



|                  |                                                                                                                          |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | 逆相系高速液体クロマトグラフィーによる高度不飽和脂肪酸含有トリグリセリド分子種の分離改善に及ぼすカラム温度の影響                                                                 |
| Author(s)        | 澤田, 哲志; 高橋, 是太郎; 羽田野, 六男                                                                                                 |
| Citation         | 日本水産学会誌, 58(7), 1313-1317<br><a href="https://doi.org/10.2331/suisan.58.1313">https://doi.org/10.2331/suisan.58.1313</a> |
| Issue Date       | 1992                                                                                                                     |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/52079">https://hdl.handle.net/2115/52079</a>                                        |
| Rights           | © 1992 公益社団法人日本水産学会                                                                                                      |
| Type             | journal article                                                                                                          |
| File Information | JSFS58_1313.pdf                                                                                                          |



## 逆相系高速液体クロマトグラフィーによる高度不飽和脂肪酸含有 トリグリセリド分子種の分離改善に及ぼすカラム温度の影響

澤田 哲 志, 高橋是太郎, 羽田野六男

(1991 年 10 月 2 日受付)

Effect of Column Temperature on Improvement of Resolution in Separating  
Triglyceride Molecular Species Containing Highly Unsaturated Fatty Acids  
by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography<sup>\*1,2</sup>

Tetsushi Sawada,<sup>\*3</sup> Koretaro Takahashi,<sup>\*3</sup> and Mutsuo Hatano<sup>\*3</sup>

By taking advantage of the low melting point of fish oil, chilled-column reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) was examined in order to obtain good resolution of triglyceride (TG) molecular species. TGs containing high proportions of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) were synthesized by using 90% pure EPA and DHA with a bacterial lipase. Four TG molecular species thus obtained were subjected to HPLC analysis, from which the difference in retention time, theoretical plate number, and resolution of the adjacent peaks were discussed in relation to the column temperature of the system. The lower the column temperature, the better the theoretical plate number and resolution. However, they reached a maximum at around  $-15^{\circ}\text{C}$ . It was concluded that low temperature, wherever it is practicable not to exceed the melting point, is the best temperature for fish oil TG molecular species analysis and fractionation.

高分子分離膜の急速な発達とともに、魚油の部分加水分解物よりエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA)、さらにはパルミトオレイン酸を多く含む部分グリセリドをとり出そうとする試みが行われ始めている。<sup>1,2)</sup> 一方、リパーゼの分解ならびに合成活性を活用して、これらの脂肪酸の濃度を高めたグリセリドの合成も試みられている。<sup>3)</sup> しかし、原料となるべき魚油の分子種組成については堀ら<sup>4)</sup> によりごく一部が明らかにされているに過ぎず、このため魚油改質の研究は試行錯誤的に行われているのが現状である。魚油の分子種の組成が十分明らかにされていない主な理由は、その組成が極めて複雑であることに加え、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の分解能が一定溶媒比溶出法では極めて不十分な点にある。HPLC の分解能を最大限発揮させるには勾配溶離法を用いなければならないが、従来までトリグリセリド (TG) 分子種の検出に広く用いられてき

た示差屈折検出器では勾配溶離法の適用ができなかった。一方これに対し、勾配溶離法が可能な UV 検出器や蛍光検出器は TG 分子種の検出には適さないという問題があった。以上の理由から、両者の欠点を改善した散乱光検出器を魚油の TG 分子種分析に応用することは、従来まで分析がほぼ不可能とされていた魚油の分子種の組成解明に新たな可能性を提供するものであると考えられる。散乱光検出器はマスディテクターとも呼ばれ、その原理は溶離溶媒とともに噴霧器に入った試料が霧状になり、そこにタンダステン光を照射して散乱光の変化を光電管で検出するものである。魚油の分析に散乱光検出器の使用を試みた例としては Herslof<sup>5)</sup> の研究があるが、1989 年当時の HPLC の分解能の不十分さを指摘したにとどまっている。

本研究では原料魚油の主要成分である TG の分子種組成を明らかにすることを目標として、勾配溶離法を可能

<sup>\*1</sup> 散乱光検出器を有した液体クロマトグラフによる魚油トリグリセリドの分子種分析—I (Molecular Species Analysis of Fish Oil Triglyceride by Light Scattering Mass Detector Equipped Liquid Chromatography-I).

<sup>\*2</sup> 本研究は、文部省平成 2 年度科学研究費補助金に基づく研究 (一般研究 C) の一部として行ったものである。なお、大要は平成 3 年度日本水産学会秋季大会において講演発表した。

<sup>\*3</sup> 北海道大学水産学部食品化学第一講座 (Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Minato, Hakodate, Hokkaido 041, Japan).

にする散乱光検出器を HPLC に応用するとともに、魚油の融点が高いことに着目して分配クロマトグラフィーの性能を最大限発揮させるべく、カラム (分離管) の低温化の有効性について検討した。

### 実験方法

**試料** 純度約 90% の EPA ならびに DHA と、イワシ油およびカツオ油 (内臓油) は日本化学飼料 (株) の供与を受け、いずれも可及的に過酸化物を含まないものを用いた。

一方、金華山沖にて平成 3 年 9 月 2 日に捕獲した体重 1.8 kg のカツオより氷蔵 2 日後に深部血合肉をとりだし、クロロホルム/メタノール混液 (8:3, v/v) で全脂質を抽出した。

これらより、調製用薄層クロマトグラフィー [Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 20×20 cm, 0.5 mm 厚; *n*-ヘキサン/エチルエーテル/酢酸 (70:30:1, v/v)] によって TG を精製した。

**EPA と DHA からなるトリグリセリド分子種の合成** 前報<sup>6)</sup>の方法に準じ、EPA と DHA 0.6 ml ずつにグリセロールを 16 ml 混合し、これにリパーゼ *TOYO Chromobacterium viscosum* (東洋醸造 (株)) を 30.4 mg 含む酵素液 (pH 6.0 の 0.5 M リン酸緩衝液 0.22 ml に同酵素を溶解) を添加して、25°C で反応を開始した。反応はアルゴンガスを封入した共栓三角フラスコ中にて 1,500 rpm に攪拌しながら行い、24 h 後、エタノールを 30 ml 加えることによって反応を停止した。次いでエチルエーテルを用いて反応生成物を抽出し、エチルエーテル層を水洗後、調製用 TLC (同上) によって TG を精製した。

**逆相勾配溶離高速液体クロマトグラフィー** 合成した TG を以下の条件で逆相 HPLC に供した。装置: 日立 638-50 型液体クロマトグラフ, カラム: Wakosil 5C18N (粒子径 5 μm), 300×4 mm と Supersphere RP-18 (粒子径 4 μm), 250×4 mm の直列構成, 溶媒: アセトン/アセトニトリル (3:2→7:1/240 min の直線勾配溶離), 流速: 0.7 ml/min, カラム温度: 20, 15, 10, 5, 0, -5, -10, -15, -20°C の 9 段階, 検出器: Applied Chromatographic Systems 750/14 型散乱光検出器 (マスディテクター; Time Constant: 5, Attenuation: ×2, ホトマル感度: 1, 噴霧器の空気圧, 0.8 kg/cm<sup>2</sup>), 試料量: 1~2 μl。なお、本検出器は試料の回収が困難とされるが、本研究では分離管の出口を分岐させて TG の分取を可能とした。分取の同調はオイルレッドをマーカーとし、ニードルバルブによって行った。この方法によって分取した合成 TG 分子種の同定は、前報<sup>6)</sup>によった。

**溶離溶媒の粘度測定** オストワルド型粘度計を用い、

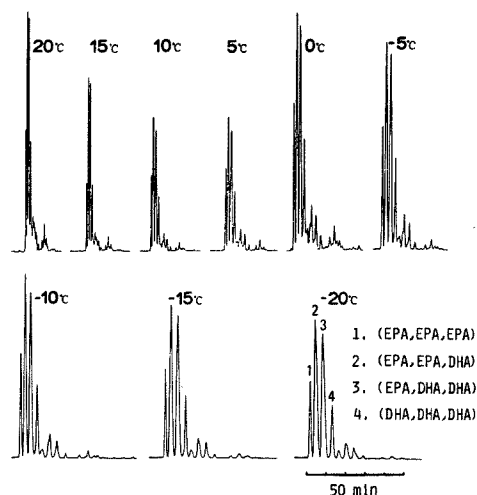


Fig. 1. Reverse phase HPLC elution profiles of synthetic triglycerides containing high proportions of EPA and DHA under various column temperatures.

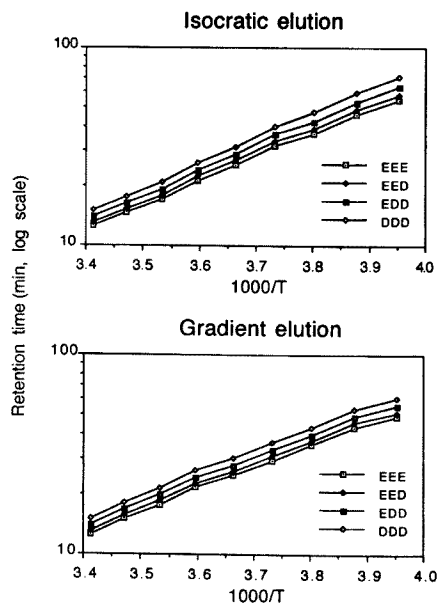


Fig. 2. Relationship between the retention time of a synthesized triglyceride composed of EPA and DHA and the reciprocal value of absolute column temperature in reverse phase HPLC.

Each point represents means of ten chromatographic runs. E stands for EPA and D for DHA.

アセトン/アセトニトリル (3:2) ならびにアセトン/アセトニトリル (7:1) についてそれぞれの各温度に対する粘度の相対変化を測定した。

**トリグリセリドの融点の測定** 理学電機 (株) CN 8131L 型低温形示差熱分析計を用い、20 と  $-100^{\circ}\text{C}$  における保持時間を 5 min, 両者の間の温度上昇および下降速度を 60 と  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  の 2 種類に設定し、吸熱・発熱のピークを検出して、そのときの示す温度を融点とした。

### 結果および考察

リパーゼにより合成した TG より Fig. 1 のクロマトグラムを得た。これらの主要分子種について縦軸に保持時間の対数値, 横軸にカラムの絶対温度の逆数をとると (Fig. 2), いずれの分子種もカラム温度の逆数に対して直線関係となり,  $\Delta\mu = RT \ln \alpha$  なる Martin の式<sup>7)</sup> ( $\Delta\mu$  はケミカルポテンシャル,  $R$  は気体定数,  $T$  は絶対温度,  $\alpha$  は分配係数) を裏付ける結果が得られた。この関係は一定溶媒比溶出法, 勾配溶離法の別にかかわらず成り立った。すなわち, カラム温度が低くなるほど保持時間が対数的に延長することが認められた。

一方, クロマトグラム上で相隣合う分子種のピーク間の距離を対数値として縦軸にとり, 横軸にカラム温度をとっても Fig. 3 のような直線関係が得られた。したがって, ピーク間の距離は温度の低下とともに増し, EPA, DHA 含有 TG は融点が高い (EPA と DHA を 90% 以上含む場合は  $-90^{\circ}\text{C}$  以下) ことから低温クロマトグラフィーはピーク間の分離に極めて有利に働くと考えられた。しかしながら, カラム温度を低温にするとそれとともにピーク幅も増えることが知られているので, 理論段数を指標として次にこの点についての検討を行った。

Fig. 4 はカラム温度に対する各成分 TG ピークの理論段数 (成分量の違いを面積比により補正した値) を示したものである。この図より明らかなように, カラム温度が低くなるにつれて理論段数は高くなるが  $-15^{\circ}\text{C}$  付近で極大となり, それ以下の温度ではむしろ低下することが認められた。これは  $-15^{\circ}\text{C}$  以下では溶媒の粘度が急激に上昇するか, 固定相に対する溶質の溶解度が大きく低下するためではないかと推察された。

一般に, カラム温度が低下するほど理論段数はむしろ低下することが知られている。<sup>8)</sup> しかし, カラム温度が低下すれば, 同族体同士の分配率の差がより大きくあらわれるとも考えられ, また寄与率は小さいとはいえカラム温度の低下によって渦状拡散や軸方向拡散が小さくなることも推察される。その結果, 本条件ではカラム温度の低下にともない理論段数が上昇したとも考えられる。

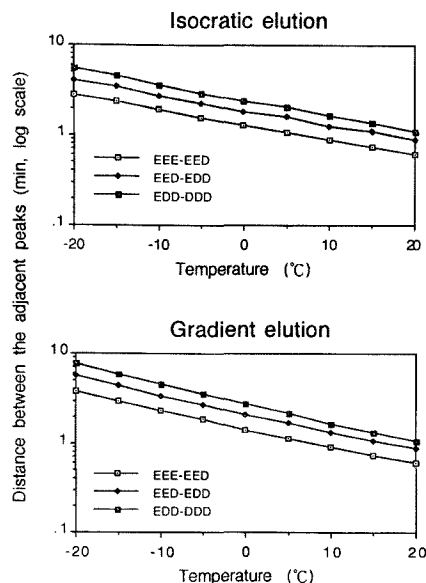


Fig. 3. Relationship between the distance between two adjacent peaks and the temperature of the column in reverse phase HPLC. Each point represents means of ten chromatographic runs. Symbols are the same as in Fig. 2.

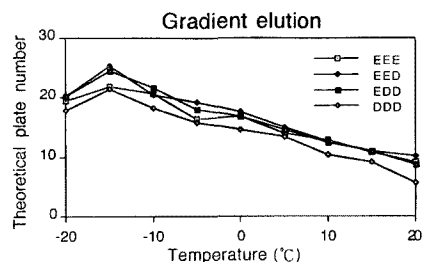


Fig. 4. Relationship between theoretical plate number\* and the temperature of the column in reverse phase HPLC.

Each point represents ten chromatographic runs. Symbols are the same as in Fig. 2.

\* Each theoretical plate number was calculated after the correction of the peak area, supposing that four dominant peaks in Fig. 1 have the same peak area.

クロマトグラムの分離の良不良を表す指標として分離度 ( $R_s$ )<sup>9)</sup> がある。 $R_s$  は二つの相隣合うピークの幅をそれぞれ  $t_{w1}$ ,  $t_{w2}$ , 保持時間をそれぞれ  $t_{R1}$ ,  $t_{R2}$  とすると,

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(1/2)(t_{w1} + t_{w2})}$$

で与えられる。 $R_s$  の値がより大きくなるということは,

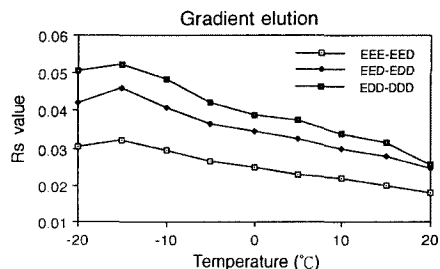


Fig. 5. Relationship between resolution ( $R_s$ ) value and the temperature of the column in reverse phase HPLC.

Each point represents means of ten chromatographic runs. Symbols are the same as in Fig. 2.

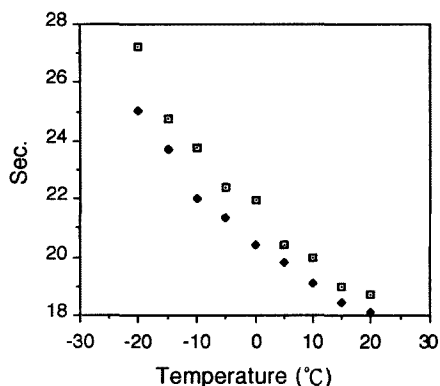


Fig. 6. Relative comparison of viscosity by Ostwald viscometer between solvent A, acetone/acetonitrile (3:2, v/v), and solvent B, acetone/acetonitrile (7:1, v/v).

□: Solvent A (initial gradient solution).  
◆: Solvent B (final gradient solution).

分離がよくなることを意味する。 $R_s$  (成分量の違いを面積比により補正した値) とカラム温度との関係について検討した結果, Fig. 5 に見られるように Fig. 4 と同様  $-15^\circ\text{C}$  付近で極大となり, それ以下の温度ではむしろ分離は低下した。 $R_s$  は先の理論段数の平方根に比例することが知られている<sup>9)</sup> ので, このことは当然の結果ながら Fig. 4 と同様,  $-15^\circ\text{C}$  以下では溶媒の粘度が急激に上昇するか, 固定相に対する溶質の溶解度が大きく低下するためではないかと考えられた。

そこで, この点を確かめるために溶離溶媒の粘度を測定した結果, Fig. 6 に見られるように  $-15 \sim -20^\circ\text{C}$  における粘度上昇は比較的急激であった。この温度域での固定相に対する溶質の溶解度の低下を測定する方法がないので確かなことはいえないが,  $-15^\circ\text{C}$  以下の温度

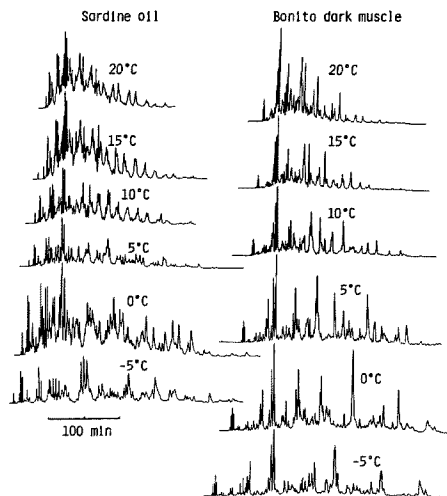


Fig. 7. Reverse phase HPLC elution profiles of sardine oil triglycerides and bonito dark muscle triglycerides under various column temperatures.

帯における  $R_s$  の低下は, EPA, DHA 含有 TG の固定相に対する溶解度の低下と溶離溶媒の粘度の急激な増大が複合して起こるものと推察された。

一方, 低温形示差熱分析計を用いて供試魚油 TG の融点を測定したところ, イワシ油 TG で約  $0^\circ\text{C}$ , カツオ油 (内臓油) TG では約  $5^\circ\text{C}$  であった。また,  $0^\circ\text{C}$  以上の温度ではカラム内に析出して残存する TG 分子種はないことが, クロマトグラフィー終了後室温にまでフラッシュした際に溶出する成分がないことにより確認された。これらのことから, 融点以上の可及的低温が TG 分子種の至適分析温度と考えることができる。すなわち, TG の融点以上であれば一般にカラム温度が低い程  $R_s$  は高く, 分離がよくなるものと結論した。

実際, イワシ油 TG とカツオ血合肉 TG を種々の温度で逆相勾配溶離 HPLC に供したところ, Fig. 7 に示したように TG の融点以上の温度であればカラム温度が低いほど分離が向上した (なお,  $-5^\circ\text{C}$  以下の温度では TG 分子種の一部がカラム内で析出したので, それ以下に温度を下げることはできなかった)。

以上のことより, 今後は魚油 TG の分子種の分析, 分離, 精製に低温逆相勾配溶離 HPLC を積極的に導入すべきであると考えられる。

## 謝 辞

本研究は文部省平成 2 年度科学研究費補助金 (一般研究 C) によるものである。記して感謝する。

## 文 献

- 1) 小池誠治, 鈴木一昭, 佐橋祐子, 石塚浩敏: 高度不飽和脂肪酸の分離・濃縮 (I). 農化誌, **65**, 566 (1991).
- 2) 佐橋祐子, 石塚浩敏, 小池誠治, 鈴木一昭: 高度不飽和脂肪酸の分離・濃縮 (II). 農化誌, **65**, 566 (1991).
- 3) 高橋是太郎: 魚油の利用. 油化学, **40**, 931-941 (1991).
- 4) 堀 正典, 杉浦健児, 佐橋祐子, 小池誠治: 質量分析によるイワシ油の分子種分析. 農化誌, **65**, 566 (1991).
- 5) B. Herslof: Analysis of marine oils by HPLC. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, 483 (1989).
- 6) 長田恭一, 高橋是太郎, 羽田野六男, 細川雅史: リパーゼを用いて合成した高度不飽和脂肪酸含有油脂の分子種. 日本誌, **57**, 119-125 (1991).
- 7) A. J. P. Martin: Some theoretical aspects of partition chromatography. *Biochem. Soc. Symposia*, (Cambridge, England), **3**, 4-20 (1950).
- 8) L. R. Snyder, J. J. Kirkland: 高速液体クロマトグラフィー (小島次雄, 春木達郎訳), 東京化学同人, 東京, 1976, pp. 22-26.
- 9) L. R. Snyder, J. J. Kirkland: 高速液体クロマトグラフィー (小島次雄, 春木達郎訳), 東京化学同人, 東京, 1976, pp. 27-29.