

高速液体クロマトグラフィによる 油脂トリグリセリドの迅速分析

松	下		駿
多	田	芳	光
河	村	直	人
大	西	英	世
前	田	幸	伸
生	重	哲	男

Rapid Analysis of Triglycerides of Oils and Fats by High Speed Liquid Chromatography

Susumu MATSUSHITA
Yoshimitsu TADA
Naoto KAWAMURA
Eisei OHNISHI
Yukinobu MAEDA
Tetsuo IKUSHIGE

A rapid separation of triglycerides of oils and fats according to the chain length and degree of unsaturation has been made by high speed liquid chromatography with infrared monitoring (HLC-IR), using LS-410 ODS SIL as support and a mixture of acetonitrile and dichloromethane as mobile phase. The molecular weight and fatty acid composition of triglycerides were estimated by a chemical ionization mass spectrometer (CI-MS) coupled with a microcomputer system (MICON). Based on the results obtained, it is suggested that HLC-IR used in combination with CI-MS and MICON can provide more detailed information on the triglyceride structures.

1. はじめに

種々のトリグリセリド (TG) の複雑な混合物である植物油の分析は、TG を加水分解後、遊離脂肪酸をエステル化して揮発性物質に変えてガスクロマトグラフィ (GC) で行なう方法がある¹⁾。HLC による方法は、逆相クロマトグラフィにより TG を直接分離することができる。

Plattner ら²⁾は、種々の TG を ODS カラムに供し、アセトニトリル/アセトン等で溶出し、構成脂肪酸 (FA) の炭素数 (CN) と二重結合 (DB) の関係を示すパラメー

タ ECN と溶出容量との関係を説明した。

和田ら^{3,4)}も大豆油を HLC で分離分取し、GC と大型コンピュータにより TG の FA 組成を算出した。

一方、CI-MS は分子量の推定に有力であり、村田ら⁵⁾は数種の TG についてイオン化の方法を検討している。

筆者らは、アセトニトリル/メチレンクロリド系溶離液と ODS タイプの LS-410 を用いて、植物油を細かく分離できた。溶出成分を分取して、CI-MS により分子量を求め、MICON によって FA を算出し、TG と溶出容量の関係を示した。

2. 方法

〔1〕 HLC

高速液体クロマトグラフは HLC-803B (東洋曹達製), カラムは TSK-GEL LS-410 (ODS タイプ, 5μ) を直径 4 mm, 長さ 30 cm のステンレス管に充てんし, アセトニトリル/メチレンクロリド (60/40) を移動相に用いて, 流速 1.2 ml/min , 圧力 50 kg/cm^2 で測定した。検出は, 赤外線検出器 MIRAN-1A型 (東洋曹達製)⁶⁾ を用いた。

IR 5.75μ は, TG のカルボニル基の伸縮振動 ($\nu_c=0$) を選択的かつ高感度に検出する波長であり, 遊離脂肪酸などの影響を受けない。

〔2〕 CI-MS

質量分析装置は, JMS-D300 (日本電子製) を用い, アンモニアを反応ガスとする化学イオン化—質量分析法によって, TG の分子量を求めた。

〔3〕 MICON

自作製マイクロコンピュータ Lkit-16 (パナファコム

製) を用い, BASIC 言語により TG の脂肪酸組成を算出した。

3. 結果と考察

Fig. 1 (a), Fig. 1 (b) に植物油 (アマニ油, エノ油, オリーブ油, カカオ脂, ゴマ油, ダイズ油, 椿油, コーン油, ナタネ油, パーム油, ヒマシ油, 綿実油, ヤシ油, 落花生油) と動物油 (牛脂, 鯨油) のクロマトグラムを示す。

試料濃度, 30 mg/ml を $30\mu\text{ l}$ 注入すると, TG は 5~20分 の間に溶出する。

クロマトグラム上のピークは油脂の主成分である TG であり, 溶出容量は, 3種の FA の組合せによっていると考えられた。

IR 検出器は, GPC で高分子化合物を選択検出するのに有用である⁶⁾ が, 本方法においても TG を選択的に検出するために採用した。

溶出成分の解析例をナタネ油について説明する。

Fig. 2 において, ①, ②, ③, ④, ⑤, ⑥, ⑦を分

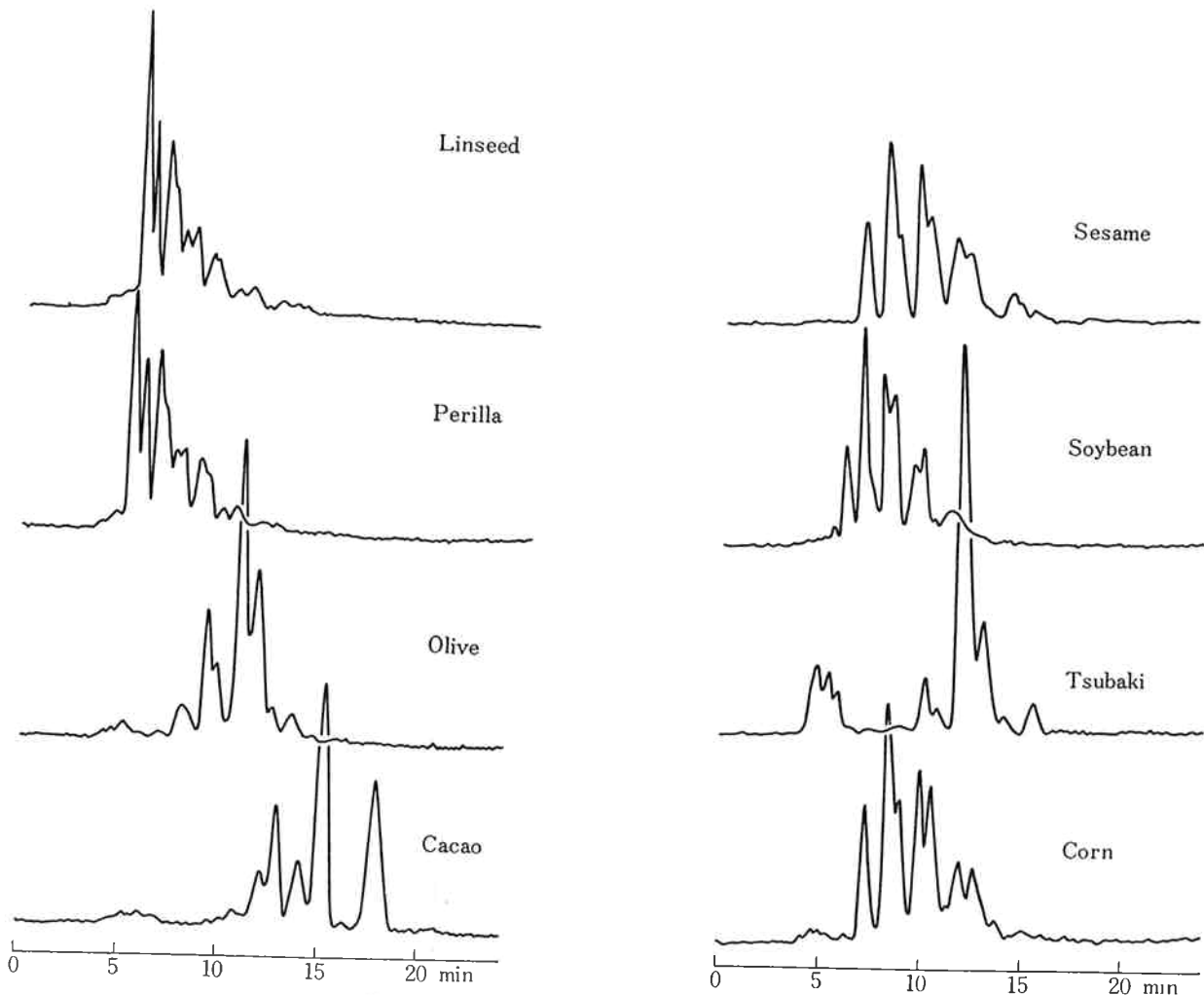


Fig. 1 (a) Chromatograms of oils and fats

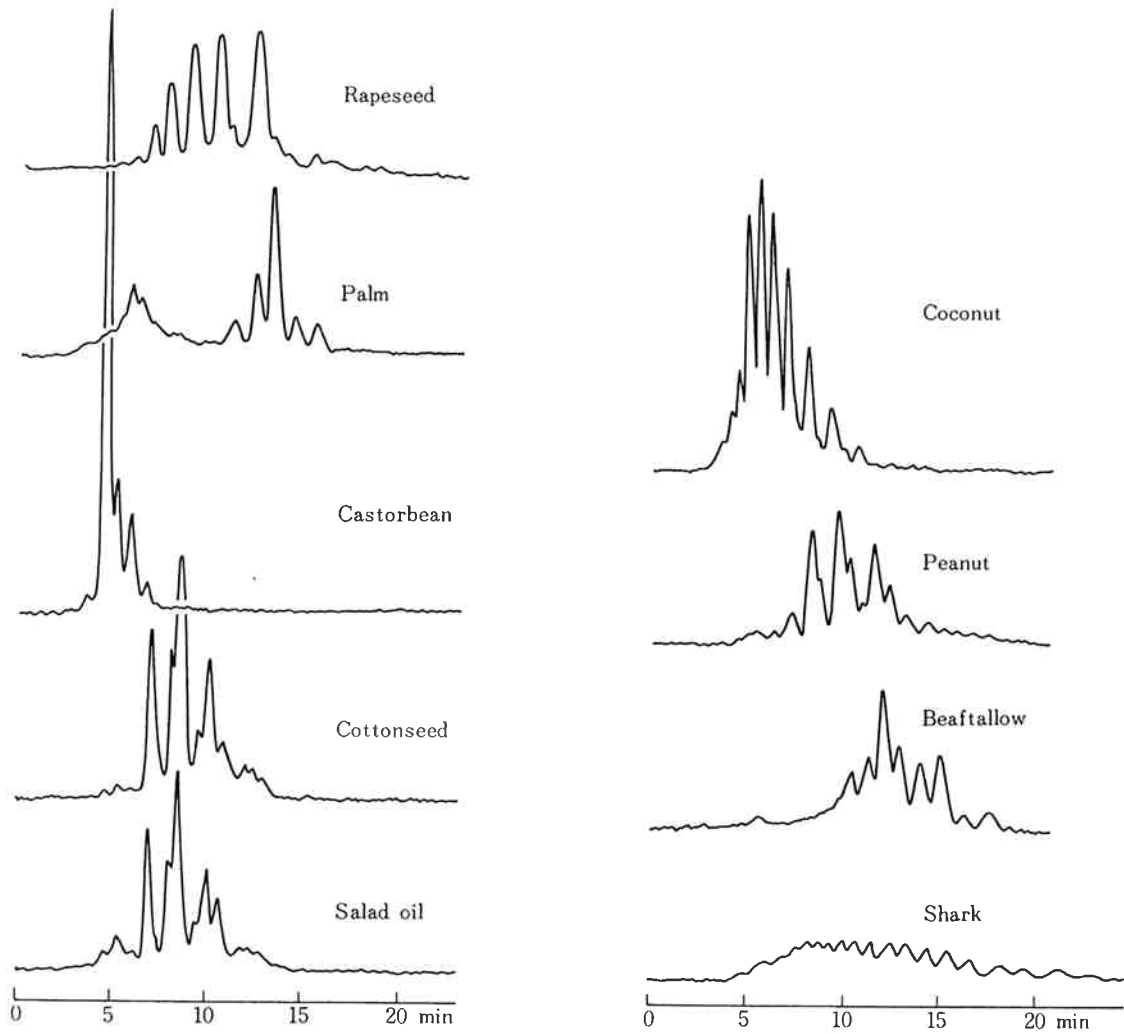


Fig. 1 (b) Chromatograms of oils and fats

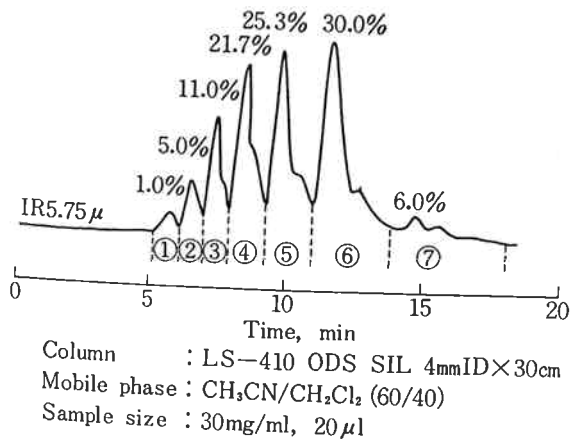


Fig. 2 Chromatogram of Rapeseed oil

取した。

直接導入による CI-MS スペクトルを Fig. 3 に示す。

Fig. 3 において上段はなたね油, 中段は分取成分⑤, 下段は分取成分⑥であり, 横軸に m/e , 縦軸に強度を示した。

なたね油の主な TG は分取成分⑥に含まれており, $m/e=902, 876, 850$ の 3 種の TG が見出された。

m/e は, 凝分子イオン (QM^+) であり, アンモニウムイオン (NH_4^+) を差引いた値が TG の分子量である。 $m/e=902$ において, TG の分子量は 884 となり, その脂肪酸組成は, 3 × オレイン酸 (OOO) か, リノレン酸 + 2 × ステアリン酸 (LeSS) か, オレイン酸 + リノール酸 + ステアリン酸 (OLS) が推定されたが, Table 1 より (OOO) が最も多く存在すると考えられた。

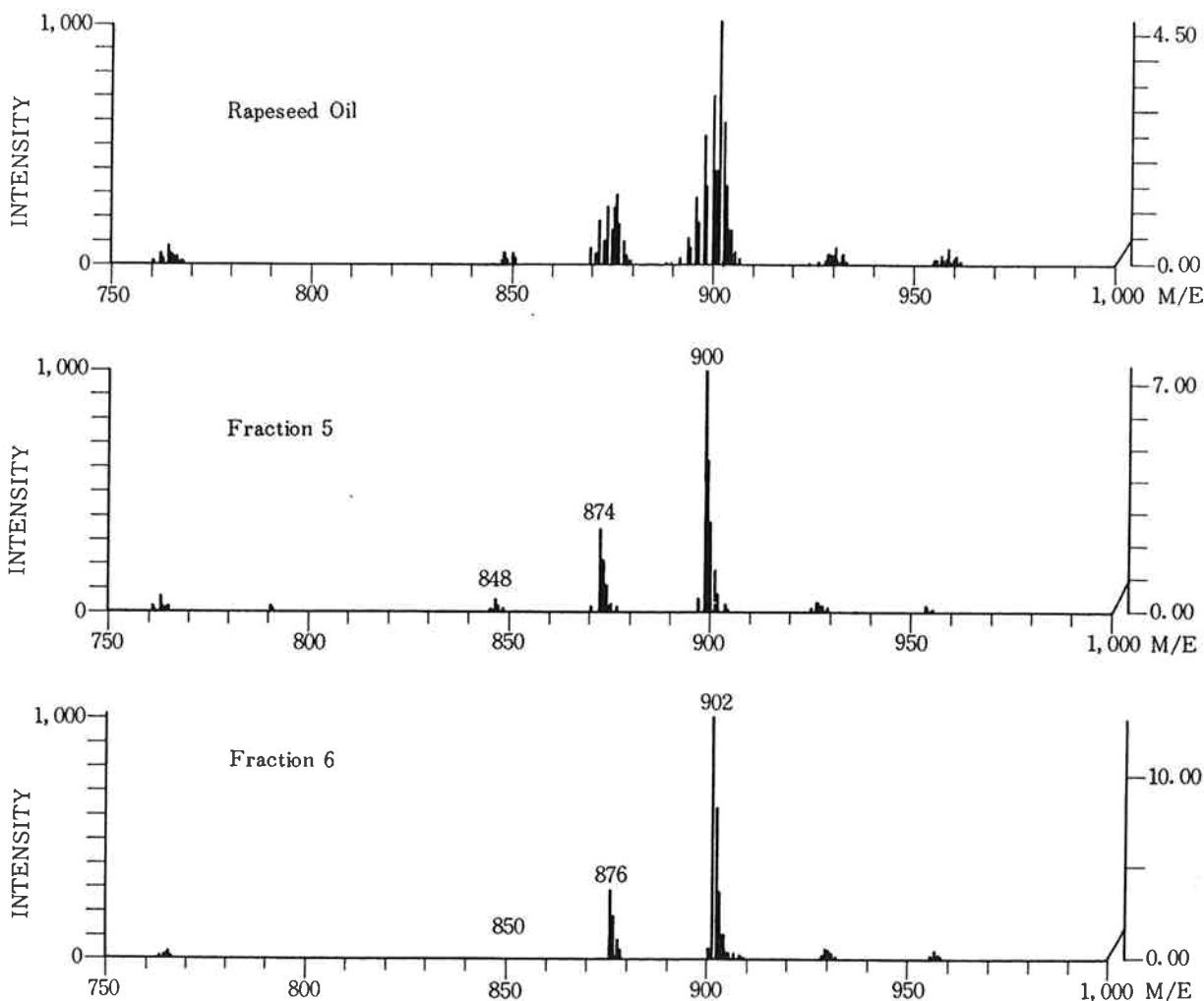


Fig. 3 Ammonia chemical ionization mass spectra of Rapeseed Oil, Fraction 5, and Fraction 6

Table 1 において、O (オレイン酸)、L (リノール酸)、Le (リノレン酸)、P (パルミチン酸)、S (ステアリン酸) である。

TG の脂肪酸組成について、1.単酸基トリグリセリド説 (Mono acid theory), 2.均等分布説 (Even distribution theory), 3.無差別分布説 (Random distribution theory) などの説がある。

先のナタネ油の脂肪酸組成は、P=5%、S=2%、O=53%、L=23%、Le=10% が解っているので無差別分布説に従って算出した値と IR の実測値を比較した結果、Table 1 に示すようにほぼ一致した。

また、Table 1 においてパラメータ ECN は、FA の炭素数: CN, 二重結合数: DB によって $ECN = CN - 2 \times DB$ で示され、溶出容量 (Ve) は

$$\log V_e = a \times ECN + b \quad (a, b: \text{定数}) \dots\dots(1)$$

の関係が得られた。

他の油脂においても HLC, CI-MS, MICON の使用により、溶出容量から TG の脂肪酸組成が予測できると思われる。

TG の分離を改良するために、アセトニトリル/メチレンクロリド=65/35 とすると(1)式の関係は、成立しなくなる。

Table 1 Triglyceride composition of rapessed oil

Peak No.	Fatty acid Composition	Molecular Weight	Triglyceride Composition		ECN
			Cal.	Exp.	
1	LeLeL	874	0.7	1.0	38
2	LLLe	876	1.7	5.0	40
	LeLeO	876	1.8		40
	LeLeP	850	0.2		40
			3.7		
3	LLL	878	1.1	11.0	42
	OLLe	878	8.8		42
	LLeP	852	0.8		42
			10.7		
4	OLL	880	9.6	21.7	44
	OOLe	880	11.1		44
	LLeS	880	0.3		44
	LLP	854	0.9		44
	OLeP	854	2.0		44
			23.9		
5	OOL	882	25.3	25.3	46
	LLS	882	0.3		46
	OLeS	882	0.7		46
	OLP	856	4.5		46
			30.8		
6	OOO	884	20.0	30.0	48
	OLS	884	1.6		48
	OOP	858	5.5		48
	OPP	832	0.4		48
			27.7		
7	OOS	886	2.0	6.0	50
	OPS	860	0.4		50
			2.4		

4. おわりに

本研究では、HLC/IRにより種々の油脂を簡便かつ迅速にパターン分析することができた。

一方、HLCは混合物を簡便かつ迅速に分離するという点では確かに有利であるが、現在のHLCの検出器は、化学構造を決めるための決定的な証拠とならず、HLCを補うために高度な解析装置を併用することが必要であること、さらに決定した化学構造と溶離挙動を解析するために、手軽なマイクロコンピュータを用いるのは、有意義であることを体験した。

最後に本研究をまとめるにあたり、山縣則子嬢、藤井喜代江嬢、岡本浩二氏の御協力に感謝します。

文 献

- 1) A. E. Pierce; *Silylation of Organic Compounds*, Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois.
- 2) R. D. Plattner; *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **54**, 511 (1977).
- 3) S. Wada; “油化学”, **26**, 95 (1977).
- 4) S. Wada; “油化学”, **27**, 579 (1978).
- 5) T. Murata; *Anal. Chem.*, **49**, 728 (1977).
- 6) S. Matsushita; “A & R”, **16**, 481 (1978).
- 7) “生物化学ハンドブック”, 技報堂, 74 (1972).