ノ ー ト

高度不飽和脂肪酸分画魚油の GC 分析における IPA, DHA 含量測定法の標準化 (第 1 報) DEGS 液相濃度と面積百分率について

日比野英彦*・牧野孝夫**・前野達***・小沢昭夫****

* 日本油脂株式会社 筑波研究所 (茨城県筑波郡豊里町東光台 5-10)

** タマ生化学株式会社 伊勢原工場 品質管理課 (神奈川県伊勢原市神戸 450)

*** 株式会社カネショク 川崎事業所 品質管理課 (神奈川県川崎市中原区中丸子 1261)

**** 日本水産株式会社 中央研究所 分析室 (東京都八王子市北野町 559-6)

Studies on the Standardization of a GC Method for Content Determination of IPA, DHA in PUFA-Fractionated Fish Oil. I.

The relation between area percentage and DEGS concentration

Hidehiko HIBINO*, Takao MAKINO**, Touru MAENO***, and Akio OZAWA****

* Tsukuba Research Laboratory, Nippon Oil & Fats Co., Ltd.

(5-10, Tokodai, Toyosato-machi, Tsukuba-gun, Ibaraki)

** Isehara Factory, Tama Biochemical Co., Ltd.

(450, Gohdo, Isehara-city, Kanagawa)

*** Kawasaki Factory, Kaneshoku Ltd.

(1261, Nakamaruko, Nakahara-ku, Kawasaki-city, Kanagawa)

**** Central Research Laboratory, Nippon Suisan Kaisha

(1134-1, Kitano-cho, Hachioji-city, Tokyo)

For standardization of a quantitative analysis method of IPA (Icosapentaenoic acid) and DHA (Docosahexaenoic acid) in fish oil containing concentrated polyunsaturated fatty acid, the methyl esters of IPA at a content of about 25% and 18% were analyzed by the gaschromatography method of DEGS (Diethylene Glycol Succinate) packed column.

The experimental data were treated statistically to examine inter- and intralaboratory scattering. The inter- and intralaboratory CV (Coefficient of Variation) of DHA mean values appreciably increased more than those of the IPA mean values obtained at each laboratory. The CV of IPA mean values at 10% DEGS were less than 2.0% in either sample.

1 緒 言

Dyerberg¹⁾ によるグリーンランドエスキモーの疫学的調査から端を発したイコサペンタエン酸 (IPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) は、 ω -3 系脂肪酸として、アラキドン酸カスケードのプロスタグランジン等と同様、今後医薬方面での研究が期待されており、抗血栓、抗動脈硬化等の成人病に対する健康食品として国民の保健向上に役立つものと思われる。

魚油から IPA, DHA を分画製造している IPA バルクメーカーは、健康補助食品として発展期にあるこれらの製品の需要が高まる中で、より健全な製品の育成を図るため『EPA 技術懇話会』を設立し、品質の安定、容

量の規格化などのために、下部に分析分科会を設けて分析法の確立及びその統一をめざして検討を開始した。

現在、GC 法による脂肪酸メチルの定量に関しては、基準油脂分析法²⁾に定められているが、魚油は適用範囲外となっている。分画魚油では、その構成脂肪酸が多数であり、それらの主要高度不飽和脂肪酸 (オクタデカテトラエン酸, IPA, DHA など) の標準品の入手の困難さや酸化安定性からスタンダードモデルを調整しづらい点を考え「面積百分率法」による測定法から合同実験を始めた。DEGS 充てんカラムを用いた GC の面積百分率法における、分画魚油中の IPA, DHA 測定値について、機関内及び機関間のばらつきの程度を検討した結果について以下に報告する。

2 実 験

2.1 分析機関

日本油脂株式会社筑波研究所, タマ生化学株式会社伊勢原工場, 株式会社カネショク川崎事業所, 日本水産株式会社中央研究所。

2.2 装置と試料油

測定に使用した GC は, Shimadzu GC-5 A, -6 A, -7 A で, インテグレーターは, Chromatopac C-R1 A, C-R1 B (いずれも島津製作所製) であった。試料油は次の二品を用いた。R.P. Scherer 社製 (USA) の商品名 MaxEPA は IPA 18%, DHA 12% という内容表示のある試料である。混合試料はバルクメーカー各社が市販している製品を等量混合し, これを等量分画して調整した。試料油の性状は Table-1 に示した。

2.3 GC 用カラム

カラムは, 島津 GC 用の内径 3mm, 長さ 2.0m のガラスカラムをジュアルで使用した。充てん剤は信和化工製で担体は Chromosorb W-AW-DMCS 60~80 mesh 液相はジエチレングリコールサクシネート (DEGS) を 10% コーティングしたものと 20% コーティングしたものを使用した。充てん剤を常法でカラムに充てん後, エージング条件は, 室温で 30min キャリヤーガス流量 50~60 ml/min を流して, 210°C まで 2°C/min で昇温し, 210°C で 20h コンディショニングした。

2.4 GC の分析条件

2.4.1 カラム条件: 10% DEGS カラムと 20% DEGS カラムにおける測定温度は 200°C に設定し, いずれのカラムにおいても DHA の保持時間が 35 から 40 min になるようにキャリヤーガス (窒素) 流量を調整し

Table-1 The characteristics data of polyunsaturated fatty acid fractionated fish oil used.

Characteristics	Max EPA	Mixed sample
Peroxide value (meq/kg)	9.4	0.9
Acid value	2.3	0.07
Iodine value	189.9	222.5
Saponification value	188.6	189.1

Table-3 Parameter of the integrater.

Parameter	Set condition
Width	5 s
Slope	40 V/min
Min area	10 V/min
Lock time	Establish to count in methy dodecanoate
Drift	Automatic operation
Time-DBL	Automatic operation

た。

2.4.2 検出器: FID の感度は, Range×Attenuation が $10^2 \times 8 \sim 64$ で測定し, インテグレーター 端子は GC 本体に接続した。

2.5 脂肪酸メチルエステルの調製方法

試料の調製は 基準油脂分析試験法の三フッ化ホウ素-メタノール法³⁾に準拠した。試料油は N/2 水酸化ナトリウム-メタノール溶液でけん化後, 直ちに三フッ化ホウ素-メタノール試薬を添加する方法で行った。

2.6 GC の実験条件

各機関における GC 条件は Table-2 に示し, インテグレーターのパラメーター設定値は Table-3 に示した条件に統一した。

3 結 果

3.1 GC クロマトグラム

混合試料の脂肪酸メチルエステルを 10% DEGS 充てんカラムで測定したクロマトグラムを Fig.-1 に示した。Fig.-1 のクロマトグラムにおける IPA, DHA のピークについては, 著者らの報告⁴⁾から, これらのピークは重複のない単一ピークと判断した。20% DEGS 充てんカラムにおける測定結果も相似のクロマトグラムであった。

3.2 分析回数

各機関において, 2種類の試料について 10% DEGS 充てんカラムと 20% DEGS 充てんカラムで各3回測定した。3回の測定は, 連続的に行わず測定間の間隔をなるべくあけて行った。試料は測定ごとに脂肪酸メチルエステルを調整し, 残余の試料油は窒素バブリングを充

Table-2 GC conditions of each laboratory.

Lab.	Instrument	Detector				Injec. temp. (°C)	Carrier gas (N ₂) flow rate (ml/min)		Sample	
		Temp. (°C)	H ₂ Flow rate (ml/min)	Air Flow rate (ml/min)	Sensitivity Rang × Atte.				Concn. (%)	Injuction volume (<i>μ</i> l)
							10%-DEGS	20%-DEGS		
A	S*GC-6 A	250	40	1.0**	10 ² × 8	250	25	75	10	0.2
B	S*GC-7 A	250	50	600	10 ² × 64	250	33.3	87.6	10	1.5
C	S*GC-7 A	250	0.6**	0.6**	10 × 8	250	38	80	10	0.3
D	S*GC-7 A	250	50	1.0**	10 × 16	250	30	60	10	0.5

S*: Shimadzu ** : kg/cm²

Column: 2m × 3mm, 10% DEGS, Chromosorb W AW DMCS60-80 mesh
 Temperature: Column 200°C, Injector 250°C, Detector 250°C
 Detector: FID Sample: Mixed sample (Ca. IPA 25% area)

Fig.-1 Gaschromatogram of polyunsaturated fatty acid fractionated fish oil fatty acid methyl esters (mixed sample)

分に行い、窒素シールした褐色瓶に入れ、冷凍庫保存した。各機関の測定値についての最小値、最大値、平均値を **Table-4** に示した。

全機関の測定値に関する平均値、標準偏差、変動係数について **Table-5** に示した。

Table-4, -5 から次の事項がわかった。

- 1) DHA は IPA に比べ試料の組成や充てん剤の DEGS 濃度に関しても測定値の変動係数が大きかった。

Table-5 Mean value* of all measured value*.

Column	Sample	Fatty acid	Mean value	S.D.	C.V.
10%- DEGS	Max	IPA	18.3	0.6	3.1
	EPA	DHA	11.7	0.8	6.6
	Mixed sample	IPA	25.2	0.4	1.7
		DHA	13.3	0.6	4.2
20%- DEGS	Max	IPA	17.9	0.8	4.5
	EPA	DHA	12.0	1.5	12.5
	Mixed sample	IPA	24.5	0.5	2.2
		DHA	13.1	0.6	4.6

S.D. : Standard deviation C.V. : Coefficient of variation
 * % area

Table-4 Measured value* and mean value* of each laboratory.

Column	Sample	Lab.	Measured value				Mean value	
			Min. value		Max. value		Mean value ± S.D. (C.V.)	
			IPA	DHA	IPA	DHA	IPA	DHA
10%- DEGS	Max EPA	A	18.5	12.0	19.4	13.1	19.0±0.3 (1.5)	12.5±0.4 (3.0)
		B	17.5	11.3	17.7	11.6	17.6±0.1 (0.7)	11.5±0.2 (1.5)
		C	18.0	10.2	18.3	11.5	18.1±0.1 (0.6)	11.1±0.4 (3.9)
		D	17.8	10.8	17.9	11.2	17.9±0.1 (0.3)	11.0±0.2 (1.8)
		I.S.					18.2±0.6 (3.3)	11.5±0.68 (5.91)
	Mixed sample	A	24.9	12.7	26.1	14.5	25.5±0.5 (2.0)	13.7±0.7 (4.7)
		B	24.4	12.7	24.6	12.9	24.5±0.1 (0.4)	12.8±0.1 (0.8)
		C	24.8	12.7	25.5	13.3	25.2±0.2 (0.9)	13.1±0.2 (1.6)
		D	25.0	12.8	25.1	13.0	25.1±0.1 (0.2)	12.9±0.1 (0.9)
		I.S.					25.1±0.42 (1.67)	13.1±0.40 (3.05)
20%- DEGS	Max EPA	A	17.9	12.0	19.6	16.2	18.7±0.6 (3.2)	13.5±1.6 (12.0)
		B	16.4	10.1	16.8	11.1	16.5±0.2 (1.4)	10.7±0.6 (5.1)
		C	17.4	10.5	17.9	12.1	17.7±0.2 (1.1)	11.4±0.5 (4.5)
		D	17.3	10.9	17.5	11.2	17.4±0.1 (0.1)	11.1±0.2 (1.5)
		I.S.					17.6±0.91 (5.17)	11.7±1.25 (10.68)
	Mixed sample	A	24.1	13.3	24.6	14.5	24.5±0.2 (0.9)	13.6±0.6 (4.2)
		B	23.1	11.8	23.4	12.5	23.3±0.2 (0.6)	12.2±0.4 (3.1)
		C	24.5	12.6	25.1	13.5	24.9±0.2 (0.8)	13.1±0.3 (2.2)
		D	24.4	12.6	24.6	12.8	24.5±0.1 (0.4)	12.7±0.1 (0.9)
		I.S.					24.3±0.69 (2.84)	12.9±0.59 (4.57)

S.D. : Standard deviation
 * % area

C.V. : Coefficient of variation
 I.S. : International scattering

- 2) DHA, IPA の面積百分率値は機関内の標準偏差が小さいが、機関間の平均値のばらつきが大きかった。
- 3) 充てん剤の DEGS 濃度が増えると
 - ① IPA の測定値は有意に減少した。DHA に関しては不明である。
 - ② IPA の測定誤差範囲が広がる。DHA に関しては不明である。
 - ③ IPA, DHA いずれも変動係数が大きくなる。すなわちばらつきの程度が増した。

4 考察と総括

合同実験の結果から分析条件をある程度統一しても、各機関間の測定値に差があり、また充てん剤濃度によっても測定値、及びそのばらつきに差があることが判明した。測定値に関するばらつきの程度も把握できた。IPA 製品の脂肪酸組成の測定に際しては各機関では GC 用充てんカラムの液相に 10% DEGS に統一することが

望ましいと思われる。

今後、IPA 製品中の IPA 絶対値濃度を定量するため、DEGS 以外の液相やよりコーティング量の低いカラムや、さらに試料に一定重量の内部標準物質を加えて脂肪酸メチルエステルを調製する方法などを EPA 技術懇話会の分析分科会に所属する各機関において合同実験をする予定である。

著者らは、このような合同実験を重ねて IPA, DHA 含量の GC 分析における高度不飽和脂肪酸分画魚油の測定法を標準化することを目的としている。

(昭和 60 年 1 月 25 日受理)

文 献

- 1) J. Dyerberg, H.O. Bang, N. Hjørne, *Am. J. Clin. Nutr.*, **28**, 958 (1975)
- 2) 日本油化学協会編, “基準油脂分析試験法” 2.4.21.2-73
- 3) 日本油化学協会編, “基準油脂分析試験法” 2.4.20.2-77
- 4) 日比野英彦, 福田信雄, 工藤喜代志, 油化学, **34**, 111 (1985)