総 説

ガスクロマトグラフィー

白 井 浩*・吉 富 和 彦*

Gas Chromatography

Yutaka USUI and Kazuhiko YOSHITOMI

1 ま え が き

ガスクロマトグラフィーが誕生してから今年で約 10 年になるが、わが国において国産の装置が市販され、工場や研究所で手軽に用いられるようになったのはごく最近のことである。しかるに、ここ一、二年の間にガスクロマトグラフィーは、機器分析法としてかつて例のないほど急速な発展をとげ、あらゆる有機化合物の分析に欠くことのできないものとなってしまった。油脂化学の分野においても、脂肪酸をはじめ、その誘導体であるアルコール、エステル、アルデヒド、アミンやステロイドなどの高沸点物質の分析が行なわれるようになり、現在さらにその応用範囲が広まりつつある。本稿では脂肪酸エステルの分析法を中心に、現在まで多くの研究者によって得られたことがらを、著者らの経験を織りまぜて紹介したいと思う。

2 ガスクロマトグラフィーの分類と文献、総説

ガスクロマトグラフィーに関する一般的な基礎事項や理論などについてくわしく説明することは本稿の目的にはずれるので、文献の紹介^{1)~4)}だけに止めたい。特に脂肪酸、油脂関係のガスクロマトグラフィーについては、藤原⁵⁾、Farquhar⁶⁾、武内、長谷川⁷⁾、高橋⁸⁾、James¹⁰⁾、らの文献があり、また H.P. Kaufmann らの総説⁹⁾は参考になる。

現在市販されている装置を、その検出方法から分類すると、熱伝導度型ガスクロマトグラフ、および高感度イオン化ガスクロマトグラフの 2 種に大別される。後者のイオン化方式には、水素炎を用いるものと¹⁶⁾、放射線によるもの⁹⁷⁾とあり、一般に熱伝導度型のものに比べて 1,000~10,000 倍の検出力を持つ。装置の種類には、通常のガスクロマトグラフのほか、昇温ガスクロマトグラフ、分取ガスクロマトグラフ^{12)~14)}、プロセス用ガスクロマトグラフ^{11), 16)}があり、操作の方法によって多段ガスクロマトグラフィー、減圧ガスクロマトグラフィー¹⁵⁾、反応ガスクロマトグラフィーなどがある。本稿では、主

として熱伝導度型の検出器を持つ通常のガスクロマトグラフィーについて述べることにする。

3 脂肪酸メチルエステルの分析

3.1 エステル化

エステル化は脂肪酸のガスクロマトグラフィーを行なう際の前処理として有効な手段であり、脂肪酸のままでは分析不可能な高沸点の試料も、エステル化することによって蒸気圧を下げ、容易に分析できる場合が多い。エステル化法としては、一般につきに述べる方法がとられている。

3.1.1 酸触媒および BF_3 によるエステル化法

酸とアルコールの混合物に濃硫酸を加え還流する通常の方法では、試料中に不飽和基のある場合、おかされる心配があるため、一般には無水メタノールに 5% 塩化水素を含ませたものを脂肪酸と 1/2~2 hr 湯浴上で還流する方法がとられている。著者らの研究室では、エステル化試薬として 1% パラトルエンスルホン酸-無水メタノール溶液をあらかじめ調製しておき、試料脂肪酸 1g に対し、このもの 3 ml を加え湯浴上に 1 hr 還流し、植物油脂肪酸のエステル化を行なっている。Metcalfe ら¹⁷⁾は、 BF_3 を触媒として用いれば 2 min で反応を終え、全エステル化操作が 10 min で可能であると報告している。Armour Industrial Chemical 社では、この方法を現場に採用し、ガスクロマトグラフィーを用いて脂肪酸精留の工程管理を行なっているといわれる¹⁸⁾。これらの方法では試料を比較的多量に要するうえ、エステル化後エーテル抽出、メタノール除去、洗浄などの操作を行なう必要があり、その間に揮発性エステルなどがいくらか損失するおそれがある。Stoffel ら¹⁹⁾は数ミリigramの試料をメタノール-塩酸でエステル化後、microsublimationによりコレステリンなどの不ケン化物を含む試料から、エステルのみを分離する方法を報告しているが、この方法は C_{10} 以下の低級酸を含む試料については適当でない²⁴⁾。

3.1.2 ジアゾメタンによるエステル化法

* 日清製油株式会社研究所 (横浜市神奈川区千若町 1-3)
The Nisshin Oil Mills, Ltd., Research Laboratory

ジアゾメタン-エーテル溶液を脂肪酸に加えるだけで迅速にエステルが得られ、ただちにガスクロマトグラフィーに供しうる。ジアゾメタンを用いた場合、試料脂肪酸のエチレン結合と反応して副生物 (pirazolnes) を生じることが心配されていたが、Schlenk ら²⁰⁾ は $^{14}\text{CH}_2\text{N}_2$ を用いてエステル化反応の検討を行なった結果、純エーテル溶媒中でエステル化を行なった場合は副生物を生じ、反応は不完全になるが、10% メタノールを含むエーテル溶媒中で反応を行なうと副生物を生じることなく迅速にエステル化できることを明らかにした。なお、ジアゾメタンの製法については、いろいろな方法があるが^{21)~23), 28)}、このガスは爆発性のため取り扱いに注意を要する。脂肪酸のエステル化は以上のほかに、2,2-ジメトキシプロパン²⁷⁾、ジメチル硫酸²⁹⁾、ヨウ化メタンなどを用いても行なうことができるが、一般にはあまり用いられていない。ガスクロマトグラフィーの前処理としてのエステル化法が最も適当であるかは個々の試料の性質によって異なるが、種々のエステル化法を用い揮発性脂肪酸、長鎖脂肪酸、高度不飽和酸のエステル化を定量的に比較検討した Vorbeck ら²⁴⁾ の報告は参考になる。不飽和脂肪酸に及ぼすエステル化の影響を表-1 に示す。

表-1 不飽和脂肪酸に及ぼすエステル化の影響²⁴⁾

脂 肪 酸	面 積 (%)*		
	Diazomethane ²⁰⁾	Methanol-HCl ³⁰⁾	Methanol-BF ₃ ¹⁷⁾
Hexadecenoic	13.4	14.0	13.3
Hexadecadienoic	1.8	1.9	1.8
Octadecenoic	23.9	22.9	23.7
Octadecadienoic	3.9	3.9	3.9
Octadecatrenoic	4.2	4.0	3.9
Octadecatetraenoic	4.9	4.8	5.4
Eicosatetraenoic	2.4	2.5	2.4
Eicosapentaenoic	22.4	23.4	22.3
Docosapentaenoic	3.6	3.3	3.9
Docosaheptaenoic	19.5	19.3	19.6

注) * 4 回測定の平均

3.1.3 エステル基交換法

トリグセリドの脂肪酸組成などを分析する場合、ケン化分解して脂肪酸にしてからメチルエステル化するので、操作が2段階になりわずらわしい。この場合エステル基交換法によるのが便利である。中西ら²⁵⁾ は乳脂肪からメチルエステルを得る場合の反応条件として、試料に対し 10 倍量の 3% 塩酸-メタノールを用い、5 hr 還流するのが適当であると報告しており、Stoffel ら¹⁹⁾ も同様の反応を行なっている。著者らの経験ではアルカリ触媒を用いた方が反応が速いようで、たとえば油 1 部に対し 0.5% カセイソーダ-メタノール溶液 1 部を加え、

60°C で 1 hr かきまぜれば比較的簡単にエステル化できる。この場合、反応は不均一系で行なわれるため、カキマゼを十分に行なう必要がある。また、触媒としてナトリウムメチラートを用いる方法についても Craig ら²⁶⁾ の報告がある。

3.2 カラム固定液相

カラム固定液相の選択は分析の目的、試料の種類、性質などによって決められるもので、つぎに述べるように分類される。

3.2.1 低級脂肪酸エステル

低級脂肪酸エステルは揮発性のため、エステル化する際の定量的取り扱いには十分な注意を要する。試料が低沸点のため、固定液相の選択はさほど困難ではなく、James ら³¹⁾ が初期に用いた流動パラフィン、ジオクチルフタレートのほか、ジデシルフタレート、ジノニルフタレート、ジオクチルセバセート、ジオクチルアジペート、シリコングリース、シリコンオイルなど³²⁾ が使用できる。これらの固定液相を Celite 545, C 22 に被覆したものが用いられ、*n*-脂肪酸メチルとイソ脂肪酸メチルの分離が可能である。

3.2.2 高級脂肪酸エステルの炭素数による分離

シリコングリース、シリコンオイル DC 550 が最も一般に用いられる。これらの固定液相を用いると、同一炭素数の *n*-飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸エステルは同時に流出するため、一つのピークとなり、のちに述べる不飽和度の違いによっても分離できるカラムと並用し、定性分析を行なうのに都合がよい。シリコンオイルは 200°C 以上の高温にはできないので、特に炭素数 16 以上の脂肪酸を対象に分析を行ないたい場合は、250°C でも安定なシリコングリースの方が扱いやすい。このほか高温で安定なカラムとしては、シリコンゴム⁵⁰⁾ および、藤原ら^{33), 5)} のドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムを用いた例がある。

3.2.3 高級脂肪酸エステルの不飽和度による分離

初期においては Apiezon L, Apiezon M が用いられていたが、Craig³⁴⁾ がジエチレングリコール-コハク酸ポリエステル、ブタンジオール-コハク酸ポリエステルを用い、従来の固定液相では不可能であったステアリン酸メチル、オレイン酸メチルの完全分離に成功して以来、種々のポリエステルが研究され、動植物油脂肪酸の分析が行なわれるようになってきた。ポリエステルの二塩基酸成分としてコハク酸、アジピン酸、グルタル酸³⁵⁾、マロン酸³⁷⁾、セバシン酸、オルトフタル酸³⁵⁾など、またポリオール成分として、ブタンジオール、ジエチレングリコール、エチレングリコール、プロピレングリコール³⁹⁾ が使用され、種々の組み合わせのものが試みられているがポリエステルの分子量も異なるうえ、担体も実験者によってまちまちのものを使用しているため、その優劣は定

めにくい。特に飽和酸、不飽和酸エステルの分離は、液相における分離と吸着の組み合わせで可能となるといわれ³⁸⁾、担体の種類、固定液相の量などを変えることによって異なった結果が得られる。なお、前記に類似したポリエステル類はアメリカにおいては、Reoplex 400 (polyoxyalkylene adipate), LAC-2R-446 (polydiethyleneglycol-pentaerythritol adipate), などの商品名で市販されている⁷⁾が、入手困難な場合は実験室でも比較的簡単に合成しうる。合成法については文献^{34), 39), 8)}を参照されたい。このようにして得たポリエステルは一般に低分子量の未反応物を含み、高温で分析する際カラムから溶出してくるおそれがあるから、これらを適当な溶剤を用いて除く³⁴⁾、または使用する温度より 10~20°C 高めの温度で窒素ガスを通じ、数時間あるいは数日間保ち揮発成分を除く方法がとられている^{40), 51)}。また、反応に用いた触媒を除くことがカラムの寿命を長くするうえに大切で、これにはポリエステルのアルコールまたはアセトン溶液をイオン交換樹脂のカラムに通す方法が提案されている^{34), 41)}。

不飽和脂肪酸エステルを分離できる固定液相としてはポリエステルのほかにポリ酢酸ビニルを用いた例がある^{42), 43)}。丸山ら⁴⁴⁾は市販のクロトン酸変性ポリ酢酸ビニルを用い、このものを Celite-545 の粉末と乳鉢でねりませ 30~40 メッシュの大きさの顆粒にしたものを固定相として 220°C でサフラワー脂肪酸メチルの分析を行っている。著者らは経験を持たないが、分離能もポリエステル系の Resoplex などに対比しうるといわれ、入手も容易である点注目される。ポリエステル、ポリ酢酸ビニルのいずれも 230°C 以上の高温で操作すると分解するおそれがあり、カラムの寿命も短い。またポリエステルの場合、そのような高温で脂肪酸エステルの分析を行なうと試料脂肪酸メチルと固定液相が反応し、定量分析値に影響を及ぼすことも報告されている⁴⁵⁾ので、さらに高温でも安定なカラムが望まれる。D.M. Sand ら⁴⁵⁾は高温で安定な極性カラムとして β -cyclodextrin acetate を用い、236°C で炭素数 18 の飽和、不飽和酸エステルの分析を行っている。

3・2・4 二重結合位置異性体およびシス-トランス異性体の分離

共役リノール酸メチル、共役リノレン酸メチルの分離については、Daniel ら⁴⁷⁾がジエチレングリコール-アジピン酸ポリエステルを固定相とするカラムを用い、アルカリ異性化小麦油脂肪酸メチルの分析を行なった例がある。著者らもジエチレングリコール-コハク酸ポリエステルカラムで、異性化リノール酸メチル、リノレン酸メチルの分離を試み、適当な条件では、リノール酸メチルと共役リノール酸メチル、リノレン酸メチルと共役リノレン酸メチルの分離が可能なること、および共役酸エステル

は非共役のものよりおくれて流出することを認めた⁵⁹⁾。共役以外の二重結合位置の異なる高級脂肪酸の異性体を、通常の充填カラムで分離することは困難と考えられ、キャピラリーカラムを用いて得られる高理論段数のカラムで初めて分離が可能となる。Lipsky ら³⁶⁾はエチレングリコール-グルタル酸ポリエステルで被覆したキャピラリーカラムを用いて $d^{8,11}$, $d^{9,12}$, $d^{10,13}$ および $d^{11,14}$ メチルオクタジエノエートの完全分離を行ない、Scholfield ら⁴⁸⁾も Apiezon L の 200 ft キャピラリーカラムを用いて $d^{12,15}$, $d^{9,15}$, $d^{9,12}$ のオクタジエン酸メチルを分離している。オレイン酸メチル、エライジン酸メチル、シス-トランス異性体の分離については Kauffman の報告がある⁴⁹⁾。

3・3 定性分析

カラムから流出してクロマトグラムに画かれたピークの成分が、はたしてどのような物質かを知りたい場合がしばしば起こる。まったく未知の物質の混合物をガスクロマトグラフィーのみで定性分析することは困難な場合が多く、赤外、紫外、核磁気共鳴など、ほかの機器を併用したり、そのほか有機化合物の定性に必要なあらゆる知識を動員することが望まれる。また、試料中に不ケン化物を含む場合は、分析に先だちできるだけ除いておくことが望ましく、沸点範囲の広い脂肪酸混合物については、蒸留などの操作によってあらかじめいくつかの区分に分けておく都合がよい。

3・3・1 保持容量

脂肪酸エステルのガスクロマトグラフィーによる定性分析は、ほかの有機化合物の分析と同様、つぎの基本的事項に基づいて行なわれる。

A) 同一操作条件(カラム、温度)では同一成分の保持容量(R_V)は等しい。

B) 同族体の中では、保持容量の対数と炭素数の間に一般に直線関係がある。

被検成分のピークが少なく、その試料の起源から考えて含まれる物質がほぼ推定される場合には、試料と同一の分析条件で純物質の R_V を求めておき、この値と試料中未知ピークの R_V を比較する。または、純物質を試料に加え、未知試料のものと同一のところにピークが現われるかどうかを測定すればよい。一般に一つの成分と考えられるピークでもカラムを変えれば数成分に分離したりするから、極性の異なる数種のカラムを用いて同様な操作を試みる必要がある。

試料のクロマトグラムに、未知ピークが数多くある場合は、個々のピークについて上述のような操作を行なうのは面倒なため、(B) の関係を用いる。脂肪酸メチルエステルの比保持容量(R_V)と炭素数の関係(C_n)を図-1に示す。

数種の純物質について保持容量を測定し、 $\log R_V - C_n$

図-1 脂肪酸メチルエステルの比保持容量と鎖長との関係⁵¹⁾

図を作製しておけば、未知ピークの保持容量（または比保持容量）からその物質の炭素数、不飽和度が推定できる。2種の極性の異なるカラムを用い、図-2のように両軸に比保持容量をとって各成分をプロットしたものは、やはり直線となり、定性分析に役立つ。

図-2 2種のカラムによる飽和、不飽和酸メチルの比保持容量¹⁰⁾

3.3.2 E.C.L. (Equivalent Chain Length) または Carbon Number による表示

上述のようにガスクロマトグラフィーの定数として保持容量、または比保持容量が用いられているが、この値はカラムの長さ、温度などの操作条件によって変わるのであまり便利ではない。T.K. Miwa ら⁵²⁾ は飽和酸の炭素数と比保持時間 (C_{14} または C_{16} 飽和酸メチルの保持時間を基準とする) を半対数方眼紙にプロットし、飽和酸メチル以外のピークの比保持時間を求めて炭素数-比保持時間の直線から、飽和酸メチルに相当した炭素数を読み、この値を E.C.L. Value と呼んでいる。E.C.L. Value はカラムの温度 ($\pm 20^\circ\text{C}$)、内容積、キャリアガスの流速などの操作条件に影響されない値として、天然脂肪酸の定性に役立つことを示している。また、F.P.

Woodford ら³⁷⁾ も同様の値を Carbon Number と名付けて、Apiezon L, Apiezon M, ポリエステルなどを固定液相とするカラムでの不飽和酸、分枝脂肪酸各メチルエステルの Carbon Number を報告している。不飽和酸および二塩基酸エステルの E.C.L. Value を表-2 に示す。

表-2 メチルエステルの E.C.L.⁵²⁾

Parent Acid (Common Name)	E.C.L.	
	Apiezon L	Resoflex 446
Monocarboxylic Methyl Esters*		
Saturated straight-chain Cn acid : octadecanoic (stearic)	18.0	18.0
Unsaturated straight-chain acids		
Monoenoic		
<i>cis</i> -9-Hexadecenoic (palmitoleic)	15.7	16.4
<i>cis</i> -9-Octadecenoic (oleic)	17.7	18.4
<i>cis</i> -6-Octadecenoic (petroselinic)	17.7	18.4
<i>cis</i> -13-Docosenoic (erucic)	21.7	22.4
Dienoic : <i>cis, cis</i> -9-12-octadecadienoic (linoleic)		
	17.6	19.0
Trienoic : <i>cis, cis, cis</i> -9, 12, 15-octadecatrienoic (linolenic)		
	17.6	19.8
Tetraenoic : <i>cis, cis, cis, cis</i> -5, 8-11, 14-eicosatetraenoic (arachidonic)		
	19.2	21.6
Dicarboxylic Methyl Esters		
Pentanedioic (glutaric)	7.6	12.4
Hexanedioic (adipic)	8.6	13.4
Nonanedioic (azelaic)	11.7	16.4
Undecanedioic	13.7	18.4
Tridecanedioic (brassylic)	15.7	20.3

* Fatty acids used as standards.

これらの表は、各カラムにおける脂肪酸エステルの流出順序が明確にわかるので、カラムの選択を行なうときの参考にもなる。ただし、固定液相が同じでも担体の種類や、液相の量によって不飽和酸メチルの E.C.L. も異なることが考えられ³⁸⁾、注意を要する。

3.3.3 特定ピークの消去、移動による検出法

未知成分が官能基を含んでいると考えられる場合は、試料に特定の化学反応を行なわせ、反応前後のクロマトグラムを比較すれば、ピークの移動によってどのピークが官能基を持つかを知ることができる。例として二重結合を含む脂肪酸エステルの検出に用いられる手段について述べることにする。

3.3.3.1 臭素化 試料を冷エーテル、または四塩化炭素溶液中で臭素付加し、得た臭化物のクロマトグラムと反応前のクロマトグラムとを比較すれば臭素化されたエステルは不揮発性となるため、不飽和酸エステルのピークは消える。

3.3.3.2 二重結合の切断 試料エステルに過マンガン酸カリウム、またはオゾンなどを作用させて二重結合を切断し、酸化生成物を除き去ったのちクロマトグラフィーにかけ、反応前のクロマトグラムと比較すれば、不

飽和結合を持つピークは消える。酸化反応生成物をさらにガスクロマトグラフィーを用いて検討すれば、脂肪酸の構造決定にも応用できる⁵³⁾。

3.3.3.3 水素添加 不飽和酸エステルに対し、水素添加を行えば、ピークは相当する炭素数の位置に移動するため、鎖長が推定できる。水素添加は白金触媒を用い、無水メタノール中で行なうのがよい⁵⁴⁾。

以上の応用として、著者らが行なった分析例を図-3に示す。試料は、ヒマシ油をアルカリ溶融してセバシン酸とオクタノールを得た際に副生する脂肪酸のメチルエステルで、シリコングリース、ポリエステル両カラムを用いて炭素数を決定し、水素添加、過マンガン酸カリウム処理により不飽和酸ピークの推定を行なったものである。

図-3 ヒマシ油アルカリ溶融の際副生する脂肪酸メチルエステルのクロマトグラム

3.4 定量分析

定量分析は試料の経歴が明確で、その定性的な組成がはっきりしているか、あらかじめ定性分析を行なって成分のわかっている場合のみ適用できる。つぎにその問題点について述べる。

3.4.1 ピーク面積の測定

一般にクロマトグラムに現れた各成分のピーク面積とその成分量との間には比例関係が成立する。このためピーク面積から各成分の定量が可能となる。ピーク面積の測定法¹⁾としては、三角法、半値幅法、プランリメーターを用いる方法、チャートを切りぬいて重量を測定する方法のほか、分離の悪いピークについては、各ピークが正規分布曲線を画くものとみなし、その標準偏差から算出する方法^{55), 56)}など提案されている。著者らの経験ではプランリメーターを用いるよりも半値幅法の方が迅速であり再現性がよい。

3.4.2 内部標準法

注入する試料の量を常に正確にできれば、注入量とピーク面積との関係から各成分の定量が可能となるが、注入する試料がごく微量のため、よほど精密な注入器を用いないかぎり定量は不可能である。そのため標準となる物質を既知量試料に加えたものをガスクロマトグラフィーにかけ、そのものの示す面積と試料成分のピーク面積

との比から、各成分の定量を行なう方法が一般に行なわれ、内部標準法といわれる。内部標準物質としては、試料全ピークの中程に出現するような保持時間を持つもので、試料のピークと重複しない安定なものが望ましく、動植物油脂肪酸エステルの分析には、ミリスチン酸メチル、マーガリン酸メチル⁵⁷⁾などが用いられている。重合脂肪酸などの不揮発分を含む場合にも、内部標準法を用いて推定できる。

3.4.3 相対感度

熱伝導度型の検出器を用いた場合、クロマトグラムに示される各成分のピーク面積と試料成分の濃度とは比例関係にあるが、ただ単にその成分のモル %、重量 % や容量 % に比例するというのではなく、成分の化学構造や分子量によって検出器のレスポンスが異なる⁵⁸⁾。Killheffer ら⁵⁷⁾は C₆~C₁₄ の飽和脂肪酸メチルにつき、相対モル感度を求めた結果、この値は分子量に比例することを認めた。Horrocks ら⁵⁸⁾はさらに同様の実験を C₄~C₂₂ の飽和、不飽和脂肪酸エステルについて試み、飽和酸エステルの炭素数 (N) と相対感度 (R, パルミチン酸メチルを 100 とする) の間に (1) 式および、シス不飽和二重結合数 (D) と相対モル感度 (R') の間に (2) 式の関係があることを示した。

$$R = 24.68 + 5.79N - 0.075N^2 \quad (1)$$

$$R' = 92.84 - 1.865D - 0.175D^2 \quad (2)$$

$$R_1/R_2 = (M_1/M_2)^{2/3} \quad (3)$$

(M: 分子量)

Horrocks らはこれらの実験式から得られた相対モル感度の値が、表-3、表-4 に示すように Katharometer の molar response についての理論式 (3) から得られる計

表-3 飽和脂肪酸エステルの相対感度 (熱伝導度検出器)⁵⁸⁾

Ester	Relative Response				
	Experimental		Calculated ²⁾		Theoretical ³⁾ Molar
	Mass ¹⁾	Molar	Mass	Molar	
Acetate (7) ⁴⁾	128±7	35	133.8	36.6	42.2
Butyrate (11)	121±14	46	125.9	47.5	52.3
Hexanoate	—	—	120.1	57.8	61.4
Octanoate (23)	114±9	67	115.3	67.5	70.0
Decanoate (12)	108±6	74	111.1	76.5	78.0
Laurate (17)	105±5	83	107.2	85.0	85.6
Myristate (11)	102.6±3.9	92	103.5	92.8	93.0
Palmitate	—	—	100.0	100.0	100.0
Stearate (10)	93.7±5.1	103	96.6	106.6	106.8
Arachidate (16)	91.0±6.0	110	93.2	112.6	113.4
Behenate (23)	88.3±5.0	116	90.0	118.0	119.8

1) Relative mass response ± standard deviation of observation.

2) Calculated from equation: $R = 24.68 + 5.79N - 0.075N^2$.

3) Calculated from relationship: $(M_1/M_2)^{2/3}$.

4) Figures in parentheses represent the number of experiments.

表-4 不飽和 C₁₈ 脂肪酸エステル相対感度

Ester	Relative Response	
	Experimental Mass ¹⁾	Calculated ²⁾ Mass
Stearate (10) ³⁾	93.7±5.1	96.6
Oleate (26)	88.2±6.2	94.5
Linoleate (25)	91.0±6.6	92.0
Linolenate (11)	84.8±5.6	89.2
Elaidate (22)	93.2±6.8	—

- 1) Relative mass response±standard deviation of observation.
- 2) Calculated from the equation: $R' = 92.84 - 1.865 D - 0.175 D^2$.
- 3) Figures in parentheses represent the number of experiments.

算値と一致することを述べている。このように個々の脂肪酸エステルについて検出器の感度がすこしずつ異なることは確かであるが、試料によってはこれら各脂肪酸エステルの相対的な感度の違いを無視してもよい場合が多く、動植物油脂肪酸エステルの分析で、その組成が主として C₁₈ 飽和、不飽和脂肪酸エステルからなる場合は面積比が各成分の重量比を示すものと仮定して定量を行なってもよい結果が得られている^{34), 59)}。

3・4・4 その他、定量分析値に影響する要因

脂肪酸エステルの定量分析に現在一番多く用いられているカラムは、ポリエステルを固定液相とするものであるが、このものは一般に 200°C 以上の高温ではあまり安定ではなく、試料とエステル基交換を行なって実験と異なった分析値を示すことがある⁴⁶⁾。また Morris ら⁶⁰⁾ は共役トリエン酸メチルを通常の分析条件でガスクロマトグラフィーにかけた場合、シス-トランス異性化が起こること、およびヒドロパーオキシドを含む不飽和酸メチルは脱水反応を行なってさらに高度の不飽和化合物に変化することを述べている。脂肪酸エステルの分析は試料が高沸点のものである以上、カラムの温度もある程度高温に保つことは止むをえないので、熱に対し不安定な試料については十分な注意が必要である。著者らは C₁₈ 不飽和酸メチルの分析に際し、試料注入口の温度を変えて定量分析を試みた結果、この部分の温度が 350°C を越えるとリノレン酸メチルの分解が起こり、実際よりも低い分析値を示すことを認めた。しかし、注入口の温度が低すぎると、試料の気化に時間がかかり、ピークの形状、分離が悪くなる。表-5 に試料注入口の温度と不飽和酸メチルの分析値を示す。

なお、試料の調製に当たっての取り扱い方、特にエステル化後の貯蔵には十分の考慮をはらう必要があることは当然であるが、きわめて重要なことである。

3・4・5 他の分析法との比較

一般の動植物油脂肪酸の定量分析には、従来主として固体酸については鉛塩アルコール法、不飽和酸について

表-5 試料注入口温度と不飽和酸の分析値

注入口 温 度 (°C)	メチルエステル (重量 %)				リノレン 酸回収率 (%)
	パルミチ ン酸	オレイン酸	リノール酸	リノレン酸	
160	27	23	27	23	100
240	27	24	27	24	104
300	27	23	26	24	104
350	27	24	27	23	100
410	27	24	28	21	91
460	27	23	27	14	61

カラム：ジエチレングリコール-コハク酸ポリエステル、温度 226°C、銅パイプ 4 mm φ×2.5 m。

キャリアーガス：He 流速 60 cc/min。

コタキスパーフラクショナー：G・U-12 型使用。

はアルカリ異性化による紫外線吸収スペクトル法（以下 UV 法と記す⁶¹⁾）が用いられていたが、最近ではその迅速性と精度の点からガスクロマトグラフィーが用いられるようになってきた。著者ら⁶⁰⁾ は、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸各メチルエステルを種々の割合に配合し、同一試料について UV 法およびガスクロマトグラフィーによる定量分析を試みた結果、再現性および正確度ともに後者の方法がすぐれていることを認め、特に UV 法ではオレイン酸メチル、飽和酸メチルの分析精度が悪いことを認めた。実際の動植物油脂肪酸の分析については、二、三の報告があり⁶²⁾、落花生油、Pecan 油⁶²⁾、オリーブ油、サフラワー油、ゴマ油、豚脂⁶³⁾ などについていずれも両者の分析値がよく一致した結果が報告されている。Kauffmann ら⁶⁴⁾ は水素添加油の分析について、水添前の試料中のリノール酸は、両者の分析値がよく一致するが、リノレン酸は UV 法の値が低く、水添後はリノール酸、リノレン酸とも UV 法による値の方が低いと報告している。以上は UV 法との比較であるが、さらに Kauffman ら⁴⁹⁾ は、水素添加植物油中のエライジン酸をガスクロマトグラフィーで定量し、赤外線吸収スペクトルによるトランス体の定量法と比較し、表-6 に示すようによい結果を得ている。

表-6 水素添加植物油の分析⁶⁴⁾

メチルエステル	組 成 (%)		
	Infrared	Capillary Column	Packed Column
Miristate	—	0.3	0.5
Parmitate	—	14.8	15.2
Stearate	—	6.3	5.8
Oleate	—	30.2	67.0
Elaidate	33.5	32.1	
Unknown	—	4.7	
Linoleate(isomers?)	—	11.6	11.5

4 脂肪酸の直接分析

これまでは脂肪酸をエステル化してガスクロマトグラ

フィーにかける方法について述べてきたが、最近では脂肪酸をエステル化せずに直接分析する方法が試みられるようになってきたので、これについての研究を紹介しよう。

James ら⁶⁹⁾ が気-液クロマトグラフィーを考案し、初めて脂肪酸を分離した際に用いたカラムは、ステアリン酸 10% を含むシリコーン DC 550 を Celite 545 に被覆したものであった。それ以来低級脂肪酸の直接分析には、この種のカラムが多く用いられていた^{69), 70)} が、最近 Metcalfe⁷¹⁾ は 25% ジエチレングリコール-アジピン酸ポリエステル-2% リン酸-Celite 545 の 1 m カラムを用い、235°C で $C_{10} \sim C_{22}$ の飽和、不飽和酸の分離に成功した。この際添加するリン酸の作用は、シリコーンカラムに添加するステアリン酸と同様、試料の脂肪酸がカラム中で 2 量化することを防ぎ、テーリング防止の役目を果たすといわれる。著者らも同様のカラムを用い、 $C_2 \sim C_{18}$ 脂肪酸の分離によい結果を得た。ヤシ油脂肪酸の分析例を図-4 に示す。リン酸を添加したために、特にカラムが不安定になることはなく、このカラムでエステルの分析も可能なため、脂肪酸とメチルエステル混合物の分析も可能である。ただし、メチルエステルに比べ、熱伝導度型検出器を用いた場合の脂肪酸の感度は著しく劣り、同じ分析条件で同面積のピークを画かせるためには、約 3 倍量の試料を必要とする。また、この場合図-5 に示すように、脂肪酸のピークは同一鎖長のメチルエステルよりも炭素数で 7 遅れて現われる。

カラム：ジエチレングリコール-コハク酸ポリエステル- C_{22}
(33% W/W) 1% リン酸添加, 2.5 m, 226°C
He 流速 90 cc/min

図-4 ヤシ油脂肪酸のクロマトグラム

図-5 脂肪酸およびメチルエステルの比保持時間と炭素数の関係

Sture⁷²⁾ は、酸、アルカリ処理をした Celite 545 に Reoplex 400 を 5~20% 被覆したカラムを使用し、アルゴンイオン化検出器を用いて $C_6 \sim C_{20}$ 飽和、不飽和脂肪酸の分離を検討した結果、最適条件においてはメチルエステルの場合と同様の分離が得られることを報告している。

脂肪酸の直接分析法は現在研究の途上にあり、ガスクロマトグラフの発達とあいまって、さらに完全なものとなろう。特に迅速性を要する現場の工程管理や、日常分析には試料の前処理としてのステル化はわずらわしいので、一日も早く、この方面の研究成果が望まれる。

5 二塩基酸の分析

二塩基酸も、高級脂肪酸の場合と同様、ジアゾメタンでエステル化したのち、ガスクロマトグラフィーに供する。Quin ら⁷³⁾ はタバコの煙に含まれる不揮発性酸の分析を種々のカラムを用いて検討し、乳酸、グリコール酸、シュウ酸、マロン酸、フランカルボン酸、レブリン酸、コハク酸各ジメチルエステルの分離には Flexol-A-26 (アジピン酸ジオクチル) およびカーボワックス 1,500 のカラムがよく、グルタル酸、アジピン酸、リンゴ酸、フタル酸については、Flexol-R-2 H (ポリエステル) が適当であるとした。フマル酸、マレイン酸の分離にはポリエステルがよく、著者らはジエチレングリコール-コハク酸ポリエステルを用いて両者の分離に成功している。なお、この種のカラムを用いた場合、シュウ酸ジメチル、マロン酸ジメチルは分解を起こすため、これらの分析にはシリコーングリースカラムを用いるのがよい⁷⁴⁾。そのほか固定液相として Apiezon L⁷⁵⁾, Apiezon M⁷⁷⁾, Reoplex 400⁷⁶⁾, Resoflex 446⁷⁵⁾, Butanediol-succinate⁷⁸⁾ などを用いて $C_5 \sim C_{13}$ の二塩基酸メチルの分離を行なった例が報告されている。

6 脂肪酸誘導体の分析

高級アルコール^{79)~83)} は脂肪酸エステルと同じカラムを用いてほぼ同じ条件で分析すればよい。すなわち炭素数による分離はシリコーングリースが適当であり、不飽和度による分離にはポリエステルカラムを用いる。ただしこの場合試料の前処理としてアセチル化を行なう方法が一般にとられている。Nikelly はカーボワックス 20,000 またはシリコーンゴムを 200 μ のガラス玉につけたカラムを用い、 $C_6 \sim C_{26}$ アルコールを昇温ガスクロマトグラフィーによって分析している。またエステル、炭化水素、アルデヒドなどの混合物のクロマトグラムから、アルコールを半定量的に抽出し、アルコールピークの同定を行なう Suffis ら⁸⁴⁾ の方法は応用が広い。そのほかの脂肪酸誘導体として、高級アルデヒド^{85), 87)}, ニトリル⁸⁰⁾, α -オレフィン⁸⁰⁾, アミン⁸⁶⁾, 臭素化オレイン酸

メチル⁸⁸⁾, モノグリセリド⁸⁹⁾, ジグリセリド⁹²⁾, トリグリセリド⁸⁴⁾,⁹⁵⁾, エポキシ酸⁸⁷⁾,⁹⁶⁾, オキシ酸⁹⁵⁾ などについての分析例があるが説明は省略する。

7 あ と が き

以上、脂肪酸エステルを中心に、関連物質のガスクロマトグラフィーについて述べてきたが、この方面の基礎研究や応用に関する報文は、現在日ごとに増している状態であり、理論、装置の発達に伴って、さらに飛躍的な発展が期待できる。ガスクロマトグラフィーは簡易、迅速、そして比較的精度のよい分析方法であり、日常分析に取り入れられるべき要素を多分に持っている。油脂化学の分野においても、この方面の研究者が協力し合い、一日も早く、ガスクロマトグラフィーが機器分析の一環として、脂肪酸その他の基準分析法にとり入れられることを希望する。

本稿の発表許可をいただいた 日清製油株式会社社長 坂口幸雄氏に感謝の意を表する。

(昭和 37 年 8 月 14 日受理)

文 献

- 武内, 高山, “入門 ガスクロマトグラフィー”, 南江堂 (1960)
- 雨宮, “ガスクロマトグラフィー”, 共立出版 (1958)
- 荒木, “ガスクロマトグラフィー”, 東京化学同人 (1961)
- 益子, 色材協会誌, **34**, 140 (1961)
- 藤原, 科学と工業, **35**, 79 (1961)
- J.W. Farquhar *et al.*, *Nutrition Reviews (Supplement)*, **17**, 1 (1959)
- 長谷川, 武内, 化学の領域増刊, **44**, 207 (1961)
- 高橋, 田中, 武藤, 同誌, **46**, 149 (1961)
- H.P. Kaufmann, G. Mankel, A.K. Lehman, *Fette-Seifen Anstrichmittel*, **63**, 1109 (1961)
- James, “Method of Biochemical Analysis”, VIII, p 1-50 (1960), Interscience Publishers Inc. New York
- 春木, 化学の領域増刊, **44**, 233 (1962)
- 益子, 同誌, **49**, 115 (1962)
- 春木, 同誌, **49**, 133 (1962)
- 安盛, 岸本, 同誌, **49**, 153 (1962)
- 功力ら, 本誌, **9**, 2 (1960)
- 春木, “最新の分析化学”, 第 13 集, p. 15 (1962) 化学同人
- L.D. Metcalfe, A.A. Schmitz, *Anal. Chem.*, **33**, 363 (1961)
- Chem. Eng. News*, **38** (No. 29), 58 (1960)
- W. Stoffel, F. Chu, E.H. Ahrens, *Anal. Chem.*, **31**, 307 (1959)
- H. Schlenk, J.L. Gellerman, *Anal. Chem.*, **32**, 1412 (1960)
- 丸山, “新分析化学講座”, I, p. 66 (1960)
- ガッターマン, ウィーランド, “有機化学実験書(邦訳)”, p. 242 (1959) 共立出版
- T.J. De Boer, H.J. Backer, “Org. Synthesis”, **36**, 16 (1956)
- M.L. Vorbeck, L.R. Mattick, F.A. Lee, C.S. Pederson, *Anal. Chem.*, **33**, 1512 (1961)
- 中西, 中江, 農化, **36**, 361 (1962)
- A.P. Tulloch, B.M. Craig, G.A. Ledingham, *Can. J. Microbiol.*, **5**, 485 (1959)
- N.S. Radin *et al.*, *J. Lipid Research*, **1**, 250 (1960)
- 日本化学会編, “実験化学講座”, 18 卷(下), p. 528 (1958)
- 北原, 真空化学, **10**, 97 (1962)
- I. Hornstein, J.A. Alford, L.E. Elliott, P.F. Crowe, *Anal. Chem.*, **32**, 540 (1960)
- A.T. James, A.J.P. Martin, *Biochem. J.*, **63**, 144 (1956)
- 中江, 中西, 農化, **36**, 364 (1962)
- 藤原, 日化会第 14 年会報告
- B.M. Craig, N.L. Murty, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **36**, 552 (1959)
- B.M. Craig, *Chem & Ind.*, **47**, 1442 (1960)
- R.A. Landowne, S.R. Lipsky, *Biochim. et Biophys. Acta*, **46**, 1 (1961)
- F.P. Woodford, C.M. van Gent, *J. Lipid Research*, **1**, 188 (1960)
- B.M. Craig, 1961 Intern Gas Chromatograph Symposium, 27 (1961)
- A.T. James, *J. Chromatog.*, **2**, 552 (1959)
- T. Gerson, *ibid.*, **6**, 178 (1961)
- J. Crose, R. Teranishi, *J. Lipid Research*, **1**, 191 (1960)
- I. Hornstein, P.F. Crowe, *Anal. Chem.*, **33**, 310 (1961)
- I. Hornstein, L.E. Elliot, P.F. Crowe, *Nature*, **184** 1710 (1959)
- 丸山, 妹尾, 工化, **64**, 777 (1961)
- D.M. Sand, H. Schlenk, *Anal. Chem.*, **33**, 1624 (1961)
- C.H. Orr, J.E. Callen, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **72**, 658 (1959); 長谷川, 武内, 化学の領域増刊, **44**, 228 (1961)
- N.W.R. Daniels, J.W. Richmond, *Nature*, **187**, 55 (1960)
- C.R. Scholfield, E.P. Jones, J. Nowakawska, E. Selke, H.J. Dutton, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **38**, 208 (1961)
- F.L. Kauffman *et al.*, *ibid.*, **37**, 385 (1960)
- N. Nicolaides, *J. Chromatog.*, **4**, 496 (1960)
- J.C. Hawke, R. P. Hansen, F.B. Shrland, *ibid.*, **2**, 547 (1959)
- T.K. Miwa, K.L. Mikolajczak, F.R. Earle, I.A. Wolf, *Anal. Chem.*, **32**, 1739 (1960)
- B. Sreenivasan *et al.*, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **39**, 255 (1962)
- R. Poukka, L. Vaseius, O. Turpeinen, *J. Lipid Research*, **3**, 128 (1962)
- K.K. Carroll, *Nature*, **191**, 377 (1961)
- A.E. Messener, D.M. Rosie, *Anal. Chem.*, **31**, 230 (1959)
- J.V. Killheffer *et al.*, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **37**, 456 (1960)
- L.A. Horrocks, D.G. Cornwell, J.B. Brown, *J. Lipid Research*, **2**, 92 (1961)
- 白井, 片岡, 吉富, 日化会第 15 年会講演
- L.J. Morris *et al.*, *J. Lipid Research*, **1**, 412 (1960)
- A.O.C.S. Tentative Method Ca-7-48
- R.F. French, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **39**, 173 (1962)

- 63) S.F. Herb, P. Magidman, R.W. Riemenschneider, *ibid.*, **37**, 127 (1960)
- 64) F.L. Kauffman *et al.*, *ibid.*, **38**, 495 (1961)
- 65) H. Schlenk *et al.*, *ibid.*, **37**, 547 (1960)
- 66) K.G. Woalmington, *J. Appl. Chem.*, **11**, 114 (1961)
- 67) R.B. Iden, E.J. Kahler, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **39**, 171 (1962).
- 68) A.T. James, A.J.P. Martin, *Biochem. J.*, **52**, 679 (1952)
- 69) 黒岩ら, 日化会第 14 年会報告
- 70) C.W. Gehrke, W.M. Lamkin, *Agricultural and Food Chemistry*, **9**, 85 (1961)
- 71) L.D. Metcalfe, *Nature*, **188**, 142 (1960)
- 72) W. Sture, *Fette-Seifen Anstrichmittel*, **63**, 325 (1961)
- 73) L.D. Quin, M.E. Hobbs, *Anal. Chem.*, **30**, 1400 (1958)
- 74) R.G. Ackman *et al.*, *ibid.*, **32**, 1209 (1960)
- 75) T.K. Miwa *et al.*, *ibid.*, **32**, 1739 (1960)
- 76) R.C. Bartisch *et al.*, *ibid.*, **32**, 1101 (1960)
- 77) James, "Method of Biochemical Analysis", VIII, p. 54 (1960), Interscience Publishers Inc., New York
- 78) C.G. Youngs, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **38**, 62 (1961)
- 79) W.E. Link, R.A. Morrisette, *ibid.*, **37**, 668 (1960).
- 80) W.E. Link, H.M. Hickman, R.A. Morrisette, *ibid.*, **38**, 20 (1959)
- 81) G. Popjack, R.H. Cornforth, *J. Chromatog.*, **4**, 214 (1960)
- 82) J.G. Nikelly, *Anal. Chem.*, **34**, 472 (1962)
- 83) 福島, 本誌, **11**, 128 (1962)
- 84) R. Suffis, D.E. Dean, *Anal. Chem.*, **34**, 480 (1962)
- 85) G.M. Gray, *J. Chromatog.*, **4**, 52 (1960)
- 86) J. Nelson, A. Milhin, *Chem & Ind.*, June 4 (1960)
- 87) G.M. Gray, *J. Chromatog.*, **6**, 236 (1961)
- 88) R.A. Stein, *ibid.*, **6**, 118 (1961)
- 89) A.G. McInnes, M.H. Tattre, M. Kates, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **37**, 7 (1960)
- 90) F.H. Fryer, W.L. Ormand G.B. Crump, *ibid.*, **37**, 589 (1960)
- 91) V.R. Huebner, *ibid.*, **38**, 628 (1961)
- 92) V.R. Huebner, *ibid.*, **36**, 262 (1959)
- 93) L.J. Morris, R.T. Hollman, K. Fontell, *J. Lipid Research*, **2**, 68 (1961)
- 94) Y. Kishimoto, N.S. Radin, *ibid.*, **1**, 72 (1959)
- 95) J.H. Recourt *et al.*, *ibid.*, **2**, 142 (1961)
- 96) A.P. Tulloch, B.M. Craig, G.A. Ledingham, *Can. J. Microbiol.*, **5**, 485 (1959)
- 97) 山根, 化学の領域増刊, **46**, 133 (1961)

(599 頁より続く)

文 献

- 1) J. D. Roberts, "Nuclear Magnetic Resonance, Application to Organic Chemistry" McGraw-Hill Book Co. Inc. New York (1959); J. A. Pople, W. G. Schneider H. J. Bernstein, "High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance", Mc Graw-Hill Book Co. Inc. New York (1959); Jackman "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", Pergamon Press (1959); 佐々木, 化学の領域, **11**, 253, 423 (1957); 額田, 計測と制御, **1**, 89 (1962); 藤原, 中川, 清水, "高分解能核磁気共鳴—化学への応用", 丸善 (1962)
- 2) 額田ら, 日化会第 15 年会発表 (1962)
- 3) W.H. Storey JR., *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **37**, 676 (1960)
- 4) 橋本, 額田, 椎名, 土屋, 油化学 研究 発表会発表 (名古屋) (1961); *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 印刷中
- 5) C. Y. Hopkins, H. J. Bernstein, *Can. J. Chemists'*, **37**, 775 (1959)
- 6) 須原, 東工試, **57**, 382 (1962)
- 7) C. Y. Hopkins, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **38**, 664 (1961)
- 8) J. R. Nunn, *J. Chem. Soc.*, **1952**, 313; P. K. Faure, *Nature*, **178**, 372 (1956)
- 9) J. P. Verma *et al.*, *Nature*, **175**, 84 (1955); J. P. Verma *et al.*, *J. Indian Chem. Soc.*, **33**, 111 (1956)
- 10) K. L. Rinehart *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 503 (1958)
- 11) G. V. D. Tiers, Characteristic Nuclear Magnetic Resonance "Shielding Values" (Spectral Positions) for Hydrogen in Organic Structures. Part I: Tables of τ -values for a variety of Organic Compounds (1958)