ガスクロマトグラフィーによるトリグリセライドの分析; 定量分析法の検討*

佐藤 克哉, 松居 正己**, 池川 信夫***

前報¹⁾においてトリグリセライドのガスクロマトグラフィーにおける分析条件の影響について報告を行なったが、本報においてはさらに他の分析条件について検討を行なった。

固定相液体については JXR, OV-1, OV-17, Versamid 900 などを検討したが、OV-17 が耐熱性もよく、すぐれた分離を示すことがわかった。OV-17 を使用することにより、従来は同一物と報告されていたバターとマーガリンのグリセライドの各成分は同一物ではないことがわかった。

充てん剤の作製方法はエバポレーター法よりフィルター法がはるかにすぐれ、試料の損失も少なかった。

固定相量については 2~8% の範囲を検討した結果、固定相量が 8% の場合、試料の損失が大きくなることがわかった。

定量性についてはキャリアーガス流量調節に質量流量制御弁を用いることにより、良好な結果を得た。

上記の分析条件により、ラード、牛脂、鯨油などの動物性油脂、バター、マーガリン、チーズなどの食用油脂の直接分析を行なった。

1 緒 言

ガスクロマトグラフィーにおいてトリグリセライドの分析を困難にしているのは試料の分子量が大きく、極性が大きいいため、かなり高温で分析を行なわないと流出してこないということにある。しかし、最近に至り高温で安定に使用しうる機器が製作されたことにより、また分離管作製技術が進歩したことなどにより、トリグリセライドの直接分析が可能になってきた。

トリグリセライドのガスクロマトグラフィーにおいて最も重要な問題はトリグリセライドのかなりの量が分析中に失われることである。比較的分子量の小さいグリセライドではこの影響はわずかであるが、分子量が大きくなるにつれて、急激に損失量が多くなる。すなわちピーク面積が急速に小さくなり、条件によってはまったくピークとして現われないことがある。この現象を起こす原因として、使用した固定相液体の種類、固定相液体量、担体の種類、カラム長さ、カラム材質、分析温度、装置、試料量などが考えられる。

前報¹⁾においては、カラム長さ、試料量、カラム材質などの試料損失に対する影響について検討を行ない、最適分析条件として 35cm のガラスカラムに、Shimalite W を担体とし 2% JXR をコーティングした充てん剤を充てんした分離管を用い、200°C より 325°C までの昇温分析を行なう条件を選定した。

本報においてはさらに新しい固定相液体などの分析条件の検討を行なった。固定相液体として JXR, OV-1, OV-17, Versamid 900 を選び、耐熱性および分離能について比較した。さらにコーティングパーセントおよびコーティング方法について検討を加えた。またキャリアーガス流量調節にマスフローコントローラーによる定差圧制御方式を採用することにより、再現性よく定量することが可能となった。これらの分析条件の検討の結果、トリグリセライドの分析法としてきわめてすぐれた方法が確立された。さらに本分析法の応用例として鯨油、ラード、牛脂などの動物性油脂、バター、マーガリン、チーズなどの食用油脂の分析を行なったので報告する。

2 実 験

2.1 装 置

使用した装置は島津製作所製ガスクロマトグラフ GC-1C 形で、水素炎イオン化検出器 FID-1B 形、多段自動昇温装置 TP-2A 形を用いた。キャリアーガスには窒素を使用し、流量調節にはマスフローコントローラ

* ガスクロマトグラフィーの応用研究(第2報)。

第1報は佐藤克哉, 松居正己, 池川信夫: 本誌, 15, 954 (1966)

** 株式会社島津製作所東京研究所: 東京都調布市柴崎町

*** 理化学研究所: 埼玉県大和町下新倉

ーによる定差圧流量制御方式を用いた。カラムはガラス製内径 4 mm, 長さ 35 cm のものを使用した。充てん剤用固定相液体としてシリコン系の JXR, OV-1, OV-17 およびポリアミド系の Versamid 900 を Applied Science Laboratory より入手した。担体は Shimalite W (島津製作所製) の粒度 80~100 メッシュのものを使用した。検出器温度は 350°C, 試料注入口温度 400°C に設定した。カラムは 200°C より 310°C 程度まで昇温を行なった。昇温速度は毎分 4°C にした。検出器エレクトロメーターレンジは 8×10^{-9} A/フルスケール, 水素流量は 25 ml/min, 空気流量は 1 l/min で行なった。

2.2 試 薬

ラード, 牛脂, 鯨油, バター, マーガリン, チーズなどは市販品を使用した。標準品として用いたトリプロピオン, トリラウリン, トリパルミチン, トリステアリンおよびトリフェニレンは東京化成より購入した。各グリセライドはテトラヒドロフラン溶液とした。

3 結果および考察

3.1 分析条件の検討

3.1.1 固定相液体の検討 固定相液体の種類については, 分析温度が 300°C 以上になるので, 少なくとも 350°C 程度まで安定に使用しうるのが望ましい。現在市販されている高温用固定相液体のうち, 特に安定と思われるメチルシリコン系の JXR, さらに最近新しく市販されたメチルシリコン系の OV-1, フェニルメチルシリコン系の OV-17 およびポリアミド系 Versamid 900 について検討を行なった。

担体としては Shimalite W (80/100 メッシュ) を使用し, コーティングはフィルター法によった。作製した 2% の各種充てん剤をガラスカラム (長さ 35 cm, 内径 4 mm) に充てんし, 同一時間エージングした分離管により実験を行なった。

実際の分析において最も重要な問題はトリグリセライドのかなりの量が分析中に失われることである。比較的分子量のグリセライドではこの影響はわずかであるが, 分子量が大きくなるにつれて急激に損失量が多くなり, 条件によってはピークとして現われないことがある。しかし, この問題については定量的に詳しく検討されてなく, また固定相液体による相違を比較した報告もない。

この現象に対する固定相液体の影響を検討するためにトリステアリン (脂肪酸相当炭素数 54), トリパルミチン (炭素数 48), トリラウリン (炭素数 36) の等重量混合物を各分離管で 200°C より 320°C までの昇温分

析を行なった。Table I に各分離管におけるトリラウリンに対するトリパルミチンおよびトリステアリンのピーク面積比を示す。この場合各分離管はまったく同一方法により作製し, 一定時間エージング後ただちに分析を行なった。

Table I Effect of liquid phase on peak area of triglyceride

Peak area ratio	Liquid phase			
	JXR	OV-1	OV-17	Versamid 900
Tripalmitin Trilaurin	0.91	0.72	0.85	0.67
Tristearin Trilaurin	0.74	0.28	0.75	0.38

OV-1, Versamid 900 に比べ, OV-17, JXR のほうがかなり試料の損失が少ないことがわかる。またいずれの分離管においてもある程度使用したあとのほうが試料の損失が少なくなる。たとえば, JXR では約 1 週間使用後各ピーク面積は Table I に示した値よりも約 8% 程度大きくなった。このことは Kuksis の “thermal stripping” 効果と一致する。

次に各分離管のカラム効率を検討するために, 300°C でトリステアリンの分析を行なった。その結果, OV-1 が最もよく, ついで OV-17 であり, Versamid 900 では 350 段/35cm 程度の理論段数しか得られなかった。

分離能力については極性のある OV-17, Versamid 900 がすぐれ, 特に OV-17 を使用することにより, 従来同一グリセライド構成を持つと考えられていたバターとマーガリンのグリセライドがまったくそれぞれ異なるものであることがわかった。Fig. 1 は A 社バターを OV-17 分離管により分析したクロマトグラムであるが, 炭素数 36, 38 などのグリセライドおよび炭素数 50, 52 などを中心としたグリセライドの二つのグループより構成

Fig. 1 Chromatogram of butter A

Column: 2% OV-17 on Shimalite W (80/100 mesh),
I.D. 4mm×35cm, glass; Detector: FID 1.6×10^{-9} A/FS

Fig. 2 Chromatogram of margarine

Column: 2% OV-17 on Shimalite W (80/100 mesh),
I.D. 4mm×35cm, glass; Detector: FID 1.6×10^{-9} A/FS

されていることがわかる。またA社マーガリンのグリセライドは Fig. 2 に示すようによく似ており、大きなグリセライドを若干含み、各成分量が異なっている程度である。しかしながら両者のクロマトグラムを詳細に比較検討した結果、ピーク流出温度に差のあることが明らかになった。この点について確認するためバター、マーガリンの混合物を分析した。その結果を Fig. 3 に示す。

Fig. 3 Chromatogram of mixture of butter and margarine

Column: 2% OV-17 on Shimalite W (80/100 mesh),
I.D. 4mm×35cm, glass; Detector: FID 1.6×10^{-9} A/FS

このクロマトグラムより明らかにバターとマーガリンのグリセライドは別物であることがわかる。炭素数の大きいところでは分離していないが、同じ成分なのかもしれないが、はほかの原因で分離していないのかは不明である。トリラウリンをそれぞれの試料に加えて分析した結果、マーガリンの炭素数 36 のピークに一致するがバターの炭素数のピークはトリラウリンのピークに一致しなかった。この違いについては炭素数の差または不飽和度の差などが考えられるが、確認されていないため、さらに検討の必要がある。なお本報では便宜上、バターもマーガリンも同じ炭素数グリセライドとして扱う。

また OV-17 では試料の流出が速くなる傾向がある。さらに分析条件を検討することにより、トリステアリンなどを分析温度 300°C 以下で分析できる可能性があり、カラム接続材料の寿命を延ばすことができるものと思われる。反対に OV-1 などでは試料の流出温度がかなり高くなり、より高温で分析しなければならない。

耐熱性については、同一履歴の各分離管による昇温分析を行ない、ベースラインの変化により検討を行なった。Versamid 900 は 300°C をこえると急速にベースラインが上昇し、耐熱性に乏しいと思われる。OV-1, OV-17, JXR については 350°C まで昇温しても大きな変化は起きず、ほぼ同等の耐熱性であると考えられる。

以上の実験結果より本分析に最も適している固定相は OV-17 であった。OV-17 はトリグリセライドの分析のみならず高沸点試料の分析にも応用できるものと考えられる。

3・1・2 充てん剤の作製方法の比較 一般には低液相量充てん剤の作製にはフィルター法がよいとされているが³⁾、Kuksis らはエバポレーター法による充てん剤を使用している⁴⁾。この二つの方法の差を検討するために、それぞれの方法で充てん剤を作り、カラムの性能の比較を行なった。

50 ml の 80~100 メッシュの Shimalite W を塩酸で洗浄し、1 昼夜放置し、じゅうぶん水洗したあと、アセトンで洗い、100°C で 2 時間乾燥したものをジメチルジクロロシランの 2% トルエン溶液に加え、10 分後ガラスフィルターで吸引ろ過を行ない乾燥した。この担体 50 ml のうち 20 ml を取り、JXR の 2% トルエン溶液を加え、10 分後ガラスフィルターにより溶媒をろ過し、風乾後、乾燥器で乾燥した。1 g の Shimalite W は 1 ml の溶媒を吸収するので⁵⁾、この方法により得られた充てん剤は 2% と考えてよい。残りの Shimalite W 20 ml を取り、先に使用した 2% JXR トルエン溶液 20 ml を加え、ロータリーエバポレーターで大部分の溶媒を留去し、風乾後、乾燥器で乾燥した。したがってエバポレーター法により 2% の充てん剤を得たことになる。この充てん剤をそれぞれ数本の、長さ 35 cm、内径 4 mm のガラスカラムに充てんした。エージングは 350°C で 10 時間行なった。トリラウリン (炭素数 36)、トリパルミチン (炭素数 48)、トリステアリン (炭素数 54) の 1% テトラヒドロフラン溶液を試料とし、昇温分析を行ない、ピーク面積を測定した。結果を Fig. 4 に示す。横軸は試料の炭素数、縦軸にフィルター法とエバポレーター法とのピーク面積比をとった。トリラウリンについてはそれほど差は見られないが、トリパルミチンでは

Fig. 4 Effect of coating method

エバポレーター法ではフィルター法によるピーク面積の 84% 程度になり、トリステアリンでは 45% 程度のピーク面積しか得られなかった。しかもピーク面積はエバポレーター法による充てん剤ではかなりばらつくことがわかった。

したがって、この程度の固定相濃度においてはエバポレーター法よりフィルター法のほうがはるかにすぐれていることが明らかである。

3.1.3 固定相量による影響 固定相液体量が担体に対し 1% 以下では試料の損失がきわめて多いことがすでにわかっているため、2% より 8% までの充てん剤をフィルター法により作製した。担体は Shimalite W (60/80 メッシュ) を使用し、35 cm のガラスカラムを用いた。一般には固定相液体量が多くなることによって担体の表面による効果が減少すると考えられている。しかし固定相液体量が多くなると固定相自体による影響も起きてくる可能性がある。実験の結果、固定相液体量を増すにつれ、やや試料の損失が多くなる傾向にあり、8

Fig. 5 Effect of concentration of liquid phase

% になると急激に吸着量が多くなることがわかった。各分離管で 150°C より 325°C まで毎分 4°C で昇温を行ない、トリプロピオン (炭素数 9)、トリラウリン (炭素数 36)、トリパルミチン (炭素数 48)、トリステアリン (炭素数 54) を分析した場合のトリプロピオンのピーク面積に対する各トリグリセライドのピーク面積比を Fig. 5 に示す。いずれの液相量においても炭素数が大きくなるにつれ、ピーク面積が小さくなる傾向はあるが、特に 8% の充てん剤ではピーク面積が非常に小さいことがわかる。結局、流出時間を考慮した場合、2% の充てん剤がよいと考えられる。

3.1.4 流量制御方法の影響 グリセライド分析には昇温操作が必要なので、従来の定圧制御方式では昇温に伴う分離管の抵抗変化のため、検出器への流量が減少し、一定の感度を得ることが困難で、データの再現性を期待することができない。検出器への流量を一定させる方法としてマスフローコントローラーによる定差圧流量制御方式がある。本実験でもこの方式により分析を行なった。標準物質としてトリフェニレンを使用し、トリラウリン、トリパルミチン、トリステアリンの等量混合物を 200°C より 320°C まで 2% JXR 分離管を用いて 6 回分析を行なった。Table II にその結果を示す。

Table II Reproducibility of peak area

No.	Relative peak area (Triphenylene=1)		
	Trilaurin	Tripalmitin	Tristearin
1	1.47	1.56	1.36
2	1.56	1.59	1.39
3	1.49	1.64	1.36
4	1.59	1.65	1.46
5	1.67	1.65	1.38
6	1.59	1.58	1.53
Average	1.56	1.61	1.41

いずれのグリセライドについても、変動係数 (標準偏差/平均値) は 5% 以下であるので定量分析は可能であると考えられる。

3.2 グリセライドの分析

3.2.1 動物性油脂の分析 Fig. 6 に精製されたまっこう鯨の油のクロマトグラムを示す。炭素数 22 より炭素数 34 までのグリセライドが主成分であり、分離もよいが、炭素数の大きいグリセライドも若干存在し、それらの分離はあまりよくなく、複雑な組成を持っていることが考えられる。試料は 1% テトラヒドロフラン溶液とし、その 1 μ l をガスクロマトグラフに注入し、150°C

Fig. 6 Chromatogram of whale oil

Column : 2% OV-17 on Shimalite W (80/100 mesh),
I.D. 4mm×35cm, glass; Detector : FID 1.6×10^{-9} A/FS

Fig. 7 Chromatogram of lard

Column : 2% OV-17 on Shimalite W (80/100 mesh),
I.D. 4mm×35cm, glass; Detector : FID 1.6×10^{-9} A/FS

より 310°C まで毎分 4°C で昇温を行なった。分離管は Shimalite W に 2% OV-17 をコーティングした充てん剤を 35 cm のガラスカラムに充てんしたものを使用した。

これに対し、ラードのグリセライドは Fig. 7 に示すように比較的単純な構成になっている。ほとんどが炭素数 50, 52, 54 のグリセライドから構成され、低分子量のグリセライドはほとんどない。分析条件は鯨油の場合と同様であるが、昇温は 200°C より行なった。

牛脂のグリセライド構成もラードに似ており、比較的高分子量のグリセライドより構成されているが、ラード

Fig. 8 Chromatogram of beef tallow

Column : 2% OV-17 on Shimalite W (80/100 mesh),
I.D. 4mm×35cm, glass; Detector : FID 1.6×10^{-9} A/FS

ほど単純ではなく、低分子量のグリセライドもやや多くなっていることがわかる。Fig. 8 に牛脂のグリセライドのクロマトグラムを示す。また炭素数 48, 50, 52 のグリセライドのピーク間にもピークが認められるが、確認していない。

さらにサメ油などの魚油についても検討を行なったが、ほとんどピークとして現われず、単純なグリセライドではないことが予想される。

3・2・2 食用油脂の分析 Fig. 9 に B 社バター¹⁾のグリセライドのクロマトグラムを示す。Fig. 1 の A 社バタ

Fig. 9 Chromatogram of butter B

Column : 2% OV-17 on Shimalite W (80/100 mesh),
I.D. 4mm×35cm, glass; Detector : FID 1.6×10^{-9} A/FS

ーに比較した場合、構成しているグリセライドの種類は同じで、やはりマーガリンとは一致しない。しかし各ピークの大きさに差があることがわかる。たとえば、A 社バターでは炭素数 38 のピークが炭素数 36 のピークより大きい、B 社バターでは逆に炭素数 36 のピークのほうがわずかに大きい。炭素数 50 および 52 のピークについても同様ながいえる。したがって、じゅうぶんバターの識別をすることができると考えられる。いずれのバターでも炭素数 40 のグリセライドは他のピーク

Fig. 10 Chromatogram of cheese

Column : 2% OV-17 on Shimalite W (80/100 mesh),
I.D. 4mm×35cm, glass; Detector : FID 1.6×10^{-9} A/FS

に比べ, ピーク幅が広く, 単純なグリセライドではないことが考えられる. 試料はテトラヒドロフラン溶液とした.

Fig. 10 にチーズのクロマトグラムを示す. チーズにテトラヒドロフランを加え, よく振ったのち, その溶液の数 μ l をガスクロマトグラフに注入した. この場合ブランドによる差は見られなかった. バター同様炭素数40のグリセライドは単純ピークではないことが予想される.

4 結 語

前報に引き続きトリグリセライドの最適分析条件を検討した結果, 固定相液体としては OV-17 がすぐれていることがわかった. 従来同一成分と思われていたバターとマーガリンの各成分が同じものではないことが, この固定相を使用することにより明らかになった. またこの固定相は 350°C までは安定に使用でき, さらに OV-17 では流出温度が下がる傾向にあるので, 分離管の寿命を長くできる.

充てん剤の作製方法についてはフィルター法が適当であり, 試料の損失を少なくすることができた. 担体に対する固定相の割合は2~6% まではあまり変わらず, ほかの条件を考慮した場合, 2% が適当であると考えられる.

またキャリアーガス流量制御方式にマスフローコントローラーによる定差圧制御方式を採用することにより, じゅうぶん再現性よく定量できることが明らかになった.

上述の実験結果より得られた最適分析条件により, 動物性油脂, 食用油脂の分析を行ない, ガスクロマトグラ

フィーによる油脂類の直接分析がすぐれた分析方法であることを示した.

文 献

- 1) 佐藤克哉, 松居正己, 池川信夫: 本誌, **15**, 954 (1966).
- 2) A. Kuksis: *J. Am. Oil Chemists Soc.*, **42**, 269 (1965).
- 3) E. C. Horning, E. A. Moscatelli, C. C. Sweely: *Chem. Ind.*, **1959**, 751.
- 4) A. Kuksis, M. J. McCarthy: *Can. J. Biochem.*, **40**, 679 (1962).
- 5) 佐藤克哉, 松居正己: 島津評論, **23**, 51 (1966).

Gas chromatography of triglycerides; Scrutinization of determination. Katsuya SATO, Masami MATSUI* and Nobuo IKEKAWA** (*Shimadzu Seisakusho Ltd., Tokyo Research Laboratory, Shibasakimachi, Chofu-shi, Tokyo; **Institute of Physical and Chemical Research, Yamato-cho, Saitama-ken)

Operating conditions in gas chromatography of triglycerides were investigated. Liquid phase OV-17 having a high thermal stability gave an excellent separation of triglycerides. The result by using OV-17 revealed the differences in the constituent triglycerides of butter and margarine. Better column packings were obtained by filtration method than by evaporation method. The regulation system for carrier gas with mass flow controllers improved the accuracy of quantitative determination of glycerides.

Lard, beef tallow, whale oil, butter, margarine and cheese were analysed for their triglycerides, with a 35 cm glass column packing with 2% OV-17 on 80~100 mesh Shimalite W, by programmed temperature gas chromatography between 200°C and 310°C.

(Received Mar. 22, 1967)