脂肪酸メチルの GLC 分析に及ぼす操作条件の影響 (第 2 報)

キャリアーガス流速および昇温範囲, 速度の影響

清 野 肇・渡 辺 昭 一 郎

北里大学衛生学部化学科 (相模原市麻溝台 1)

Influences of Operating Conditions on the Determination of Fatty Acid Methyl Esters by GLC. II.

Influences of the Flow Rate of the Carrier Gas, and the Range and the Rate of Temperature Programming

Hajime SEINO and Shōichirō WATANABE

Department of Chemistry, Faculty of Hygienic Sciences, Kitasato University
(1, Asamizodai, Sagami-hara-shi)

The composition of a standard mixture containing methyl esters of C_{12} , C_{14} , C_{16} and C_{18} fatty acids was determined by a gas chromatograph with a flame ionization detector and an electronic integrator by changing the flow rate of the carrier gas, and the influence of the variation on the weight response of the components were examined. It was observed that the variation of the flow rate of the carrier gas had significant influence on the weight response of the components, especially on those of C_{12} -Me and C_{18} -Me.

Then the programmed temperature operation was carried out using a standard mixture of six components from C_8 -Me to C_{18} -Me to examine if the correct analytical values would be obtained by this operation. The deviation of the analytical values from the known values was decreased by temperature programming, but not diminished. The weight response of the components increased as the carbon number increased, and the rate of the increase from C_8 -Me to C_{10} -Me was significant. Therefore, authors believe that the influence of the carbonyl group in the molecule on the weight response of C_8 -Me and C_{10} -Me is not negligible.

1 緒 言

水素炎イオン化検出器 (FID) を備えたガスクロマトグラフは, 脂肪酸メチル混合物の組成の分析に広く用いられている。しかし, その分析の精度は必ずしも満足できないことが Herb ら¹⁾によって報告されている。また, 日本油化学協会のガスクロ委員会が, FID を備えたガスクロマトグラフによる脂肪酸組成の分析法を制定する目的で行なった合同実験結果の報告^{2), 3)}でも, 同一試料についての分析結果が機関によりかなり異なることが述べられている。正確な分析を行なうためには, ガスクロマトグラフの諸操作条件が脂肪酸メチルの応答感度に応じたような影響を与えるかについて知ることが重要と考えられる。

含酸素化合物の FID に対する感度に関しては, いくつかの報告^{4)~7)}がある。たとえば, Ackman^{5)~7)} は分子

中の酸素原子の炭素原子に対する比が大きくなるほど, その化合物の重量感度は低くなること, また分子中の炭素原子数が 8 以上になると, 酸素原子の影響は無視できるほど小さくなることを報告している。しかし, 脂肪酸メチルの感度に重大な影響を及ぼす可能性があるガスクロマトグラフの操作条件は数多くあり, それらについての, 実用的に参考になるようなデータはあまり公表されていない。

著者らは, 先に FID を備えたガスクロマトグラフにより脂肪酸メチル混合物の組成を分析する際の諸操作条件が分析値に及ぼす影響について検討し, とくに試料注入量が大きな影響をもつことを報告した⁸⁾。引き続いて, キャリヤーガス流速の影響, さらに昇温 GLC を行なった場合の, 昇温範囲および昇温速度の影響について検討した結果について以下に報告する。

2 実験および結果

2.1 装置および試料

装置 実験に用いた装置は、日立 063 型ガスクロマトグラフで、これに KENT Chromalog II 型インテグレーターを接続して、ピーク面積の測定を行なった。ガスクロマトグラフおよびインテグレーターの操作条件は以下に示すとおりである。

ガスクロマトグラフ 日立-063

column: 20%-DEGS/Chromosorb W (60~80 mesh), 4 mm×2 m

detector: FID

range: 10

attenuation: 8

インテグレーター KENT Chromalog II

slope sensitivity: 7

slope sampling rate: 8

試料 $C_8 \sim C_{18}$ の直鎖飽和脂肪酸のメチルエステルを Table-1 に示すように種々の割合で混合し、20% (wt/wt) クロロホルム溶液としたものを実験試料として用いた。これらのメチルエステルのうち、 $C_{12} \sim C_{18}$ の脂肪酸メチルは、日本油脂株式会社から寄贈されたもので、また C_8 および C_{10} 脂肪酸メチルは、それぞれ市販のカプリル酸およびカプリン酸を、硫酸-メタノール法でメチルエステルとしたのち、減圧蒸留したものである。これらのエステルは、ガスクロマトグラフィーで調べた結果、いずれも純度 99.6% 以上であった。

Table-1 Composition of the samples.

	C_8 -Me (%)	C_{10} -Me (%)	C_{12} -Me (%)	C_{14} -Me (%)	C_{16} -Me (%)	C_{18} -Me (%)
Sample 1	—	—	50.54	—	—	49.46
Sample 2	—	—	24.18	23.48	28.45	23.89
Sample 3	—	—	28.63	25.92	24.36	21.10
Sample 4	17.02	16.69	16.95	16.91	15.88	16.56

2.2 実験方法

各分析条件下での測定は、3 回ずつ一定試料量を注入して行ない、インテグレーターによるカウント数の 3 回の平均値から試料中の成分の百分組成を求めた。なお、この 3 回の測定値間のバラツキは、前報⁸⁾で述べた通りきわめて小さかった。また、各測定条件下でのそれぞれの脂肪酸メチルの応答を比較検討するため、以下に定義するような値を計算した。

- 1) 混合比に対する分析値の比分析値/混合比
- 2) 重量感度=インテグレーターによる各成分のカウント数/混合比
- 3) 相対重量感度=各成分の重量感度/ C_{12} -Me の重量感度

2.3 キャリヤーガス流速の影響

分析値に及ぼすキャリヤーガス流速の影響を調べるため、 C_{12} -Me および C_{18} -Me をほぼ等量ずつ含む試料 1 を用い、カラム温度を 160°C とし、キャリヤーガスを $30 \sim 70 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ の種々の流速に変えて、測定を行なった。以上の実験の結果得られた、重量感度とキャリヤーガス流速との関係を Fig.-1 に、また分析値の混合比に対する比と流速との関係を Fig.-2 に示す。

Fig.-1 に明らかなように、キャリヤーガス流速の変化による重量感度の変化を示す曲線の傾斜は、 C_{12} -Me と C_{18} -Me とでは異なっており、また重量感度が最大値を示す流速にも、両成分の間でいくらかの差が認められ

Fig.-1 Weight response vs. flow rate of the carrier gas-(1).

Fig.-2 Ratio of the analytical value to the known value vs. flow rate of the carrier gas-(1).

る。また、**Fig.-2** に示したように、流速がおそい場合は、 C_{12} -Me の分析値は混合比より大きく、 C_{18} -Me は混合比より小さい値が得られた。両成分の分析値は、流速 $45 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 付近で、もっとも混合比に近づき、流速が増すと、両成分の分析値の混合比に対する割合の大小は、流速がおそい場合の逆になる。

次に、 C_{12} -Me、 C_{14} -Me、 C_{16} -Me および C_{18} -Me の 4 成分をほぼ等量ずつ混合した試料 2 を用い、カラム温度 160°C で、試料を $0.7 \mu\text{l}$ ずつ注入して、同様な実験を行なった。

その結果、**Fig.-3** に示したように、各成分の重量感度はキャリヤーガス流速の変化によって変化し、その変化の割合は成分によって異なることが認められた。さらに、各成分の分析値の混合比に対する比と流速との関係を示す **Fig.-4** に明かなように、 C_{12} -Me および C_{18} -Me の分析値の変動が顕著であり、とくに流速のおそい場合の C_{12} -Me および C_{18} -Me、また流速のはやい場合の C_{12} -Me の分析値の混合比からのずれが著しい。**Fig.-4** からわかるように、キャリヤーガス流速が $40 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 付近のとき、各成分とももっとも混合比に近い分析値が得られた。

Fig.-5 は、上述の実験で得られた、各成分の相対重量感度と成分の炭素数との関係を示したものである。キャリヤーガス流速のおそい $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ では、相対重量感度は、炭素数の増加とともに減少する傾向が認められるが、流速がはやくなると C_{12} -Me から C_{16} -Me までは、炭素数の増加とともに、相対重量感度は増加し、 C_{18} -Me にいたってやや減少が認められる。この場合も、

Fig.-3 Weight response vs. flow rate of the carrier gas-(2).

Fig.-4 Ratio of the analytical value to the known value vs. flow rate of the carrier gas-(2).

Fig.-5 Relative weight response vs. carbon number-(1).

キャリヤーガス流速が $40 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ のときに、もっとも変化の割合が少なかった。以上の実験結果、キャリヤーガス流速の変化が脂肪酸メチルの感度にかなりの影響を及ぼし、とくに C_{12} -Me および C_{18} -Me などは、その影響が著しいことが明らかとなった。これらの成分の感度が分析条件により大きな影響をうけることは、先に報告した、カラム温度、試料注入量についても同じよう

な結果が得られており⁸⁾、また油化学協会的气クロ委員会で行なった合同実験の結果^{2), 3)}でも、同様なことが明らかにされている。この原因としては、保持時間に大きな差がある成分を含む試料を一定カラム温度で分析する場合、どの成分についても、定量に適した形状のピークを得ることが困難であること、ならびに炭素鎖長の異なる成分では、FID による検出感度に差のあることなどが考えられる。

2.4 昇温 GLC による分析

前述の通り、定温 GLC による分析では、炭素鎖長に大きな差のある成分を含む試料の組成を正確に求めることは困難である。そこで、昇温 GLC を行なって、試料中の成分のすべてについて、定量に適した形状のピークを得ることによって、正確な分析ができるか否かについて、以下のように検討した。

すなわち、 C_{12} -Me $\sim C_{18}$ -Me の 4 成分をほぼ等量ずつ混合した試料 3 を用い、キャリアガス流速を、2.3 で述べた実験の結果、もっとも適当と認められた、 $40 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ とし、カラム温度を 120°C から 200°C まで、 1 min に $3^\circ\text{C} \sim 15^\circ\text{C}$ の種々の割合で上昇させて測定を行なった。

Fig. 6 に各成分の重量感度と昇温速度との関係を示す。各成分の重量感度は、 C_{18} -Me を除いては、昇温速度の変化とともにほぼ同じような変化を示し、昇温速度が $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ の場合に最大値を示す。また、分析値/混合比の値と昇温速度との関係を示した Fig. 7 に明らかなように、昇温速度が $5 \sim 10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ の範囲では、昇温速度の変化による分析値の変動はあまり顕著ではない。Fig. 8 には、以上の実験で求めた各成分の相対重量感度と炭素数との関係を示した。図に明かなよう

Fig. 6 Weight response vs. programming rate of the column temperature-(1).

Fig. 7 Ratio of the analytical value to the known value vs. programming rate of the column temperature-(1).

Fig. 8 Relative weight response vs. carbon number-(2).

に、 C_{12} -Me から C_{16} -Me までは、炭素数の増加とともに、相対感度は増加し、 $C_{16} \sim C_{18}$ の間では、その増加率が減少するか、あるいは感度の減少が認められる。

つぎに、さらに炭素鎖の短い成分を含む試料として、 C_8 -Me $\sim C_{18}$ -Me の 6 成分をほぼ等量ずつ含む試料 4 を用いて同様な実験を行なった。さきの実験により、カラム温度の上限を 200°C とすると、 C_{18} -Me の分析値がやや不正確になることが認められたので、カラム温度の範囲を、 $80 \sim 220^\circ\text{C}$ および $120 \sim 220^\circ\text{C}$ とし、昇温速度

Fig.-9 Eluting temperature vs. carbon number of the component.

をそれぞれ $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, $7.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ として測定を行なった。測定結果を **Table-2** に示す。

表に明らかなように、分析値はカラム温度の範囲および昇温速度の変化によってあまり顕著な影響は受けていない。

Fig.-9 に昇温速度を $7.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ とした場合の各成分の溶出温度と炭素数との関係を示す。カラム温度の範囲が $80\sim 220^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ の場合は、各成分の溶出温度は炭素鎖長の増加に伴ってほぼ直線的に上昇するが、温度範囲の狭い $120\sim 200^{\circ}\text{C}$ の場合は、炭素鎖長の短い $\text{C}_8\text{-Me}\sim\text{C}_{12}\text{-Me}$ の溶出温度と炭素数との関係は、 $80\sim 220^{\circ}\text{C}$ の場合に比べ、傾斜のゆるやかな曲線となる。

Fig.-10 に昇温速度を $7.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ とした場合の各成分の相対感度との関係を、比較のためにカラム温度

Fig.-10 Relative weight response vs. carbon number-(3).

170°C (定温) で測定した結果とともに示す。図に明らかなように、昇温で測定した場合、各成分の相対重量感度は、定温の場合に比べ、変化の割合は小さくなるが、炭素鎖長の増加とともに増大し、炭素数が 12 以下では、とくにその変化率が大きいことが認められる。

3 考 察

FID を備えたガスクロマトグラフを用い、 $\text{C}_{12}\text{-Me}\sim\text{C}_{18}\text{-Me}$ を含む試料について、カラム温度を 160°C とし、キャリアガス流速を種々に変化させて測定を行なった。その結果、流速の変化が成分の重量感度にかんがりの影響を与え、成分によってその影響にいくらか差があることが認められた。とくに、 $\text{C}_{12}\text{-Me}$ および $\text{C}_{18}\text{-Me}$ は大きな影響をうけ、流速のおそい場合の $\text{C}_{12}\text{-Me}$ および $\text{C}_{18}\text{-Me}$ 、また流速のはやい場合の $\text{C}_{12}\text{-Me}$ の分析値の混合比からのずれが著しい。キャリアガス流速が $40\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 付近の場合に、各成分の分析値がもっとも混合比に近づくことが認められた。各成分の相対重量感度は、流速のおそい $30\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ の場

Table-2 Results of the programmed temperature operations.

Component Known value (%)			$\text{C}_8\text{-Me}$ 17.02	$\text{C}_{10}\text{-Me}$ 16.69	$\text{C}_{12}\text{-Me}$ 16.95	$\text{C}_{14}\text{-Me}$ 16.91	$\text{C}_{16}\text{-Me}$ 15.88	$\text{C}_{18}\text{-Me}$ 16.56
	Column temperature (°C)	Program-ming rate (°C/min)						
Analytical value (%)	80—220	5	14.73	15.90	17.22	17.61	16.85	17.69
		7.5	14.87	16.07	17.37	17.51	16.67	17.51
		10	14.70	16.05	17.36	17.65	16.55	17.69
	120—220	5	14.88	15.94	17.10	17.53	16.87	17.69
		7.5	14.67	15.82	17.06	17.55	17.02	17.89
		10	14.89	15.94	17.12	17.52	16.79	17.74
Weight response	80—220	5	0.852	0.938	1	1.025	1.045	1.052
		7.5	0.852	0.940	1	1.011	1.024	1.032
		10	0.843	0.939	1	1.019	1.018	1.043
	120—220	5	0.867	0.947	1	1.027	1.053	1.059
		7.5	0.857	0.942	1	1.031	1.065	1.073
		10	0.866	0.946	1	1.026	1.047	1.060

合を除いて、 C_{12} 、 C_{14} 、 C_{16} と炭素数の増加に伴って増加し、 C_{18} -Me に至って減少が認められた。以上の結果、キャリアガス流速の変化がとくに C_{12} -Me および C_{18} -Me の分析値に著しい影響を及ぼすことが認められた。この原因の一つとして、 C_{12} -Me、 C_{18} -Me のように、保持時間に大きな差のある成分を含む試料を、一定カラム温度で分析する場合、どの成分についても、定量に適した形状のピークを得るのが困難であることが考えられる。この原因は、昇温 GLC を行なって、各成分のピークをほぼ同じような形状にそろえることによって、排除できると考えられるので、つぎに昇温 GLC を行なった。その結果、 C_{12} -Me $\sim$ C_{18} -Me を含む試料では、成分の炭素鎖長の増加に伴う相対重量感度の増加の割合は、定温 GLC の場合に比べ低下した。そして、昇温速度が $5^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ の範囲では、各成分の相対重量感度には、著しい差は認められなかった。さらに、 C_8 -Me $\sim$ C_{18} -Me の 6 成分を含む試料について実験を行なった結果、昇温速度の変化に伴う各成分の相対重量感度の変化は、昇温速度が $5^{\circ}\text{C}\sim 7.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ の範囲では僅少であった。また、各成分の溶出温度と炭素数との関係は、カラム温度範囲が $80^{\circ}\text{C}\sim 220^{\circ}\text{C}$ の場合はほぼ直線となった。しかし、各成分の相対重量感度は、炭素数の増加とともに増加することが認められた。その増加率は定温 GLC の場合ほど大きくはないが、炭素数の少ない成分でとくに著しく、昇温によって各成分の相対重量感度をほぼ等しくすることはできなかった。Ackman^{2)~7)} はカルボニル基をもつ化合物の FID に対する重量感度は、分子中のカルボニル基の炭素鎖に対する比が大きくなるほど低下すること、また、分子中の炭素原

子数が 8 以上になると、カルボニル基の影響は無視できるほど小さくなることを報告している。著者らが行なった実験の結果では、昇温 GLC を行なっても、炭素数 8 以上の成分の重量感度が、炭素数の増加とともに増加することが認められた。昇温 GLC を行なった結果得られたガスクロマトグラム中の各成分のピークは、いずれもほぼ同程度の傾斜をもつ二等辺三角形で、ベースラインもきわめて安定していたので、各ピークごとの傾斜の違いによるインテグレーターの検出感度の差、あるいはベースラインの変動による測定誤差はきわめて小さいものと考えられる。したがって、 C_8 -Me および C_{10} -Me、とくに C_8 -Me の重量感度が低いのは、脂肪酸メチル中のカルボニル基の影響が、この程度の炭素鎖長の脂肪酸メチルではかなり大きいということも考えられる。しかし、この点に関しては、さらに検討を要する。

(昭和 48 年 4 月 2 日受理)

文 献

- 1) S.F. Herb, V.G. Martin, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, **47**, 415 (1970)
- 2) 渡辺, 中里ら, 油化学, **22**, 95 (1973)
- 3) S. Watanabe *et al.*, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, in print
- 4) A.B. Littlewood, "Gas Chromatography", p. 306 (1970), Academic Press, New York
- 5) R.G. Ackman, J.C. Sipos, *J. Chromatog.*, **16**, 298 (1964)
- 6) R.G. Ackman, *J. Gas Chromatog.*, **2**, 173 (1964)
- 7) R.G. Ackman, *J. Gas Chromatog.*, **6**, 497 (1968)
- 8) H. Seino, S. Watanabe, T. Nihongi, T. Nagai, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, in print