報 文

高速液体クロマトグラフィーによる乳及び乳製品中の
遊離脂肪酸の定量戸塚 新一^{®*}, 松田 恒*, 佐藤 孝義*, 皆川 憲夫*

Determination of free fatty acid in milk or dairy products by HPLC

Shinichi TOTSUKA, Hisashi MATSUDA, Takayoshi SATO and Norio MINAGAWA*

*Food Research Laboratory Quality Assurance Dept., Snow Brand Milk Products Co., 1-1-2, Minamidai, Kawagoe-shi, Saitama 350-11

(Received 22 March 1996, Accepted 12 June 1996)

A sensitive HPLC method with fluorescence precolumn-labeling using 4-hydroxymethyl-7-methoxycoumarin (HMC) was developed for the determination of fatty acid in milk or dairy products. Fatty acid was extracted by using hexane-diethyl ether (1:1). A reaction reagent was prepared by mixing 20 mg of HMC, 50 mg of 4-dimethylaminopyridine, 10 ml of acetonitrile and 90 ml of 1% dichloromethane solution of *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide. 1 ml of the extract was added to 1 ml of the reaction reagent and the mixture was allowed to stand for 70 min at room temperature to form FFA-HMC derivatives. 10 μ l of the reactant was injected into a reversed phase column and eluted with ethanol: acetonitrile=1:1. FFA-HMCs were separated completely within 44 min by HPLC monitored by fluorescence (Ex. 330 nm, Em. 395 nm). Detection limits were 0.1 μ g for each FFA in 1 g of sample. The reproducibility of the HPLC measurements was 10.2% or less (RSD.). This method was applied successfully to the determination of FFA in a variety of dairy products.

Keywords : determination of fatty acids; milk or dairy products; HPLC using 4-hydroxymethyl-7-methoxycoumarin derivatives; fluorescence precolumn-labeling method; hexane-diethyl ether extraction.

1 緒 言

乳及び乳製品に含まれる短鎖から長鎖まで多種類の遊離脂肪酸 (FFA) は、乳及び乳製品の“おいしさ”に影響する重要な物質である¹⁾。乳及び乳製品中の FFA は元々存在するほかに、トリグリセリド (TG) 等の油脂の酸化によって二次的に生成し、更には油脂からリパーゼの働きで加水分解されることによって生成する。この反応が著しく促進されることによって FFA が増加

し、風味異常を引き起こす。この風味は FFA の種類によって異なっている¹⁾ことから、乳及び乳製品中の FFA を個別に精度よく正確に定量することは非常に重要である。

FFA の一般的な定量法としては FFA の総量を中和滴定法で測定する酸価 (AV)²⁾が主体である。AV は、日本薬局方、JIS、衛生試験法などの試験法として定められているが、FFA を個別に同時定量することができず、更に前処理における油脂の抽出操作³⁾が煩雑である。FFA を個別に同時定量する方法としては、GC を用いるのが一般的である⁴⁾⁵⁾が、前処理において TG の除去

* 雪印乳業(株)品質保証部分分析センター: 350-11 埼玉県川越市南台 1-1-2

操作を要し、抽出操作が煩雑で時間を要するために、それらを簡便に精度よく定量するのは困難である。近年、HPLC 法^{6)~8)}が蛍光ラベル化剤を用いることによって高感度化され、FFA の定量に用いられている。更に最近では、LC/MS による FFA の分析例も見られる⁹⁾が、乳及び乳製品中の FFA を個別に同時定量した報告はない。

本報では、乳及び乳製品中の FFA を、蛍光ラベル化剤である 4-ヒドロキシメチル-7-メトキシクマリン (HMC) でラベル化させ、HPLC を用いて個別に定量するとともに、高感度で信頼性の高い分析方法を確立したので報告する。

2 実 験

2.1 装 置

HPLC は日本分光製であり、PU-980 型のポンプを 2 台、蛍光検出器は 821-FP 型、カラム恒温槽は 865-CO 型、オートサンプラーは 851-AS 型を使用した。カラムは化学品検査協会製の L-column ODS を使用した。

2.2 試 薬

反応用試薬: HMC (HPLC 用蛍光ラベル化試薬、関東化学製)、4-ジメチルアミノピリジン (99% 以上、メルク製)、*N,N*-ジシクロヘキシルカルボジイミド (関東化学製)、FFA 標準溶液: 酪酸 (C4:0)、カプロン酸 (C6:0)、カプリル酸 (C8:0)、カプリン酸 (C10:0)、ラウリン酸 (C12:0)、トリデカン酸 (C13:0)、ミリスチン酸 (C14:0)、ミリストオレイン酸 (C14:1)、ペンタデカン酸 (C15:0)、パルミチン酸 (C16:0)、パルミトオレイン酸 (C16:1)、マルガリン酸 (C17:0)、ステアリン酸 (C18:0)、オレイン酸 (C18:1)、リノール酸 (C18:2)、リノレン酸 (C18:3) (すべて 99% 以上、シグマ製) をそれぞれヘキサンで希釈して 5 mM の標準溶液を調製し、これを適宜ヘキサンで希釈して使用した。

アセトニトリル、エタノールは市販 HPLC 用、その他の試薬は市販特級を用いた。

2.3 前処理及び測定方法

試料は牛乳、ヨーグルト、チーズ、バターなどを供した。

2.3.1 試験溶液の調製 牛乳、ヨーグルト、バター、チーズは Fig. 1 に示す手順に従って試験溶液を調製した。

2.3.2 反応溶液の調製 HMC 20 mg、4-ジメチ

Fig. 1 Procedure for extraction of FFA and labeling FFA from milk or dairy products

*: HMC 0.2%, 4-dimethylaminopyridine 0.5% in acetonitrile (a) + DCC 1% in dichloromethane (b). (a): (b)=1 : 9.

Table 1 Analytical conditions for HPLC

Column	L-column ODS (250 mm×4.6 mm i.d.)
Mobile phase	
eluent A	H ₂ O
eluent B [†]	CH ₃ CN: C ₂ H ₅ OH (50: 50, v/v)
Detector	FL (Ex. 330 nm, Em. 395 nm)
Flow rate	1.0 ml/min
Injection volume	10 μl
Determination	peak area method

[†] gradient program according to % of eluent A is as follows: 50% (0 min) → 22% (5 min) → 22% (33.5 min) → 5% (40 min) → 5% (50 min)

ルアミノピリジン 50 mg をアセトニトリル 10 ml で定溶した後、これを 1% *N,N*-ジシクロヘキシルカルボジイミド-ジクロロメタン溶液 90 ml で混合し、反応溶液とした。

2.3.3 測定方法 試験溶液 1.0 ml に反応溶液 1.0 ml を加えて密栓混合して常温で 70 分以上反応後、その 10 μl を HPLC へ注入した。HPLC の条件を Table 1 に示す。この条件で FFA 標準溶液 5 μM を上記手順と同様に反応させ、その 10 μl を HPLC に注入し、得

Fig. 2 HPLC chromatograms of standard mixture (a) and milk sample (b)

1. C4: 0-HMC; 2. C6: 0-HMC; 3. C8: 0-HMC; 4. C10: 0-HMC; 5. C12: 0-HMC; 6. C14: 1-HMC; 7. C13: 0-HMC; 8. C18: 3-HMC; 9. C14: 0-HMC; 10. C16: 1-HMC; 11. C18: 2-HMC; 12. C15: 0-HMC; 13. C16: 0-HMC; 14. C18: 1-HMC; 15. C17: 0-HMC; 16. C18: 0-HMC

られたクロマトグラムのピーク面積より、内標準物質として用いる C13: 0 の HMC 誘導体とその他の FFA の HMC 誘導体とのピーク面積比を算出し、内標準法により定量した。

3 結果と考察

3・1 HPLC 条件の検討

標準品を用いてそれぞれの FFA の HMC 誘導体をあらかじめ調製した後、カラム及び移動相の最適条件を検討した。市販の ODS カラム 3 種類について比較検討した結果、L-column ODS (250 mm×4.6 mmφ) が最も理論段数が高く良好であった。又、移動相は従来、水-アセトニトリル系でのこの配分離が用いられてきた¹⁰⁾が、良好な分離が得られなかったため、B 液にエタノール-アセトニトリルの混合液を用いた場合の分離について検討した結果、それらの組成が 1:1 で上記 FFA の

Fig. 3 Effect of reaction time on the formation of FFA derivatives

Reaction temperature: room temperature

HMC 誘導体のピークがすべて分離することが確認された。Fig. 2 に標準溶液及び実試料である牛乳のクロマトグラムを示す。

3・2 ラベル化反応時間の検討

上述 (2・3・2) の反応溶液 1.0 ml と C12: 0-FFA 標準溶液 1.0 ml を混合し、その経時変化について求めた。Fig. 3 に示すように、160 分後でも反応は完全に終了していないが、内標準物質として、測定対象の FFA と同種の直鎖で一価の FFA である C13: 0 を用いているため、反応が完全に終了しなくても、定量には影響がないことを考慮し、反応時間は反応が緩やかになる 70 分以上とした。

3・3 標準物質と内標準物質のピーク面積比

C4: 0, C8: 0, C12: 0, C13: 0, C16: 0, C18: 0 の 6 種類の FFA 標準溶液を等濃度 (各 1~50 μg/ml) で混合した溶液を上記反応条件 (3・2) に従って 3 時間反応後、その 10 μl を HPLC に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積より、内標準物質である C13: 0 の HMC 誘導体と、その他の 5 種類の FFA の HMC 誘導体とのピーク面積比を算出した。5 種類の誘導体のいずれもどの濃度においても一定のピーク面積比を示した。又、上述 (2・2) の 16 種類の FFA 標準溶液を等濃度 (各 50 μg/ml) に混合した溶液を反応後、その 10 μl

Fig. 4 Determination range of FFA using this method

を HPLC に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積より、内標準物質である C13:0 の HMC 誘導体とその他の 15 種類の各 FFA の HMC 誘導体とのピーク面積比を求め、その値を定量の際に用いた。

3.4 定量範囲

C12:0-FFA 標準溶液 1 pM~10 nM を上記反応条件 (3.2) に従って 3 時間反応後、その 10 μ l を HPLC に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積を算出し、濃度との関係について検討した。Fig. 4 に示すように上記すべての濃度範囲で直線性 (相関係数 0.999 以上) が得られた。

3.5 抽出溶媒の検討

C4:0, C8:0, C12:0, C16:0, C18:0 の 5 種類の FFA 標準混合溶液 10 ppm をヘキサン、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、ヘキサン:ジエチルエーテル (1:1) の 4 種類の溶媒を用いてそれぞれ調製し、この混合溶液 10 ml に水 5 ml を加え、それぞれ 1 回抽出し、脱水した溶液 1 ml に内標準物質である C13:0 の 10 ppm ヘキサン溶液を 1 ml 添加し、上記反応条件 (3.2) で反応させることにより、5 種類の FFA の回収率を求めた。Table 2 に示すようにジエチルエーテル及びヘキサン:ジエチルエーテル (1:1) が良い回収率であったが、ジエチルエーテルは水にわずかに溶解し、揮

Table 2 Recoveries of FFA standards by four kinds of extraction solution ($n=4$)

FFA standards	Recovery, %			
	1)hexane extn.	2)diethyl ether extn.	3)dichloro-methane extn.	4)1:2)= 1:1 extn.
C4:0	2.9	92.0	39.5	91.3
C8:0	84.4	93.1	90.6	93.2
C12:0	86.7	97.3	95.6	97.5
C16:0	90.1	97.8	96.8	99.1
C18:0	87.8	94.1	95.4	96.1

Table 3 Recoveries of FFA from milk ($n=5$)

FFA	Added/ μ g g ⁻¹	Recovery, %	S.D. [†]	RSD ^{†2} , %
C4:0	10	95	0.14	1.4
C8:0	10	91	0.12	1.3
C12:0	10	93	0.19	2.0
C16:0	20	99	0.92	4.6
C18:0	10	97	0.37	3.8

†: standard deviation; †²: relative standard deviation

Table 4 Recoveries of FFA from process cheese ($n=5$)

FFA	Added/ μ g g ⁻¹	Recovery, %	S.D. [†]	RSD ^{†2} , %
C4:0	50	98	2.55	5.1
C8:0	50	99	1.31	2.6
C12:0	50	98	1.10	2.2
C16:0	200	95	8.20	4.1
C18:0	100	94	4.03	4.0

†: standard deviation; †²: relative standard deviation

発しやすいため、そのための操作性を考慮し、ヘキサン:ジエチルエーテル (1:1) で試料を抽出することとした。

3.6 添加回収実験

前述 (2.3) 前処理及び測定方法に従って、C4:0, C8:0, C12:0, C16:0, C18:0 の 5 種類の FFA 標準混合溶液を用いて牛乳、プロセスチーズにつき添加回収実験を行った。Table 3, Table 4 に示すように 5 種類のどの FFA についても、牛乳で 91~99%, プロセスチーズで 94~99% といずれも良好な結果が得られた。

Table 5 Repeatability of FFA measurements from milk samples ($n=5$)

FFA	$x^{\dagger}/\mu\text{g g}^{-1}$	S.D. ^{†2}	RSD ^{†3} , %
C4:0	11.23	0.21	1.9
C6:0	5.59	0.28	5.0
C8:0	3.58	0.13	3.5
C10:0	4.12	0.11	2.8
C12:0	3.92	0.12	3.0
C14:0	8.08	0.35	4.4
C14:1	0.83	0.05	6.4
C15:0	1.77	0.18	10.2
C16:0	22.32	0.93	4.2
C16:1	1.82	0.10	5.6
C17:0	0.34	0.02	5.9
C18:0	8.76	0.35	3.7
C18:1	18.91	0.71	3.8
C18:2	4.15	0.18	4.2
C18:3	0.53	0.05	8.8
total	96.04	2.90	3.0

†: mean; †²: standard deviation; †³: relative standard deviation

3・7 実試料の繰り返し精度

実試料として牛乳, プロセスチーズを用いて 5 回の繰り返し測定を行った。牛乳の結果を Table 5 に, 又, プロセスチーズの結果を Table 6 に示す。15 種類の FFA について, 相対標準偏差は牛乳が 1.9~10.2%, プロセスチーズが 0.3~8.7% で満足する結果が得られた。

3・8 実試料の測定結果

市販の牛乳, ヨーグルト, プロセスチーズ, バターの FFA を測定した結果を Table 7 に示した。測定値については 0.1 $\mu\text{g/g}$ 以下を定量下限とした。なお, これらの測定値から脂肪分の AV を計算し, その結果を実測値と併せて示した。保存期間や熟成方法にもよるが, 牛乳やヨーグルトのように FFA 含量の少ないものから, チーズやバターのように FFA 含量の多いものまで様々で, 広範囲にわたって測定可能であり, AV 値ともほぼ対応がとれていることが確認された。

文 献

- 1) 永井政喜, 山下昭芳, 桜田宏介, 浅居良輝, 萬田富治, 篠田 満: 畜産の研究, **44**, 453(1990)。
- 2) 日本油化学協会制定, 基準油脂分析試験法 2.4.1-71 酸価 (1983)。
- 3) G. H. Richardson: "Standard Method for the Examination of Dairy Products", p. 327 (1985),

Table 6 Repeatability of FFA measurements from process cheese samples ($n=5$)

FFA	$x^{\dagger}/\mu\text{g g}^{-1}$	S.D. ^{†2}	RSD ^{†3} , %
C4:0	35.38	0.41	1.2
C6:0	12.32	0.33	2.7
C8:0	13.36	0.48	3.6
C10:0	37.92	0.28	0.7
C12:0	48.14	0.54	1.1
C14:0	106.56	0.36	0.3
C14:1	15.44	0.15	1.0
C15:0	28.44	0.60	2.1
C16:0	253.06	1.67	0.7
C16:1	25.04	0.52	2.1
C17:0	7.77	0.68	8.7
C18:0	86.58	1.57	1.8
C18:1	207.76	1.12	0.5
C18:2	24.18	0.47	1.9
C18:3	16.00	0.63	3.9
total	917.71	4.40	0.5

†: mean; †²: standard deviation; †³: relative standard deviation

Table 7 Assay results of FFA and acid value from milk and dairy products

FFA	Concentration/ $\mu\text{g g}^{-1}$			
	Milk	Yogurt	Butter	Process Cheese
C4:0	5	8	8	19
C6:0	3	6	17	15
C8:0	3	6	15	13
C10:0	5	10	45	30
C12:0	3	8	79	40
C14:0	7	18	179	89
C14:1	—	2	32	12
C15:0	1	4	51	21
C16:0	19	46	563	213
C16:1	1	4	56	19
C17:0	—	1	15	5
C18:0	10	17	275	83
C18:1	19	35	657	165
C18:2	2	5	79	22
C18:3	—	1	24	9
total	76	172	2100	758
AV [†]	0.51	1.26	0.61	0.68
AV ^{†2}	0.55	1.27	0.45	0.51

†: calculated; †²: measured

(American Public Health Association Inc., New York).

- 4) A. H. Woo, R. C. Lindsay: *J. Dairy Sci.*, **63**, 1058 (1980)。

- 5) H. C. Deeth, C. H. Fitz-Gerald, A. J. Snow: *J. Dairy Sci.*, **67**, 1521 (1983).
- 6) J. M. Elliott, B. de Haan, Parkin, K. L. : *J. Dairy Sci.*, **72**, 2478 (1989).
- 7) S. Lam, E. Grushka: *J. Chromatogr.*, **158**, 207 (1978).
- 8) W. Voelter, R. Huber, K. Zech: *J. Chromatogr.*, **217**, 491 (1981).
- 9) 山本信也, 吉田誠一, 高松 翼: 油化学, **45**, 155 (1996).
- 10) 蛍光ラベル化剤カタログ (関東化学), p. 7 (1992).

要 旨

乳及び乳製品中の遊離脂肪酸を 4-ヒドロキシメチル-7-メトキシマリンによりラベル化した後, HPLC を用いて脂肪酸別に高感度に同時定量する方法を確立した. 乳及び乳製品の前処理としてヘキサン: ジエチルエーテル (1:1) を用いることで, 容易にタンパク質や糖質などを除去し, ラベル化することが可能となった. 本法は 1 pM~10 nM まで測定が可能であり, 検出限界は 0.1 µg/g, 回収率は 91~99%, 相対標準偏差は 0.3~10.2% と良好であった. なお, 本法と従来の中和滴定法との間にはほぼ対応がとれていることが確認された.