報 文

脂肪酸メチルエステル中の混入フタル酸
エステルの簡易除去法

芝原 章・中西まゆみ・梶本 五郎

神戸学院大学栄養学部（神戸市西区伊川谷町有瀬）

A Simple Method for Removal of Contaminative Phthalates
from Fatty Acid Methyl Esters

Akira SHIBAHARA, Mayumi NAKANISHI, and Gorō KAJIMOTO

Faculty of Nutrition, Kobe-Gakuin University
(Arise, Ikawadani-cho, Nishi-ku, Kobe)

On the gas chromatography of fatty acid methyl esters prepared from trace amounts of lipids, the accurate analysis of the esters is sometimes interfered with phthalates which are eluted from various materials used in the course of sample preparations for gas chromatography. We devised a simple method for removal of the contaminative phthalates from a sample for gas chromatography.

The method was comprised of a sequence of methanolysis and thin-layer chromatographic separation, and this simple combination technique was effectively applied to gas chromatographic microanalysis of fatty acid methyl esters which were contaminated with a wide variety of phthalates. By re-methanolysis of fatty acid methyl esters containing phthalates with 0.5% (wt/vol) sodium methoxide at 80°C for 30 min, the phthalates were converted into dimethyl phthalate and small amounts of heterogeneous phthalates containing one methyl group, but the fatty acid esters were unchanged during the treatment. The resulting mixture was spotted on thin-layer plate which was cleaned up with ether before use, and developed with a solvent mixture of hexane-ether-acetic acid (80/20/1, vol/vol/vol). The fatty acid methyl esters were separated on the plate from the contaminative phthalates, by taking advantage of higher R_f values of the fatty acid esters than those of the methanolysis products from the contaminants. The purified fatty acid methyl esters could be re-analyzed by gas chromatography without any interferences. This method had no influence on the fatty acid methyl esters to be analyzed.

1 緒 言

脂肪酸メチルエステル (FAME) の GC 分析時に各種の可塑剤が定性・定量を妨害することはよく知られている。Ackman¹⁾によると、脂肪酸の GC 分析にたずさわっている者は、遅かれ早かれ、未同定ピークの出現に直面するといわれており、GC 分析試料への可塑剤の汚染が指摘されている。この問題の提起は古く、1962 年に Lindgren ら²⁾がフタル酸エステルについて報告した。その後、数多くの例が発表されているが、いずれも汚染の実態と汚染源の指摘にとどまっているようである。GC 分析での定性・定量妨害を避けるため、試薬・器具などからの可塑剤混入をなくすことはまず第一に必要である。しかし生体試料などを分析する際、一たん GC 試料が汚染されれば、その再調製が不可能となる微

量試料を取り扱う場合もあり、またその再調製に多大の労力を要する場合もみうけられる。こういった場合、可塑剤が混入した GC 試料から、簡単な操作で可塑剤を除去し、もとの試料組成をそこなうことなく定量的に試料が回収できれば、有効な可塑剤除去法として利用価値は高いと思われる。本研究は以上のように、微量試料を取り扱うことの多い生化学的な観点から、GC の高感度運転を対象として企画されたものである。多種類の可塑剤のうち、今回はフタル酸エステルについて報告する。

2 実 験

2.1 標品

市販大豆油と日本油料検定協会より提供された中国産なたね油を、0.5% (wt/vol) ナトリウムメトキシドを用いるメタノリシスに供し、80°C, 30 min 還流加熱して

それぞれ FAME に変換し、後述する TLC で精製後、標品 FAME 混合物として使用した。内部標準として用いる 16:0 (脂肪酸, 炭素数:二重結合数), 18:1, 20:0, 及び 26:0 は半井化学より購入し, 14% BF₃-メタノールで 60°C, 5 min 還流加熱してメチルエステルとし, TLC 精製後使用した。フタル酸ジメチル (DMP), フタル酸ジエチル (DEP), フタル酸ジプロピル (DPP), フタル酸ジブチル (DBP), フタル酸ジヘプチル (DHP), フタル酸ビス (2-エチルヘキシル) (DOP), フタル酸ジオクチル (DnOP), フタル酸ジイソデシル (DiDP), フタル酸ジトリデシル (DTDP), フタル酸ベンジル=ブチル (BBP), フタル酸ブチル=グリコリルブチル (BGBP), などのフタル酸エステルの標品及びフタル酸は, 和光純薬, 半井化学または東京化成の製品である。これらはいずれも後述する GC と, GC-MS で不純物を同定し純度を検定後使用した。

2.2 試薬と器具

使用量の多いヘキサン (残留農薬試験用) は和光純薬より購入した。その他の有機溶媒は市販一級品を蒸留し, テフロンキャップ付きのガラス瓶に保存した。これらは使用の都度, 空試験として使用量にみあう量の溶媒を減圧濃縮しその全量を GC へ注入して, ピークの出ないことを確認後使用した。硫酸ナトリウム (無水物) は 500°C で 2 h 加熱後, デシケーター中に保存し, 使用直前にヘキサンで洗浄した。蒸留水は, 蒸留水製造装置で得られたものを同量のヘキサンで 3 回洗浄して用いた。メタノリシス試薬は, できるだけ小片にした金属ナトリウム 0.5 g をヘキサンで洗浄後, 乾燥したメタノール 100 ml に溶解して作製した。ガラス器具は, 洗浄・乾燥後, ヘキサンで洗浄してただちに使用した。汙過に

は, 直径 6 cm のガラス製三角漏斗に約 0.1 g のガラスウールを密につめて作製した簡易型ガラスフィルターを使用した。このフィルターは, 脱水剤はもとより TLC シリカゲルの吸引汙過にも支障なく用いられた。

2.3 TLC, GC, GC-MS

各条件は関係する図に示した。

2.4 本法の概要

フタル酸エステルによって汚染された FAME から, 汚染物を除去する方法 (以下本法と略記する) の概要を Fig.-1 に示すが, 基本的にはメタノリシス法と TLC の簡単な組み合わせで構成されている。

フタル酸エステルと FAME が混在した GC 試料をメタノリシスすれば, FAME は変化せず, フタル酸エステルは DMP, あるいはジエステルの一方がメチル基に変換された型となり, これら反応物を TLC に供すれば, 反応後の汚染物は FAME より低く展開され分離可能となる。本法は, Fig.-1 に示した各操作中におけるあらたなフタル酸エステルの混入を避けることを前提とするが, これは 2.2 試薬と器具の項で述べたように, また以下本文で説明するように比較的簡単に行える。

3 結果と考察

3.1 汚染の実態

Fig.-2 に汚染の一例を示す。このガスクロマトグラムは, GC-MS でまったくフタル酸エステルが含まれないことを確認した大豆油 FAME に, 内部標準として, 20:0 メチルを 1.5 µg 添加して調製したヘキサン溶液を開封直後の某社製汙紙 (ヘキサンの洗浄は行わない) で汙過後, GC に注入して得られたものである。20:3 メチルにほぼ一致する溶出位置に未知ピークが出現し,

これは GC-MS により DBP と同定された。検出感度はノイズが出ない程度に設定してあり最高感度ではない。汙紙中のフタル酸エステルについては Lam³⁾ や Ishida⁴⁾ によって報告され, DBP の濃度は上記汙紙中で 5.28 ppm⁴⁾ となっている。

Fig.-2 の内部標準から求めたその濃度は約 3 ppm で, Ishida らの報告より低めの値を示すが, これは一度の汙過で溶出した量であり全汙紙中の濃度を示すものではない。このように微量試料の GC 分析では, 不注意な操作をすればフタル酸エステルが混入して, あたかも未知脂肪酸のようなピークが出現し, あるいは既知脂

Fig.-1 Scheme of the method for removal of contaminants.

Methyl arachidate as an internal standard (I.S., 1.5 μ g) was added to the methyl esters of soybean fatty acids, and these esters were filtrated once through a new filter paper without any cleanup.
Following operating conditions were used. Instrument, Shimadzu GC-7A with dual flame ionization detector; Injection and detector temp., 270°C; Carrier gas, He, 40 ml/min; Chart speed, 10 mm/min; Column temp., 230°C, Column, 3mm $\times$ 2m glass column packed with 5% SP-2300 on 60-80 mesh Neopak 2A.

Fig.-2 Appearance of dibutyl phthalate (DBP) on gas chromatogram of methyl esters of soybean fatty acids.

脂肪酸のピークと重なってその定性・定量を妨害する場合がみうけられる。なお可塑剤の GC における挙動については、別の機会に報告する。フタル酸エステルの混入の機会は数多く、試料の包装や保存に用いられた各種ラップやプラスチックコンテナ類、脂質の抽出操作で用いられる有機溶媒（特にその保存に用いる容器の栓が汚染源となる場合が多い）、汙紙、クロマトグラフィー用吸着剤、GC 試料調製のための試薬類（塩酸-メタノール⁸⁾、ジアゾメタン⁹⁾）などの汚染源が判明している。またクリーンナップしたガラス器具でも一夜実験室中に放置すれば、空気中のフタル酸エステルが付着した。空気中のフタル酸エステルについては、すでに Giam¹⁰⁾によって報告されている。我々が経験した汚染の実例では、 μ g オーダー以下の脂質から FAME を調製し、パックドカラムのガスクロマトグラム上でフタル酸エステルを検出した場合が多い。混入するフタル酸エステルの量は汚染源との接触の機会など種々の要因で変動し、一概に決められるべき性格のものではないが、 μ g オーダー以下の脂質を取り扱う場合には、常に汚染の可能性について考慮すべきである。しかし mg オーダー以上の脂質から FAME を調製し、一般的な感度で GC 分析を行う場合には、混入したフタル酸エステルが FAME に対し実質的な妨害を与えたり、また未知ピークとして出現することはまずありえないと思われる。

3.2 フタル酸エステルの TLC

FAME とフタル酸エステル及びフタル酸の TLC を Fig.-3 に示す。フタル酸エステルのアルキル鎖長が短くなるにつれてその R_f は低くなり、フタル酸は展開されなかった。

このように Bloom⁸⁾ の報告と同様の傾向がみられた。この展開溶媒の混合比では、DiDP が FAME と一部重なっているが、溶媒の極性を弱めると両者の分離は改善された。しかし再現性とばくしく、TLC 上で FAME

FAME, fatty acid methyl esters; DTDP, ditiidecyl phthalate; DiDP, diisodecyl phthalate; DOP, bis (2-ethylhexyl) phthalate; MTDP, methyl tridecyl phthalate; iDMP, isodecyl methyl phthalate; OMP, 2-ethylhexyl methyl phthalate; PA, phthalic acid; Plate, Wakogel B-5F (0.3mm); Detection, UV 254 nm and I_2 vapor; Solvent system, hexane-ether-acetic acid (80/20/1, vol/vol/vol).

Fig.-3 Thin-layer chromatogram of fatty acid methyl esters, phthalates, and phthalic acid.

と分離可能か、あるいは不可能となるフタル酸エステルが、この DiDP であると思われる。混入したフタル酸エステルの分子量が DiDP のそれより小さければ、メタノリシスを省略し、直接 TLC に供すれば汚染物の除去が可能となる。しかし事前に、混入したフタル酸エステルの種類がわかる場合はほとんどなく、またそれ以外の二塩基酸エステル系可塑剤の汚染もあるので、すべての GC 試料は、メタノリシス完了後 TLC に供する方がより安全だと思われる。つぎに TLC で使用するプレートのクリーンナップを検討した。これは TLC 吸着剤自体に ppm オーダーのフタル酸エステルが含まれ、その上作製したプレートの保存中にもそれらが付着する場合がみうけられたからである。結果を Fig.-4 に示す。

1. Dimethyl phthalate; 2. Butyl glycolylbutyl phthalate; 3. Dibutyl phthalate; Plate, Wakogel B-5F (0.3mm); Detection, UV 254nm; Developing solvent, ether.

Fig.-4 Cleanup of thin-layer plate.

比較的 R_f の低い DMP, BGBP 及び DBP を選んで、プレートに斜めに着点し、エーテルで展開するとほぼ先端まで移動した。従ってエーテルの展開でクリーンナップしたプレートの R_f 0.8 前後までを利用する TLC を行えば、TLC プレートからの汚染が避けられる。なおクリーンナップは TLC 使用直前に、エーテルの蒸発なしに試料を着点して、ただちに展開する。この場合クリーンナップで使用したエーテルがプレートに残存するため、試料の TLC に用いる展開溶媒ではエ

エーテルの混合比を幾分低めに設定する。また極微量の試料に本法を適用するには、この TLC プレートのクリーンナップでは不充分であった。すなわち、クリーンナップで展開槽のエーテルに浸したシリカゲル部より、フタル酸エステルが溶出して展開溶媒は汚染される。この場合、プレートの下端約 2 cm の部分に、エーテルを繰り返し帯状に滴下してフタル酸エステルを溶出後、上記クリーンナップを行えばよい。このプレートクリーンナップに、エーテルによる下降展開法の利用が考えられるが、今回検討はしなかった。

3・3 フタル酸エステルのメタノリシス

Table-1 には、DBP と DOP のメタノリシスにおけるタイムコースを示す。

Table-1 Time-course of transformation of dibutyl phthalate (DBP) and bis(2-ethylhexyl) phthalate (DOP) by methanolysis with 0.5 % (wt/vol)-CH₃ONa reagent.

Reaction temp.(°C)	Reaction time(min)	Relative peak area to I.S. ^{a)}			
		Phthalates			
		DBP	DOP	BMP ^{b)}	OMP ^{c)}
60	0	100.0	100.0	—	—
	10	3.7	20.5	14.9	34.7
	20	0.4	10.0	2.1	25.6
	30	Tr.	1.8	0	10.4
80	10	0.6	6.8	2.2	28.7
	20	0	Tr.	0	8.3
	30	0	0	0	0.8

a): The peak area of methyl oleate as an internal standard (I.S.) was expressed as 100.0 on GC using Diasolid ZT column.

b): Butyl methyl phthalate derived from DBP.

c): 2-Ethylhexyl methyl phthalate derived from DOP.

DBP と DOP の量、及びそれらの不完全なメタノリシスで生じるフタル酸ブチル=メチル (BMP) とフタル酸 2-エチルヘキシル=メチル (OMP) の生成量は、内部標準として加えた 18 : 1 メチルの GC ピーク面積を 100.0 とする相対面積で表示した。フタル酸のジエステルの両方が、あるいは一方だけでもメタノリシスを受ければ、現在可塑剤として使用されているほとんどすべてのフタル酸エステルが、本法により FAME から除去される。そのメタノリシス条件は短時間で完了し、かつ FAME に損傷を与えないことが望まれる。Pascaud⁹⁾ は塩酸-メタノールによる 2 h のメタノリシスを DBP に適用したところ、DBP は 63% 残存し、BMP と DMP はそれぞれ 33%, 3% 生成したとしている。本法では比較的低温度でかつ短時間にメタノリシスが完了するナトリウムメトキシドを試薬として採用した。反応温度 60°C では DBP, DOP とともに一部残存するが、80°C、

30 min の条件でまったく消失した。よってこれを本法の標準メタノリシス条件として決定した。DBP と DOP は代表的な可塑剤でその生産量が多く、汚染の機会も増すものと思われる。従ってこれらを選んでそのメタノリシスにおけるタイムコースを示したが、本条件が他のフタル酸エステルにも適するか検討した。結果を **Table-2** に示す。

Table-2 Disappearance of various phthalates by methanolysis with 0.5% (wt/vol)-CH₃ONa reagent at 80°C for 30 min.

Phthalates	I.S. (fatty acid methyl esters)	Relative peak area to I.S. ^{a)}	
		Original phthalate	Heterogeneous phthalate ^{b)}
DEP ^{c)}	18 : 1	0	0
DPP	18 : 1	0	0
DBP	18 : 1	0	0
DHP	18 : 1	0	0
DOP	18 : 1	0	0.8
DnOP	16 : 0	0	Tr.
DiDP	16 : 0	0	Tr.
DTDP	26 : 0	0	7.4
BBP	16 : 0	0	0
BGBP	16 : 0	0	0

a): The peak area of an internal standard (I.S.) was expressed as 100.0 on GC using Diasolid ZT column. I.S. was added to each phthalate by a weight ratio of 1 : 1.

b): Heterogeneous phthalate containing one methyl group.

c): Abbreviations. DEP, diethyl phthalate; DPP, di-n-propyl phthalate; DBP, dibutyl phthalate; DHP, diheptyl phthalate; DOP, bis(2-ethylhexyl) phthalate; DnOP, dioctyl phthalate; DiDP, diisodecyl phthalate; DTDP, ditridecyl phthalate; BBP, benzyl butyl phthalate; BGBP, butyl glycolylbutyl phthalate.

アルキル鎖長 2 から 13 まで、またベンジル基やブチルグリコリル基をもつ供試フタル酸エステルすべてに適用可能であることがわかった。この条件では大部分のフタル酸エステルが DMP に変換されるわけであるが、GC で内部標準より求めた変換後の DMP ピーク面積に一部減少が認められた。メタノリシス反応後、その試薬を除くため水洗を行うが、その際一部の DMP が水層に移行することが認められた。水層と有機溶媒層間における DMP の分配を検討して **Table-3** に示す結果を得た。

メタノリシス反応後の脂質の抽出回収によく用いられるヘキサンとエーテルを選んで、内部標準を加えた DMP を溶解して、蒸留水で繰り返し水洗した。なお、使用した蒸留水は 1 回ごとに廃棄している。3 回目の水洗では、DMP はそれぞれ 30%, 15% 程度有機溶媒層

Table-3 Partition rate of dimethyl phthalate (DMP) between organic solvents and distilled water.

Organic solvents	Numbers of partition ^{a)}	Distribution of DMP (%)	
		Organic layer	Aqueous layer
Hexane	0	100.0	0.0
	2	74.9	25.1
	3	69.0	31.0
Ether	2	84.4	15.6
	3	84.2	15.8

a): 15 ml of organic solvent containing 1 mg of a mixture of DMP and methyl palmitate (peak area ratio, 1.643:1) was vigorously washed with 15 ml of distilled water for 10 s in a separatory funnel. The organic layer was washed with water in the same manner, repeatedly.

から除去された。GC 試料に混入したフタル酸エステルを完全に DMP に変換し、Table-3 に示したような水洗により DMP をすべて水層に移行させれば、本法に変わる一つの簡単な汚染物除去法として有効であると考えられた。しかし使用する有機溶媒や水の量を変えるなどその水洗方法を変更すると除去率が変動し、その再現性には問題があるようである。また本実験で用いた水洗方法では、水洗を3回以上繰り返しても除去できる DMP の量に大差は認められず実用にはいたらなかった。

3.4 フタル酸エステルのメタノリシス中間体同定

Table-1 や Table-2 に示したフタル酸のジエステ

GC operating conditions
Column, 3mm×1m glass column packed with 2% OV-101 on 100~120 mesh Chromosorb W HP; Column temp., 120~(16°C/min)~260°C;
Other conditions were the same as in Fig-1.

Fig-5 Gas and thin-layer chromatograms of the products from partial methanolysis of diisodecyl phthalate using 0.5%(wt/vol)-CH₃ONa reagent at 60°C for 5 min.

ルの一方がメチル基に変換されたメタノリシス中間体の同定は GC と GC-MS によったが、DiDP の例を Fig-5 に示す。

約 30 mg の DiDP に 0.5%(wt/vol) ナトリウムメトキシド 5 ml を加え、60°C, 5 min のメタノリシスを行った。つづいて反応物の 9/10 容を TLC に供し、ヘキサン-エーテル-酢酸 (80:20:1, vol/vol/vol) で展開すると (a)~(c) の3画分に分離された。TLC における (a) 画分の R_f は標品 DMP と、また (c) 画分のそれは標品 DiDP と一致している。おのおのをかき取り、エーテルで抽出回収後 GC に注入した。また反応物の残量を GC に注入し、溶出ピーク [(1)~(4)] のすべてが、さきの3画分のピークと一致することを確認した。つぎにこれらを 2% OV-101 を接続した GC-MS に導入し、その質量スペクトルを得た。Fig-5 の TLC に示す (a) 画分は GC 及び GC-MS 上で2ピークとなり、溶出時間 (t_R) の早いピーク (1) の質量スペクトルを Fig-6 に、それより遅れるピーク (2) のそれを Fig-7 に示す。

Following operating conditions were used.
Instrument, Hitachi M-60; Ionizing voltage, 20eV (EI), 100eV (CI); Emission current, 100 μ A; Accelerating voltage, 3 kV;
Ion source temp., 180°C; Reactant gas for CI, isobutane.

Fig-6 EI(top) and CI(bottom) mass spectra of a mixture of isodecyl alcohol and other decyl alcohol isomers (M.W. 158).

Fig-6 の EI では m/z 140 (M-18), m/z 112 (M-46) がみられ、CI では m/z 157 [QM⁺ (M-1)], m/z 141 (M-17) が認められ典型的な長鎖アルコールのフラグメンテーション¹¹⁾を示す。また (a) 画分をトリメチルシリル化すると、このピーク (1) のみ t_R が遅れ、その EI で m/z 230 (M⁺), m/z 215 (M-15) が観察された。よってこのピーク (1) の主成分はイソデシルアルコール^{注1)}と同定した。

Fig-7 の EI では m/z 194 (M⁺), m/z 163 (M-OCH₃), その CI で QM⁺ が m/z 195 (M+1) となり標品 DMP

注 1) フタル酸イソデシルより生成したアルコールであるのでこのように表示した。デシルアルコールの各種異性体が混在している。

Operating conditions were the same as in Fig.-6.

Fig.-7 EI(top) and CI(bottom) mass spectra of dimethyl phthalate(M.W. 194).

の質量スペクトルと、また Friocourt ら¹¹⁾の結果とも完全に一致した。また標品 DMP と GC の t_R が等しく、このピーク (2) を DMP と同定した。Fig.-5 の TLC に示す (c) 画分〔ピーク (4)〕は標品 DiDP と同じ t_R とピーク形状を示した。その質量スペクトルを Fig.-8 に示すが、標品のそれとまったく同一で容易に DiDP であることが同定された。

Operating conditions were the same as in Fig.-6.

Fig.-8 EI(top) and CI(bottom) mass spectra of diisodecyl phthalate(M.W. 446).

ピーク (4) は GC 上で単一ピークとならず、 m/z 149 と m/z 447 の CI によるマスキロマトグラフィーを行うと、この混合ピークのすべてにこれら 2 種のイオンが存在した。標品の名称は DiDP で、イソデシルアルコールが構成成分となるはずであるが、**Fig. -6** の結果からもデシルアルコールの各種異性体で構成されていることがわかる。同様に DHP, DTDP も各種分枝鎖アルコールで構成される異性体の混合物であった。しかし本報告では可塑剤の慣用語としてこのような名称を用いた。**Fig. -5** の TLC に示す (b) 画分〔ピーク (3)〕の質量スペクトルを **Fig. -9** に示す。

EI ではフタル酸エステルを示す m/z 149, $M-OC_{10}$
 H_{21} を示す m/z 163 $\left(\text{C} \begin{smallmatrix} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OCH}_3 \end{smallmatrix} \right)$, $M-C_{10}H_{19}$ を示

Operating conditions were the same as in Fig.-6.

Fig.-9 EI(top) and CI(bottom) mass spectra of isodecyl methyl phthalate(M.W. 320).

す m/z 181 $\left(\text{C}_6\text{H}_4\left(\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_3\right) \text{C}(=\text{O})\text{OH}^+ \right)$, デシル基を示す m/z 140 がみられ, これはフタル酸のジエステルの一方がメチル基で他方がデシル基であることを強く示唆する。また CI では m/z 321[QM⁺(M+1)] が明らかに観察された。この (b) 画分を本法の標準条件でメタノリシスに供すると (a) 画分と同じ GC ピーク〔ピーク (1) と (2)〕を示し, その GC-MS でイソデシルアルコールと DMP が確認された。従って (b) 画分を目的とする iDMP と同定した。このようにフタル酸エステル標品を不完全なメタノリシスに供し, その反応生成物を TLC 分画後同定した。同定された目的とするメタノリシス中間体は, GC と GC-MS の標品として使用した。なおメタノリシス, TLC 及び GC の各条件は各標品ごとに変更し

Column temp., 220~(3°C/min)~250°C; Other operating conditions were the same as in Fig.-1.

Fig.-10 Gas chromatogram of a mixture of fatty acid methyl esters from Chinese rapeseed oil, dimethyl phthalate (DMP), dibutyl phthalate (DBP), and bis(2-ethylhexyl) phthalate (DOP).

Table-4 Influence of the method for removal of contaminants on the composition of major fatty acids from Chinese rapeseed oil.

Samples	Fatty acids (wt%)						
	16 : 0	18 : 0	18 : 1	18 : 2	18 : 3	20 : 1	22 : 1
Original methyl esters	2.6	1.0	15.5	12.2	7.8	9.1	51.8
Final methyl esters ^{a)}	2.8	1.0	15.8	12.0	7.3	9.3	51.8

a) : Purified by TLC after methanolysis of the original methyl esters to which a mixture of phthalates was added as shown in **Fig.-10**.

た。

3・5 汚染試料への適用

以上述べた本法を実際の GC 試料に適用した。DMP, DBP, DOP を混合し、その重量比が 17.2, 41.1, 41.7 % となるように調製したフタル酸エステル混合物を、中国産なたね油 FAME に約 30 % の重量割合で添加した。そのガスクロマトグラムを **Fig.-10** に示す。

この GC 条件では、DMP は 17 : 0 メチル、DBP は 20 : 3 メチル、DOP は 26 : 1 メチルとほぼ同一の t_R を示した。つぎに本法標準条件のメタノリシスに供すると、DBP と DOP のピークは消失し、DMP のピーク面積は増大した。また DOP より生じた少量の OMP が 22 : 0 メチルと一部重なり、溶媒ピークのすぐ後に、2-エチルヘキシルアルコールが溶出した。TLC に供し精製した FAME のガスクロマトグラムでは、フタル酸エステル及びその派生物のピークはまったく消失していた。これらはすべて 5% SP-2300 のカラムを接続した GC-MS で確認している。

本法によって試料 FAME の組成変化がみられるかどうか検討した結果を **Table-4** に示す。

フタル酸エステル類を添加する前の主要 FAME 組成と、それらを添加し本法を適用後の主要 FAME 組成をみると、ジエン酸とトリエン酸にわずかの差がみられるが、半値幅法を利用した面積測定の見誤差内で両者は一致した。また 26 : 0 メチルを内部標準として本法適用 FAME の回収率を求めると 98 % 前後となった。

以上述べたように、GC 試料がたとえどのような型の

フタル酸エステルの混入で汚染されても、簡単なメタノリシス法と TLC の組み合わせによる本法を適用すれば、試料 FAME の組成をそこなうことなしに、またその損失もほとんどなしに汚染物が除去され、その試料の再度 GC 分析が可能となることがわかった。

GC-MS 操作法を丁寧に御指導くださいました本学薬学部福井巳芳教授に深く感謝します。また中国産なたね油を恵くださいました日本油料検定協会総合分析センター 所長中山孝夫氏ならびに同センター山本公平氏に厚くお礼申し上げます。本報告の一部は、日本農芸化学会中部支部・関西支部合同大会 (1981 年, 岐阜) で発表した。

(昭和 57 年 3 月 25 日受理)

文 献

- 1) R.G. Ackman, "Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids," ed. R.T. Holman, Pergamon Press, Oxford (1972), Vol. 12, p. 165
- 2) F.T. Lindgren, A.V. Nichols, N.K. Freeman, R.D. Wills, *J. Lipid Res.*, **3**, 390 (1962)
- 3) J. Lam, *Chem. Ind. (London)*, **1967**, 1837
- 4) M. Ishida, K. Suyama, S. Adachi, *J. Chromatogr.*, **189**, 421 (1980)
- 5) P.V. Johnston, B.I. Roots, *J. Lipid Res.*, **5**, 477 (1964)
- 6) J. Mai, J.E. Kinsella, J.S. Chou, *Lipids*, **15**, 968 (1980)
- 7) C.S. Giam, H.S. Chan, G.S. Neff, *Anal. Chem.*, **47**, 2319 (1975)
- 8) P.J. Bloom, *J. Chromatogr.*, **72**, 35 (1972)
- 9) M. Pascaud, *Anal. Biochem.*, **18**, 570 (1967)
- 10) 鈴木真言, 立松 晃, 化学の領域, **27**, 863 (1973)
- 11) M.P. Friocourt, D. Picart, H.H. Floch, *Biomed. Mass Spectrom.*, **7**, 193 (1980)