- (1) 佐々木林治郎: 本誌, **7**, 916, 984(1931).
- (2) A. T. James, A. J. P. Martin: *Biochem. J.*, **50**, 679(1952).
- (3) A. Jart: *Acta Chem. Scand.*, **13**, 1723(1959).
- (4) S. Patton, R. D. McCarthy, L. Evans, T. R. Lynn: *J. Dairy Sci.*, **43**, 1187(1960).
- (5) S. F. Herb, P. Magidman: *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **37**, (12) 29(1960).
- (6) K. S. Markley: *Fatty Acids* (1947).
- (7) 丸山正生: 新分析化学講座 I, 機器ガス分析法, p. 68(1960).
- (8) C. W. Gehrke, D. F. Goerlitz, C. O. Richardson, H. D. Johnson: *J. Dairy Sci.*, **43**, 839(1960).
- (9) H. Kurz: *Fette u. Seifen*, **44**, 144(1937).
- (10) 外山修之: 化学と工業, **2**, 119(1949).
- (11) 京大農学部農芸化学編: 農芸化学実験書, 第2巻, p. 748(1957).
- (12) 喜多源逸: 油脂化学及び試験法, p. 1688(1957).
- (13) 喜多源逸: 同上, p. 470(1957).

〔農化 第36巻, 第4号, p. 364~369, 1962〕

ガスクロマトグラフィーによる本邦産牛乳脂肪の 脂肪酸組成に関する研究 (第2報)*

ガスクロマトグラフィーによる低級脂肪酸 メチルエステルの相互分離

中江利孝, 中西武雄 (東北大学農学部)

昭和36年9月14日受理

ま え が き

乳脂肪は比較的低級の脂肪酸から高級まで, 種々の構成脂肪酸を有し, これを一定の運転条件のガスクロマトグラフィーによって, 完全に相互分離させることはかなり困難である. このために, 脂肪酸のガスクロマトグラフィーは低級脂肪酸と高級脂肪酸に分けて, 2種類の温度条件の下で試験を行なうことにした.

この研究は, 前報⁽¹⁾によって調製した混合脂肪酸メチルエステルを相互分離させるために, $C_1 \sim C_8$ 脂肪酸メチルエステルに限定して標準脂肪酸メチル混合液のガスクロマトグラフィーによる分離条件を検討したものである.

実 験 方 法

1. ガスクロマトグラフ装置 ガスクロマトグラフ分析に使用した装置は熱伝導度方式の日立製ガスクロマトグラフ KGL-1 型で, カラムは内径 4 mm, 長さ 1 m の U 字管の連結式のものである.

2. カラム充填剤 i) 固体担体: 固定相の担体には C-22, Chromosorb "P" 及び Celite 545(いずれも Johns-Manville 社製)を用いた. C-22 と Chromosorb は 50 メッシュのもの, Celite 545 は James and Martin の方法⁽²⁾によって調製したものを選んだ.

ii) 固定液相: 固定液相は脂肪酸メチルエステルの性質を考慮して, ジデシルフタレート (DDP), ジノニルフタレート (DNP), ジオクチルセバケート (DOS), ジオクチルアジペート (DOA), 高真空グリース (HVG), 変性酢酸ビニル "ゴーセラシ" (GSR) 及びエチレングリコールコハク酸エステル (EGS) を用いた. HVG は Dow Corning 製, GSR は日本合成化学製, EGS は日本ライヒホルド化工製, その他は東京化成製である.

iii) 充填剤の調製: 固体担体と固定液相の混合重量比は 10:1, 10:3, 10:4 及び 10:6 とし, 固定液相は予め 10 倍量のエーテル, アセトンまたはクロロホルムに溶かして担体と混和し, 溶媒を溜去しながら固定液相を担体に均一に吸着させる. GSR の場合はアセトン溶液とし, 丸山⁽³⁾らの方法によって担体とともにつき固めて径 0.5 mm の目の篩を通して成型する.

3. キャリヤーガス キャリヤーガスは N_2 または He を用い, ブリッジバランスの電流は N_2 のとき 125

* Studies on the Fatty Acid Constituents of Butterfat in Japan by Gas Chromatography. Part II. Separation of Methyl Esters of the Lower Fatty Acids by Gas Chromatography. By Toshitaka NAKAE and Takeo NAKANISHI (Faculty of Agriculture, Tohoku University)

mA, He のとき 160mA に調整した。

4. 標準脂肪酸メチルエステル混合液の調製 辛酸メチル(C_1), 酢酸メチル(C_2), プロピオン酸メチル(C_3)は特級品を使用し, 酪酸以上の脂肪酸メチルエステルは特級品の脂肪酸から前報⁽¹⁾の遊離脂肪酸メチルエステルの調製法に準じ, 反応時間を 5 時間にして調製した。調製脂肪酸メチルエステルは n -酪酸 ($n-C_4$), i -酪酸 ($i-C_4$), n -吉草酸 ($n-C_5$), i -吉草酸 ($i-C_5$), カプロン酸(C_6), エナント酸(C_7), カプリル酸(C_8)の各メチルエステルである。各脂肪酸メチルエステルは実際にガスクロマト分析を行なって, あらかじめ純度を検定し, 一定重量ずつ混合して, 標準脂肪酸メチルエステル混合液を調製した。

5. バター及びマーガリン脂肪のエステル化 前報⁽¹⁾に準じてバター及びマーガリンより中性脂肪をとり, そのエステル基交換処理によって, 構成脂肪酸のメチルエステル混合溶液を調製した。

6. 装置の運転条件 種々の充填剤を用いたカラム 1~5 本を装置に取付け, 恒温槽の温度 $100^{\circ}\sim 140^{\circ}$, 試料注入室の温度は恒温槽の温度と同一またはそれより 50° 高い温度範囲に調節した。キャリアーガスの流速は $20\sim 100$ ml/min, の種々の条件とし, 減衰器の感度は $1\sim 8$ ノッチ ($5\sim 40$ mV), 記録計のチャートスピードは 20 mm/min, 試料注入量は $0.01\sim 0.05$ ml とした。

7. 記録グラフの判定 チャートから保持時間(t_R)とピーク幅(ω)を求め, 相対分離度(S), 相対尖鋭度(Q), 分解度(R)及び理論段数(n)を算出し^(4,5), 種々の処理条件における分離能の優劣を判定した。

実 験 結 果

1. 分離能に及ぼすカラム充填剤の影響

i) 固体担体の種類による影響: $C-22$, Chromosorb 及び Celite 545 を HVG と $10:4$ の割合で混合した 2 m のカラムで, カラム温度 120° , 試料室温度 170° , He ガス流速 50 ml/min の条件における $C_1\sim C_8$ 混合脂肪酸メチルのガスクロマトグラフは第 1 図のとおりである。 $C-22$ と Chromosorb を分解度で比較した場合の分離能は, ほとんど同様であった。Celite 545 は $C-22$ と Chromosorb に比べて分離能が高く, DDP を固定液相にした結果でも同様であった。Celite 545-DDP のカラムでは, $C_1\sim C_8$ 間のいずれの脂肪酸メチルの分解度も 2.5 以上の値を示し, かなり良好な分離能を示すが, C_8 の保持時間が 85.8 分であるため分析時間が長すぎる欠点がある。それに反して, Celite 545-HVG では分析時間が 25 分ですむ。

第 1 図 低級脂肪酸メチルエステルの分離に及ぼす固定相担体の種類の影響

■ HVG-C-22 または Celite 545 ($10:3$), 2 m カラム, カラム温度 120° , 試料温度 170° , He 50 ml/min., Sens. 8, $C_1\sim C_8$ 試料 0.01 ml.

一般に固体担体の種類による優劣は固定液相の種類に影響されるが⁽⁶⁾, 本実験で得た結果では Celite 545 が固体担体として適しており, 以下の実験は主にこれを用いた。

第2図 低級脂肪酸メチルエステルの分離能に及ぼす固定液相の種類の影響

DDP Celite 545-DDP (10:4) カラム 2 m, He 50 ml/min, DNP Celite 545-DNP (10:4), HVG Celite 545-HVG (10:3), GSR Celite 545-GSR (10:3) カラム 4 m, EGS Celite 545-EGS (10:3) カラム 2 m, He 15 ml/min
(カラム温度 120°, 試料温度 170°)

ii) 固定液相の種類による影響 : Celite 545 を固体担体とし, 固定液相と 10:3 の割合で DDP, DNP, HVG, GSR, EGS を担持させ, GSR は 4m, その他は 2m のカラムで 120°, He ガス流速 50 ml/min で行なった $C_1 \sim C_8$ 脂肪酸メチルのガスクロマトグラフィーは第 2 図のとおりである。なお, この他に同じ条件で行なった DOS, DOA は DDP と同様なピークを示した。第 2 図から明らかなように, GSR と EGS は $C_1 \sim C_5$ 間の分離が悪く, DDP, DNP 及び HVG は良好な相互分離を示した。これらの結果を隣接するピーク間の分解度で比較すると, 第 3 図のようになる。DDP(DOS, DOA も同様) は最も分解度と理論段数が高く, HVG がこれにつぐ。しかし, 前者は C_8 までの分析時間に 1 時間以上を要するので, 迅速正確な分析の点からは HVG が適当と考えられる。ただ, C_8 までの分析には DDP が適しており, 30 分で分析可能である。

iii) 固定液相担持率の影響 : DDP と HVG が優れた分離能を有することから, この 2 種の液相の Celite 545 に対する担持率を 1:10, 3:10, 4:10, 6:10 として分離能に及ぼす影響を調べた。Celite 545-DDP で行なった担持率と担持時間の関係は第 4 図のとおりであり, 担持率が低いほど保持時間が短縮されるが, 分離能は悪くなった。分解度で比較すると, Celite 545-DDP が 10:3 または 10:4 のとき最も高い値を示し, この条件が適していると考えられる。HVG の場合も同様であり, Celite 545 に対する % で示す担持率は 15~30% が最適ということになる。

第 3 図 低級脂肪酸メチルエステルの分解度に及ぼす固定液相の種類の影響

—○— DDP —▲— GSR
—△— DNP —□— EGS
—●— HVG

第 4 図 低級脂肪酸メチルエステルの保持時間に及ぼす Celite 545 に対する DDP 担持率の影響

カラム温度 120°, 試料室温度 170°,
カラム 2m, He 50ml/min

2. 分離能に及ぼすカラムの長さの影響 一般にカラムの長さを大にすると保持時間が延長され, 分離能は高くなる⁽⁶⁾。実際に Celite 545-HVG (10:4) のカラムを 1m, 2m, 3m で比較すると, 1m カラムで不完全分離を示す $C_1 \sim C_2$, $i-C_4 \sim n-C_4$ 及び $i-C_5 \sim n-C_5$ のピークは 2m と 3m カラムで完全に分離した。しかし, カラムが長いほど分析時間が長くなり, またゲージ圧に限度があるためキャリアーガスの流速が制約される。その意味から Celite 545-HVG のカラムは 2m が適当である。

3. 分離能に及ぼすキャリアーガスの種類と流速の影響 本実験では N_2 と He をキャリアーガスに用いたが, 熱伝導度の高い He の方が, 高い感度でピークを得ることができ, かつかなり安定したピークを示した。また, He ガスの流速を 20, 40, 60, 80 ml/min として Celite 545-HVG の 2m カラムの性能を比較すると, C_8 の場合の保持時間はそれぞれ, 49, 30, 25, 21 分であり, $C_7 \sim C_8$ の分解度は流速の上昇とともに低下する傾向を示した。分析時間の迅速性を考慮に入れば, He ガスの流速は 40~60 ml/min が最適であり, DDP の場合も同様であった。

4. 分離能に及ぼす恒温槽の温度の影響 Celite 545-HVG (10:3) 2m カラム, He ガス流速 60 ml/min の条件で, 恒温槽の温度を 100°, 120°, 140°, 試料室の温度をそれぞれ 50° 高くして行った $C_1 \sim C_8$ 脂肪酸メチル

第1表 低級脂肪酸メチルエステルの分解度に及ぼす恒温槽の温度の影響

恒温槽温度 (°C)	脂 肪 酸 メ チ ル エ ス テ ル									
	C ₁	C ₂	C ₃	i-C ₄	n-C ₄	i-C ₅	n-C ₅	C ₆	C ₇	C ₈
分 解 度 { 100	2.88	3.15	2.17	1.35	2.21	1.93	5.46	5.13	4.12	
120	1.64	2.10	1.50	0.87	1.66	1.39	4.31	4.70	4.42	
度 { 140	0.78	1.26	0.86	0.32	0.75	0.69	2.14	3.27	3.73	

運転条件: Celite 545-HVG (10:3), カラム 2m, He 60 ml/min, 試料室温度=カラム温度+50°

の分解度は第1表, 恒温槽温度と各脂肪酸メチルの保持時間対数は第5図のとおりである. この結果から, 恒温槽の温度がこの試験範囲で低いほど分離能が高く, 恒温槽温度と保持時間対数の間には概ね直線関係が示された. この試験の結果からも分析の迅速性を考慮して, 120° の恒温槽温度が適当と考えられる.

5. 分離能に及ぼすその他の要因の影響 試料室の温度は恒温槽の温度より高い方が成分の分離をよくするといわれ⁽⁷⁾, 事実 Celite 545-HVG カラムで恒温槽の温度 120° に対し, 試料室温度 120°, 170°, 200° で比較した結果, 170° と 200° の尖鋭度が高かった. しかし, 200° の場合は C₁~C₄ の分解度を低下させるので, 170° の試料室温度, すなわち, 恒温槽温度より 50° 高い温度が最適と考えられる.

試料の注入量は 0.01~0.05 ml で行ったが, 同一感度の減衰器の条件では, 注入量の少ない方が分離がよく, ピークの再現性から考えても, 4 または 8 ノッチの感度で 0.01~0.02 ml が適当な注入量である.

考 察 及 び 結 論

この試験で用いた充填剤は数種に限られているが, 得られた実験結果は Celite 545-HVG の組合せが低級脂肪酸メチルの分離に, 所期の目的を果たし得ると考える.

C-22 は Celite 545 よりも扱い易く, 分離能もよいといわれているが⁽⁸⁾, 本実験の結果では Celite 545 の方が優れていた. 固定液相は C₁~C₆ の分析のためには DDP, DOS などが優れていて理論段数はすべて 1500~2000 であり, 特に水溶性の脂肪酸の分析に好適と考えられる.

以上のような成績から, Celite 545-DDP または HVG を用いた C₁~C₈ 脂肪酸メチルの炭素数 (元の脂肪酸として) と保持時間対数の関係は第6図のとおりである. すなわち, DDP, HVG いずれの場合も C₁~C₂ 間を除いて炭素数と保持時間対数の間に, 直線関係が成立し, 異性体は別個の直線関係を示す. この結果は James and Martin⁽⁹⁾ の結果と一致している. この図から脂肪酸系列の未知成分の確認が可能となり, さらに直線の勾配から, 分析時間の選択や分離能の判定があら程度可能となる.

このようにして, Celite 545-HVG の優秀性が確認されたが, そこで実際に市販バター及びマーガリン試料を用い, 前報⁽¹⁾に基づいて脂肪酸メチルを調製して, その低級脂肪酸メチルのガスクロマト分析を行った. その結果は第7図のとおりである. このクロマトグラムのピークからわかるように, 実際の試料の分析にも良好な結果を得, 定量的にも分析が可能と考えられる.

結論的にいうならば, 牛乳及び乳製品やその他の油脂食品の低級脂

第5図 恒温槽の温度と低級脂肪酸メチルエステルの保持時間対数との関係

Celite 545-HVG(10:3), カラム 2m, He 60 ml/min, 試料室温度 = 恒温槽温度 + 50°

第6図 脂肪酸炭素数と保持時間対数との関係

---△---△--- Celite 545-DDP(normal)
 ---▲---▲--- Celite 545-DDP(iso)
 ---○---○--- Celite 545-HVG(normal)
 ---●---●--- Celite 545-HVG(iso)

第 7 図 バター及びマーガリン試料の低級脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラフ
Celite 545-HVG (10:3), カラム 2m, He 50ml/min, カラム温度 120°, 試料温度 170°, 試料 0.01ml.

脂肪酸のガスクロマト分析には、まず、脂肪及び遊離脂肪酸を脂肪酸メチルエステルの混合液の形に調製し、Celite 545-HVG (10:3 または 10:4) のカラム 2m を用いてメチル化試料 0.01~0.02 ml を注入し、カラム温度 120°, 試料温度 170° の条件で、流速 40~60ml/min の He ガスをキャリアーガスとして分析を行うのが適当である。分析時間の許す限りにおいては、Celite 545-DDP (10:4) のカラム 2m を用いても良好な結果が得られる。

要 約

ギ酸からカプリル酸までの低級脂肪酸を分離確認するために、脂肪酸をメチルエステルの形にしてガスクロマト分析を行ない、その各成分ピークの分離能に及ぼすカラム充填剤の種類、固定液相の担持率、キャリアーガスの種類と流速、カラム恒温槽と試料注入室の温度などの影響を検索した。分離能の優劣は保持時間またはその対数、分解度及び理論段数によって判定した。

その結果、低級脂肪酸メチルエステルの分離には Celite 545-高真空グリース (重量比 10:3 または 10:4) を充填剤として 2m カラム (内径 4mm) を用い、脂肪酸メチル試料 0.01~0.02 ml を注入して、カラム恒温槽温度 120°, 液体試料室温度 170° の条件で、流速 40~60ml/min の He ガスの導入によって良好な結果を得た。試料注入後の全低級脂肪酸メチルの分析時間は 30 分で完了し、かつ定量分析に対する可能性を満たすのに充分な高い分離能を示した。分析時間の許す限りにおいては高真空グリースの代りにジデシルフタレートを用いても良好な結果が得られた。実際に、このような条件下でバター及びマーガリン脂肪の低級脂肪酸の分析に供したが、良好な分離確認の結果を得ることができた。

本実験に対し御教示を頂いた三共株式会社丸山正生氏に深謝し、バター試料を提供下された明治乳業株式会社、並びに、充填剤を提供下された日本合成化学工業株式会社及び日本ライヒホルド化学工業株式に御礼申し上げます。(本報告の要旨は昭和 36 年 4 月、日本農芸化学会大会において講演発表した。)

(1) 中西武雄, 中江利孝: 本誌, 36 , 361(1962).	(5) W. J. Johnes, R. Kieselbach: <i>Anal. Chem.</i> , 30 , 1591(1959).
(2) A. T. James, A. J. P. Martin: <i>Biochem. J.</i> , 50 , 679(1952).	(6) A. I. M. Keulemans: <i>Gas Chromatography</i> , p. 19(1957).
(3) 丸山正生, 妹尾節哉: 工業化学, 64 , 777 (1961).	(7) F. H. Pollard, C. J. Hardy: <i>Chem. and Ind.</i> , 1955 , 1145.
(4) 高山雄二: 新分析化学講座 I, 機器ガス分析法 (1960).	(8) 雨宮良三: ガスクロマトグラフィー (1959).