

報 文

高速液体クロマトグラフィーによるトリグリセリドの分離

川 端 省 三, 出 来 三 男*

ヤシ油, ダイズ油, その他 10 種の植物油のトリグリセリドを, Permaphase - ODS カラムを用い, アセトン - アセトニトリル混液を移動相とする HPLC 法により分離した。ヤシ油は 8 本のピーク, ダイズ油は 5 本のピークに分離される。ダイズ油の分離は GLC による分離よりピーク数が多い。ヤシ油及びダイズ油の HPLC における溶離液の GLC による分離, 並びに標準トリグリセリドの保持時間の比較から, この逆相系を用いる HPLC では, トリグリセリドの保持時間はその炭素数だけでなく, その不飽和度によっても異っていることを明らかにした。さらに, キャパシティーファクター(k')の対数とトリグリセリドの炭素数及び不飽和度には直線関係が認められた。

1 緒 言

油脂の分析は, 主としてガスクロマトグラフィー(以下 GLC と略記)により脂肪酸組成, トリグリセリド組成, ステロイドなど化学組成のほか, 屈折率, ヨウ素価, ケン化価などから油脂の種別の判定を行っている。しかし, 油脂は天然物であり, 同じ種類のもでも組成には変動があり, 種類が異っていても分析値が似ているものもある。

GLC によるトリグリセリドの分離は 試料を直接装置に注入するだけでよく, 油脂の種別を判定するために簡便で迅速な方法であるが, 200 から 350 の高い温度で行わなければならないため, 条件の僅かな違いでクロマトグラムが異ったり, 各ピークはアシル基の炭素数の総和として現れ, 構成する脂肪酸の不飽和度に関する知見が全く得られないなどの難点がある。そのため, 炭素数 18 の脂肪酸を主成分とするダイズ油, 綿実油などの植物油は相互によく類似したガスクロマトグラムを示し種別の判定が困難となる。

これまで高速液体クロマトグラフィー(以下 HPLC

と略記)による脂質の分離はステロイドなどの特定の化合物を対象としており¹⁾トリグリセリド相互の分離は分子サイズによって分離する GPC カラムによる方法が試みられているが²⁾分離は不十分で油脂の鑑別には使用できない。

最近, Wada ら³⁾は, カラムに μ - Bondapak - C16 を用い, メタノール - クロロホルム混液を移動相とする HPLC によりダイズ油を分離し, そのトリグリセリド組成を決定している。

ここではカラムに Permaphase - ODS を用い, アセトン - アセトニトリル混液を移動相とする HPLC 法により, 各種の植物油脂のトリグリセリドを分離し, その判別に有用であることを明らかにした。さらに, キャパシティーファクター(k')とトリグリセリドのアシル基の炭素数, 及びその不飽和度との間には直線関係があることを知ったので報告する。

2 実 験

2・1 試 料

使用した植物油は市販のものをそのまま用いた。標準トリグリセリド(トリカプリン, トリラウリン,

* 大蔵省関税中央分析所 271 千葉県松戸市岩瀬 531

トリミリスチン, トリステアリン, トリパルミチン, トリパルミトレイン, トリオレイン, トリリノレイン) はシグマ社製のものをを用いた。

2・2 HPLC

高速液体クロマトグラフは島津デュボン 830 型で, 示差屈折計を検知器とし, 分離カラムは内径 2.1mm 長さ 25cm で, Permaphase - ODS (Zipax のシリカ表面にオクタデシルシリルクロリドを反応させたもの) を充てんしたものを用いた。⁴⁾

カラム槽温度は室温, 検知器温度は 25 とした。移動相はアセトン(試薬特級)及びアセトニトリル(高速液体クロマトグラフ用)を種々の割合で混合して用いた。

試料は, 約 1 μ l を液状のものはそのまま, ペースト状のものは加温して溶融し, マイクロシリンジを用いて装置に注入した。

2・3 GLC

ガスクロマトグラフは島津 GC - 5APF で, FID 検知器を用い, カラムは chromosorb GAW(60 ~ 80 メッシュ)を固定相担体とし, Dexsil 300GC を充てん剤としたガラスカラム(内径 3mm, 長さ 30cm)で, カラム

温度は 200 ~ 350 , 5 /min で昇温を行い, キャリヤーガスは He(60ml/min), 注入口温度は 350 とした。

3 結果及び考察

3・1 標準トリグリセリドの分離

Fig.1 は標準試薬の各トリグリセリドの混合物について HPLC で分離したもので, 同じ条件でヤシ油を分離したものと比較した。トリカプリン, トリラウリン, トリミリスチン及びトリステアリンの飽和のトリグリセリドは対数的に溶出時間が増大している。しかし, 不飽和脂肪酸からなるトリオレイン及びトリリノレインでは, 溶出時間が早く, 不飽和度が高くなるほど溶出時間が短いことが認められる。また, ヤシ油のクロマトグラムで, ピーク C₃₀, C₃₆ 及び C₄₂ の溶出時間は, それぞれ標準試薬のトリカプリン, トリラウリン及びトリミリスチンの溶出時間に対応している。

C₃₆ の飽和トリグリセリドの分子量は 644 であり, C₃₈ の飽和トリグリセリドの分子量 668 よりも 28 質量数が大きい。このような質量数差の化合物の分離は, 分子サイズによって分離する GPC カラムでは不可能であり, トリグリセリドは単一のピークとして検出される。しかし, Permaphase - ODS を固定相とした逆相

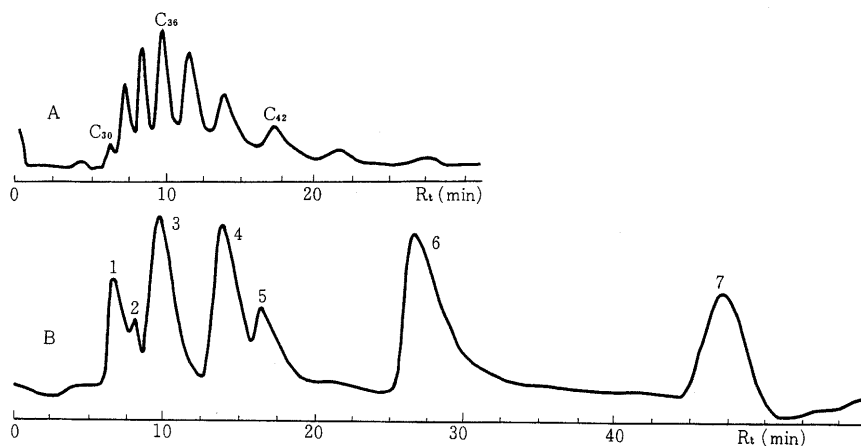


Fig.1 Chromatograms of triglycerides by HPLC

A : coconut oil and B : standard mixtures.

Peak1 : Tricaprin, 2 : Trilinolein, 3 : Trilaurin, 4 : Triolein,

5 : Trimyristin, 6 : Tripalmitin, 7 : Tristearin.

Column : permaphase-ODS, Eluent : acetone-acetonitrile(45 : 55v/v)

Flow rate : 0.138ml/min, Pressure : 30kg/cm², Detector : 16 × 10⁻⁵RIU

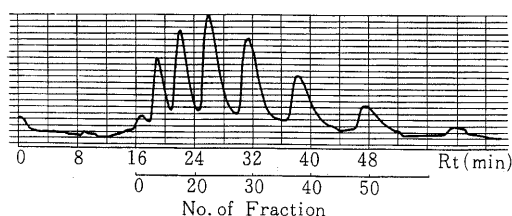


Fig.2 Chromatogram of coconut oil by HPLC
 Column:permaphase-ODS, Eluent: acetone-acetonitrile(45:55v/v), Flow rate: 0.094ml/min, Pressure:20kg/cm²
 Detector:16 × 10⁻⁵RIU.

分配クロマトグラフィーでは、固定相及び移動相への分配の差を利用して混合物の分離が行われるため、分子量の差だけでなく不飽和度も分配に大きく関与しているものと考えられる。

3・2 ヤシ油のトリグリセリドの分離

Fig.2にヤシ油のトリグリセリドをHPLCにより分離したクロマトグラムを示す。ヤシ油においては8つのピークに分れ、このクロマトグラムはGLCのクロマトグラムと類似しているがピーク数はGLCの場合よりも少ない。ヤシ油のHPLCにおける溶離液を60μlずつ分取し、各フラクションをGLCによって分離したものがFig.3である。各フラクションの主要ピークはGLCの場合と同様に、ほぼGLCでのトリグリセリド分布に対応して規則的に溶出している。

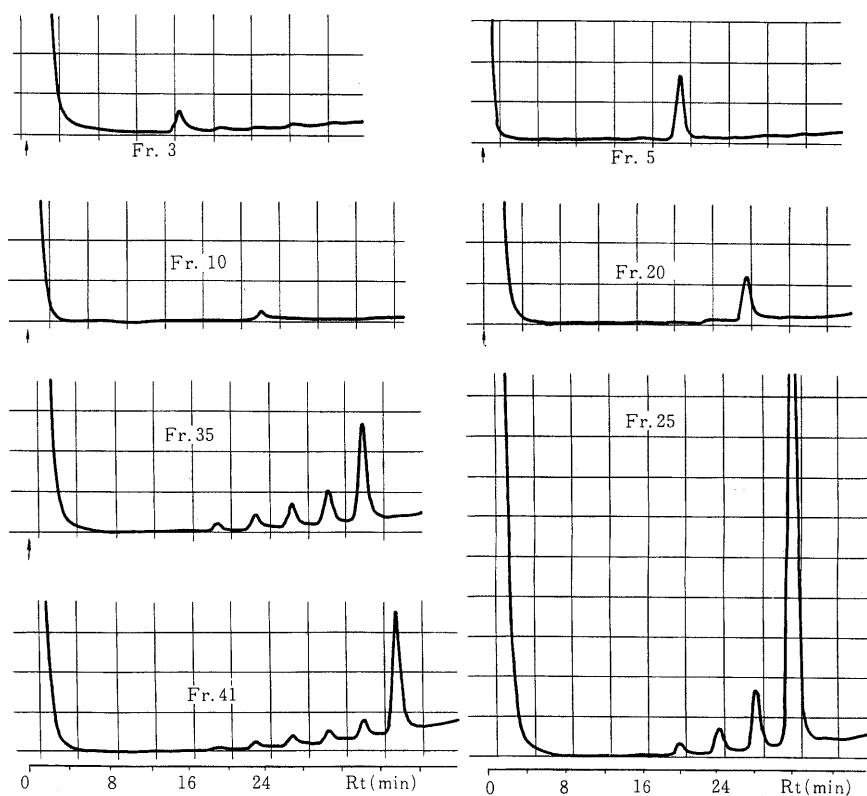


Fig. 3 Gas chromatograms of each fraction of coconut oil fractionated by HPLC
 Fraction numbers are the same as cited in Fig.2.
 Column:Dexsil 300GC, glass column 3mm × 30cm, Column temperature:200
 - 350 , 5 /min, FID, He:60ml/min .

3・3 ダイズ油のトリグリセリドの分離

ダイズ油のトリグリセリドの HPLC におけるクロマトグラムを Fig.4 に示す。GLC による分離では、トリグリセリドのアシル基の炭素数が C_{54} のピークを最大として、 C_{50} 、 C_{52} の 3 本しか得られないが、HPLC では 5 本のピークに分れ、HPLC による分離は GLC とは異っている。ダイズ油の HPLC による各ピーク成分を分取し、これらの各フラクションについて GLC により分離すると、Fig.5 に示すように各フラクションとも C_{50} 、 C_{52} 、 C_{54} または C_{52} 、 C_{54} のピークが現われている。このことはトリグリセリドの不飽和度の相異によっても分離されていることを示唆するものである。

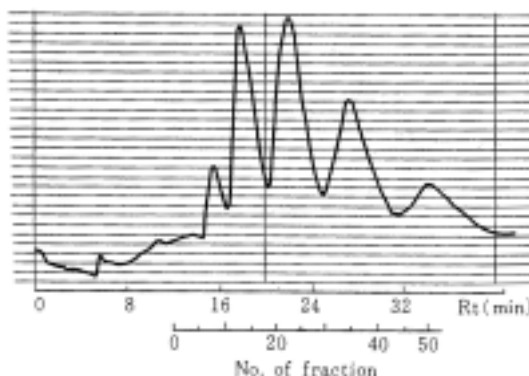


Fig.4 Chromatogram of soyabean oil by HPLC
Column : permaphase-ODS, Eluent : acetone - acetonitrile(60:40v/v),
Flow rate : 0.14ml/min, Pressure : 30kg/cm²,
Detector : 16×10^{-5} RIU.

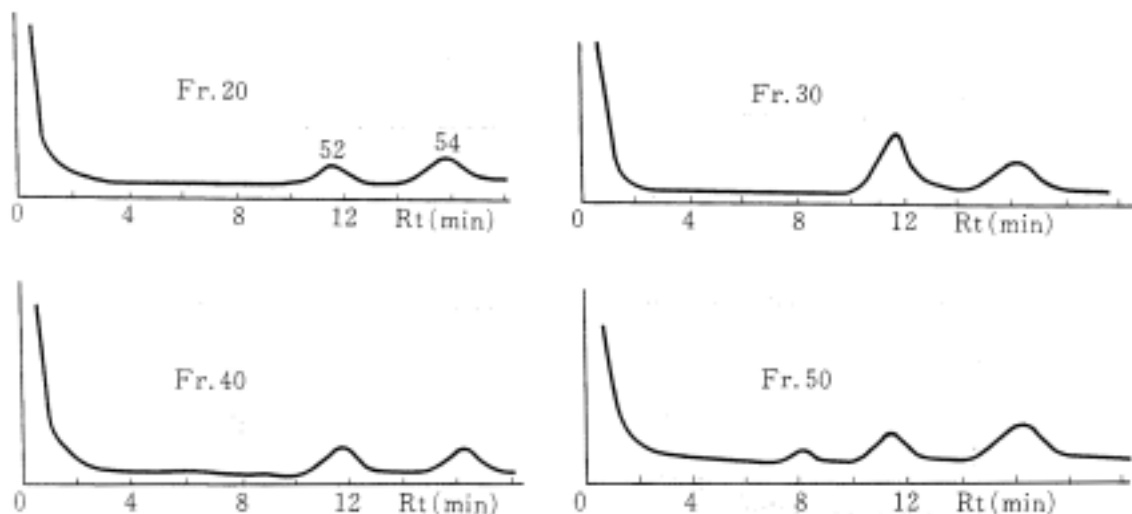
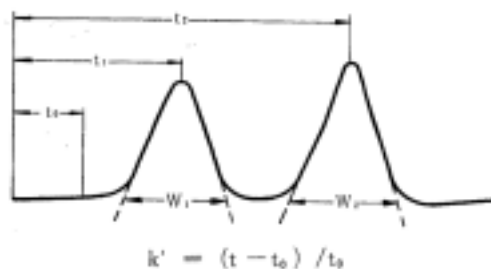


Fig.5 Gas chromatograms of each fraction of soyabean oil fractionated by HPLC
Fraction numbers are the same as cited in Fig.4.
Column temperature : 350 , other conditions are the same as cited in Fig.3.

3・4 キャパシティーファクター(k')とトリグリセリドの炭素数

ヤシ油の HPLC における各ピークについて、3・1 及び 3・2 で同定したトリグリセリドのアシル基の炭素数と k' の関係を Fig.6 に示した。 k' はクロマトグラムから次のようにして求めた⁵⁾



ただし, t_0 はカラムに保持されない化合物が溶出する位置で四塩化炭素を注入して求めた。

Fig.6 のように, k' の値はトリグリセリドのアシル基の炭素数に対応して対数的に増大し, その勾配は移動相の組成及び流速の変化にかかわらずほぼ一定であり, アセトンの含有量の多い移動相では各トリグリセリドの溶出は早くなる。

また, Fig.7 に示したように, k' は同族化合物では不飽和の数に対応して同じ勾配の直線関係を示している。

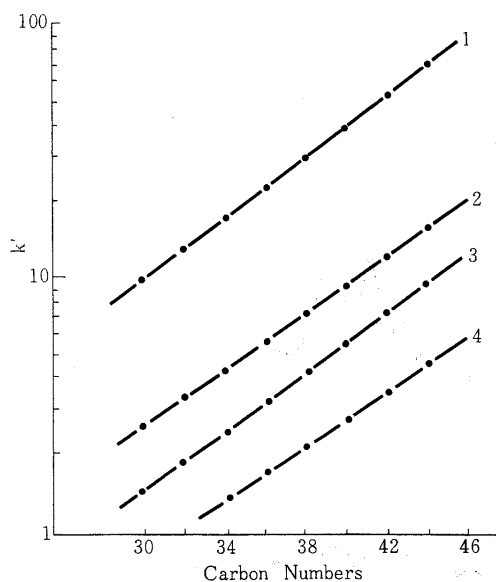


Fig.6 Relation of capacity factor(k') and carbon numbers of acyl groups of tri-glyceride in coconut oil
Column : permaphase-ODS, Detector : 16×10^{-5} RIU, Composition of eluents are as follows :

No.	acetone : acetonitrile		flow rate
1	45	55 (V/V)	0.176 ml/min
2	50	50	0.176
3	55	45	0.140
4	60	40	0.140

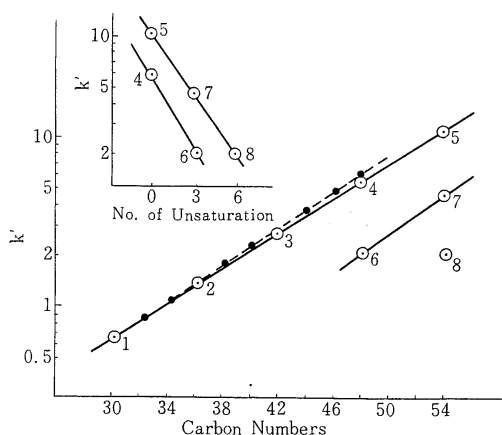


Fig.7 Relation of capacity factor(k') and carbon numbers of acyl groups of triglyceride
---●--- Coconut oil
—○— Authentic sample
1 . Tricaprin 2 . Trilaurin
3 . Trimyristin 4 . Tripalmitin
5 . Tristearin 6 . Tripalmitolein
7 . Triolein 8 . Trilinolein
Conditions are the same as cited in Fig.1

Table1 に, k' , 理論段数(N), 理論段高さ(H), 及び分離係数(R_s)を示した。これらの値はヤシ油のクロマトグラムから求めた。 C_{34} と C_{32} のトリグリセリドの R_s は 1 で, C_{32} 以下の場合, $R_s < 1$, C_{34} 以上では $R_s > 1$ となっている。 $R_s = 1$ のとき 4 分離であり, 分離ピークがガウス分布をしている場合, 両成分の重なりは 2% にすぎないが, 実際には重なりがもっと大きく, このことは Fig.3 から認められる。

Table1 Values of capacity factor(k'), theoretical plates(N), height of theoretical plates(H), separation factor(α) and resolution(R_s)

Carbon Number	30	32	34	36	38	40	42
$k' = (t - t_0)/t_0$	0.54	0.75	1.00	1.33	1.75	2.30	3.04
$N = 16 (t/w)$		466	576	784	900	1006	
$H = L/N$ (mm)		0.54	0.43	0.32	0.28	0.25	
$\alpha = k'_2/k'_1$	1.38	1.33	1.33	1.31	1.31	1.32	
$R_s = 2(t_2 - t_1)/(w_1 + w_2)$	0.76	1.00	1.19	1.42	2.09		

3・5 各種の油脂のHPLC

各種油脂について同一条件で測定したHPLCのクロマトグラムをFig.8及びFig.9に示した。

パーム核油はヤシ油と比較的によく似た脂肪酸組成を有しており、クロマトグラムもヤシ油のものに類似している。

アマニ油、ピーナッツ油、カカオ脂はFig.4で示したダイズ油と同様に、主に炭素数18の脂肪酸から成るトリグリセリドから成っており、これらのガスクロマトグラムは互いによく似ているが、不飽和度が異なるため、HPLCにおけるクロマトグラムは互いに著しく異なっている。アマニ油ではリノレン酸が多く、最初に出るピークはトリリノレンと考えられる。

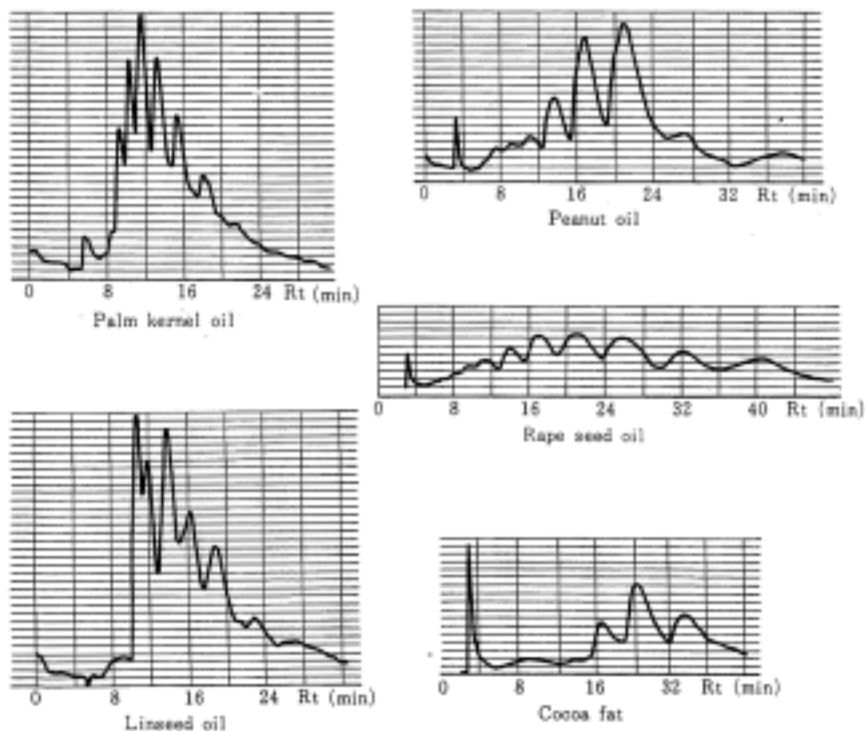


Fig.8 Chromatograms of various vegetable oil by HPLC

Column : permaphase-ODS, Eluent : acetone-acetonitrile(60 : 40V/V),
Flow rate : 0.248ml/min, Pressure : 50kg/cm², Detector : 16×10^{-5} RIU.

ナタネ油は炭素数 20 の脂肪酸を 5% 程度含むため、トリグリセリドのガスクロマトグラムも他のものとやや異っているが、 C_{54} のトリグリセリドが非常に多く、GLC の測定条件によってはピーナッツ油とよく似たパターンになるが、HPLC では非常な相異が認められる。

キリ油はトリリノレインを主成分とする乾性油であり、最初にトリリノレインの強いピークが検出される。また、米ヌカ油、綿実油、アーモンド油においても特徴的なクロマトグラムを与え、これらの油脂相互の鑑別は HPLC 法によって容易に行うことができる。

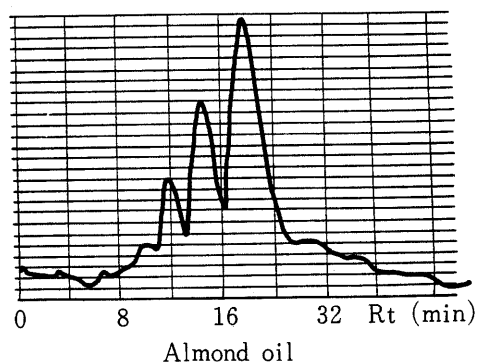
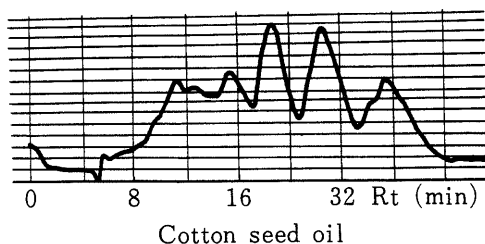
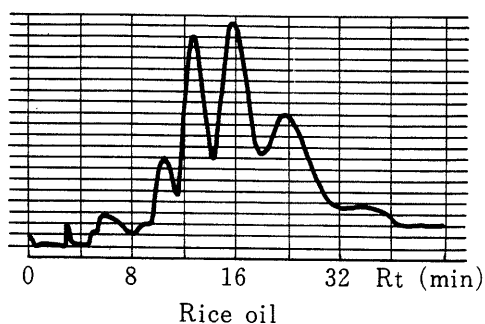
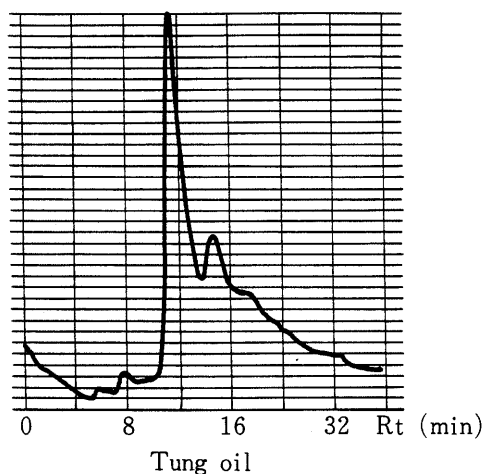


Fig.9 Chromatograms of various vegetable oil by HPLC
Conditions are the same as cited in Fig.8.

文 献

- 1) K. Kiuchi, T. Ohta and H. Ebine: *J. Chrom. Sci.*, **13**, 461(1975).
- 2) M. J. Cooper and M. W. Anders: *J. Chrom. Sci.*, **13**, 407(1975).
- 3) S. Wada, C. Koizumi and J. Nonaka: 油化学, **26**, 96(1977).
- 4) J. J. Kirkland: *Anal. Chem.*, **43**, 12, 36A(1971).
- 5) 波多野博行編: 化学の領域増刊 **102 号** “高速液体クロマトグラフィー”, (1973).

Analysis of Triglyceride of Vegetable Oils by High Pressure Liquid Chromatography

Shozo KAWABATA and Mitsuo DEKI*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance, 531, Iwase, Matsudo - shi, Chiba - ken, 271, Japan.

The technique of high pressure liquid chromatography(HPLC) was applied to the separation of triglyceride of coconut oil, soyabean oil and other vegetable oils, using a column packed with permaphase-ODS and a solvent of acetone-acetonitrile mixture. The triglycerides were separated into eight peaks in coconut oil, five peaks in soyabean oil and some peaks in other vegetable oils.

It was found that not only the carbon number but also the degree of unsaturation of triglyceride gave different retention time, from the result of the GLC analysis of fraction eluted by HPLC and the comparison of the authentic mixture of triglycerides. Moreover, a linear relationship between the logarithms of capacity factor(k') and the carbon number of triglycerides, and a linear relationship between the k' and the degree of unsaturation were found.

As a result, it was suggested that species of many vegetable oils can be estimated by the HPLC method.

Received Sept. 30, 1977