総 説

ガスクロマトグラフ法による脂肪酸の測定

丸 山 正 生

中央大学理工学部 (東京都文京区春日 1 丁目)

Gas Chromatography of Fatty Acids

Masao MARUYAMA

Faculty of Science and Engineering, Chuo University

(Kasuga, Bunkyo-ku, Tokyo)

James Martin が 1932 年にガスクロマトグラフで脂肪酸を測定して以来、ガスクロマトグラフィーで脂肪酸を分析したという報告は非常に多い。それまでは脂肪酸の組成を明らかにすることはそう容易なことではなかったが、ガスクロマトグラフ法という手段が出現するに及んで、現在でも問題となる点もないわけではないが、ともかくこの方面の研究に非常に大きな貢献をしていることは周知のとおりである。ここでは著者の研究室で長年研究してきたデータ、経験をも含めてガスクロマトグラフ法による脂肪酸の測定に関して概観したい。

1 前処理 (エステル化)

脂肪酸をガスクロマトグラフで測定するためには、一般に脂肪酸をメチルエステル¹⁾にして測定する。低級脂肪酸の場合、あるいは最近では後述のように高級脂肪酸でも、そのまま測定に供することもできるが、現在まではエステルにして測定するほうが好結果が得られるとされている。

エステル化する方法としてはこれまで多くは、試料を適当な触媒の存在下で無水メタノールと加熱還流し、反応終了後、水を加えて石油エーテルまたはエーテルでエステルを抽出し、その抽出物をガスクロマトグラフ測定に供している。

鉍酸を触媒に用いるエステル化の方法は古くから用いられているが、最近では触媒に三フッ化ホウ素を用いると^{2), 3)}エステル化は簡単にこなせる。この場合、三フッ化ホウ素の代わりに三塩化ホウ素を用いてもエステル化することができよう。

またジアゾメタンを用いてエステル化する方法もしばしば利用されている。反応速度も速くガスクロマトグラフ法の前処理として良い方法である。ただジアゾメタンは毒性が強く、また爆発性であるから、ドラフトで注意して操作するなどの配慮が必要である。またジアゾメタン溶液の保存はむずかしく、使用時に準備する必要がある。著者らは以前ジアゾメタンによるエステル化の方法

について検討し⁴⁾、必要に応じて必要量のジアゾメタンを簡単に合成し、一方でそのジアゾメタンで直ちにエステル化する方法を試み、好結果を得た。ジアゾメタンによるエステル化の場合、不飽和酸が存在するとピラゾリンを生成するとか、その他の副反応が起こるとかいはわれているが、これは試料中の不飽和酸の量にもよるが、全操作中からくる誤差から考えると著者らの経験では問題になるような量ではなく、そのためにジアゾメタンによるエステル化の方法が利用できないということはない。

そのほか Stoffel ら⁵⁾の行なった脂肪酸を分離することなく、微量の試料を直接酸の存在下でエステル交換する方法は、たとえば生体試料中の脂肪酸の定量のような場合に有利な方法である。

また最近グリセリドから直接脂肪酸メチルエステルを得る方法が多く工夫されている。たとえば Craig ら⁶⁾は触媒にナトリウムメトキシドを用いてエステル化を行なっている。Gehrke ら⁷⁾は酸化銀とヨウ化メチルを用いてエステル化している。2,2-ジメトキシプロパンを用いてトリグリセリドから脂肪酸メチルエステルをうる方法も最近試みられている^{8), 9)}。この 2,2-ジメトキシプロパンによるエステル交換は加熱還流、蒸発、抽出などの操作を必要としないので、誤差の原因が少なく、特に低級脂肪酸の損失が少ない。またグリセリンとジメトキシプロパンとの反応でイソプロピリデングリセリンができるが、これは保持時間を決める標準に利用できる。

上述の方法で脂肪酸をメチルエステル化してガスクロマトグラフ法で分析した結果を 表-1, 2 に一例として示

表-1 低級脂肪酸の分析結果

脂 肪 酸	添加割合	ジアゾメタン法	塩酸-メタノール法 (樹脂上でエステル化)	BF ₃ -メタノール法
酪 酸	38.7	38.6	4.0	20.1
吉 草 酸	30.0	29.8	14.8	24.4
カブロン酸	31.2	31.6	29.6	30.4

しておく。

ところでこれらのエステル化法のうちでどの方法が最もよいかということになるが、これは対象とする試料、その形、目的によっても異なり、一概にはなんともいえ

表-2 高級脂肪酸の分析結果

脂 肪 酸	添加割合	ジアゾメタン法	塩酸-メタノール法 (樹脂上でエステル化)	BF ₃ -メタノール法	塩酸-メタノール法 (Stoffelの方法)
カプロン酸	7.3	7.3	6.2	6.7	
カプリル酸	9.0	9.1	7.9	8.4	
ミリスチン酸	14.2	14.7	13.8	13.9	17.8
パルミチン酸	16.1	15.9	15.7	15.6	19.6
ステアリン酸	17.8	17.6	18.7	18.0	21.0
オレイン酸	17.8	17.6	17.7	17.4	21.0
リノール酸	17.8	17.8	17.8	17.8	20.7

ずそれぞれの場合に応じて最適の方法を選ばざるを得ない。

2 固定相液体

初期のころはアビエングリスのような非極性の固定相液体が用いられていた。この場合、飽和酸は炭素数の順に溶出するが、同一炭素数で不飽和度を異にする酸の分離は不可能あるいは少なくとも困難である。たとえば C₁₈ の脂肪酸、すなわち、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸の分離はこのような固定相液体ではできない。

シリコーンゴム SE-30 はアビエングリスよりも一般に分離は悪く、同一炭素数の不飽和酸の分離はできない。

著者らは以前、ポリ酢酸ビニル系の固定相液体の開拓

1. ミリスチン酸 (C₁₄),
2. パルミチン酸 (C₁₆),
3. ヘキサデセン酸
4. ステアリン酸 (C₁₈)
5. レイン酸 (C₁₈^{1st})
6. リノール酸 (C₁₈^{2nd})
7. リノレン酸 (C₁₈^{3rd})
8. アラキン酸 (C₂₀)

分 離 管: クロトン変性ポリ酢酸ビニル/
セラライト 545, 5 m

分 離 管 温 度: 220°C

キャリアーガス: He, 80 ml/min

検 出 器: 熱伝導度セル

図-1 C₁₈ 脂肪酸メチルエステル混合物のクロマトグラム

図-2 C数と保持容量の関係

を行ない、クロトン酸変性ポリ酢酸ビニルが不飽和高級脂肪酸メチルエステルの分離にすぐれた性能を示すことを認めた¹⁰⁾。測定の一例を図-1,2 に示す。さらに多くの人々によってポリエステル系の固定相液体が開拓され、今日ではこのようなポリエステル系の固定相液体が脂肪酸メチルエステルの分離に最もよいとされて広く用いられている。ところで一般に非極性固定相液体では不飽和脂肪酸が飽和脂肪酸より速く溶出する。しかし極性固定相液体、たとえばポリエステルを用いた場合はピークの出現順序がまったく逆になり、最初に飽和脂肪酸が溶出し、ついで不飽和脂肪酸がモノエン、ジエン、トリエンの順に出る。たとえば、C₁₈ の脂肪酸については、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸の順に出現する。この事実はこれら脂肪酸の定性に役立つ。

3 遊離脂肪酸の測定

最近では前述のように脂肪酸をエステルにせず、遊離酸のまま測定しようという試みもある。たとえば Metcalfe¹¹⁾ は固定相液体に 2%-リン酸を添加した 20%-エチレングリコールアジペート-ポリエステルを用い、C₂₂ の脂肪酸まで分離することを認めており、また Jowett ら¹²⁾ は担体に ガラスビーズを用い、それにわずかのリン酸を添加したエチレングリコールサクシネート-ポリエステルをつけて測定すると脂肪酸の分離がうまくいくと報告している。これらの場合リン酸は脂肪酸が会合し、また担体に吸着するのを防ぐ目的で固定相液体に加えられたものである。

さらに小西ら¹³⁾ は担体にリン酸スズを用い、固定相液体にチオジプロピオン酸ジラウリルを使用することによって C₂~C₁₈ の脂肪酸を分離している。

著者の経験では、前述のような充テン剤を用い、試料を注入したのにピークが現われなかったり、あるいは試料を注入しないで、たとえばアルコールなどを注入するとアルコールのピークのほかに前に注入した脂肪酸の保持時間の位置にピークが現われる、いわゆる“ゴースト”という現象をしばしば経験した。この事実から、脂肪酸が分離管内あるいはその他の通過部分に吸着される

ということが推測される。また脂肪酸が熱で分解されるおそれがあるので、できるだけ分離管の温度を低くして測定するためには、液相量を少なくすることが必要になってくる。この場合、ピークのテーリングが起りやすく、したがって、対称的なピークが得にくいことにもなる。種々の点について総合的に検討した結果、吸着現象に大きな影響を及ぼすのは、担体、固定相液体はもちろんのこと、注入口から検出器にいたるまでの全流路の材質もその大きな因子であることが結論された¹⁴⁾。また二、三の市販のガスクロマトグラフで測定した結果、程度の差は多少あったが、注入口内部の形状、大きさも大いに関係があり、特に内壁表面の粗密の程度も大きな影響を及ぼすことがわかった(案外測定の場合気づかない

が、注入口内部によごれがある場合は論外である)。したがってたとえば充テン剤にジエチレングリコールサクシネートポリエステル/ガラスビーズを用い、分離管を含めた全流路をホウケイ酸ガラス製にすることによって再現性のあるしかも対称性のよいクロマトグラムを得ることができた。測定の数例を 図-3,4 に示す。

4 毛管式分離管による測定

すぐれた分離能を持っているため、最近注目されている分離管に毛管式分離管がある。1958 年、Golay によって実現したこの毛管式分離管は、今まで述べてきた普通用いられている充テン式分離管と異なり、その内部に充テン物をつめない中空のパイプであって内壁に固定相液体を付着させただけのものである。構造上、これまでの充テン式分離管と異なり、内部の流れが一樣で圧力降下が少ないので、全長を長くすることができ、理論段数のきわめて高い、いまだで得られなかった高分離能のものが容易に得られる。また固定相液体が少ないので、保持時間が短く、低温で操作できるという特徴をもっている¹⁵⁾。

このような高い分離能を示す毛管式分離管を使用することによって脂肪酸の分析は非常に進歩した。固定相液体にアビエゾン L を用いた毛管式分離管で測定した結果では、同じ固定相液体を使用した充テン式分離管よりはるかに高い分離能を示した。たとえば Condon¹⁶⁾ は固定相液体にアビエゾン L を用いた 100 ft の毛管式分離管を使用して C_{18} の脂肪酸

1. ミリスチン酸 2. パルミチン酸 3. ステアリン酸
(a) 分離管: DEGS, 0.5%/ガラスビーズ, ガラス, 4.2 mm×1 m
分離管温度: 160°C
キャリアーガス: N_2 80 ml/min
検出器: 水素炎イオン化検出器
(b) 分離管: DEGA, 2.2%/クロモソルブ W, ガラス 4.2 mm×1 m
分離管温度: 170°C
キャリアーガス: N_2 , 60 ml/min
検出器: 水素炎イオン化検出器

図-3 脂肪酸のクロマトグラム

1. 酢酸 (C_2) 2. プロピオン酸 (C_3)
3. 酪酸 (C_4) 4. 吉草酸 (C_5)
5. カブロン酸 (C_6) 6. カプリル酸 (C_8)
7. カプリン酸 (C_{10}) 8. ミリスチン酸 (C_{14})
9. パルミチン酸 (C_{16}) 10. ステアリン酸 (C_{18})
11. アラキニン酸 (C_{20})
分離管: DEGA, 0.5%/ガラスビーズ, ガラス, 4.2 mm×1 m
分離管温度: 56.5~183°C
キャリアーガス: N_2 , 60 ml/min
検出器: 水素炎イオン化検出器

図-4 脂肪酸の昇温クロマトグラム

1. ミリスチン酸メチル 2. パルミトレイン酸メチル
3. パルミチン酸メチル 4. リノール酸メチル
5. オレイン酸メチル 6. ステアリン酸メチル
分離管: アビエゾン L (0.01 in×100 ft)
分離管温度: 225°C
検出器: アルゴンイオン化検出器

図-5 C_{18} 脂肪酸メチルエステルのクロマトグラム

図-6 C_{18} 脂肪酸メチルエステルのクロマトグラム

メチルエステルの分離に成功している。その一例を 図-5 に示す。

また Lipsky¹⁷⁾ らは同一の分離管を用いてエライジン酸メチル($C_{18}H_{34}$ *trans*)とオレイン酸メチル($C_{18}H_{34}$ *cis*)とのような *cis*, *trans* 異性体の分離を行なっている。Kauffman ら¹⁸⁾もアピエゾンを固定相液体に用いた毛管式分離管で C_{18} のオレイン酸メチル, エライジン酸メチルの分離に成功している。Kauffman らの結果を 図-6 に示す。

その後, Litchfield ら^{19)~21)}, Butterfield ら²²⁾, Frankel ら²³⁾が固定相液体にアピエゾン L, ジエチレングリコールサクシネート (DEGS) などのポリエステル, ニトリルシリコンなどを用いた毛管式分離管で, 種々のオクタデセン酸メチル異性体の分離を発表した。たとえば Litchfield らはリノール酸メチルの四つの異性体の分離定量が, 固定相液体にアピエゾン L および DEGS ポリエステルを用いた 2 本の毛管式分離管で可能なことを報告している。すなわち, アピエゾン L を用いると, 9-*cis*, 12-*cis* 異性体, 9-*cis*, 12-*trans* 異性体, (9-*trans*, 12-*cis* + 9-*trans*, 12-*trans*) 異性体の分離が可能であり, ポリエステルを用いると, 9-*trans*, 12-*cis* 異性体, (9-*cis*, 12-*cis* + 9-*cis*, 12-*trans*) 異性体, 9-*trans*, 12-*cis* 異性体の分離が可能である。したがって両者を併用する

図-8 リノール酸メチル立体異性体のクロマトグラム

ころいくつかの分離管を併用してもすべてを分離定量できる段階にまで達していない。今後の課題であろう。たとえば固定相液体にニトリルシリコンを用い, 200 ft の毛管式分離管により, *all cis*, *mono trans*, *di trans*, *all trans* の四つに分離され, さらに *mono trans* が二つのピーク, *di trans* が二つのピークに分かれる。固定相液体にニトリルシリコンを用いた場合, *cis*, *trans* 異性体がよく分離されるおもな原因はニトリル基が二重結合の π 電子と π -complex をつくりやすいためと考えられている。

このような高い分離能を持つ分離管を巧みに使用することにより, 今後油脂の分野にこれまでも増して多くの新しい情報を提供してくれるのではなかろうか。

(昭和 41 年 2 月 16 日受理)

文 献

- 1) 具体的方法としてたとえば下記の文献を参照していただきたい。
 丸山, 実験化学講座(続), **9**, 338 (1965)
 丸山, 医学のあゆみ, **50**, 205 (1964)
- 2) J. Mitchell, Jr., D.M. Smith, W.M.D. Bryant *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 4 (1940)
- 3) L.D. Metcalfe, A.A. Schmitz, *Anal. Chem.*, **33**, 363 (1961)
- 4) 丸山, 坂口, 日本化学会第 17 年会発表 (1964)
- 5) W. Stoffel, F. Chu, E.H. Ahrens, Jr., *Anal. Chem.*, **31**, 307 (1959)
- 6) B.M. Craig, N.L. Murty, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **36**, 549 (1959)
- 7) C.W. Gehrke, D.F. Goerlitz, *Anal. Chem.*, **35**, 76 (1963)
- 8) S.B. Tove, *J. Nutrition*, **75**, 361 (1961)
- 9) M.E. Mason, G.R. Waller, *Anal. Chem.*, **36**, 513 (1964)
- 10) 丸山, 妹尾, 工化誌, **64**, 777 (1961)

図-7 リノール酸メチル立体異性体のクロマトグラム

- 11) L.D. Metcalfe, *Nature*, **188**, 142 (1960)
- 12) P. Jowett, B.J. Horrocks, *Nature*, **192**, 966 (1961)
- 13) 小西, 狩野, 分析化学, **13**, 299 (1964)
- 14) 丸山, 坂口, 分析化学, **15**, 56 (1966)
- 15) 毛管式分離管の詳細については、たとえばつぎの文献を参照していただきたい。
丸山, 福田, 化学の領域, 増刊 73 号, 29 (1965)
- 16) R.D. Condon, *Anal. Chem.*, **31**, 1717 (1959)
- 17) S.R. Lipsky, J.E. Lovelock, R.A. Lindowne, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 1910 (1959)
- 18) F.L. Kauffman, G.C. Lee., *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **37**, 385 (1960)
- 19) C. Litchfield, A.F. Isbell, R. Reiser, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **39**, 330 (1962)
- 20) C. Litchfield, R. Reiser, A.F. Isbell, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **40**, 302 (1963)
- 21) C. Litchfield, R. Reiser, A.F. Isbell, G.L. Feldman, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **41**, 52 (1964)
- 22) R.O. Butterfield, C.R. Scholfield, H.J. Dutton, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **41**, 397 (1964)
- 23) E.N. Frankel, E.P. Jones, V.L. Davison, E. Emken, H.J. Dutton, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **42**, 130 (1965)

書 評

MARGARINE (Second revised edition)

A.J.C. Andersen and P.N. Williams 16×23 cm, 420 頁, 価 £5 10 s, 1965,
Pergamon Press

初版は 1954 年に Andersen 単独の著書として刊行されて以来マーガリンに関する基礎的理論と実際技術のすぐれた専門書として認められてきたものである。しかし最近 10 年間の原材料, 機械等における進歩が著しかったので, これら新知見を補足した新技術書の刊行が望まれていた。たまたま今回 Williams 氏が初版の内容を基本とし, その後の新知見により大幅に改訂増補を行ない改訂 2 版として Andersen 氏と共著で刊行された。

初版と比較して本著に増改訂された部門の概要をあげると, まず総論の栄養価値の項では従来の消化吸收の問題に加えて新たに生長と寿命, 必須脂肪酸とコレステリンとの関係やイソ酸の栄養問題についての新知見を総括的に記述している。統計の項では初版以降 10 年間 1960 年度までの生産消費統計が追補された。

原材料篇の化学の項ではトリグリセリドの新種ならびにその性質や各油脂についての新知見が加えられ, また新たにサフラワー油のようなものが追加されている。副原料としての組成分の項でも新型プレート殺菌機を追補し詳細な説明がなされ, さらに保存料, 着色料, 風味成分, 酸化防止剤の項もそれぞれ新知見が補足され, ビタミンについては実際製菓に使用した場合の変化などについて述べているのは興味がある。

製造篇はほとんど初版の内容と変わらないがマーガリン製造装置の項で, すでに旧型化したものは簡略にし, その代わり現在一般化しているチューブラークーラー型のものに重点をおき, ボテーター新型, パーフェクターならびにコンビネーターについて多くの紙面を費している。

包装関係では最近の新包装資材や新型包装機特に直結包装方式について詳しく述べ, また計量のチェック方法, ケースパッカーなどが新しく加えられた。その他特殊マーガリンとして, Whipped, Refrigerator, Essential Faty Acid の 3 種マーガリンが追加されている。

貯蔵保管篇では製品の変敗, 物性的見地よりの保管温度について新知見を述べ, 工程管理篇においては製品の物理性試験を相当多く拡大説明し, さらに微生物管理の項を新たに追加してある。

規格法規篇も各国の事情により多少の改訂が見られ, 工場設計篇ではチューブラークーラーを配置した工場内新写真が多くのせられている。

以上増補事項の文献も巻尾に記されているので専門家にとってもまた一般関係者にとっても現在最もすぐれたマーガリン類に関する参考書であると思う。

(今村正男)