油脂, 脂肪酸, そのエステルおよび不ケン化物

のガスクロマトグラフィー

浅 原 照 三*・山下 健 二 郎*

Teruzō ASAHARA and Kenjiro YAMASHITA

1. ま え が き

最近, 揮発性有機物のガスクロマトグラフィーが盛んに行なわれるようになった。油脂, 脂肪酸, そのエステルおよび不ケン化物などについてもガスクロマトグラフィーはすぐれた分析手段の一つとなってきた。

ガスクロマトグラフィーは原理的にいって, 置換ガスクロマトグラフィーと溶出ガスクロマトグラフィーに大きく分けられる。置換ガスクロマトグラフィーを用いた例としては, 吸着剤として活性炭, 置換体として酢酸エチル, キャリヤーガスに窒素を用いて脂肪酸エステルを分離した例²⁾の少数例がみられるのみで溶出ガスクロマトグラフィーに比べて, その適用例はきわめて少ない。これは同じカラムを用いて繰り返して連続的に分析できる点などで溶出ガスクロマトグラフィーの方がより便利であるためと思われる。油脂, 脂肪酸, そのエステルおよび不ケン化物の分析においては, 溶出ガスクロマトグラフィーのうちでも, 気-液ガスクロマトグラフィーを利用することが, ほとんど大部分を占めているので, ここでは気-液溶出ガスクロマトグラフィーについてその代表的実験例を述べることにする。なお油脂(グリセリド)そのものを直接分析することはガスクロマトグラフィーの性格上無理であるし, また不ケン化物としては高級アルコールのみが対象となりステリンなどは実際問題としては分析例がほとんどないようであるから, これらのものを除外することとした。

2. 脂 肪 酸

A. T. James³⁾らはガスクロマトグラフィーによって種々の揮発性脂肪酸の分離を行なっている。かれらはセライト 545 を塩酸処理, 水洗後 145°C で乾燥し, それにシリコーン油を固定液相として含浸させたものを充填剤としたカラムを用い, 検出器としてはアルカリ滴定セルを用いている。得られた結果を 図-1, 2, 3 に示す。

図-1 の曲線 A に示すように分離はあまりよくない。しかしカラムにステアリン酸を添加すると, 曲線 B にみられるようによい分離を示すようになる。James らはステアリン酸添加により分離がよくなる理由をつぎのよ

1. プロピオン酸, 2. 酪酸, 3. *n*-酪酸, 4. イソ吉草酸, 5. α -メチル酪酸, 6. 吉草酸

A: カラムの長さ 4 ft, 固定液相シリコーン DC 550; キャリヤーガス(窒素)の圧 30 cmHg, 流速 23 ml/min; カラムの温度 100°C。

B: カラムの長さ 4 ft, 固定液相シリコーン DC 550-ステアリン酸(10%); キャリヤーガス(窒素)の圧 46 cmHg, 流速 45 ml/min; カラムの温度 100°C。

図-1 プロピオン酸, イソ酪酸, *n*-酪酸, イソ吉草酸, *n*-吉草酸の分離曲線

カラムの長さ 4 ft, 固定液相シリコーン DC 550-ステアリン酸(10%); キャリヤーガス(窒素)の圧 47 cmHg, 流速 18.2 ml/min; カラムの温度 137°C。

1. 酢酸, 2. プロピオン, 3. *iso*-酪酸, 4. *n*-酪酸, 5. α -メチル酪酸, 6. *n*-吉草酸, 7. *r*-メチル吉草酸, 8. ヘキサ酸, 9. ヘプタン酸, 10. オクタン酸, 11. ノナン酸, 12. デカン酸, 13. ヘンデカン酸

図-2 $C_2 \sim C_{12}$ 脂肪酸のガスクロマトグラム

うに説明している。すなわち, 試料脂肪酸はシリコーンの中では二量体を作る。二量体ができると脂肪酸がシリコーン中に高濃度に存在し, 酸の蒸気圧はその濃度の平方根に比例するようになるので通常の吸着平衡と異なる。その結果蒸気圧の低い部分が蒸気圧の高い部分より速く流出してくるので, 普通のテーリングの逆にピークの前方がだらだらした上昇曲線となり後方が急傾斜のピークができる。これにステアリン酸を充分加えるとステ

* 東京大学生産技術研究所(千葉市弥生町)

Institute of Industrial Science, Tokyo University

1. 酢酸, 2. プロピオン酸, 3. イソ-酪酸, 4. *n*-酪酸, 5. α, α -ジメチルプロピオン酸, 6. イソ-吉草酸, 7. α -メチル酪酸, 8. *n*-吉草酸,
カラムの長さ 11 ft, 固定液相 シリコン DC 550-ステアリン酸 (10%); キャリヤーガス(窒素)の圧 74 cmHg, 流速 18.2 ml/min; カラムの温度 137°C.

図-3 酢酸, プロピオン酸, *n*-酪酸, イソ-酪酸・吉草酸異性体の分離曲線

A: 実験によって得られた曲線

B: Aの微分曲線

表-1 脂肪酸の保持容量
(*n*-酪酸を標準物質とし, シリコン-ステアリン酸(10wt%)のカラムを用いる)

酸	bp (°C)	カラムの温度(°C)	
		100	137
ギ 酸	107.7	0.076	—
酪 酸	118.1	0.20	0.26
プロピオン酸	141.1	0.47	0.54
イソ-酪 酸	154.4	0.77	0.81
<i>n</i> - 酪 酸	163.5	1.0	1.0
α, α -ジメチル プロピオン酸	163.8	1.15	—
イソ-吉 草 酸	176.7	1.51	1.48
α -メチル酪酸	177	1.70	—
<i>n</i> - 吉 草 酸	178	2.17	1.91
γ -メチル吉草酸	199.1	—	2.94
ヘキサン酸	205	—	3.58
ヘプタン酸	223.5	—	6.55
オクタン酸	237.5	—	12.0
ノナン酸	254	—	22.0
デカン酸	268~70	—	40.5
ヘンデカン酸	225*	—	72.8
ドデカン酸	22**	—	138.5

* 100 mmHg ** 40 mmHg

アリン酸が脂肪酸と二量体を作り, 直線的な吸着平衡となり, 対称的な曲線が生ずると考えられる。しかし低級脂肪酸には上記のような傾向を示さないで, 普通のテーリングを示すものもある。この原因としてはケイソウ土の表面吸着が考えられるので固定相液体のほか添加剤

としてリン酸を加えて改善することができる。図-2 からわかるとおり, 4 ft のカラムを用いると $C_2 \sim C_{12}$ までの *n*-脂肪酸を完全に分離でき, イソ-脂肪酸は C_6 まで分離できる。また 図-3 に示すように 11 ft カラムを用いれば吉草酸の異性体をすべて分離することができる。

保持容量について: 直鎖の脂肪酸では, 鎖長の増加につれて保持容量は確実に増加している。たとえば酪酸を例外として, カラムの温度 137°C の場合 $-\text{CH}_2$ 基 1 個の増加について約 1.9 の比率で型加している (表-1)。

また $\log V_R^0$ を炭素数に対してプロットした結果

△: *n*-脂肪酸 ○: イソ-脂肪酸
図-4 低級脂肪酸における $\log V_R^0$ (または V_R^0) と炭素数との関係 (全長 4 ft のシリコン-ステアリン酸カラム, 温度 137°C)

を 図-4 に示す。これによると イソ-脂肪酸の曲線は *n*-脂肪酸の曲線に平行している。

A. G. McInnes⁴⁾ はシリコン DC 550-ステアリン酸を固定液相として, A. T. Jamesらの用いた条件で, 試料脂肪酸調製法にいくぶん新しい工夫をして上記の実験を追試している。その結果によると自動滴定法は低級脂肪酸の検出測定のみに限るべきで, C_{10} 以上の脂肪酸では定量的な結果が得られていない。またリン酸-トリクレジルは低級脂肪酸用の固定液相として使用できると述べている。

3. 脂肪酸エステル

ガスクロマトグラフィーを行なうに当たって, 脂肪酸をあらかじめメチルエステルとしておくことは種々の利点がある。脂肪酸を試料とする場合, 分離に悪い影響を与える脂肪酸の二量化を防ぐための固定液相を発見することはなかなか困難であるが, エステル化することによってこのような特殊の固定液相を用いる必要がなくなる。また当然その沸点が低下するから都合がよい。ただしあまり低級の脂肪酸では沸点が下がり過ぎるから, その場合はむしろ脂肪酸のまま取り扱う方が便利である。

熱伝導度セルを用いて脂肪酸エステルをガスクロマトグラフィーを用いて分析したのは, F. R. Cropper⁵⁾ が最初のものである (そのカラムは添加剤を用いない通

* V_R^0 はカラムの圧力差が零のときの保持容量を表す。

常のものである)。また G. Dijkstra⁶⁾ らは窒素をキャリアガスとし、ピーク面積からは直接に(補正を行わず) $C_9 \sim C_{22}$ までの脂肪酸エステルの定量分析を行った。A.T. James⁷⁾ らは $C_1 \sim C_{18}$ の飽和酸および不飽和酸のメチルエステルの分離、同定を詳細に行なっている。この実験において検出器として gas-density (balance) meter を用い、担体にはセライト 545 を希アルコールで再処理したものをを用いた。長さ 4 ft, 直径 4 mm の直線カラムを使用し、カラムの温度と固定液相は試料によって異なったものを用いている。たとえば、

1) $C_1 \sim C_6$ 脂肪酸メチル (ギ酸 $\sim$ ヘキサ酸メチル)

(a) カラム温度($^{\circ}\text{C}$) 78.7

固定液相 流動パラフィン, D.O.P.

(b) カラム温度($^{\circ}\text{C}$) 100

固定液相 パラフィンワックス(凝固点 49°C),
D.O.P., ベンジルフェニル

2) $C_9 \sim C_{18}$ 脂肪酸メチル (ペンタン酸 $\sim$ オクタデカン酸)

(a) カラム温度($^{\circ}\text{C}$) 197

固定液相 Apiezon vacuum stopcock grease
(Shell Chemical Ltd.)

(b) カラム温度($^{\circ}\text{C}$) 205

固定液相 heavy lubricating oil から抽出して得られる芳香性物質

パラフィン系の固定液相を用いる場合には、主として溶媒和の自由エネルギー中の van der Waals 力の差によって分離が行なわれるが、芳香族系の固定液相ではなお別の力が働くと考えられる。表-2 から明らかなように

表-2 低級飽和脂肪酸メチルエステルの保持容量
(n -酪酸を標準物質とする)

メチルエステル	カラム温度 78.6 $^{\circ}\text{C}$		カラム温度 100 $^{\circ}\text{C}$			
	カラム		カラム			
	流動 パラ フィ ン	D.O.P.	パラ フィ ン	ベン ジ ル フェ ニ ル	D.O.P.	
ギ酸メチル	0.071	0.098	0.09	0.117	—	
酢酸メチル	0.177	0.216	0.228	0.261	0.124	
プロピオン酸メチル	0.445	0.485	0.495	0.53	0.256	
イソ-酪酸メチル	0.724	0.71	0.75	0.67	0.51	
n -酪酸メチル	1.0	1.0	1.0	1.0	0.706	
α , α -ジメチルプロ ピオン酸メチル	1.04	0.87	1.0	—	1.0	
α -メチル酪酸メチル	1.69	1.51	1.52	—	0.875	
イソ-吉草酸メチル	1.63	1.56	1.53	1.34	1.45	
n -吉草酸メチル	2.42	2.31	2.15	2.13	1.45	
3-メチル吉草酸メチル	4.25	3.66	3.53	—	2.12	
イソ-カブロン酸メ チル	4.5	3.96	3.60	3.03	3.24	
n -カブロン酸メチル	5.86	5.16	4.70	4.37	4.36	

表-3 飽和脂肪酸メチルエステルの保持容量 (ミリスチン酸メチルを標準物質とし、カラム温度 197 $^{\circ}\text{C}$)

メチルエステル	固 定 液 相	
	Apiezon M vacuum grease	Heavy- lubricating oil extract
n -ペンタン酸メチル (酪酸メチル)	0.0194	0.0148
n -ヘキサ酸メチル (カブロン酸メチル)	0.0311	0.240
4-メチルヘキサ酸メチル	0.0407	0.0354
6-メチルヘプタン酸メチル	0.0567	0.052
n -オクタン酸メチル (カプリル酸メチル)	0.0715	0.064
6-メチルオクタン酸メチル	0.0965	0.0861
n -ノナン酸メチル (ペラルゴン酸メチル)	0.112	0.100
8-メチルノナン酸メチル	0.144	0.133
n -デカン酸メチル (カプリン酸メチル)	0.173	0.169
8-メチルデカン酸メチル	0.235	0.229
10-メチルウンデカン酸メチル	0.354	0.344
n -ドデカン酸メチル (ラウリン酸メチル)	0.426	0.396
10-メチルドデカン酸メチル	0.567	0.55
n -テトラデカン酸メチル (ミリスチン酸メチル)	1.0	1.0
12-メチルテトラデカン酸メチル	1.35	1.37
14-メチルペンタデカン酸メチル	2.04	2.09
n -ヘキサデカン酸メチル (パルミチン酸メチル)	2.41	2.45
14-メチルヘキサデカン酸メチル	3.24	3.32
n -オクタデカン酸メチル (ステアリン酸メチル)	5.60	5.92

▲: n -脂肪酸, ●: イソ-脂肪酸, ■: anteiso-脂肪酸

図-5 $C_5 \sim C_{18}$ 脂肪酸のメチルエステルにおける保持容量の対数と炭素数との関係

パラフィン系固定液相では *n*-脂肪酸と イソ-脂肪酸のエステルはかなりよく分離される。しかし α , α -ジメチルプロピオン酸やエチルメチル酢酸のように高度に枝分れた脂肪酸のエステルは、芳香族系の固定液相を用いる方が、同じ沸点を持つ *n*-脂肪酸、イソ-脂肪酸などからさらによく分離することができる。いいかえれば D.O.P. はこれより粘稠なパラフィン系の固定液相よりカラム効率が高くなり、そのため分離の点では劣ってもシャープなクロマトグラムを得ることができる。

エチルメチル酢酸, *iso*-酪酸など側鎖を持つ脂肪酸はエステル化すると、エステル化しない場合に比べて分離は悪くなる¹⁾。このことから二つの側鎖間に働く van der Waals 相互作用の差のほかにも分離を助ける別の要因があることがわかる。揮発性脂肪酸が、固定液相に含まれているステアリン酸と会合することによって分離がよくなるのは側鎖の影響のためと考えることができる。

表-3 の保持容量の対数とエステルの炭素数との間には大体直線関係が認められる (図-5)。図-5 から明らかのように イソ-脂肪酸と *anteiso*-脂肪酸との間では少しずれが出ているが、これは 4 ft のカラムでこの程度の温度で行なった分析では当然考えられることで、このような物質の分離にはさらに長いカラムを用いる必要がある。

不飽和脂肪酸のメチルエステルを芳香族系の固定液相を用いて分離すれば、表-4 から明らかなようにその最も近縁の飽和脂肪酸に比較して目立って遅れて出てくることがわかる。しかし純粋な芳香族系の固定液相を用いると、不飽和炭化水素がよく分離することが報告されている²⁾。このことから推定すると、芳香族物質の含量の多い固定液相を用いれば不飽和脂肪酸を明瞭に同定できるはずである。そして Apiezon M grease のようなパラフィン系の固定液相を用いると、*cis*-配置を持つ不飽和脂肪酸のエステルは *trans*-配置のものより速く出てくる。また不飽和脂肪酸のエステルは対応する飽和脂肪酸のエステルより速く出る。そして不飽和度が高いほど速くなり、二重結合の位置がカルボキシル基に近づくにつれて次第に遅くなる。このようなことは炭化水素の場合とよく似ている³⁾。しかし上記のカラムでは、イソ-, *anteiso*-脂肪酸エステルを同じ炭素数を持った不飽和の *n*-脂肪酸と分離することはできない。このような脂肪酸エステルを同定したい場合には、化学的方法を併用すればよい。たとえば、対応する飽和脂肪酸に還元するとか、酸化して低揮発性のオキシ酸にするとか、さらに酸化を進めて対応するモノジカルボン酸にするとか、あるいは臭素化して一段と揮発性の低いジブロム脂肪酸にしてからガスクロマトグラフィーを行なうとよい。このようにして生成したもののエステルは、もとの脂肪酸のエステルとは違ったクロマトグラムを与える。

A 曲線 試料：オリーブ油中の脂肪酸メチルエステル 8 mg

カラム：長さ 4 ft, 固定液相 高沸点潤滑油の芳香族成分

温度：205°C

キャリアーガス：窒素入口圧 74 cmHg, 流速 96 ml/min

(1) 空気, (2)~(10) $C_6 \sim C_{15}$ の飽和, 不飽和脂肪酸のメチルエステル, (11) パルミトオレイン酸メチルまたは C_{18} 酸の飽和脂肪酸メチルエステル, (12) パルミチン酸メチル, (13) オレイン酸メチル, (14) 高度不飽和脂肪酸または分枝飽和 C_{19} 脂肪酸メチルエステル

B 曲線 試料：上記の試料を臭素化したもの, その他の条件は A と同じ

(12) パルミチン酸メチル, (13 a) 恐らく C_{18} の脂肪酸メチル, (13 b) ステアリン酸メチル

図-6 オリーブ油脂肪酸の分離曲線

図-6 にガスクロマトグラフィーを用いて天然の油脂の脂肪酸組成を求めた実験例を示す。試料メチルエステルはエステル交換法によって調製する。曲線 A においてピーク (14) はステアリン酸メチルとすれば遅すぎるので C_{19} 脂肪酸のエステルと思われる。曲線 B は臭素化したものについてのガスクロマトグラムであり、A のピーク (13) は消えて (13 a), (13 b) が現われている。13 b はステアリン酸メチル, 13 a は C_{18} の分枝脂肪酸であることが同定されているが、ステアリン酸メチルにあまりにも近すぎるため イソ-ステアリン酸メチルとは考えにくい。臭素化によって、炭素数の少ない脂肪酸のエステルのクロマトグラムはほとんど消失する。なお試料の量を大きく (9.2 mg) とし、キャリアーガスの流速を遅くすれば 図-6 のピーク (10) までに少なくとも 16 個の成分があることがわかる。これらは C_6 , C_8 , C_{11} , C_{12} の不飽和脂肪酸, C_6 , C_8 , C_9 , C_{10} の *n*-飽和脂肪酸およびコン跡量の C_8 , C_9 , C_{11} , C_{12} , C_{13} の分枝脂肪酸である。

F.R. Cropper⁴⁾ らは $C_{12} \sim C_{22}$ の *n*-脂肪酸のメチルエステルについて James らの行なった実験を追試している。かれらの用いた固定相液体は Dow Corning の高真空シリコングリースで、これを酢酸エチルで処理したもの 40 g を 60 g のセライト 545 に含浸させてカラム充填剤として用いた。このカラムはキャリアーガスの流れ抵抗がかなり大きいので入口圧 40 cmHg, 出口圧

表-4 保持時間炭素数との関係

成 分	N	ピークの現われるまでの時間 T(min)	$\log T = 2.87 + 0.1128 N$ の計算値 T(min)
ラウリン酸メチル	12	2.65	2.55
ミリスチン酸メチル	14	4.6	4.6
パルミチン酸メチル	16	8.3	8.28
ステアリン酸メチル	18	15.2	14.9
アラギドン酸メチル	20	27.0	26.9
ベヘニン酸メチル	22	48~49	48.5

2 cmHg にして操作した。食塩を30~60メッシュにし、これをグリースに漬けると約5%くらいグリースが付着する。これをカラム充填剤に用いると入口圧 4 cmHg, 出口圧 2 cmHg で 4~5 ml/min (760 mmHg に換算して) の流速が得られるので従来のものより 60°C も温度を下げることができ、したがって試料の熱分解を減少させることができた。なお固定相液体としては、シリコングリース E301 [I.C.I. Nobel Division] もすぐれているといっている。

さきに A.T. James³⁾ らが同族列の脂肪酸について $-\text{CH}_2$ 基1個の増加によって生ずる保持容量の増加について述べているが、F.R. Cropper らは脂肪酸エステルについてつぎの関係があることを認めている(表-4 参照)。

$$\log T = a + bN$$

T はピークの現われるまでの時間 (min), N は脂肪酸の炭素数, a, b は温度, 圧, 流速に関係する定数で, この表では $a=2.87$, $b=0.128$ である。

なお $\text{C}_{12} \sim \text{C}_{26}$ の n-脂肪酸のメチルエステルについては R.K. Beerthuis¹⁰⁾ の研究があり, M.A. Khan¹¹⁾ らは $\text{C}_8 \sim \text{C}_{18}$ の飽和, 不飽和脂肪酸のメチルエステルの混合物の定量分析を行なうとともに, さらに C_{34} までの n-脂肪酸のメチルエステルの分離に成功している。かれらはカラムを減圧にすることによって窒素キャリアガス中の試料の濃度を高くし, 市販の脂肪酸中に含まれている奇数炭素数の脂肪酸を検出し, マススペクトル分析によって確認している。使用した装置¹³⁾は通常のものであるが検出器は高温用(300°Cまで)に工夫してあるものを用いた。カラムは, 長さ 3~12 ft, 内径 1/4" のガラスU字管に固定相液体として Dow Corning のシリコン真空グリース, またはシリコングリース E301 (Imperial Chemical) を含浸させたカラム充填剤を詰めたものを用いた。前者は使用前 F.R. Cropper⁹⁾ らの方法によって酢酸エチルで処理しておく。実験の結果によれば, 酢酸エチル処理をした Dow Corning グリースは 260°C, シリコングリース E301 は 295°C まで使用できる。この条件で, ステアリン酸メチルを標準物質にとったときの保持容量を表-5 に示し, 図-7 に市販の

表-5 $\text{C}_{18} \sim \text{C}_{34}$ 飽和脂肪酸メチルエステルの 295°C における保持容量 (ステアリン酸メチルを標準にとる。同温度におけるステアリン酸メチルの保持容量は 69.3cc/g である)

脂肪酸の炭素数	保持容量	脂肪酸の炭素数	保持容量
18	1.00	28	8.56
20	1.63	30	13.15
22	2.48	32	21.15
24	3.63	34	30.11
26	5.63

図-7 市販脂肪酸メチルエステルの分離曲線

脂肪酸のメチルエステルを分離したクロマトグラムを示す。

同族列系では炭素数と保持容量との間に一定の関係^{3), 14)}が存在することが知られている。すなわち, $\log V_R^0 = a + bN$ (記号は前出) の関係がある。奇数炭素数の脂肪酸エステルの同定は

表-6

メチル エステル	$\log V_R^0$	
	計算値	実測値
C_7	2,300	2,305
C_9	2,556	2,567
C_{15}	3,491	2,487
C_{17}	3,800	3,792
C_{21}	3,885	3,881

log V_R^0 を N に対してプロットしたグラフから得られる保持容量を実測値と比較して行なうことができる。表-6 にこのようにして求めた保持容量をあげる。

$\text{C}_2 \sim \text{C}_{19}$ までの脂肪酸はすでに天然の油脂から得られているが¹⁵⁾, C_{21} の脂肪酸の存在はこれまでのところ確認されていない。M.A. Khan らは, 水添魚油を試料として C_{15} , C_{17} , C_{19} , C_{21} の脂肪酸のメチルエステルをガスクロマトグラフィーによって分離し, それぞれ 0.3, 0.7, 0.7, 0.8 %含まれていることを認めた。E.R. Adlard¹⁶⁾ は同じく $\text{C}_{18} \sim \text{C}_{34}$ の飽和脂肪酸のメチルエステルおよびセバシン酸第二-ブチル, セバシン酸第二-ペンチルの分離を行なっている。かれらの用いたカラムは, 長さ 96 cm, 内径 6 mm, 52~85 メッシュの Sterchamol 耐火煉瓦に

4.8 g のシリコングリース E301 を含浸させたものを充テン剤としたものである。

S.R. Lipsky¹⁷⁾, C.H. Orr¹⁸⁾ らは固定液相としてポリエステル系のものを用い、飽和、不飽和脂肪酸メチルエステルの混合物を分析してよい結果を得ている。ポリエステルは飽和脂肪酸メチルエステル中の不飽和脂肪酸成分に特に選択的に働くようである。かれらの用いた測定条件はつぎのようである。セライト 545 に 30 wt% の Reoplex 400 Plasticizer (Geigy Chemical Co., Dye-stuffs Division, Yonkers, New York) を含浸させたもの 23.1 g を外径 1/4", 長さ 12 ft の鋼管につめたものをカラムとして使用し、キャリアーガスヘリウムの流速 75 ml/min (カラム出口, 常温), カラムおよび検出器の温度 240°C, カラムによる圧降下 30 psi, 試料の量は 10 μ l である。得られた保持容量を表-7 に示す。

表-7 脂肪酸メチルエステルのリテンションポリウム

脂肪酸メチル	保持容量	脂肪酸メチル	保持容量
カプリル酸メチル	140	ステアリン酸メチル	2,000
カプリン酸メチル	245	オレイン酸メチル	2,180
ラウリン酸メチル	420	リノール酸メチル	2,520
ミリスチン酸メチル	710	リノレン酸メチル	3,040
パルミチン酸メチル	1,220	アラキドン酸メチル	3,400
パルミトオレイン酸メチル	1,340	エルシン酸メチル	(6,000)

保持容量の対数値を脂肪酸の炭素数またはその二重結合の数に対してプロットすると直線が得られ、比較的存在量の少ないアラキドン酸メチルのような脂肪酸エステルの保持容量を推定することができる。また B.M. Craig²⁹⁾ によるとステアリン酸メチルとオレイン酸メチルの分離のための固定液相としてはアジピン酸のポリエステルよりもコハク酸のポリエステルの方がすぐれており、他方アジピン酸のポリエステルはリノレン酸メチルとアラキドン酸メチルを分離するのにすぐれているという。

最近, M.J.E. Golay¹⁹⁾ は細く長いキャピラリー管の面に薄い固定相液体を被覆させたカラムを使用するという新しい考案をして、ガスクロマトグラフィーを行なった。このようなカラムを用いて脂肪酸エステルを分離した結果をみると、従来の充テンカラムを用いて得られる結果に比べて、その分離は必ずしもすぐれていない。しかしこのようなカラムを用いるときは、分離が非常に速く行なわれ、かつ装置は簡単になる。またいろいろな要因たとえば固定液相の被覆の厚さなどについてはまだよく研究されていないが、カラム充テン剤のために生ずる

キャリアーガスの圧降下を減少させることができることや、試料の量を少なくすることができるため、大きな効果が得られることが考えられる。なおカラム充テン剤によって起こるキャリアーガスの圧降下を小さくする効果は、ガス速度の変化がカラムの分離効果に及ぼす影響は小さいことから考えて、それほど好影響を与えるとは考えられない。しかし分離を迅速に行なうことができることから、少量の高沸点物質をかなり短いキャピラリーカラムで分離することもできると思われる。

キャピラリーカラムを使用するに当っては、試料の量は非常に少量であり、かつキャピラリーの内面を被覆している固定相液体の量も少量であるため、カラムから出てくる濃度の希薄な試料蒸気 (0.1 τ 程度) を検出するには非常に感度のよい検出器が必要である。J.E. Lovelock²⁰⁾ は 10^{-13} mol の感度で、数 μ l の試料に感じるイオン検出器について種々の考案を述べているが、S.R. Lipsky^{21), 22)} らはさらに改良を加えたもの²³⁾ を用いて実験を行なった。かれらの用いたアルゴン検出器は金属製のイオン化室 (または金属の細い線) を持っている。これには高電圧がかけられており、かつ α , β 粒子源によってイオン化放射を受けるようになっている。いま、キャリアーガスとしてアルゴンを用いると、アルゴン中に遊離状態に存在する第一次電子はイオン化室に加えられている高電圧によって加速され、多数のアルゴン原子を metastable な状態へ励起する。

カラムから出てくる有機物の蒸気が argon^* で満たされたイオン化室に入ってくるとイオン衝突が起こり第二次電子を放出する。この電子は陽極に集められ、イオン化電流は増加し、かつこれは蒸気の濃度と一定の関係を持っている。この電流によって metastable なアルゴン原子が発生し、蒸気分子と衝突して消失した argon^* を補給する。

この検出器は大抵の有機物の 10^{-13} mol の少量を検出できる。イオン化室の有効容積は 3~10 ml のものが普通であるが、さらに有効容積 1 ml のものを用いると、純粋なアルゴン流中のイオン化室の電流は 2×10^{-8} A であり、有機物蒸気の最少検出可能量は signal-noiseratio 2:1 に対して約 10^{-14} mol である。もし β -粒子源を使用すれば ^{90}Sr の 10 mc—noise level は 1/10 となり、感度は 10 倍高められ、測定可能量は 10^{-15} mol の範囲にまで上げられる。キャリアーガスとして超高純度のヘリウムを使用すれば、さらにより結果が得られることが考えられる。

この実験において使用されたキャピラリーカラムは、内径 0.010 inch, 長さ 100~200 ft のつぎ目なしの焼きなましステンレス鋼の細管に、固定相液体 2% を含むクロロホルム溶液 10~20 ml を 40 psi で圧入し、一度充分に満たしてから 40 psi で注意深く液を押し出し、数時間アルゴンガスを送入して溶媒を完全に蒸発させて作る。このような方法で、熱安定性の固定相液体を被覆させたカラムは 240°C で 2~3 ヶ月間使用しても、その効果は低下しなかった。Apiezon L を被覆させた 200 ft のキャピラリーカラムを用い、入口圧 20 psi, 出口流速 0.5 ml/min, 温度 240°C で操作したときの既知脂肪酸混合物の分離を示すクロマトグラムを 図-8 に示す。比較のために同じ試料を通常の充テンカラム (140~170 メッシュのセライト 545 に 20 wt% の Apiezon L を含浸させた長さ 8 ft のカラム) で熱伝導度セルを使用し、温度 196°C, ヘリウム流速 132 ml/min の条件で得られたクロマトグラムを 図-9 に示す。図-8 から明らかなように、操作温度はかなり高く、キャリアーガスの流速は、非常に遅いにもかかわらず、*cis-trans* 異性体、エライジン酸メチルとオレイン酸メチル²¹⁾は容易に分離できる。ステアリン酸メチルとオレイン酸メチルは明瞭に分離されるが、リノール酸メチルとリノレン酸メチルとは分離できない。分析可能範囲は広くなり、ステアリン酸メチルの保持時間は 図-9 では 140 min であるが 図-8 では 77.5 min である。一成分について最も高いプレート効率アラキドン酸メチルについて 200,000 で 1 ft 当たり、1,000 理論段数である (表-8)。またグルタル酸ジエチレングリコールポリエステル²⁴⁾を固定相液体に用いた 100 ft のカラムで行なった C₈~C₂₂ の脂肪酸エステルの分離は迅速かつ完全である。この場合カラムの理論プレート効率は極端に貧弱であるが (ステアリン酸メチルに対して 2800 理論段数) リノール酸メチルとリノレン酸メチルをよく分離しており、ステアリン酸メチル

図-8 脂肪酸混合物をキャピラリーカラムを用いて分析して得られたクロマトグラム

図-9 同じ試料を充テンカラムを用いて分析して得られたクロマトグラム

表-8 脂肪酸メチルエステル既知混合物の分析結果

メチルエステル	成分 %	保持時間 (min)	S _f	理論プレート段数計算値
オクタン酸メチル	4.1	2.8	0.04	21,400
ノナン酸メチル	6.8	4.4	0.07	25,400
デカン酸メチル	3.5	6.4	0.10	30,600
ウンデカン酸メチル	1.2	9.6	0.15	40,000
ラウリン酸メチル	9.0	14.1	0.21	55,400
トリデカン酸メチル	2.9	20.6	0.31	60,200
ミリスチン酸メチル	10.7	30.6	0.47	64,100
ペンタデカン酸メチル	0.2	44.4	0.68	80,800
パルミトオレイン酸メチル	1.4	58.6	0.89	101,800
パルミチン酸メチル	14.2	65.6	1.00	36,800
マーガリン酸メチル	4.4	95.1	1.45	94,500
リノレン酸メチル	7.5	118	1.80	—
リノール酸メチル	3.7	—	—	—
オレイン酸メチル	14.9	124	1.89	31,800
エライジン酸メチル	2.2	125	1.91	76,500
ステアリン酸メチル	8.4	139	2.12	59,200
アラキドン酸メチル	1.7	204	3.11	200,000
アラキジン酸メチル	3.2	296	4.52	128,000

カラム：長さ 200 ft, 内径 0.010 inch のキャピラリーの内面に Apiezon L を被覆させたもの
 温度：240°C, キャリヤーガス (アルゴン) 圧：10 psi
 S_f：パルミチン酸メチルの分離係数を 1 とする

およびオレイン酸メチルに対する分離係数は 1.13 で優秀である²⁵⁾。

なおイオン検出器のすぐれた特長の一つは、カラムの圧と温度が相当変化しても、基線はほとんど変動せず安定であることである。もし基線に変動が現われたときは、それは固定相液体が少量流出したためと考えられる。

4. 脂肪族アルコール

ガスクロマトグラフィーを用いて脂肪族アルコールを分離した例としては、G. Dijkstra⁹⁾, J.G. Keppler²⁶⁾の実験があるが、これらの場合はその分離は必ずしもよいとはいえない。W.E. Link²⁷⁾らは、Carbowax 4000-モノステアリン酸を C-22 耐火煉瓦に含浸させたものをカラム充テン剤に用い、230°C 以上の温度ですぐれた分離を得ている。この場合シリコンカラムの方がさらによい結果を与えるといっている。たとえば、ベヘニルアルコールは 1.5 ft シリコンカラム (30~60 メッシュの C-22 耐火煉瓦に 31.6 wt% のシリコングリースを含浸させたもの) で操作温度 230°C, キャリヤーガス (ヘリウム) の流速 85 ml/min, 試料採取量 0.010 ml のとき、80 min で溶出してくる。このカ

ラムを用いて同一炭素数ではあるが不飽和度の違うアルコール混合物を分離したときはあまりよい結果は得られない。F.R. Cropper⁹⁾ らは *n*-脂肪族アルコール ($C_{10} \sim C_{18}$) のガスクロマトグラフィーを行なっている。かれらの用いたカラムはシリコングリースをセライト 545 に含浸させたもので、操作温度 230°C 、出口圧 2 cmHg 、流速 8 ml/min である。担体としてセライトの代りに食塩を用いてシリコングリースに漬けると、約 5% くらいのシリコングリースが付着する。これをカラム充テン剤に用いるとガス流に対する抵抗が減少するので、入口圧 4 cmHg で出口圧 2 cmHg 、キャリアーガス流速 $4 \sim 5\text{ ml/min}$ に保つことができる。その結果操作温度を約 30°C くらい下げることができ、 $195 \sim 210^{\circ}\text{C}$ で分析を行なうことができるという。

脂肪酸の場合と同様に、高級アルコールの場合にも、アルコールのままよりもその酢酸エステルを試料とした方が分離度がよくなる。W.E. Link²⁸⁾ らはポリエステル系の固定液相を用いて、飽和、不飽和脂肪族アルコールの酢酸エステルのガスクロマトグラフィーを行なってよい結果を得ている。すなわち、カラムと検出器の温度 228°C 、入口圧 30 psi 、出口圧 常圧、カラムの長さ 9 ft (外径 $1/4''$)、キャリアーガス (ヘリウム) の流速 42 ml/min の条件で操作するとき、固定相液体として用いたポリエステルは次第に消失してゆく傾向を示すが、たとえば Resoflex 446 (Geigy Chemical Co. 製の可塑剤) は短時間では 260°C でも安定であり、 230°C では数週間連続使用しても安定であることがわかった。 $60 \sim 80$ メッシュの担体 (Johns-Manville) Chromosorb W に $15\text{ wt } \%$ の Resoflex 446 を含浸させたカラム充テン剤 15.1 g を詰めたカラムを用いて、 $C_{10} \sim C_{18}$ *n*-脂肪族アルコールの酢酸エステル混合物およびアミナルアルコール酢酸エステルを分離して得られるクロマトグラムをそれぞれ 図-10, 11 に示す。

飽和脂肪族アルコールの酢酸エステルの保持時間は炭素数の 1 個大きい脂肪酸のメチルエステルのそれとほとんど等しい。たとえば C_{16} のアルコール酢酸エステルは

図-10 $C_{10} \sim C_{18}$ の *n*-脂肪族アルコールの酢酸エステルのクロマトグラム

図-11 アミナルアルコール酢酸エステルのクロマトグラム

C_{17} の脂肪酸のメチルエステルが現われると思われるところに出てくる。ステアリルアセテートとオレイルアセテートの分離は特にむづかしいようである。

5. そ の 他

なお高級アルコールを除いては、油脂の不ケン化物について直接ガスクロマトグラフィーを適用した例はみかけないようである。ただ応用例として、たとえば J.S.G. Cox³⁰⁾ らはステロイドの側鎖を通常の条件で分解し、その生成物をガスクロマトグラフィーによって調べている。すなわちステロイドを等重量のフェニルスルホクロリドと 400°C で 2 hr 加熱し、その生成物を蒸留し (200°C , 30 min)、得られたものを、 $40 \sim 90$ メッシュの耐火煉瓦に Apiezon L グリースを含浸させた充テン剤を詰めたカラムを用い、操作温度 100°C でガスクロマトグラフィーによって分析している。コレステリンや C_8 の側鎖を持つステリンは当然 2-メチル-ヘプタンを、他方エルゴステリンや C_9 の側鎖を持つステリンは 2,3-ジメチルヘプタンを与える。(昭和34年10月21日受理)

文 献

- 1) C.S.G. Phillips, *Disc. Faraday Soc.*, No. 7, 241 (1949)
- 2) D.H. James, C.S.G. Phillips, *J. Chem. Soc.*, **1953**, 1600
- 3) A.T. James, A.J.P. Martin, *Biochem. J.*, **52**, 679 (1952)
- 4) A.G. McInnes, "Vapour Phase Chromatography", D.H. Desty, Ed., p.304, Academic Press, New York (1957)
- 5) F.R. Cropper, A. Heywood, *Nature.*, **172**, 1101 (1953)
- 6) G. Dijkstra, J.G. Keppler, J.A. Schols, *Rec. trav. chim. Pays. Bas*, **T 74**, 805 (1955)
- 7) A.T. James, A.J.P. Martin, *Biochem. J.*, **63**, 144-52 (1956)
- 8) A.J.P. Martin, A.T. James, *Biochem. J.*, **63**, 138 (1956)
- 9) F.R. Cropper, A. Heywood, "Vapour Phase Chromatography", D.H. Desty, Ed., p. 316, Academic Press, New York (1957)

- 10) R.K. Beerthius, J.G. Keppler, *Nature, London*, **179**, 731 (1957)
- 11) M.A. Khan, B.T. Whitham, *J. Appl. Chem.*, **8**, 549 (1958)
- 12) A.J. Davis *et al.*, "Proceedings of the Symposium on Vapour-Phase Chromatography", Institute of Petroleum, London, Butterworths Scientific Publication (1956)
- 13) B.T. Whitham, 同書
- 14) A.T. James, A.J.P. Martin, *Analyst*, **77**, 915 (1952)
- 15) R.P. Hansen, F.B. Shorland, N.J. Cooke, *Nature, London*, **176**, 882 (1955)
- 16) E.R. Adlard, B.T. Whitham, "Gas Chromatography", p.351, D.H. Desty, Ed., London, Butterworths Scientific Publications (1958)
- 17) S.R. Lipsky, *Chem. Eng. News.*, **36**, No. 5, 48 (1958)
- 18) C.H. Orr, J.E. Callen, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 249 (1958)
- 19) M.J.E. Golay, "Gas Chromatography", p. 36, 56, Academic Press, New York
- 20) J.E. Lovelock, *J. Chromatog.*, **1**, 35 (1958)
- 21) S.R. Lipsky, J.E. Lovelock, R.A. Landowne, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 1010 (1959)
- 22) S.R. Lipsky, R.A. Landowne, J.E. Lovelock, *Anal. Chem.*, **31**, 852 (1959)
- 23) J.E. Lovelock, *Nature.*, **182**, 1663 (1958)
- 24) S.R. Lipsky, R.A. Landowne, *Ann. N.Y. Acad. Soc.*
- 25) S.R. Lipsky, R.A. Landowne, M.R. Godet, *Biochem. Biophys. Acta*, **31**, 336 (1959)
- 26) J.G. Keppler, *Chem. Weekblad.*, **51**, 911 (1955)
- 27) W.E. Link, H.M. Hickman, R.A. Norrisette, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **36**, 20 (1959)
- 28) W.E. Link, H.M. Hickman, R.A. Morrisette, *ibid.*, **36**, 300 (1959)
- 29) B.M. Craig, N.L. Murty, *Can. J. Chem.*, **36**, 1297 (1958)
- 30) J.S.G. Cox, L.B. High, *Proc. Chem. Soc.*, 234-5 (1958)

油脂, 脂肪酸, 不ケン化物のカラムおよび

ペーパークロマトグラフィー

野 田 万 次 郎*

Manjiro NODA

油脂およびその構成成分のクロマトグラフィーは、近年著しい発達を遂げ、各種の有力な方法が考案された結果、最近では油脂の試験、研究の面で非常に多数の本法の応用例をみるに至っている。この総説ではガスクロマトグラフィーおよびステロイドと複合脂質のクロマトグラフィーに関する記述をそれぞれ別項にゆずり、グリセリド、ロウ、脂肪酸、および不ケン化物（脂溶性ビタミン類、色素類などを除く）のクロマトグラフィーについて、よく利用されている代表的な方法や特色ある方法を中心として解説し、その応用例は特に最近の報告を主として紹介するに努めた。したがって本稿で記載できなかった多数の文献については既に発行された他の総説^{1)~8)}を御覧になっていただきたい。

脂質各群間の分離

動植物体からとり出された総脂質をシリカまたはシリカ²⁴⁾-ケイソウ土カラムによって、炭化水素、ステリンエステル、トリグリセリド、脂肪酸、ステリン、リン脂

質の順に各成分に分離溶出してゆく方法(表-1の1)は、血液^{9)~11)}、体組織^{12), 13)}、人髪¹⁴⁾などの脂質の分析に主として生化学方面で利用されているが、魚油^{15), 16)}、乳脂¹⁷⁾、酵母の油脂¹⁸⁾などの分析にも使われており、脂質各群間の基本的な相互分離法として、広く応用できるものである。シリカ固定ガラス繊維ロ紙も同様に魚油成分の分析に利用され¹⁹⁾、またステリン、ステリンエステル、グリセリド相互の分離にも同ロ紙¹⁸⁾またはシリカ-ケイソウ土カラム¹⁹⁾が使われた。さらにシリカ-ケイソウ土カラムを用いる上記類似の方法でマッコウ鯨油のグリセリドとロウが分別されている²⁰⁾。その他 Amberlite-IRA 400^{21), 22), 30)}のカラムによる中性油脂と脂肪酸の分離が行なわれ、また中性油脂量の定量たとえば絶対精製損失量²³⁾の定量や炭化水素との分離^{24), 27)}などにもカラムクロマトグラフィーが利用された。ペーパークロマトグラフィーによる重合油と未重合グリセリドとの分離²⁵⁾やタバコ葉の脂質の分別²⁶⁾、円形ペーパークロマトグラフィーによる皮脂各成分の分析³³⁾なども報告されている。

グリセリド

シリカカラム^{21), 27)~29)}、またはシリコーン処理ケイソ

* 京都府立大学農学部農芸化学教室（京都市左京区下鴨半木町）College of Agriculture, Kyoto Prefectural University