Quantitative Determination of *Trans*-Fatty Acids in Oils and Fats by Capillary Gas Chromatography: Results of a JOCS Collaborative Study

Seiichi Shirasawa^{1*}, Makoto Shiota², Hiroshi Arakawa³, Yasuhiko Shigematsu⁴, Kazuhisa Yokomizo⁵, Noriko Shionoya⁶, Takahisa Okamoto⁷, Yousuke Miyazaki⁸, Shigeyuki Takahashi⁹ and Katsuichi Himata¹⁰

¹ The Nisshin OilIIO Group, Ltd. (1-Banchi, Shinmei-cho, Yokosuka, Kanagawa 239-0832, JAPAN)

² Snow Brand Milk Products Co., Ltd. (1-1-2, Minami-dai, Kawagoe, Saitama 350-1165, JAPAN)

³ ADEKA CORPORATION (7-2-34, Higashi-Oku, Arakawa-ku, Tokyo 116-8553, JAPAN)

⁴ Q.P. Corporation (5-13-1, Sumiyoshi-cho, Fuchuu, Tokyo 183-0034, JAPAN)

⁵ J-OIL MILLS, INC. (8-1, Akashi-cho, Chuo-ku, Tokyo 104-0044, JAPAN)

⁶ Japan Food Research Laboratories (4-5-13, Oozu, Naka-ku, Nagoya 460-0011, JAPAN)

⁷ Japan Institute for Oils and Fats and Other foods Inspection (3-27-8, Nihonbashi-Hamacho, Chuo-ku, Tokyo 103-0007, JAPAN)

⁸ NOF CORPORATION (3-3, Chidori-cho, Kawasaki-ku, Kawasaki, 210-0865, JAPAN)

⁹ NIPPON YURYO KENTEI KYOKAI (5-26-1, Kaigan-doori, Naka-ku, Yokohama 231-0002, JAPAN)

¹⁰ YAMAZAKI BAKING CO., LTD (3-15-6, Chitose, Sumida-ku, Tokyo 130-0025, JAPAN)

Abstract: Excessive intake of *trans*-fatty acids increases the risk of cardiovascular disease. Much attention is drawn to the consumption of *trans*-fatty acids worldwide, and regulations for *trans*-fatty acids are instituted in several countries.

Precise and convenient methods for determination of *trans*-fatty acid level are required, but there is no standard method using capillary Gas Chromatography in Japan. Therefore, for the new standard method, collaborative studies were carried out.

The results were as follows:

- 1) Heptadecanoate (C17:0 free fatty acid) was chosen for internal standard substance.
- 2) Two Gas Chromatography columns, SP2560 (100 m) column (100% cyanopropyl polysiloxane liquid phase) and TC-70 (60 m) column (70% cyanopropyl polysilphenylene-siloxane liquid phase), were examined in the collaborative studies. We measured the edible oil samples containing 2-45 g/100 g of *trans*-fatty acids, and *trans*-fatty acid contents were quantitatively the same with both columns. The range of reproducibility coefficient of variation were below 10%.
- 3) Fats and oils sampled were soybean, rapeseed, palm, palm kernel, beef tallow, pork fat and their hydrogenated forms, for which good peak resolution was achieved.

From the above results, the technique evaluated in the present study was considered to be suitable for determination of the content of *trans*-fatty acids in fats and oils exclusive of fish oil and milk fat.

Key words: *trans*-fatty acid, fatty acid analysis, capillary column, gas chromatography

1 緒 言

トランス脂肪酸は、LDL コレステロールを増加させ、

HDL コレステロールを減少させる働きがあるといわれている¹⁾。また、多量のトランス脂肪酸の摂取が動脈硬化などによる心疾患などの発症リスクを高める可能性

* Correspondence to: Seiichi Shirasawa, Standards and Analyses, Central Research Laboratory, The Nisshin OilIIO Group, Ltd., 1-Banchi, Shinmei-cho, Yokosuka, Kanagawa 239-0832, JAPAN

E-mail: s-shirasawa@nisshin-oillio.com

Accepted May 22, 2007 (received for review April 2, 2007)

Journal of Oleo Science ISSN 1345-8957 print / ISSN 1347-3352 online

http://jos.jstage.jst.go.jp/en/

があるとされ²⁾、トランス脂肪酸摂取の多い各国ではトランス脂肪酸量の表示義務化も行われている³⁻⁵⁾。日本国内においては、内閣府食品安全委員会がファクトシートを発行した⁶⁾などの動きがあるが、現状規制の動きはない。しかし、このような状況を受けて、トランス脂肪酸の簡便・正確な分析法の需要が高まっている。トランス脂肪酸分析法としては、赤外吸収 (IR)、HPLC、ガスクロマトグラフィー (GC) などがあるが、分析精度・簡便性の点から脂肪酸メチルエステルの GC 分離によりトランス脂肪酸を定量する直接 GC 法が主流となりつつある。しかし、日本の基準油脂試験法には、IR 法と、硝酸銀 TLC 分画—GC 法が収載されているが、直接 GC 法は存在していない。そこで、直接 GC 法により、簡便にモノエン、ジエン、トリエン型のトランス脂肪酸を定量可能な試験方法を、合同実験を踏まえて設定することとなった。

合同実験は以下の前提で実施した：

- ・油脂中のトランス脂肪酸含量測定法の設定であり、食品からの抽出は範囲に含まない。
- ・乳脂、魚油はトランス脂肪酸組成が複雑なため、適用範囲から除外する。
- ・国際的な各種ガスクロマトグラフ法⁷⁻⁹⁾を参考にする。
- ・キャピラリーカラムを用いた、メチルエステル体の直接 GC 法による分析とする。
- ・内部標準物質を用いた、遊離脂肪酸換算による定量分析とする。
- ・試験法における装置・器具の限定を出来る限り避けるために、カラム液相および長さについて幅を持

たせた実験設定を行う。

・幅広いトランス脂肪酸含量範囲の試験サンプルを用いた検討を行う。

2 実 験

2.1 試料、標準品及び試薬

2.1.1 試 薬

定量標準物質として検討に用いたヘプタデカン酸 (C17:0FFA) は東京化成工業(株)製のものを、ヘネイコサン酸 (C21:0FFA) は Sigma 製のものをを用いた。定性・分離確認用混合試薬として、SP-2560 評価用 FAME Mix (Supelco 製：製品番号 47088-U) をを用いた。これらの試薬は合同実験参加全機関で同一ロットのものを使用した。

2.1.2 試料油脂およびその調製

大豆油、大豆水素添加油、なたね油、なたね水素添加油は日清オイリオグループ(株)が提供したものをを用い、大豆油および大豆水素添加油、なたね油およびなたね水素添加油をそれぞれ 1:0, 20:1, 10:1, 5:1, 0:1 (いずれも w/w) に取りまとめ機関が調製した。調製サンプルは内容を示さずに参加機関に送付し、実験に供した。牛脂、豚脂、パーム核油、およびこれらの水素添加油は日本油脂(株)が、パーム油およびパーム水素添加油は(株)ADEKA が提供したものをを用いた。サンプルの送付および各参加機関での保管は冷蔵条件 (約 4℃) で行った。これら試料油脂の基本分析値を Table 1 に示す。

Table 1 Samples Used for the Collaborative Study.

	Soybean	Hydrogenated soybean	Rapeseed	Hydrogenated rapeseed
POV	0.60	0.63	0.48	0.43
AV	0.06	0.05	0.06	0.06
IV	-	72	-	74
	Beef tallow	Hydrogenated beef tallow	Pork fat	Hydrogenated pork fat
IV	48	39	60	43
m.p.	41	48	38	48
	Palm kernel	Hydrogenated palm kernel	Palm	Hydrogenated palm
IV	18	13	51	40
m.p.	27	29	36	45

2.2 装置および条件

参加各機関が実験に用いたガスクロマトグラフ装置を Table 2 に示す。

キャピラリーカラムは以下の 2 種類を用いた。実験に際しては、参加全機関で同一液相ロットの製品を使用した。

- ・ SP-2560 (Supelco 製) カラム長 100 m, 内径 ϕ 0.25 mm, 膜厚 0.20 μ m
- ・ TC-70 (ジールサイエンス製) カラム長 60 m, 内径 ϕ 0.25 mm, 膜厚 0.25 μ m

ガスクロマトグラフ条件は、事前に取りまとめ機関が設定し、各機関同一条件にて実施した。それぞれのカラムを用いた場合のガスクロマトグラフ条件を Table 3 に、得られたクロマトグラム例を Fig. 1 に示す。

Table 2 Gas Chromatographic Equipments Used by Collaborators.

Laboratory	Gas Chromatography	Auto Injector
A	HP6890 (Agilent)	equipped
B	HP5890 II (Agilent)	equipped
C	HP5890 (Agilent)	equipped
D	HP5890 II (Agilent)	equipped
E	HP6890 (Agilent)	equipped
F	GC-2010 (Shimadzu)	equipped
G	GC-17A (Shimadzu)	none
H	HP5890 (Agilent)	equipped
J	GC-2010AF (Shimadzu)	equipped
K	HP5890 II (Agilent)	equipped
L	GC-17A (Shimadzu)	none

2.3 操 作

メチルエステル化は基準油脂分析試験法 2.4.1.2¹⁹⁹⁶ 三フッ化ホウ素メタノール法¹⁰⁾ により実施した。メチルエステル化の際、装置や器具の限定は行わなかった。内部標準物質は試料油脂の約 10% (w/w) の添加量とし、試料油脂と同時にメチルエステル化を行った。ガスクロマトグラフへの負荷量を一定とするため、ガスクロマトグラフ注入時の試料濃度を約 1% と規定した。以下に操作を示す。内部標準物質 2 ~ 5 mg と試料油脂 20 ~ 50 mg を同一容器に精秤した。0.5 mol/L 水酸化ナトリウムメタノール溶液 1 mL を加え、油滴が消失するまで約 100℃ で 5 ~ 10 分加熱した。放冷後 14% 三フッ化ホウ素メタノール溶液 1 mL を加え、再度約 100℃ で 5 分加熱した。放冷後、試料濃度が約 1% になるようにヘキサン 2 ~ 5 mL を加え、これに飽和食塩水を加え振とうした。ヘキサン層を採り、少量の無水硫酸ナトリウムで脱水し、ガスクロマトグラフ用試料溶液とした。

各試料につき、以上の操作を合同実験ごとに所定の n 数で実施し、Table 3 の条件で GC に供した。

クロマトグラム中のトランス脂肪酸の同定は、事前に取りまとめ機関が所定の GC 条件にて確認したクロマトグラム中の対象トランス酸の相対保持時間を参照することで行った。参照クロマトグラムのピーク同定に関しては、市販定性用試薬 (リノール酸メチルエステル Mix: 製品番号 47791, リノレン酸メチルエステル Mix: 製品番号 47792, いずれも Supelco 製) および硝酸銀 TLC で分画した大豆水素添加油メチルエステルとの溶出時間比較と GC-MS 分析を併用することにより決定した。また、この際、既報^{11, 12)} によるピーク同定結果を参照した。

Table 3 Gas Chromatography Conditions Used in the Experiments.

	Method a	Method b
Column	SP-2560 (Supelco Inc.)	TC-70 (GL-Science)
Stationary phase	100% cyanopropyl polysiloxane	70% cyanopropyl polysilphenylene-siloxane
Length	100 m	60 m
Internal diameter	0.25 mm	0.25 mm
Film thickness	0.20 μ m	0.25 μ m
Temperature	180℃ ¹⁾	190℃
Inj/Det	250℃/250℃	250℃/260℃
Carrier gas	1 mL/min (Helium)	1 mL/min (Helium)
Split ratio	100 : 1	100 : 1
Inject volume ²⁾	1 μ L	1 μ L

¹⁾ 180℃ (60 min)-(10℃/min)-220℃ 10 min

²⁾ 1% sample solution in hexane

Fig. 1 GC Chromatograms.

Sample : Mixture of Rapeseed Oil and Hydrogenated Rapeseed Oil (10:1, w/w).

2・4 含量計算・統計処理

取りまとめ機関が事前に配布したクロマトグラムを参照し、C16:1, C18:1, C18:2, C18:3, C20:1の各トランス脂肪酸ピークを選び出し、データ処理装置によりそのピーク面積値を算出した。これを下記計

算式に適用し、含量を小数点以下第2位まで算出した。

<計算式>

①内部標準補正あり（内部標準としてヘプタデカン酸を用いた場合）

トランス脂肪酸含量 (g/100 g) = $A \times E \times F /$

$$(A \times D - B \times C) / G \times 100$$

②内部標準補正なし

$$\text{トランス脂肪酸含量 (g/100 g)} = E \times F / D / G \times 100$$

③組成計算

$$\text{トランス脂肪酸含量 (\%)} = H / J \times 100$$

但し、記号は以下を表す

A：内部標準無添加クロマトグラムのパルミチン酸のピーク面積

B：内部標準無添加クロマトグラムのヘプタデカン酸溶出位置に現れたピーク面積

C：内部標準添加クロマトグラムのパルミチン酸のピーク面積

D：内部標準添加クロマトグラムの内部標準物質のピーク面積

E：内部標準添加クロマトグラムの各分子種トランス脂肪酸ピーク面積値の合計

F：内部標準物質添加量 (mg)

G：試料採取量 (mg)

H：内部標準無添加クロマトグラムの各分子種トランス脂肪酸ピーク面積値の合計

J：内部標準無添加クロマトグラム中の溶剤ピークを除いた全ピーク面積合計値

統計処理として、基準油脂試験法¹³⁾を参考に、Cochran 検定および、Dixon 検定を行った。

3 実験結果

3.1 合同実験 1 (予備実験)

米国でのトランス脂肪酸表示義務化³⁾にともない、AOCS のトランス脂肪酸分析試験法が改訂された⁸⁾。本法はトランス脂肪酸と他の脂肪酸との高分離が期待できるため、まず本法に準じた実験を行った。ただし、内部標準物質については変更を行うこととした。改訂

AOCS 法⁸⁾で用いている内部標準物質はトリヘネイコサノイン (Tri C21:0) である。改訂 AOCS 法は、トランス脂肪酸のみではなく、総脂質等も算出する手法であること、C21:0 は通常の油脂においてはほとんど検出されないことから本物質が採用されたと考えられるが、トランス脂肪酸を遊離脂肪酸換算で算出する際には、標準物質も遊離脂肪酸体であれば換算係数が不要であること、トリヘネイコサノイン試薬が高価であり、かつ生産量が少ないため合同実験に供する量が確保できないことから、ヘネイコサノ酸 (C21:0 遊離脂肪酸) を内部標準物質とすることとした。油脂中のトランス脂肪酸はトリグリセリド体で存在しており、この観点からは標準物質もトリグリセリド体である方が望ましいが、遊離・エステル体を問わずメチルエステル化可能な三フッ化ホウ素メタノール法を前処理に採用することで、問題は無いと判断した。

合同実験 1 は大豆油および大豆水素添加油、なたね油およびなたね水素添加油、それらの混合サンプル計 10 サンプルを用い、11 機関で実施した。キャピラリーカラムおよび内部標準物質ヘネイコサノ酸は全機関で同一ロットのものを使用した。各機関において、内部標準添加を 2 連でサンプル調製し、Table 3 中の Method a のガスクロマトグラフ条件にて分析を行った。Table 4 に検定後統計処理結果を示す。この検討においては、とくにトランス含量低位のサンプルについて、再現相関係数 (CV_R) が大きい結果となっている。この要因として、内部標準物質の秤量法を統一していなかった点が考えられたため、これ以降の実験では、内部標準物質は有機溶剤で定溶して測り採る方式に統一することとした。

3.2 標準物質の選択

合同実験 1 で得られたクロマトグラムに溶出した全ピークを用いて、総脂肪酸量を測定すると 100 g/100 g

Table 4 The Results of the Statistical Analysis (1st. Collaborative Experiment).

Sample	Soybean / Hydrogenated Soybean (w/w)					Rapeseed / Hydrogenated Rapeseed (w/w)				
	1:0	20:1	10:1	5:1	0:1	1:0	20:1	10:1	5:1	0:1
Total number of laboratories in a given assay	11	10	10	11	11	11	10	11	11	9
Total number of values in a given assay	22	20	20	22	22	22	20	22	22	18
Mean	2.6	4.2	6.1	9.1	44.9	2.9	5.2	6.9	10.4	52.0
Repeatability standard deviation (Sr)	0.297	0.103	0.202	0.277	0.807	0.113	0.217	0.481	0.451	0.802
Repeatability coefficient of variation (CVr)	11.384	2.435	3.298	3.025	1.798	3.915	4.174	7.016	4.353	1.542
Reproducibility standard deviation (S_R)	0.35	0.72	0.81	1.13	3.57	0.41	0.74	1.24	1.29	1.82
Reproducibility coefficient of variation (CV_R)	13.59	17.17	13.21	12.34	7.95	14.18	14.21	18.12	12.48	3.49
Repeatability value (r)	0.84	0.29	0.57	0.78	2.28	0.32	0.62	1.36	1.28	2.27
Reproducibility value (R)	1.00	2.05	2.29	3.19	10.10	1.16	2.09	3.52	3.66	5.14

Fig. 2 Chromatograms of C21:0 FFA and C17:0 FFA Reagents' Methyleneester.

GC Condition :

(a)&(b) : TC-70 ($\phi 0.25 \times 60 \text{ m} \times 0.25 \mu\text{m}$) column, oven temp. $150^\circ\text{C} \rightarrow 3^\circ\text{C}/\text{min.} \rightarrow 240^\circ\text{C}$

(c)&(d) : DB-1ht ($\phi 0.32 \times 5 \text{ m} \times 0.1 \mu\text{m}$) column, oven temp. $50^\circ\text{C} \rightarrow 10^\circ\text{C}/\text{min.} \rightarrow 370^\circ\text{C}$ (10min. hold).

を超える値が算出され、試薬純度について疑問が呈された。そこで内部標準物質の純度確認を GC 法および中和価測定により検討した。GC 法の結果を Fig. 2 に示す。合同実験 1 に用いた試薬ヘネイコサン酸をメチルエステル化し、脂肪酸分析に用いる高極性カラムに導入したところ、Fig. 2a のように他の脂肪酸種はほとんど確認されなかったが、このメチルエステルを高沸点まで分析可能な無極性カラムに導入したところ、Fig. 2c に示すようにクロマトグラムの高沸点部に不明ピークが確認され、C21:0 メチルエステルの面積値は 92% と算出された。本試薬の中和価測定も試みたが、溶剤に溶けにくく、安定した数値が算出されなかった。

合同実験実施時点において、ヘネイコサン酸試薬は、合同実験 1 に用いた製造元のものしか入手ルートが確認出来なかった。そこで、他の試薬を標準物質として検討することとし、厚生労働省による食事摂取基準算出にも用いられているヘプタデカン酸 (C17:0 遊離脂肪酸) を検討することとした。試薬ヘプタデカン酸をメチルエステル化して得られたクロマトグラムを Fig. 2b および Fig. 2d に示す。いずれの GC 条件においても良好な結果が得られた。試薬ヘプタデカン酸については、中和価の測定結果が 209.8 (2 連測定の平均値) と算出され、理論値 207.45 から計算上の純度が 101.1% と算出された。以上二つの手法で十分な純度であると判

Fig. 3 Relative FID Sensitivity of Equal Amounts of the Methyleneesters as C12:0 Area for 100.

断されたため、以後の実験はヘプタデカン酸を標準物質として検討することとした。

3.3 FID 感度補正の検討

改訂 AOCS 法⁸⁾ においては、ガスクロマトグラフにより得られた各ピークについて、理論 FID 感度を用いて補正を行うこととしている。感度補正の基準油脂試験法における必要性を検討するために、混合メチルエステル試薬を Table 3 中の Method a のガスクロマトグラフ条件にて分析を行い、各ピークの相対面積値を求めた。Fig. 3 に C12:0 を基準にした相対感度を図示し

た。使用した混合試薬 (SP-2560 評価用 FAME Mix) は, C12:0, 9c-C18:1, 11c-C18:1, 11c-C20:1, c-C18:3, C21:0 のメチルエステルを等量ずつ含み, 理論 FID 感度は点線のように表されるが, 各機関の実測値から算出した感度は, 実線のように広く分布した。この結果から, FID 感度は装置の状態等により一定ではないと確認がなされた。分析対象であるトランス脂肪酸の主な構成成分は C18 だが, 今回の検討においては, C17 もしくは C21 脂肪酸を内部標準物質に設定しており, 標準物質と分析対象の感度差がそもそも大きくないことも踏まえ, 含量算出において, 理論値による補正の採用は見送ることとした。

3.4 合同実験 2

ヘプタデカン酸標準を用い, 合同実験 1 と同様の条件で再度実験を行った (10 機関)。サンプルとしては, 合同実験 1 に用いたサンプルのうち, なたね油となたね水素添加油, およびその混合サンプルの計 5 点とした。合同実験 1 の結果を踏まえ, 定量標準は, 有機溶剤 (クロロホルム) 溶解により添加する形に統一した。ガスクロマトグラフ条件は, 合同実験 1 と同様 Table 3 中の Method a の条件とした。ヘプタデカン酸は多くの油脂で微量ながら存在が確認されるため, 合同実験 2 においては, 内部標準添加を 2 連で, 内部標準無添加

を 1 連でデータ取得を行い, 定量標準の補正の有無それぞれを算出することとした。また, 本実験では内部標準無添加のクロマトグラムから脂肪酸組成を算出し, トランス脂肪酸を組成%で算出する手法も併せて検討した。Table 5 に算出結果を示す。組成計算で算出した数値に対し, 標準物質を用いた定量結果は, 低めの数値となっているが, メチルエステル換算の数値である組成計算に対し, 標準物質を用いた定量は遊離脂肪酸換算であるため, メチルエステルと遊離脂肪酸の分子量差を反映した結果となっていると考えられる。内部標準物質 (C17:0) と同一の位置に妨害ピークが存在する場合, 定量結果が不正確になるため, 内部標準無添加のクロマトグラムを用いた補正の有無を比較したが, 補正有りの場合は補正なしに対して若干数値が高くなることが確認された。この検討に用いたサンプルにおいては, 補正有無による数値の差は必ずしも大きなものではなかったが, ヘプタデカン酸を標準とする場合, 合同実験 2 の手法を基に, 定量標準の補正を行うことが望ましいと判断した。Table 6 に「内部標準補正あり」の場合の検定後統計処理結果を示す。Cochran 検定によりいくつかの異常値が検出されたが, Dixon 検定で排除されたデータは無く, 且つ合同実験 1 と比較すると, いずれのサンプルでも室間再現性に改善が認められた。改善の理由として, 合同実験 2 で統一化

Table 5 Total Trans-Fatty Acid Contents Measured by 10 Laboratories (2nd. Collaborative Experiment).

Table 5a ¹⁾						Table 5b ²⁾					Table 5c ³⁾						
	Sample ⁴⁾						Sample ⁴⁾						Sample ⁴⁾				
	1:0	20:1	10:1	5:1	0:1		1:0	20:1	10:1	5:1	0:1		1:0	20:1	10:1	5:1	0:1
Lab A	2.66	4.54	6.33	9.39	45.76	2.65	4.52	6.27	9.33	45.24	2.90	4.92	6.84	10.24	49.07		
Lab B	1.75	3.73	5.53	8.42	44.36	1.74	3.70	5.49	8.31	44.01	1.86	4.08	5.87	9.09	48.00		
Lab C	2.13	3.54	4.92	7.53	42.43	2.12	3.52	4.90	7.50	42.17	2.28	3.88	5.36	8.34	49.93		
Lab D	2.58	4.56	6.28	9.52	44.81	2.56	4.53	6.23	9.44	44.38	2.87	5.12	7.03	10.39	49.40		
Lab E	2.27	4.66	6.15	8.52	35.89	2.26	4.62	6.10	8.47	35.60	2.72	5.06	6.88	10.32	49.24		
Lab F	2.37	4.12	5.75	8.51	44.16	2.37	4.12	5.75	8.51	44.16	2.46	4.34	6.00	9.20	48.90		
Lab G	2.45	4.42	6.12	8.92	44.07	2.43	4.39	6.09	8.87	43.80	2.51	4.49	6.20	9.16	49.51		
Lab H	2.11	2.91	5.54	8.55	41.99	2.11	2.91	5.54	8.55	41.99	2.28	3.25	5.69	9.22	46.05		
Lab J	1.79	3.69	5.33	8.39	45.75	1.79	3.64	5.28	8.28	45.15	1.84	3.81	5.56	8.76	47.52		
Lab K	2.78	4.74	6.46	9.53	45.94	2.76	4.71	6.41	9.45	45.55	2.97	5.08	6.93	10.29	49.38		
Average	2.29	4.09	5.84	8.73	43.51	2.28	4.07	5.81	8.67	43.20	2.47	4.40	6.24	9.50	48.70		
Std.Dev.	0.35	0.60	0.50	0.62	2.99	0.34	0.60	0.49	0.62	2.93	0.41	0.64	0.63	0.74	1.18		
RSD	15.2	14.8	8.6	7.2	6.9	15.1	14.7	8.5	7.1	6.8	16.5	14.6	10.1	7.8	2.4		

¹⁾ Calculations made with correction by the internal standard

²⁾ Calculations made without correction by the internal standard

³⁾ Calculations measured as area % of the total fatty acid composition

⁴⁾ Mixture of Rapeseed Oil and Hydrogenated Rapeseed Oil (w/w)

した標準物質の添加方法（溶液として添加）に効果があったと思われるが、合同実験1に続いての検討であるため、参加各機関の操作熟練度が上がった要素もあると思われる。再現相関係数（ CV_R ）はトランス脂肪酸含量約5 g/100 g以上の試料については10%以下となり、実分析に適用可能と判断した。含量5 g/100 g未満の試料は10%以上の CV_R が算出されたが、AOCSの合同実験⁸⁾においても含量低位の試料については室間再現性が悪い結果となっており問題ないと判断した。

3.5 合同実験3

合同実験2により、AOCS法⁸⁾に準じたGC条件でヘプタデカン酸を標準として問題ない検定結果が得られたが、この条件は、100 mの長いカラムを用いるため、分析時間が長く、且つ使用装置によってはガスクロマトグラフの圧力上限値を超え、最適流量が設定できない可能性がある。また、カラムの種類を一種類に限定すると、カラムの供給がなされなくなる場合等のリスクを負う。そこで、合同実験3としてよりカラム長が短く、また合同実験1, 2と異なる液相を持つカラムを用いた実験を行うこととした。カラムとしてはTC-70（ジーエルサイエンス製）を選択した、本カラムはAOCS Cel1f-96⁷⁾記載のBPX-70と同種の70%シアノプロピルポリシルフェニレンーシロキサン液相を有するものである。合同実験にあたり、取りまとめ機関がガスクロマトグラフ条件を検討し、得られた最適条件（Table 3 Method b）にて実験を行った。標準物質および試料油脂サンプルは合同実験2と同様とした。データ取得は合同実験2と同様に内部標準添加を2連で、内部標準無添加を1連で実施し、定量標準の補正の有無それぞれを算出するとともに、組成による算出も行った。Table 7に算出結果、Table 8に「内部標準補正あり」の場合の検定後統計処理結果を示す。全試料

につき10%以下の CV_R が算出され、良好な室間再現性が得られた。また、カラム等の条件が異なる合同実験2と同様の数値が算出された。この結果をもって、合同実験に用いた2種類の液相からなるキャピラリーカラムを用いることで、約50～100 mのカラム長で実用的な含量算出が可能と判断した。

3.6 合同実験4

これまでの実験は主要な油脂産品であるなたねもしくは大豆油を用いた検討であるが、他の油脂への適用を少数機関（4または5機関）にて確認した。

分析サンプルとして、パーム油、パーム核油、牛脂、豚脂およびこれらの水素添加油計8サンプルについて、合同実験2および合同実験3それぞれの条件にて分析実施した。また、この際、合同実験1で検討した大豆油およびその水素添加油のTC-70によるデータ取得も行った。本検討は、クロマトグラムの分離状態確認を主目的とし、内部標準物質は用いず、結果は組成%で算出した。トランス脂肪酸ピークの同定は、これまでの大豆・なたねを参考とした。測定結果をTable 9に示す。少数機関による実験ではあるが、SP2560, TC70いずれを用いた場合にもそれぞれのサンプルで各機関同等の数値を得ることが出来た。この結果から、今回検討した分析条件は広い範囲の食用油に適用可能と判断した。

4 考 察

今回のわれわれの検討により、いわゆる「脂肪酸組成分析」と同様の操作で、油脂中のトランス脂肪酸含量を簡便に測定できることが確認された。ただし、トランス脂肪酸を含む油脂のクロマトグラムは各ピークが近接するため、安定した分離状態の維持、ピークの

Table 6 The Results of the Statistical Analysis after the Test in “the Presence of Correction by the Internal Standard” (2nd. Collaborative Experiment).

Sample	Rapeseed / Hydrogenated Rapeseed (w/w)				
	1:0	20:1	10:1	5:1	0:1
Total number of laboratories in a given assay	8	10	9	8	9
Total number of values in a given assay	16	20	18	16	18
Mean	2.3	4.1	5.8	8.8	44.4
Repeatability standard deviation (Sr)	0.020	0.096	0.050	0.070	0.588
Repeatability coefficient of variation (CVr)	0.894	2.344	0.859	0.796	1.325
Reproducibility standard deviation (SR)	0.39	0.61	0.52	0.69	1.47
Reproducibility coefficient of variation (CV _R)	16.79	14.85	9.01	7.81	3.32
Repeatability value (r)	0.06	0.27	0.14	0.20	1.66
Reproducibility value (R)	1.09	1.72	1.48	1.94	4.17

Table 7 Total Trans-Fatty Acid Contents Measured by 10 Laboratories (3rd. Collaborative Experiment).

Table 7a ¹⁾						Table 7b ²⁾					Table 7c ³⁾						
	Sample ⁴⁾						Sample ⁴⁾						Sample ⁴⁾				
	1:0	20:1	10:1	5:1	0:1		1:0	20:1	10:1	5:1	0:1		1:0	20:1	10:1	5:1	0:1
Lab A	2.89	4.65	6.19	9.00	44.44	2.86	4.59	6.11	8.89	43.92	2.99	4.82	6.63	9.37	46.12		
Lab B	2.75	4.40	5.90	8.62	43.19	2.74	4.37	5.87	8.55	42.86	2.87	4.73	6.25	9.16	45.59		
Lab C	2.67	4.18	5.47	7.97	39.51	2.65	4.14	5.43	7.92	39.18	3.09	5.01	6.62	9.56	45.56		
Lab D	2.87	4.65	6.19	8.87	42.88	2.84	4.62	6.14	8.80	42.49	3.03	4.96	6.63	9.53	45.87		
Lab E	2.81	4.56	6.09	8.67	43.03	2.80	4.53	6.04	8.61	42.71	2.95	4.71	6.35	9.31	46.08		
Lab F	2.52	4.11	5.51	8.09	43.42	2.50	4.08	5.48	8.04	43.16	2.52	4.18	5.65	8.35	46.22		
Lab G	2.73	4.46	6.02	8.90	43.52	2.72	4.43	5.96	8.84	43.24	3.07	4.74	6.43	9.28	46.27		
Lab H	2.52	3.52	5.32	8.24	41.28	2.52	3.52	5.32	8.16	40.89	2.64	3.76	5.88	8.58	45.10		
Lab J	3.40	5.08	6.44	9.53	43.94	3.46	5.05	6.41	9.46	43.60	2.88	4.81	6.51	9.69	45.72		
Lab K	2.84	4.84	6.37	9.20	44.51	2.82	4.80	6.31	9.11	44.09	2.91	4.85	6.47	9.53	45.65		
Average	2.80	4.45	5.95	8.71	42.97	2.79	4.41	5.91	8.64	42.61	2.90	4.66	6.34	9.24	45.82		
Std.Dev.	0.25	0.43	0.39	0.50	1.52	0.27	0.43	0.38	0.49	1.51	0.18	0.39	0.33	0.44	0.37		
RSD	8.9	9.8	6.6	5.7	3.5	9.6	9.6	6.4	5.6	3.5	6.4	8.3	5.2	4.7	0.8		

¹⁾ Calculations made with correction by the internal standard²⁾ Calculations made without correction by the internal standard³⁾ Calculations measured as area % of the total fatty acid composition⁴⁾ Mixture of Rapeseed Oil and Hydrogenated Rapeseed Oil (w/w)**Table 8** The Results of the Statistical Analysis after the Test in “the Presence of Correction by the Internal Standard” (3rd. Collaborative Experiment).

Sample	Rapeseed / Hydrogenated Rapeseed (w/w)				
	1:0	20:1	10:1	5:1	0:1
Total number of laboratories in a given assay	9	10	10	10	9
Total number of values in a given assay	18	20	20	20	18
Mean	2.7	4.4	5.9	8.7	43.4
Repeatability standard deviation (Sr)	0.025	0.087	0.048	0.090	0.255
Repeatability coefficient of variation (CVr)	0.934	1.957	0.810	1.028	0.589
Reproducibility standard deviation (S _R)	0.14	0.44	0.39	0.50	0.99
Reproducibility coefficient of variation (CV _R)	5.15	9.90	6.61	5.75	2.28
Repeatability value (r)	0.07	0.25	0.14	0.25	0.72
Reproducibility value (R)	0.40	1.25	1.11	1.42	2.80

同定、ピークの積分条件決定などに技術的に難しい要素を含む。今回の合同実験において、実験を繰り返すごとに室間再現性は向上していく傾向が見られた。これは、実験の中で、手法の確立がなされたことを示すが、各担当者の熟練度が向上した要素もあると思われる。

また、今回の検討条件においても、予想される脂肪酸ピークすべての完全分離はなされないため、クロマトグラム中のいずれかにピークの重なりが生じる可能性がある。ピークの重なりは、測定対象油脂が持つ脂

肪酸組成により異なるため、トランス脂肪酸のピーク同定は、測定対象油脂ごとに予備検討を行い、確定させる必要がある。

今回は2種類のカラムを用いて合同実験を行い、いずれも良好な結果を得た。ただし、使用したカラムにより、Fig. 1のように、各脂肪酸の溶出パターンは異なる。合同実験1, 2に用いたSP2560の場合、C18:3_t, C20:1_c, C18:3_cの順にピーク溶出がなされ、C20:1_tは明瞭には検出されない。今回の実験の中で、GC-MSによる確認を行ったところ、C18:3_t溶出位置に、

Table 9 Total *Trans*-Fatty Acid Contents in Various Oils and Fats (4th. Collaborative Experiment).

Table 9a (SP2560)

	Lab A	Lab B	Lab C	Lab K	Average	StdDev	RSD
Palm	0.77	0.65	0.57	0.84	0.71	0.12	16.9
Hydrogenated palm	20.04	19.71	18.05	19.79	19.40	0.91	4.7
Pork fat	2.02	1.70	1.67	2.19	1.90	0.25	13.2
Hydrogenated pork fat	26.38	24.17	24.74	25.98	25.32	1.04	4.1
Palm kernel oil	0.00	0.00	0.00	0.09	0.02	0.05	250.0
Hydrogenated palm kernel	7.50	7.15	6.49	7.36	7.13	0.45	6.3
Beef tallow	4.88	4.63	4.12	4.71	4.59	0.33	7.2
Hydrogenated beef tallow	26.71	25.79	25.15	26.60	26.06	0.73	2.8

Table 9b (TC70)

	Lab A	Lab B	Lab C	Lab H	Lab K	Average	StdDev	RSD
Palm	0.93	0.78	0.84	0.52	0.67	0.75	0.16	21.3
Hydrogenated palm	18.21	18.93	19.47	16.50	19.34	18.49	1.22	6.6
Pork fat	2.02	1.89	2.04	1.37	2.25	1.91	0.33	17.3
Hydrogenated pork fat	24.09	21.09	24.72	23.91	25.08	23.78	1.58	6.6
Palm kernel oil	0.16	0.12	0.08	0.00	0.08	0.09	0.06	66.7
Hydrogenated palm kernel	6.85	7.62	6.84	6.67	6.88	6.97	0.37	5.3
Beef tallow	4.43	4.14	4.09	3.07	4.49	4.04	0.57	14.1
Hydrogenated beef tallow	23.97	23.83	23.91	23.34	24.87	23.98	0.55	2.3
Soybean	2.48	2.43	2.44	2.24	2.54	2.41	0.13	5.2
Hydrogenated soybean	39.96	43.64	40.66	36.86	40.56	40.43	2.78	6.9

C20:1 メチルエステルの主要マススペクトルイオンである $m/z = 324, 292, 250$ のピーク混在が確認されたため、このカラムを用いた場合、C20:1 r は C18:3 r 群と合わせてトランス脂肪酸と算出されていると考えられる。これに対し、合同実験 3 に用いた TC-70 の場合、C20:1 r は独立して検出された。

GC 条件は、SP2560 の場合、C20:1 c と C18:3 ccc の分離が、TC-70 の場合、C18:3 ccc と C20:0 が分離する条件に設定した。これらピークはカラム液相の特性により大変近接しており、ピーク分離状態を確認する指標として有効である。今回の実験では大きな問題とならなかったが、合同実験において、同一ロットのカラムを用い、GC 条件を統一したにもかかわらず、各機関のクロマトグラムにおいて、上記のピーク分離は全く同様ではなかった。これを受けて、基準油脂試験法制定に当たっては GC 条件については完全に固定せず、今回の GC 条件を前提に、最適ピーク分離が得られる条件を各使用者が設定するスタイルにすることが望ましいと判断した。

今回の実験においては、トランス脂肪酸の高分離を意図して、昇温分析ではなく、恒温分析をメソッドとして設定した。脂肪酸分析を連続で行う場合、次の分

析に妨害ピークが出現する影響を排除するため、多くの油脂で存在が予想される C24:1 までを溶出させておく必要があるが、とくにカラム長が長い場合恒温分析では溶出までに長時間を要する。そこで、トランス脂肪酸ピーク溶出後に昇温を取り入れると、分析時間短縮と、以後の測定における妨害ピーク排除を行うことができる。今回の検討で SP2560 を用いた場合には、C22 溶出後、オープン温度をカラム耐熱上限以下まで上げる操作を取り入れている。

内部標準物質としてはヘプタデカン酸を基準油脂試験法に提案することとした。ヘプタデカン酸は多くの油種で確認されるため、今回検討のように、内部標準無添加のクロマトグラムも取得し、補正を行うことが原則であると思われる。

内部標準を用いた定量計算に加え、今回、脂肪酸組成分析で用いられる組成%による算出も併せて検討した。実験の結果、定量計算と組成%には、理論上想定される幅とほぼ等しい数値乖離が確認された。トランス脂肪酸の含量分析という視点からは、内部標準を用い、油脂食品全体の中のトランス脂肪酸を算出すべきであるが、組成計算においても、精度は同様に安定しているため、工程管理等においては、組成計算も併用

可能であると思われる。

5 総 括

基準油脂試験法設定を目的として、トランス脂肪酸含量約 2 g/100 g ～ 45 g/100 g の試料を用い、キャピラリー GC 法による合同実験を行った。

その結果、

- 1) 内部標準物質として、ヘプタデカン酸 (C17:0) が好適と考えられた。
- 2) SP2560 (100 m) カラム (100%シアノプロピルポリシリキサン液相), TC-70 (60 m) カラム (70%シアノプロピルポリシリフェニレンーシリキサン液相) の 2 種類のカラムで合同実験を行い、それぞれで同等の数値を得た。また室間再現性は CV_R < 10% と良好であった。
- 3) 油種として、大豆、なたね、パーム、パーム核、牛脂、豚脂、およびこれらの水素添加油を実験に供し、いずれも良好な分離が得られた。

以上から、魚油・乳脂を除外する食用油脂に関し、今回検討の手法は油脂中のトランス脂肪酸含量算出に適していると判断した。

References

1. Zock, P.L.; Katan, M.B. Trans fatty acids, lipoproteins, and coronary risk. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **75**, 211-216 (1997).
2. Mozaffarian, D.; Katan, M.B.; Ascherio, A.; Stampfer, M.J.; Willett, W.C. Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1601-1613 (2006).
3. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Food labeling: Trans fatty acids in nutrition labeling, nutrient content claims, and health claims. *Federal Register*. **68**, (133) 21 CFR Part 101 (2003).
4. Stender, S.; Dyerberg, J. *The Influence of Trans Fatty Acids on Health*, 4th edn. The Danish Nutrition Council, pp.45-51 (2003).
5. Health Canada, *It's Your Health-Trans Fat*. http://www.hc-sc.gc.ca/iyh-vsv/food-aliment/trans_e.html
6. Food Safety Commission of the Cabinet Office, *Fact Sheet on Trans Fatty Acid*. <http://www.fsc.go.jp/sonota/transfattyacids1902.html>
7. Determination of cis- and trans- fatty acids in hydrogenated and refined oils and fats by capillary GLC. *AOCS Official Method Ce 1f-96* (2002).
8. Determination of cis-, trans-, saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in vegetable or non-ruminant animal oils and fats by capillary GLC. *AOCS Official Method Ce 1h-05* (2005).
9. Fat (total, saturated, and unsaturated) in food. *AOAC Official Method 996.06*, (2001).
10. Preparation of methyl esters of fatty acids (boron trifluoride-methanol method). *Standard Methods for the Analysis of Fats, Oils and Related Materials* (Japan Oil Chem. Soc. ed.). 2.4.1.2-1996 (1996).
11. Duchateau, G.S.M.J.E.; Oosten, H.J.V.; Vasconcellos, M.A. Analysis of cis- and trans-fatty acid isomers in hydrogenated and refined vegetable oils by capillary gas-liquid chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**, 275-282 (1996).
12. Ratnayake, W.M.N.; Plouffe, L.J.; Pasquier, E.; Gagnon, C. Temperature-sensitive resolution of cis- and trans-fatty acid isomers of partially hydrogenated vegetable oils on SP2560 and CP-Sil 88 capillary columns. *J. AOAC Int.* **85**, 1112-1118 (2002).
13. *Standard Methods for the Analysis of Fats, Oils and Related Materials* (Japan Oil Chem. Soc. ed.). Kyo4-1996, pp.1-12 (1996).