[農化 第 36 卷, 第 5 号, p. 422~426, 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 3 報)*

ガスクロマトグラフィーによる高級脂肪酸メチルエステルの相互分離

中西武雄, 中江利孝 (東北大学農学部)

昭和 36 年 9 月 14 日 受 理

前報⁽¹⁾において, 低級脂肪酸メチルエステルのガスクロマト分析を試み, 良好な結果を得たが, 本報では高級脂肪酸メチルエステルについて同様な試験を試みた. 高級脂肪酸においては, 特にステアリン酸, オレイン酸, リノール酸及びリノレン酸の分離が相当困難を伴うが, Reoplex 400 (polyoxyalkalene adipate)⁽²⁾, Apiezon L⁽³⁾, LAC-R-296⁽⁴⁾などの充填剤が利用され, わが国においても丸山ら⁽⁵⁾は変性酢酸ビニルを用いて, かなり成功を収めている.

乳脂肪の構成脂肪酸の研究はガスクロマトグラフィーの出現以来かなり研究が進んできた^(6,7). このような観点から, 高級脂肪酸メチルをガスクロマトグラフィーによって相互分離させる目的で, $C_8 \sim C_{22}$ 脂肪酸メチル混合液を分離させるガスクロマト装置の条件及び分離能に及ぼす影響要因について検索し, 低級脂肪酸とともに乳脂肪の全脂肪酸組成を分離定量する可能性を検討した.

試 験 方 法

ガスクロマトグラフ装置, 充填剤の調製, キャリアガス, バター及びマーガリン試料の調製は前報⁽¹⁾と同様である.

1. カラム充填剤

i) 固体担体: 担体は $C-22$ 及び Celite 545 を用いた.

ii) 固定液相: 固定液相はカラムの温度を考慮して, シリコン 550 G (SG), カーボワックス 4000 (CW), 高真空グリース (HVG), 変性酢酸ビニル “ゴーセラン” (GSR), エチレングリコールコハク酸エステル (EGS), セバチン酸系ポリエステル “Polycizer P-202” (PGS), アジピン酸系ポリエステル “Polycizer P-204N” (PGAM) 及び “P-103” (PGAL) を用いた. SG 及び HVG は Dow Corning 製, CW は Carbide & Carbon Chemicals 製, GSR は日本合成化学製, EGS, PGS, PGAM 及び PGAL は日本ライヒホルド化工製であり, EGS はまた Craig らの方法⁽⁸⁾によって研究室において合成したものを用いた.

2. 標準脂肪酸メチル混合液の調製 市販の脂肪酸よりカプリル酸(C_8), カプリン酸(C_{10}), ラウリン酸(C_{12}), ミリスチン酸(C_{14}), パルミチン酸(C_{16}), ステアリン酸(C_{18}), オレイン酸(C_{18}^1), リノール酸(C_{18}^2), リノレン酸(C_{18}^3), アラキジン酸(C_{20}), ペヘニン酸(C_{22})の各メチルエステルを調製し, $C_8 \sim C_{18}^1$ または $C_8 \sim C_{22}$ を等量混合して標準液とした. 各脂肪酸メチルエステルはガスクロマトグラフィーによって純度を確かめ, 等量混合時の絶対量を求めた.

3. 装置の運転条件 運転条件は前報⁽¹⁾に準じて行なったが, 恒温槽の温度は $200 \sim 300^\circ$ とし, 分析結果は保持時間またはその対数, 分解度, 理論段数などによって判定した.

試 験 結 果

1. 分離能に及ぼす充填剤の影響

i) 固体担体の種類による影響: $C-22$ と Celite 545 を HVG 及び EGS と 10:3 の割合で混合充填し, カラムの長さ 2 m, 恒温槽温度 250° (HVG) 及び 220° (EGS), He ガス流速 50 ml/min (HVG) 及び 15 ml/min (EGS) で行なった $C_8 \sim C_{18}^3$ の結果は第 1 図の通りである. $C-22$ と Celite 545 の優劣は C_{18} , C_{18}^1 , C_{18}^2 , C_{18}^3 相互の分離を比較することによって判定できる. すなわち, $C-22$ が全く $C_{18} \sim C_{18}^3$ と分離させないのに対し

* Studies on the Fatty Constituents of Butterfat in Japan by Gas Chromatography. Part III. Separation of Methyl Esters of the Higher Fatty Acids by Gas Chromatography.

By Takeo NAKANISHI and Toshitaka NAKAE (Faculty of Agriculture, Tohoku University)

第1図 高級脂肪酸メチルエステルの分離能に及ぼす

固定相担体の種類の影響

HVG: カラム温度 250°, 試料温度 300°, He 50 ml/min.

EGS: カラム温度 220°, 試料温度 270°, He 15 ml/min.

カラム 2m, 試料 0.005~0.01 ml.

この4種の脂肪メチルエステルに重点をおき, $C_8 \sim C_{18}^{3=}$ メチルエステルについて SG, CW, HVG, GSR, EGS の固定液相を用いたときの分離能を比較した。その結果は第2図のごとく良好な分離を示したのは GSR と EGS のみであった。その他の固定液相はすべて $C_{18} \sim C_{18}^{3=}$ が同一のピークとして現われ, 分析に不適当であった。GSR と EGS との比較では EGS の方が優れていた。しかし両者とも低級脂肪酸メチルエステルの分離が悪く (前報⁽¹⁾ 参照), 同一のカラムで全脂肪酸メチルエステルを完全に分離させるのは困難である。その点 HVG は $C_{18} \sim C_{18}^{3=}$ よりも保持時間の短いピークにおいて分離能が高く, したがって同一試料について HVG と EGS のカラムの使用が必要と考えられる。なお PGS, PGAM, PGAL はともに $C_{18} \sim C_{18}^{3=}$ を分離できなかった。

iii) 固定液相の担持率の影響: Celite 545 と HVG の重量比を 10:1, 10:3, 10:4, 10:6 とした場合, カラム温度 250°, He ガス流速 50 ml/min の条件で行なった高級脂肪酸メチルの分解度は, 各脂肪酸とも 10:3 または 10:4 が最も高かった。10:1 の場合は $C_8 \sim C_{18}^{3=}$ がほとんど分離せず, 分析不可能であった。Celite 545-EGS の場合も同様であったが, むしろ 10:2 または 10:3 の重量比の場合が高い分解度を示した。

2. 分離能に及ぼすカラムの長さの影響 Celite 545-HVG (10:3) カラムを 1m, 2m 及び 3m の長さで比較すると, 3m カラムの分解度が最高であったが, $C_{18} \sim C_{18}^{3=}$ は分離せず, 保持時間は延長された。Celite 545-EGS (10:3) は 3m カラムにすると流速が 5 ml/min 以下となり, 事実上分析不可能であった。Celite 545-GSR (10:3) は 4~5m カラムが最適で, 6m では保持時間がかなり延長された。この結果から Celite 545-HVG または EGS の 2m カラムが適当であり, 前者は 250°, He ガス流速 50 ml/min の条件で, C_{22} までの分析時間が 55 分, 後者は 220°, He ガス流速 15 ml/min の条件で, その分析時間が 35~40 分であった。

3. 分離能に及ぼす恒温槽の温度の影響 恒温槽すなわちカラムの温度は高いほど分解度が低下し, 保持時間は短縮される。理論段数も同様に低下し Celite 545-HVG (10:3) 2m カラムの場合はカラム温度 220° のときの分解度及び理論段数は 220° において, 約 1/2~2/5 に低下した。EGS を用いるカラムは充填剤の性質から

第2図 高級脂肪酸メチルエステルの分解能に
及ぼす固定液相の種類の影響

○—○ SG, △—△ CW, ●—● HVG,
▲—▲ GSR, □—□ EGS
SG, CW, HVG: カラム 2m, カラム温度 250°, He 50
ml/min.

GSR: カラム 4m, カラム温度 220°, He 50 ml/min.

EGS: カラム 2m, カラム温度 220°, He 15 ml/min.

て, Celite 545 は EGS との組合せにおいて, かなり高い分離能を示している。このことから低級脂肪酸はもちろん, 高級脂肪酸でも Celite 545 の優秀性が実証された。

ii) 固定液相の種類による影響: 高級脂肪酸では特に $C_{18} \sim C_{18}^{3=}$ 間の分離が問題であるので,

第3図 高級脂肪酸メチルエステルの分離能に及ぼす

液体試料室の温度の影響

GSR: カラム 5 m, カラム温度 220°, He 60 ml/min.

EGS: カラム 2 m, カラム温度 220°, He 15 ml/min.

第4図 脂肪酸炭素数と保持時間対数との関係

○—○ Celite 545-HVG
 △---△ Celite 545-EGS (saturated)
 □---□ Celite 545-EGS (monounsaturated)

220°以上に温度をあげると固定液相自体も不安定となり、零点が移動するので分析不可能となる。200°と220°のカラム温度の比較では、220°の場合の $C_{18} \sim C_{19}^{3=}$ の分離が良好であるのに対し、同じHeガスの流速下の200°の温度ではかなり分離が悪くなることがわかった。

4. 分離能に及ぼす試料室の温度の影響 液体試料室の温度は高級脂肪酸、特に $C_{18} \sim C_{19}^{3=}$ の分離に著しい影響を及ぼした。Celite 545-GSR及びEGSで行なった種々の試料室温度条件の結果は第3図のとおりである。GSRの場合、カラム温度と同じ試料室温度(220°)では $C_{18} \sim C_{19}^{3=}$ の分離がかなり悪く、EGSの場合でも C_{18} と $C_{19}^{1=}$ の分離が低下した。GSRの場合はカラム温度220°のとき、試料室の温度がそれより50~80°高いことが望ましく、EGSでは50~60°高い方が良好な結果を得ることができた。なお、Celite 545-HVGの場合も同様であった。

5. 分離能に及ぼすその他の要因の影響 Heガスの流速はCelite 545-HVGの場合50 ml/minが適当であるが、Celite 545-EGSはHVGの場合に比べてかなり低い流速(15 ml/min)で分析可能である。Celite 545の場合C-22に比べて粒子が細かいので、カラム出口の流速で測る。この数値はカラム入口の流速とかなり差があるものと考えられるが、EGSのカラムに適用する15 ml/minの流速は C_{20} までの分析が30分で完了する利点を有する。

試料の注入量は少ないほど、 $C_{18} \sim C_{19}^{1=}$ の分離が良好であり、低級脂肪酸と異なって注入量を0.005~0.01 mlにし、感度を2ノッチに上げれば満足な結果が得られた。

考 察 及 び 結 論

一般に高級脂肪酸メチルエステルの場合も、低級脂肪酸と同様に固体担体の種類、固定液相の種類と担持率、カラムの長さ、恒温槽の温度などが分離能に大きな影響を及ぼすが、特に固体担体の種類、固定液相の種類と担持率及び試料室の温度は $C_{18} \sim C_{19}^{3=}$ の分離に著しい影響を与えた。本試験で得たCelite 545-HVG及びEGSカラムの場合の $C_8 \sim C_{22}$ 炭素数と保持時間対数との関係との関係図表は第4図のとおりである。この図において、HVGの場合の関係は直線的となるが、EGSはやや曲線状をなし、炭素数が増すに従って保持時間の延長が見ら

第1表 $C_1 \sim C_{22}$ 脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラフィーの運転条件

処 理 区	カラム充填剤	カラム の長さ (m)	恒温槽 温 度 ($^{\circ}\text{C}$)	試料室 温 度 ($^{\circ}\text{C}$)	キャリアーガス 流速 (出口) (He, ml/min)	減衰器 感 度	チャート 紙速度 (mm/min)	試 料 注 入 量 (mg)
低 温 区 (低級脂肪酸用)	Celite 545-HVG (10:3~4)	2	120	170	50	8ノッチ (40mV)	20	10~20
高 温 区 I (高級脂肪酸用)	Celite 545-HVG (10:3~4)	2	250	300	50	2ノッチ (10mV)	20	5~10
高 温 区 II (高級脂肪酸用)	Celite 545-EGS (10:2~3)	2	220	270~290	15	2ノッチ (10mV)	20	5~10

第5図 バター及びマーガリン試料の高級脂肪酸メチル
エステルのガスクロマトグラフ

HVG: カラム 2 m, カラム温度 250 $^{\circ}$, 試料温度 300 $^{\circ}$, He 50 ml/min.
EGS: カラム 2 m, カラム温度 220 $^{\circ}$, 試料温度 280 $^{\circ}$, He 15 ml/min.
試料 0.005 ml.

第2表 市販バターの脂肪酸組成定量結果

脂 肪 酸	市 販 バ タ ー					文 献	
	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	平均 (%)	I ⁽⁹⁾ (%)	II ⁽¹⁰⁾ (%)
酪 酸	1.31	1.26	1.41	1.40	1.35	3.0	2.6~3.9
カ プ ロ ン 酸	2.43	2.16	2.67	0.14	1.85	1.4	1.3~2.0
カ プ リ ン 酸	1.76	1.88	1.97	0.28	1.47	1.5	0.5~1.6
カ プ リ ン 酸*	1.67	1.98	1.88	0.14	1.42	2.7	1.6~3.1
ラ ウ リ ン 酸*	3.85	3.86	3.55	2.84	3.52	3.7	1.7~4.1
ミ リ ス チ ン 酸*	9.87	11.95	9.87	8.68	10.09	12.1	6.9~11.1
パ ル ミ チ ン 酸*	27.94	30.10	25.17	23.07	28.57	25.3	22.0~31.7
ス テ ア リ ン 酸	5.27	3.39	5.03	4.88	4.46	9.2	6.5~15.0
オ レ イ ン 酸	33.18	30.83	32.52	36.73	33.33	29.6	28.5~40.9
リ ノ ール 酸	2.85	7.53	2.96	6.92	5.06	3.6	2.5~4.5
リ ノ レ ン 酸	3.85	0.97	1.92	0.18	1.73	7.9	0.4~2.4
C_{20}	5.19	1.50	8.19	5.42	5.08		
$\geq C_{22}$	2.05	3.39	3.46	8.81	6.93		

* Monounsaturated acid を含む。

れた。EGS の曲線の関係はカラム内におけるキャリアガス圧の分布が異なるためと考えられ、今後さらに運転条件を検討すべきであると考察される。しかし、この実験で得た最適条件は $C_8 \sim C_{18}^{2=}$ の分離確認が可能であり、 C_{20} , C_{22} についても不飽和酸との分離がある程度可能と考えられる。

実際に試料の分析を行なう場合、以上の結果を総合して Celite 545-HVG 2 m カラムと Celite 545-EGS の 2 m カラムの両者を用い、第1表に示す条件で3段階の分析を行なうことが望ましい。この分析は定量的にも可能と考えられ、つまり、始め HVG のカラムで $C_1 \sim C_{22}$ の脂肪酸メチルエステルを分析し、HVG カラムで1つのピークとして示される同じ炭素数の不飽和脂肪酸を EGS カラムで分析して、各単一脂肪酸メチルエステルの含量を検量線の作成によって求めるわけである。

実際にバター及びマーガリン試料を用いて HVG 及び EGS カラムで得た結果は、第5図のとおりである。バター試料について HVG と EGS カラムを比較すると、HVG で不完全分離を示す $C_{10}^{1=}$, $C_{12}^{1=}$, $C_{14}^{1=}$,

$C_{16}^{1=}$, $C_{18}^{1=}$, $C_{18}^{2=}$, $C_{18}^{3=}$ は EGS カラムで比較的良好な分離を示し、HVG の場合の C_{20} も EGS において2つのピークに分離している。バターの場合、 C_{20} 以上にはほとんどピークを示さないが、マーガリンでは牛乳脂肪以外の動物脂肪に由来する脂肪酸のピークが認められ、これら的高级脂肪酸について、今後さらに検討を要する問題である。

本実験の結果に基づいて第1表の条件で標準脂肪酸メチルエ

ステル混合液のガスクロマト分析を種々の注入量で行ない, そのピーク面積から絶対検量線を試験的に作成して見たが, その検量線から得た市販バター試料 4 種の脂肪酸組成は第 2 表のごとく, 文献の値^(9,10)と比較的よく一致した. このような結果から, 本実験の分析法は定量への適用が可能であると言えよう.

要 約

カプリル酸からべヘン酸までの高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, カラム及び試料室の温度などの影響について検索した. その結果高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 (10:3 または 10:4) 2m カラム (内径 4mm) と, Celite 545-エチレングリコールコハク酸エステル (10:2 または 10:3) 2m カラムの両者を用い, 前者はカラム温度 250°, 試料室温度 300°, He ガス流速 50 ml/min とし, 後者はカラム温度 220°, 試料室温度 270°, He ガス流速 15 ml/min の条件で行なって, 両者を比較すれば, 定量分析に可能な良好な結果が得られる.

実際に, この分析方法で得たバター及びマーガリン脂肪の高級脂肪酸の分離は定量分析に対する可能性を満たすのに十分な成績であり, 試験的に行なったバターの脂肪酸定量値は満足な結果を得た.

本実験に対し, 御教示をいただいた三共株式会社丸山正生氏及び日本ライヒホール化学工業株式会社浅野定快氏に深謝し, 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ール化学工業株式会社に御礼申上ます. 本研究の一部はロックフェラー財団の研究補助金によるものであり, あわせて謝意を表する.

(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) 中江利孝, 中西武雄: 本誌, 36 , 364(1962).	<i>Dairy Sci.</i> , 42 , 454 (1959).
(2) C. H. Orr, J. E. Callen: <i>Ann. N. Y. Acad. Sci.</i> , 72 , 649 (1959).	(7) M. P. Thompson, J. R. Brunner, C. M. Stine: <i>ibid.</i> , 42 , 1651 (1959).
(3) S. R. Lipsky, R. A. Landowne, R. A. Godet: <i>Biochem. Biophys. Acta</i> , 31 , 336 (1959).	(8) B. M. Nraig, N. L. Murty: <i>J. Amer. Oil. Chem. Soc.</i> , 36 , 549 (1959).
(4) S. Patton, R. D. McCarthy, L. Evans, T. R. Lynn: <i>J. Dairy Sci.</i> , 43 , 1187(1960).	(9) T. P. Hilditch: <i>The Chemical Constitution of Natural Fats</i> , 3rd Ed. (1956).
(5) 丸山正生, 妹尾節哉: 工化, 64 , 777(1961).	(10) H. J. Deuel: <i>The Lipids</i> , Vol. I (1951).
(6) W. Haab, L. M. Smith, E. L. Jack: <i>J.</i>	

〔農化 第 36 卷, 第 5 号, p.427~430, 1962〕

酢酸菌によるフラクトースの酸化 (第 8 報)*

一新 γ -パイロン化合物, 3-オキシ麴酸について

寺田 治, 鈴木静子, 木下祝郎 (協和醸酵東京研究所)

昭和 36 年 9 月 25 日 受 理

緒 言

酢酸菌のあるものがフラクトースから麴酸を生成することは古く高橋, 朝井⁽¹⁾によって報告されたところであり, その後池田⁽²⁾, 相田⁽³⁾は *Gluconobacter roseus* についてイソ麴酸の生成を報告している. 著者等は主として *G. cerinus* についてフラクトース代謝を検討中, 酢酸菌のあるものが 5-ケトフラクトースを経由して 3 種の γ -パイロン化合物を生成することを認め, そのうちの 2 者は麴酸およびイソ麴酸であることを確認, 報告⁽⁴⁾したが, $(C_6H_6O_5)_n$ の元素分析値を示す第 3 の γ -パイロン (Pyrone-III と仮称) については構造を決定するには至

* Oxidation of Fructose by Members of *Acetobacter*. Part VIII. Characterization of a New γ -Pyrone Derivative, 3-Oxykojic Acid.

By Osamu TERADA, Shizuko SUZUKI and Shukuo KINOSHITA (Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakkō Kōgyō Co., Ltd.)