揮発性脂肪酸 ($C_1 \sim C_9$) のガスクロマトグラフ分析

沢村正義, 橋永文男, 篠島 豊

(九州大学農学部食糧化学工学科)

昭和 47 年 12 月 12 日 受 理

Determination of Volatile Fatty Acids of $C_1 \sim C_9$ by Gas Chromatography

By Masayoshi SAWAMURA, Fumio HASHINAGA and Yutaka OSAJIMA

*Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka*

Volatile fatty acids, such as formic acid which is difficult to detect by FID, acetic, propionic, isobutyric, butyric, isovaleric, valeric, caproic and caprylic acids, were trimethylsilylated and determined quantitatively by gas chromatography using hydrogen flame ionization detector (FID). Sodium salts of fatty acids were liberated with an acidifying agent in organic solvents, then esterified with the trimethylsilyl reagent. The supernatant solution was injected into the gas chromatograph.

Trichloroacetic acid was most suitable as acidifying agent on account of good efficiency of separation from related fatty acids. Acetone, rather than ethyl ether or petroleum ether, was suitable as the solvent. The lower boiling esters such as trimethylsilyl formate and acetate were stable in acetone at least 2 hours below 26°C , and therefore it was found that the entire procedure can be carried out quantitatively at room temperature without any significant loss. The gas chromatogram on a mixture of the fatty acids showed complete resolution with good shapes of peak. The result obtained by plotting the peak area ratio *versus* the mole ratio showed the good linearity-relation.

(Received December 12, 1972)

緒 言

James と Martin⁽¹⁾ がガスクロマトグラフで、最初に $C_1 \sim C_{18}$ の脂肪酸をメチルエステルとして測定して以来、ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸分析に関して、多くの報告がなされてきた。ところで、低級脂肪酸をガスクロマトグラフで測定する場合、脂肪酸を直接、遊離酸の状態で行なう方法と、エステル誘導体にして行なう方法が考えられている。前者の方法に関して、多くの報告がなされている⁽²⁻⁴⁾ が、 $C_1 \sim C_9$ 脂肪酸の一括分析は分析時間を長くし、テーリングを起こしやすく、またギ酸 (C_1) のイオン化電圧が高く、水素炎イオン化検出器 (FID) を用いた場合、検出不可能なことなどの難点がある。一方、後者の方法、すなわちエステル誘導体として行なう方法に関して、最初メチルエステルによる定量化

が試みられた^(5,6) が、試料調製、溶媒留去、あるいは水洗などの操作で損失が起こりやすく、 C_4 以下の脂肪酸の定量分析には適しない。したがって、沸点のより高い誘導体にすることが試みられ、Craig ら⁽⁷⁾ は、 C_8 以上の脂肪酸をブチルエステル、デシルエステル、フェナシルエステルとして、比較検討を行なっている。また Ralls ら⁽⁸⁾ は、揮発性脂肪酸をエチルエステルとして分析しているが、この場合、溶媒からギ酸を分離できない欠点がある。ところで、トリメチルシリル誘導体のガスクロマトグラフ分析は糖⁽⁹⁾、アミノ酸⁽¹⁰⁾、ステロイド類⁽¹¹⁾ など多方面へ応用されて、かなりの成功をおさめている。一方、有機酸分析に対しては不揮発性有機酸⁽¹²⁾、あるいは $C_{10} \sim C_{18}$ の脂肪酸のトリメチルシリル化が試みられ、種々報告されてきた⁽¹³⁻¹⁶⁾ が、 C_9 以下の脂肪酸への応用は、まだ試みられていない。そこで著者らは、一連の分

析操作を迅速かつ容易にすることを考慮に入れて, FID に感度のないギ酸を含めた $C_1 \sim C_8$ の揮発性脂肪酸をトリメチルシリル化し, FID によるガスクロマトグラフ分析を試み, 満足すべき結果が得られたので報告する。

実験方法

1. ガスクロマトグラフィーの条件 装置は, 水素炎イオン化検出器を備えた島津 GC-4 BPF 型ガスクロマトグラフで, 分離カラムは内面を 5% ジメチルジクロルシラン (DMCS) トルエン溶液でコーティングしたガラスカラム ($\phi 4 \text{ mm} \times 3 \text{ m}$) を使用した。充てん剤は, 固定液相として 5% SE-52, 担体として 60~80 mesh の Chromosorb W (AW-DMCS 処理) を用いた。カラム温度は, $55^\circ\text{C} \sim 160^\circ\text{C}$ まで $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 昇温とした。キャリアーガスは N_2 で, 流速を $70 \text{ ml}/\text{min}$ とした。

2. 試薬 ヘキサメチルジシラザン (HMDS) とトリメチルクロルシラン (TMCS) は, ガスクロマトグラフ用試薬特級を用いた。脂肪酸塩は一部は市販特級のもの, 一部は実験室で調製したもので, いずれも水-アセトンで 3 回再結晶した。トリクロル酢酸 (TCA) は, 市販特級を濃硫酸上で 1 昼夜乾燥させたものを使用した。またアセトン, エチルエーテルおよび石油エーテルは, 脱水のため無水硫酸銅を加え 1 夜放置し, さらに金属ナトリウムで微量の水分を除いたあと, 再蒸留したものをを用いた。

3. エステル化と検量線 $C_1 \sim C_8$ の各脂肪酸塩の混合物として 20 mg 以下, 内部標準としてナフタリン 1 mg , TCA 40 mg を約 5 ml 容の共栓付遠沈管にとり, これにアセトン 1 ml を加えて数分放置して, 脂肪酸塩を遊離させた。次に, TMCS と HMDS をそれぞれ 0.06 ml ずつ加え, はじめの 30 秒間はゆっくり, 続いて 2 分間激しく振とうしたのち, 15 分間室温に放置することによって得られた上澄液を $0.2 \mu\text{l}$ とって分析した。検量線は, 内部標準物質 s モルおよび被検成分 x モルを既知量比含む試料についてクロマトグラムをとり, ピーク面積 A_s, A_x をはかり, 横軸に x/s (モル比), 縦軸に A_x/A_s (面積比) をとって, 3 回の平均値から作成した。

実験結果

1. 脂肪酸塩の遊離化試薬の検討

無水の脂肪酸塩試料を有機溶媒中で遊離化する試薬としてモノ-, ジ-およびトリクロル酢酸を選び, それらの

エステルと $C_4 \sim C_8$ 脂肪酸エステルとの分離について, 保持時間の点から検討した。Table I において, n -酪酸のトリメチルシリルエステルの保持時間を 1.00 としたとき, モノクロル酢酸エステルは iso -吉草酸エステルと, またジクロル酢酸エステルは n -吉草酸エステルと

Table I. Relative Retention Values of TMS Esters of Selected Fatty Acids, Mono-, Di- and Trichloroacetic Acids

TMS Ester	Relative R_f
<i>n</i> -Butyrate	1.00
Isovalerate	1.31
<i>n</i> -Valerate	1.72
Caproate	2.35
Monochloroacetate	1.28
Dichloroacetate	1.70
Trichloroacetate	2.25

Fig. 1. Chromatograms Showing Separation of HMDS and TMS Ester of Propionic Acid.

Each of HMDS and TMCS were added to 1 mg of propionate and $2 \sim 4 \text{ mg}$ of formate and acetate as follows: (a) 0.2 ml , (b) 0.1 ml , (c) 0.06 ml . column temperature: 55°C , sample size: ca. $0.2 \mu\text{l}$. peaks in order of appearance: (1) acetone, (2) formate, (3) TMCS, (4) acetate, (5) HMDS, (6) propionate.

比保持時間がきわめて近似しており, それぞれ分離することは困難であった. しかしトリクロル酢酸エステルは, 隣接したカブロン酸エステルと比保持時間で0.1の差があり, ほぼ完全に分離することがわかった. したがって以後の実験では, 遊離化試薬としてトリクロル酢酸を使用した.

2. トリメチルシリル (TMS) 化試薬と脂肪酸エステルとの分離

TMCS および HMDS は低沸点で保持時間が短い, これらと近似した保持時間をもつギ酸, 酢酸およびプロピオン酸のエステルについて, カラム温度 55°C 一定にして相互の分離を検討した. Fig. 1 から明らかなように, ギ酸エステルはアセトンと TMCS との中間に, また酢酸エステルは TMCS と HMDS との間に留出し, TMCS の量には関係なく, それぞれ良好な分離を示した. しかしながらプロピオン酸エステルの場合は, HMDS と保持時間が近似しているため, 相互の分離は HMDS の量によって支配された. すなわち Fig. 1 (a), (b) のごとく, HMDS をそれぞれ 0.2 ml, 0.1 ml 使用したときは, 分離が不完全であった. しかし, Fig. 1 (c) のように HMDS を 0.06 ml 使用したとき, 良好な分離を示した. HMDS とプロピオン酸エステルについて分離の程度をあらわす分解能 R を D. Ambrose らの式⁽¹⁶⁾から求めると Fig. 1 (a), (b), (c) それぞれの場合において, $R=0.6, 0.9, 1.1$ であった. HMDS 0.06 ml は, 遊離化試薬として使用する TCA の最大量 40 mg を TMS 化するに要する量の約2倍強であり, 反応を行なうに充分な量である. なお, HMDS を 0.03 ml 使って TMS 化反応させたときのクロマトグラムには, HMDS のピークは出現せず, TMS 化が不完全であると推測された.

3. 反応溶媒の検討

沸点の低い有機溶媒の中からアセトン, エチルエーテルおよび石油エーテルの3種の溶媒を選び, 脂肪酸試料として n -酪酸についてガスクロマトグラフ分析を行ない, その精度の点から, それぞれの溶媒についても比較検討した. ガス

クロマトグラフィーの条件は, 実験方法1のごとくであり, 7回くり返し実験で内部標準のナフタリンに対する n -酪酸エステルのピーク面積比から標準偏差を求めると, Table II の結果が得られた. 表から明らかなよう

Table II. Precision in Analysis of TMS Ester of n -Butyric Acid in Some Kinds of Solvents

n	Peak area ratio		
	Reaction in acetone	Reaction in ethyl ether	Reaction in petroleum ether
1	1.55	1.40	1.30
2	1.57	1.31	1.33
3	1.54	1.35	1.32
4	1.55	1.36	1.32
5	1.56	1.32	1.31
6	1.53	1.36	1.34
7	1.55	1.33	1.31
Mean	1.55	1.35	1.32
Std. dev.	0.012	0.027	0.013

Mole ratio (n -butyrate/naphthalene) : reaction in acetone ; 2.72, reaction in ethyl ether ; 2.51, reaction in petroleum ether ; 2.53.

Fig. 2. Stability of TMS Esters of Acetic and Formic Acid at Various Temperatures.

Column temperature : 55°C , abscissa : minute, ordinate : relative peak area ratio to toluene.

に, 3 種の溶媒の中でアセトンと石油エーテルを使用した場合の方が, エチルエーテルの場合よりも精度よく分析されることがわかった。しかし脂肪酸の中性塩試料に, トリクロル酢酸を加えて遊離化するとき, アセトン中では速やかに反応が進んだが, 石油エーテル中では反応が終了するまでに長時間を要した。したがって以後の実験には, 溶媒としてアセトンを使用した。

4. 反応温度と時間

TMS 化反応時における温度の影響, および TMS エステルの経時安定性について検討した。すなわち Fig. 2 において 36°C, 26°C, 0°C, および -78°C の 4 条件下

で反応を行なわせ, それぞれについて内部標準のトルエンに対するギ酸および酢酸エステルの面積比の変化から, TMS エステルの安定性を経時的に追跡した。その結果, 36°C においてはギ酸および酢酸エステルは, いずれもばらつきがみられた。これは, おそらく生じたエステルの揮発性にもとづく損失によるものと推察される。しかしながら 26°C 以下では, 2 時間放置後でも TMS エステルは安定であり, かつばらつきも認められなかった。なお, -78°C では反応が完了するまでに 10 分間要したが, それ以後は変化がなかった。室温の 26°C で操作を行なっても, 充分定量性があることがわかったので, 操作の簡易性などの点を考慮して, 以後の実験は室温で行なうことにした。

5. 揮発性脂肪酸 $C_1 \sim C_8$ のガスクロマトグラム

実験方法 1 の条件でガスクロマトグラフィーを行なったところ, Fig. 3 のような良好に分離したガスクロマトグラムが得られた。カラム温度の昇温は, 注入時から HMDS のピークが現われるまでを 55°C 一定とし, それ以後は毎分 10°C 昇温とした。昇温条件について 5°C/min, 8°C/min についても検討したが, 分離の程度は 10°C/min の場合とほとんどかわりなく, 分析時間が長くなるだけであった。またカラム管として, ガラスカラムとステンレスカラムについて比較検討したが, 前者の

Fig. 3. Chromatogram of a Mixture of TMS Esters of C_1 to C_8 Fatty Acids.

Column size: $\phi 4 \text{ mm} \times 3 \text{ m}$, column packing: 5% SE-52 on Chromosorb W (60~80 mesh), temperature: 55~160°C (programme rate: 10°C/min), peaks in order of appearance: (1) acetone, (2) formate, (3) TMCS, (4) acetate, (5) HMDS, (6) propionate, (7) isobutyrate, (8) *n*-butyrate, (9) isovalerate, (10) *n*-valerate, (11) TCA, (12) caproate, (13) naphthalene, (14) caprylate.

Fig. 4. Calibration Line of C_1 to C_8 Fatty Acids.

(1) formate, (2) acetate, (3) propionate, (4) isobutyrate, (5) *n*-butyrate, (6) isovalerate, (7) *n*-valerate.

Fig. 5. Calibration Line of C_6 and C_8 Fatty Acids.

(1) caproate, (2) caprylate.

方がテーリングおよび充てん剤の寿命の点で、後者よりはるかに優れていることを認めた。また充てん剤として本実験では、シラン処理した Chromosorb W に Silicone SE-52 を 5% 含浸させたものを使用した。シラン未処理の Diasolid L に Silicone GE SE-53 を 10% 含浸させたものを使用したときには、脂肪酸の TMS エステルのピークは出現しなかった。おそらく、担体に吸着されたものと推察される。

6. 検量線

$C_1 \sim C_8$ の各脂肪酸のナトリウム塩混合物について、前記の実験方法にしたがってクロマトグラフィーを行ない、半値幅法によりピーク面積比を算出し、3 回平均値をプロットした。その結果を Fig. 4, Fig. 5 に示す。図から明らかなごとく、 $C_1 \sim C_8$ の各脂肪酸の検量線は、いずれも原点を通り良好な直線性を示した。

考 察

天然物からの揮発性脂肪酸試料調製の際、一連の濃縮、脱水操作での損失をなくし、操作を容易にすることを考慮して、試料として脂肪酸ナトリウム塩を使用し、有機溶媒中で遊離化させ、これに直接 TMS 化試薬を反応させて、TMS 誘導体として測定を行なった。Hunter ら⁽¹⁷⁾は $C_2 \sim C_{10}$ の脂肪酸ナトリウム塩を、遊離酸法でガスクロマトグラフ分析を行なっているが、遊離化試薬としてモノクロル酢酸 (MCA) およびトリクロル

酢酸 (TCA) を用いると、いくつかの熱分解物のピークが現われ分析を妨害するので、ジクロル酢酸 (DCA) を使用したと報告している。本実験のように、TMS 化誘導体法によると MCA、DCA および TCA エステルのガスクロマトグラム上のピークはそれぞれ単一であり、熱分解物によると思われるピークは現われなかった。したがって、遊離化試薬としては三者ともに使用可能であるが、 $C_1 \sim C_8$ 脂肪酸の分析に際しては、被検成分との分離性から、MCA, DCA は好ましくなかった (Table I)。

Krebs cycle 上の有機酸の TMS 化⁽¹⁸⁾をはじめとして、TMS 化反応の溶媒として、ピリジンが多く用いられてきた。しかし本実験では、ピリジンはプロピオン酸エステルのピークと重なるために、使用不可能である。Zinkel ら⁽¹⁴⁾は、ピリジン溶媒よりも炭化水素系の溶媒における方が、エステル化率が高いことを報告しており、また Shyluk ら⁽¹⁸⁾は芳香族有機酸の TMS 化溶媒としてアセトンを用いている。この点に関して Table II において、たとえば石油エーテルのモル比 (n -酢酸/ナフタリン=2.53) に、他二者の溶媒のモル比を補正して三者同一にしたとき、相応する面積比はアセトン、エチルエーテル、石油エーテルそれぞれ 1.44, 1.41, 1.30 となり、アセトンが他二者にくらべて、エステル化率においてもすぐれていることがわかる。なお TMS 化反応において、微量の水分の存在は定量性に著しく影響を及ぼすので、使用する試料および試薬は完全に脱水される必要がある。

要 約

水素炎イオン化検出器 (FID) により、 $C_1 \sim C_8$ の揮発性脂肪酸をトリメチルシリル誘導体として簡易、迅速に分析することを試みた。

(1) 有機溶媒中で中性試料中の脂肪酸塩を遊離酸に変える試薬として、保持時間の点から検討した結果、トリクロル酢酸が最適であった。

(2) アセトン中で脂肪酸塩は、定量的に遊離ならびにトリメチルシリル化され、とくに低沸点のギ酸および酢酸エステルは室温以下で、すくなくとも 2 時間安定である。

(3) FID に感度のないギ酸を含む $C_1 \sim C_8$ の揮発性脂肪酸混合物を一括して、FID 型ガスクロマトグラフにより、それぞれの脂肪酸を分離よく、かつ定量的に分析することができた。

(4) (3) の混合系から得られた各脂肪酸の検量線は、いずれも原点を通り良好な直線性を示した。

本研究の概要は、第 135 回日本農芸化学会西日本支部大会で発表した。

- (1) A. T. James and A. J. P. Martin : *Biochem. J.*, **63**, 144 (1956).
- (2) C. W. Gehrke and W. M. Lamkin : *J. Agr. Food Chem.*, **9**, 85 (1961).
- (3) 福井清史, 永富英男, 村田三郎 : 分析化学, **11**, 432 (1962).
- (4) A. J. Appleby and J. E. O. Mayne : *J. Gas Chromatog.*, **5**, 211 (1967).
- (5) M. L. Vorbeck, L. R. Mattick, F. A. Lee and C. S. Pederson : *Anal. Chem.*, **33**, 1512 (1961).
- (6) L. D. Metcalfe and A. A. Schmitz : *ibid.*, **33**, 363 (1961).
- (7) B. M. Craig, A. P. Tulloch and N. L. Murty : *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **40**, 61 (1963).
- (8) J. W. Ralls : *Anal. Chem.*, **32**, 332 (1960).
- (9) C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita and W. W. Wells : *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2497 (1963).
- (10) P. S. Mason and E. D. Smith : *J. Gas Chromatog.*, **4**, 398 (1966).
- (11) C. J. W. Brooks and J. G. Carrie : *Biochem. J.*, **99**, 47 (1966).
- (12) Z. Horii, M. Makita and Y. Tamura : *Chem. and Ind.*, **1965**, 1494.
- (13) L. Birkhofer and M. Donike : *J. Chromatog.*, **26**, 270 (1967).
- (14) D. F. Zinkel, M. B. Lathrop and L. C. Zank : *J. Gas Chromatog.*, **6**, 158 (1968).
- (15) G. E. Martin and J. S. Swinehart : *ibid.*, **6**, 533 (1968).
- (16) 荒木 峻 : ガスクロマトグラフィー, 東京化学同人, 1969, p. 44.
- (17) I. R. Hunter, Hawkins NG and J. W. Pence : *Anal. Chem.*, **32**, 1757 (1960).
- (18) J. P. Shyluk, C. G. Youngs and O. L. Gamberg : *J. Chromatog.*, **26**, 268 (1967).