学構造が類似しているため、これらを単離し、その構造を明らかにすることは困難とされていたが、近年、クロマトグラフィーによる分離技術の発達にともない、トリグリセリド (TG) を分離することがある程度可能となってきた。¹⁻⁴⁾

そこで、著者らは魚油の TG の脂肪酸分布について研究する前段階として分取ガスクロマトグラフ (分取 GLC) による TG の分離、とくに分取条件について検討を行なった。また、試料として大豆油を用いてその TG の脂肪酸分布の測定を試み、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

装置および試薬 装置は島津製作所製ガスクロマトグラフ GC-5APF を使用した。

分取 GLC 用分離管として Fig. 1 に示すようなガラス管を試作し、0.5% OV-1 を Shimalite W (80~

^{*1} 魚油の中性脂質の脂肪酸構成に関する研究-II (Studies on the Fatty Acid Components in Neutral Lipids of Fish-II. 前報は本誌 41, (2), 202~215 (1975).

^{*2} (株) 島津製作所東京研究所 (Tokyo Research Laboratory, Shimadzu Seisakusho, Ltd., Shibasaki, Chofu-shi, Tokyo).

^{*3} 東京水産大学 (Laboratory of Fish Nutrition, Tokyo University of Fisheries, Konan, Minato-ku, Tokyo).

^{*4} 国立予防衛生研究所食品衛生部 (Department of Biomedical Research on Food, National Institute of Health, Shinagawa-ku, Tokyo)

100 mesh) にコーティングした先でん剤を用いた。

TG の標品は東京化成製および Applied Science Laboratory 社製のものを使用した。水酸化カリウム、エチルアルコール、エチルエーテル、クロロホルム、メチルアルコールは和光純薬製の特級品を用いた。

操作法 分取 GLC で標品の TG を分取した。分取した TG を加水分解後、ジアゾメタンによつて脂肪酸メチルエステルとして GLC で分析した。

TG の分取および脂肪酸メチルエステルの分析条件は Table 1 に示す。

Table 1. Analytical conditions for GLC

Analytical conditions	Preparative GLC for triglycerides	Analytical GLC for triglycerides	Analytical GLC for fatty acids
Apparatus	Shimadzu GC-5APF	Shimadzu GC-5APF	Shimadzu GC-6APF
Column	0.5 m × 6 mmφ	0.5 m × 3 mmφ	2 m × 3 mmφ
Column packing material	0.5% OV-1 on Shimalite 80-100 mesh	2% OV-1 on Shimalite 60-80 mesh	25% DEGS on Celite 545 60-80 mesh
Detector	FID	FID	FID
Column temp.	180°C-350°C	200°C-320°C	200°C
Program rate	6°C/min	3°C/min.	...
Carrier gas	Helium	Helium	Nitrogen

結果および考察

分取 GLC の分離管の検討 分取 GLC には通常、内径 6~10 mm の分離管が使用されている。この際、分離管の内径を大にすると分離が悪くなり、また、分析試料量が多過ぎた場合には分離が悪くなるばかりでなく、試料が瞬間的に気化しにくくなる。本実験ではこれらの点を考慮し改良実験を行なった。分取 GLC の分離管と分取管の構造は Fig. 1 に示してあるように、A の試料注入部は試料を注入した際、瞬間的に気化するように内径 3 mm とした。また、C の分離管は外径 8 mm、内径 6 mm とした。C で分離した TG を検出と同時に分取するために、B の分岐部で二方に分けた。一方は検出器へ導き、他方は分取管に導いた。B における分岐比は検出器側を 1 とした場合、分取管側を 9 になるように石英ビーズの抵抗管で調整した。

分取 GLC の充てん剤の検討 GLC による TG 分析についての報告は数多くある。⁵⁻⁷⁾ これらの報告では TG の分子が大きいため、耐熱性充てん剤と短い分離管 (内径 3~4 mm) が用いられている。本実験では固定相液体として OV-1 を用い、分取 GLC に用いるため、固定相液体の濃度を減ずる方法を採用した。固定相濃度は計算によつて求めた。その方法は TG を分離、同定し得る分析用 GLC 分離管 (長さ 0.5 m、内径 3 mm) の 2% OV-1 の充てん剤と分取 GLC 分離管 (長さ 0.5 m、内径 6 mm) の充てん剤の固定相液体の総量が等しくなるように計算した。

その結果、0.5% OV-1 が分析用 GLC の充てん剤と同じ分析条件で TG の分取 GLC 分離管の充てん剤として使用できることがわかった。

分取管の検討 分取 GLC の分取管にはいろいろな形状のものが考案されている。^{8,9)} 実験に用いた 3 種類の分取管を Fig. 2 に示す。

Fig. 2 に示した I のタイプの分取管は内径 3, 6 または 8 mm のガラス管である。II のタイプは I の

Fig. 1. Diagram of a preparative column and a sample collector.

Number of collector	Shapes of sample collector
I	
II	<p>Packed with quartz powder</p>
III	

Fig. 2. Diagrams of sample collectors for a preparative gas chromatograph.

タイプのガラス管内に石英粉末 (80~200 mesh) を充てんしたもので、III のタイプはガラス管内にオリフィスを取り付けたものである。

これらの分取管を分取 GLC に取り付け、それぞれについて、トリステアリン (TS) 20~200 μ g の分取を行なった。分取した TS の回収率は分析用 GLC によつて求めた。その結果を Table 2 に示してある。I のタイプについて述べると内径 3 mm の分取管の TS 捕集率が最も高かった。また、II, III のタイプの分取管について述べると、内径 3 mm の分取管による捕集効率が I タイプにくらべ低いような結果が得られているが、その理由は II, III のタイプのものはその構造が複雑なため、TS の溶媒による抽出に問題があるものと考えられる。したがつて、TG の分取管としては単純な形状のガラス管が適しているといえる。

Table 2. Comparison of efficiencies on the collection of tristearin by different types of collectors equipped for a preparative gas chromatograph.

Collector types Sample size of tristearin	I			II			III		
	3 mm	6 mm	8 mm	3 mm	6 mm	8 mm	3 mm	6 mm	8 mm
(ug)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
20	100	75	75	90	60	45	90	60	70
50	118	84	80	86	78	80	70	80	60
100	98	86	78	68	74	96	96	95	91
200	99	81	66	94	83	86	84	92	67

大豆油トリグリセリドの脂肪酸構成 上記のような分析条件を基にして天然油脂の TG の分取と構成脂肪酸の検索を試みた。魚油 TG はその脂肪酸分布が複雑なために、比較的単純な脂肪酸よりなる大豆油の TG について検討した。

大豆油 100 μ g を用いて各 TG を分取 GLC によつて分取し、加水分解を行なつて脂肪酸組成を調べた。その結果を Table 3 に示す。Table 3 からわかるよう、炭素数 50 の TG の脂肪酸構成は 16:1, 18:0 および 18:1 で炭素数 52 の TG は 16:0, 18:0, 18:1 であり、炭素数 54 の TG は 18:0, 18:1, 18:2 および 18:3 であった。炭素数 54 の TG の脂肪酸構成から 16:0 が検出されたが、これは本実験の分取 GLC で TG が完全に分離できず、炭素数 52 の TG の一部が混入したものと考えられる。

本実験の分析条件下で TG の分取およびその脂肪酸構成の同定が可能であることが明らかになったので、次報は魚油を用いてその各 TG の脂肪酸構成について検討を加える。

Table 3. Fatty acid components of triglycerides in a soybean oil sample

Carbon number of triglycerides	Fatty acids	Proportion of fatty acid
50	16:1	45 (%)
	18:0	27
	18:1	27
52	16:0	26
	18:0	42
	18:1	30
54	16:0	27
	18:0	14
	18:1	23
	18:2	10
	18:3	26

文 献

- 1) C. LITCHFIELD: J. Am. Oil Chemists Soc. **42**, 489-857 (1965).
- 2) 池川信夫・松居正巳・吉田多摩夫・渡辺 武: 本誌, **38**, 1267-1274 (1972).

- 3) 松居正巳・渡辺 武・池川信夫： 同誌, **39**, 367-373 (1973).
- 4) 生物化学ハンドブック編集会： 生物化学ハンドブック, 第4版, 技報堂, 東京 1967, p. 692-709.
- 5) A. KUKSIS and C. BRECKENRIDGE: *Lipid*, **7**, 576-579 (1966).
- 6) R. WATTS and R. DILS: *ibid.*, **9**, 40-51 (1968).
- 7) 松居正巳・佐藤克哉・池川信夫： 衛生化学, **15**, 61-65 (1969).
- 8) T.H. PARLIMENT: *Anal. Chem.*, **45**, 1792 (1973).
- 9) D. VERDIN: *ibid.*, **43**, 1903 (1971).