Gas-liquid chromatography による 魚油の脂肪酸組成の分析

豊水正道・富安行雄

(1962年2月15日受理)

ANALYSIS OF FATTY ACID COMPOSITION OF FISH OIL BY GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY.

Masamichi TOYOMIZU and Yukio TOMIYASU*

The development of gas-liquid chromatography (GLC) made possible the rapid separation of fatty acid esters on a micro scale. However the hitherto published analyses by GLC have been limited to vegetable oils and terrestrial animal fats. The reason is that the separation of polyenes from other fatty acids is not always clean, which complicates the analysis of other oils such as fish oils comprising the great variety of saturated and unsaturated acids and polyenes. So further improvement has been required in the technique.

The present study was undertaken to establish the analytical method of fatty acids in fish oil by GLC. The procedures employed for this purpose are as follows: GLC is carried out on succinate polyester of diethylene glycol, one of the most effective stationary liquid phase for separating fatty acids. Fish oil is methylated, hydrogenated and brominated, bromides being removed, and then each of these samples is subjected to GLC. At first, carbon number composition of fatty acids is determined from the hydrogenated sample, secondly the presence of saturated acids and monoenes is confirmed from the brominated sample, and at last fatty acids are identified on the basis of retention time of chromatogram of methylated sample, reference being made to these results and the presence of polyenes revealed by an alkali-isomerization ultraviolet spectrophotometry. The percentage composition of oil is determined from weights of peaks, the results are the means of duplicate determinations.

The fatty acid composition of fish oil was compared by GLC and spectrophotometry. GLC gave somewhat lower values for the slow-moving polyenes and higher values for the fast-moving saturated acids than did spectrophotometry. GLC was not successful in the detection of very small amounts of unsaturated acids which were estimated to be below 1% by spectrophotometry. Odd-numbered acids were demonstrated in fish oil by GLC. In general, the GLC results and spectrophotometric values were in agreement. It is concluded from the present data that analytical results obtained by GLC are reliable.

脂質代謝研究の進展に伴ない脂肪酸分析の必要性が大となつたが、メチルエステルの分別蒸留、結晶化および分光分析による方法では多量の試料が必要であつた。

JAMES, MARTIN¹⁾によつて脂肪酸メチルエステルの Gas-liquid chromatography (GLC) が 1956 年に発表されていらい、この研究は各方面で長足の進歩をなし、油脂の脂肪酸組成およびグリセライド構造の研究にも応用されるようになった。

脂肪酸メチルエステルの GLC では、固定液相が高温に耐える必要から、初期の研究では silicone あるいは Apiezone などのような非極性固定相が用いられたが、これらによつては飽和酸と不飽和酸との分離、あるいは不飽和酸と不飽和酸との分離が充分でなかつた。その後、ORR ら²⁾によつて極性固定相である Reoplex 400 が用いられ、CRAIG ら³⁾によつて diethylene glycol の polyester が有効であることが確かめ

* 九州大学農学部水産化学教室 (Fish. Chem. Lab., Kyushu Univ., Fukuoka, Japan).

られるようになって、分離能は上昇した。

このような固定液相の改良のほかに、検知器については熱伝導度測定方式からイオン化検出方式へ、また column では regular column から capillary column へと改良された。ところが、本質的な問題は固定液相であつて、STOFFEL ら⁴⁾ が指摘しているように、従来の固定液相では高度不飽和脂肪酸の分離が完全でないで、非極性固定液相と極性固定液相とを併用しても、GLC の応用範囲は高度不飽和脂肪酸を含有していない植物油および陸上動物油に限られている。これらの油脂については GLC による脂肪酸組成とアルカリ異性化分光分析法による分析値とがよく一致することが確かめられたが^{3,5,6)}、複雑な脂肪酸組成をもちかつ高度不飽和脂肪酸を含有している魚油は、現在までに行なわれているようなメチルエステルの保持時間 (t_R) の比較のみによる方法では完全には分析され得ない。

GLC のこのような欠点を補つて、魚油脂肪酸の分析法を確立するために、メチルエステルのみでなく、水素添加したものおよび臭素化したものの3種の試料について GLC を行ない、さらに分光分析法を併用し、これらから得た結果も参考にしてメチルエステルの chromatogram を同定した。

実験方法

試料: メカ油, 綿実油, イカ肝油およびコイ油を用いた。

メチル化: 10g の試料を常法によつて鹼化して、不鹼化物を除去したのちに脂肪酸とした。次に 1.5% 硫酸を含んだメタノールを加え、湯煎中で1時間加熱してメチル化した。

水素添加: 2g のメチルエステルを 10cc のヘキサンに溶かし、0.2g の白金黒を触媒として加え、magnetic stirrer の上で水素の吸収がなくなるまで水素を通じた。次いでヘキサンを駆逐した。

臭素化ならびに臭化物の除去: 4g のメチルエステルを 10cc のエーテルに溶かし -10°C に保つたのちよく攪拌しながら溶液が微赤色を呈するまで臭素を滴下した。その後、 -5°C に2時間放置してから遠心分離して臭化物を除去し、上澄液は 1% チオ硫酸ソーダ溶液で洗つて過剰の臭素を除去してからエーテルを駆逐した。その後 10cc のヘキサンに溶かし、再び -5°C に2時間放置してから遠心分離して新たに生じた臭化物の沈澱を除去し、ヘキサンを駆逐した。この方法によつて全部の不飽和酸が除去されるものと予想したが、palmitoleic, oleic acid などのように二重結合 1 コの脂肪酸は完全には臭素化されないで約半量が残存した。

充填剤の製法: 固定液相である diethylene glycol の succinate polyester は KOROLY, BEAVERS の方法⁷⁾によつて調製し、40~60 メッシュの日立製珪藻土担体と 1:4 (w/w) の割合で混和した。

gas-liquid chromatography: 日立 KGL-2 型 gas-chromatograph を使用し、上記充填剤を内径 4mm 長さ 1m のチューブに填めたもの 5 本、すなわち 5m の column を用いた。column 温度は 220°C 、試料室温度は 320°C で、helium を carrier gas とし 60cc/分の量を流し、検知器の bridge 電流は 175mA、記録計の指度は 6mV、記録紙は 1cm/分の速さで測定した。この条件における methyl palmitate に対する理論段数⁸⁾は 1500 であり、 $-\text{CH}_2-$ の分離係数⁸⁾は 1.27 であつた。各ピークを切り取つてその重量を測定し、全重量に対する%から脂肪酸組成を算出した。測定結果は2回の測定値を平均したものである。

分光分析法: 植物油は 1.3N 苛性カリエチレングライコール溶液で異性化する標準法⁹⁾によつて、魚油は 21% 苛性カリエチレングライコール溶液で異性化する秋谷法¹⁰⁾によつて、それぞれ異性化したのちに吸光度を測定し、与えられた式から不飽和酸および飽和酸の含量を求めた。

実験結果

標品として methyl myristate, palmitate, stearate, arachidate, oleate, linoleate および linolenate (C_{14} , C_{16} , C_{18} , C_{20} , $\text{C}_{18:1}$, $\text{C}_{18:2}$ および $\text{C}_{18:3}$)を用いて t_R を測定した。飽和酸では Fig. 1 に示したように $-\text{C}_2\text{H}_4-$ の分離係数が 1.62 であるから、炭素数は t_R の対数に対して直線関係にある。また C_{18} では 1 コの二重結合の分離係数が 1.16 であるから、二重結合の数は t_R の対数に対して直線関係にある。この二

Fig. 1. Relationship between logarithm of retention time and number of carbon atoms for saturated acid methyl ester.

Column, succinate polyester of diethylene glycol, 5m by 4mm; column temp., 220°C; flow rate of helium gas, 60cc/min.; bridge current, 175 mA; recorder sens., 6mV; chart speed, 1cm/min.; injector temp., 320°C.

重結合の分離係数は C_{18} でも C_{16} , C_{20} , C_{22} でも同一値であるから, Fig. 2 に示したように C_{16} , C_{20} および C_{22} については C_{18} の直線と平行な直線が得られ, t_R から脂肪酸を同定し得る。

Fig. 2. Relationship between logarithm of retention time and number of double bonds for acid methyl ester from C_{16} to C_{22} , under the same conditions as those in Fig. 1.

Table 1. Composition of rice-bran oil by GLC and spectrophotometric method.

	Gas-liquid chromatography			GLC (%)	Spectro. (%)
	Methylated sample (%)	Hydrogenated sample (%)			
Myristic	0.5	0.8	Saturated	22.0	23.2
Palmitic	20.0	20.3	Monoenoic	39.0	39.0
Stearic	1.5	78.9	Dienoic	37.3	36.0
Oleic	39.0		Trienoic	1.7	1.8
Linoleic	37.3		Tetraenoic	0	0
Linolenic	1.7				

Table 2. Composition of cotton seed oil by GLC and spectrophotometric method.

	Gas-liquid chromatography			GLC (%)	Spectro. (%)
	Methylated sample (%)	Hydrogenated sample (%)			
Palmitic	14.2	14.3	Saturated	17.8	17.8
Stearic	3.6	85.7	Monoenoic	31.4	31.1
Oleic	31.4		Dienoic	46.8	46.4
Linoleic	46.8		Trienoic	4.0	4.7
Linolenic	4.0		Tetraenoic	0	0

Fig. 3. Separation of components of rice-bran oil by GLC, under the same conditions as those in Fig. 1.

No. after colon indicates double bonds in acids of unsaturated chain length (i.e. $C_{18:2}$ C_{18} -dienoic acid methyl ester).

ヌカ油について脂肪酸メチルエステル、水素添加したものおよび臭素化したもの、すなわち3種の chromatogram を Fig. 3 に示した。後二者の chromatogram から構成脂肪酸の炭素数は 14, 16, 18 であり、また C_{14} , C_{16} , C_{18} , $C_{18:1}$ が存在していることが明らかであるが、ヌカ油のように脂肪酸組成が簡単で、かつ高度不飽和脂肪酸を含有しない油では、メチルエステルの t_R を標品の t_R と比較するのみで脂肪酸を同定し得た。ピーク重量から算出した脂肪酸組成と分光分析法から得た分析値とは Table 1 に示してあるようによく一致した。まったく同様にして得られた綿実油の分析結果を Table 2 に示した。

ところが、高度不飽和脂肪酸を含有し、複雑な脂肪酸組成をしているイカ肝油では Fig. 4 に示したように、メチルエステルの chromatogram には多数のピークが存在しているので、これらピークの t_R のみから脂肪酸を同定することはできない。まず Fig. 4 の水素添加したものの chromatogram から構成脂肪酸の炭素数は 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 および 22 であることが分り、その組成は Table 3 の通りである。次に臭素化したものの chromatogram から C_{14} , C_{15} , C_{16} , $C_{16:1}$, C_{17} , C_{18} , $C_{18:1}$, C_{19} , $C_{20:1}$ および C_{22} の各脂肪酸の存在が確認された。メチルエステルの chromatogram では Fig. 2 の t_R から $C_{18:2}$, $C_{18:3}$ の存在が明らかであり、かつ C_{19} が $C_{18:2}$ と分離されないで重なって一つのピークをなしていること

Fig. 4. Separation of components of calamary oil by GLC, under the same conditions as those in Fig. 1.

Table 3. Composition of calamary oil by GLC and spectrophotometric method.

	Gas-liquid chromatography			GLC (%)	Spectro. (%)
	Methylated sample (%)	Hydrogenated sample (%)			
C ₁₄ saturated	0.9	1.1	Saturated	29.5	20.7
C ₁₅ "	0.1	0.3	Monoenoic	41.7	39.4
C ₁₆ "	14.7	} 17.1	Dienoic	0.3	0.3
monoenoic	3.9		Trienoic	1.9	5.7
C ₁₇ saturated	1.8	1.2	Tetraenoic	2.3	2.2
C ₁₈ saturated	4.6	} 26.7	Pentaenoic	9.9	15.7
monoenoic	18.9		Hexaenoic	14.4	16.0
dienoic	0.3				
trienoic	1.9				
C ₁₉ saturated	0.8	0.8			
C ₂₀ monoenoic	18.9	} 28.4			
tetraenoic	2.3				
pentaenoic	9.9				
C ₂₂ saturated	6.6	} 24.2			
hexaenoic	14.4				

Table 4. Composition of carp oil by GLC and spectrophotometric method.

	Gas-liquid chromatography			GLC (%)	Spectro. (%)
	Methylated sample (%)	Hydrogenated sample (%)			
C ₁₄ saturated	3.1	} 7.2	Saturated	24.2	20.6
monoenoic	4.3		Monoenoic	53.6	55.1
C ₁₅ saturated	trace	0	Dienoic	14.1	12.5
C ₁₆ "	16.8	} 32.6	Trienoic	2.3	3.8
monoenoic	17.1		Teteaenoic	2.5	3.1
C ₁₇ saturated	trace	0	Pentaenoic	3.2	4.6
C ₁₈ "	4.3	} 49.0	Hexaenoic	0	0.3
monoenoic	28.3				
dienoic	13.2				
trienoic	2.3				
C ₂₀ monoenoic	3.9	} 11.2			
dienoic	1.0				
tetraenoic	2.5				
pentaenoic	3.2				

が、Fig. 1, 2 で C_{19} と $C_{18:2}$ の t_R が同一値であることおよび Table 3 で水素添加したものの C_{19} 組成は 0.8% であるが、このピークの重量は 1.1% であることから分つた。また、Table 3 の分光分析の結果から tetraene, pentaene, hexaene の存在が証明されているが、これらは t_R 17.6, 20.2 および 36.0 分のピークのものであり、かつ C_{20} 以上のものは C_{20} と C_{22} しか存在していないので、Fig. 2 からそれぞれ $C_{20:4}$, $C_{20:5}$ および $C_{22:6}$ と同定された。このようにして得た結果をまとめ、各脂肪酸のピーク重量から算出した脂肪酸組成と分光分析値とを Table 3 に示した。また同様に得たコイ油の結果を Table 4 に示した。

考 察

油脂の脂肪酸分析において分光分析法ではアルカリ異性化によつて生じた共役酸が測定されるのであるから、二重結合の数によつて分けられた群の組成が測定されるにすぎない。これに対して GLC ではおのおのの脂肪酸が同定され、これら脂肪酸の組成が測定される。この点に GLC の大きな意義がある。STOFFEL⁴⁾ は高度不飽和脂肪酸の GLC において *cis* 型から *trans* 型への異性化、共役酸の生成、アルカリ異性化後の分子吸光係数の変化、および二重結合の位置の変化などが起こらないことを確かめた。また、CRAIG⁵⁾, HERB⁶⁾ は標品の混合物および植物油を試料とした場合に、GLC から得た脂肪酸組成と分光分析値とはよく一致し、GLC の値には信頼性があることを強調した。

著者らもメカ油および綿実油のような植物油では GLC における同定は容易であり、かつ GLC の値と分光分析値とはよく一致することを確認した。しかし現在までに知られている固定液相ではすべての脂肪酸を完全に分離することは不可能で、diethylene glycol の succinate polyester もその例外ではない。すなわち Figs. 1, 2 に示したように $C_{18:2}$ と C_{19} , $C_{18:3}$ と C_{20} , $C_{20:3}$ と C_{22} , $C_{20:4}$ と $C_{22:1}$ および $C_{20:5}$ と $C_{22:2}$ では t_R が互いにほぼ相等しいので、これらのピークは分離されずに重なる。このような欠点を解決して正確に脂肪酸を同定するために、著者らはメチルエステルほかに水素添加した試料および臭素化して臭化物を除去した試料についても diethylene glycol の succinate polyester で GLC を行ない、chromatogram を検討して脂肪酸の炭素数組成および飽和酸と二重結合 1 コの不飽和酸の存在を確認した。次いでメチルエステルの chromatogram から脂肪酸を同定したが、高度不飽和酸の同定には分光分析の結果も参考にして行ない、誤りのないことを期した。分光分析によつては高度不飽和酸の炭素数が分らないので、水素添加した試料の chromatogram から炭素数が知られることは t_R の比較に当つて非常に役立った。また同定した脂肪酸の炭素数組成を計算し、水素添加した試料の炭素数組成と比較することによつて同定に誤りがあるか否かを確認し得る。

このようにして得た脂肪酸組成と分光分析値とを比較すると、まづ分光分析法で 1% 以下の値を示した含量の極めて低い脂肪酸は、GLC では Table 4 に示したように検出されなかつた。また両分析値の間には多少の差異が認められ、一般に GLC では t_R の長い不飽和酸の含量が分光分析値よりも低く、その結果として t_R の短い飽和酸の含量が高い傾向にあるが、両者の値は比較的によく一致した。この他に植物油には存在しない炭素数が奇数の飽和酸、すなわちイカ肝油から C_{15} , C_{17} , C_{19} が、コイ油から C_{15} , C_{17} が少量ではあるが GLC で検出されたことは注目に値する。

要 約

1. 高度不飽和脂肪酸をもち、かつ複雑な脂肪酸組成をもつ魚油の gas-liquid chromatography による分析法について検討した。
2. diethylene glycol の succinate polyester を固定液相として GLC を行ない、水素添加した試料の chromatogram によつて脂肪酸の炭素数組成を明らかにし、臭素化した試料の chromatogram によつて飽和酸と二重結合 1 コの不飽和酸の存在を確認したのちに、高度不飽和酸の同定には分光分析の結果をも参考にして、メチルエステルの chromatogram から同定を行なつて誤りのないことを期した。

3. 分光分析法で 1% 以下の値を示す極めて含量の少ない脂肪酸は GLC では検出されない。また保持時間の長い不飽和脂肪酸は GLC では分光分析値よりも低い値を示すが、GLC から得た分析値は分光分析値と比較的によく一致している。

4. 植物油では検出されない炭素数が奇数の飽和酸が魚油から検出された。

文 献

- 1) JAMES, A. T. and MARTIN, A. J. P.: Biochem. J., **63**, 144 (1956).
- 2) ORR, C. H. and CALLEN, J. E.: J. Am. Chem. Soc., **80**, 249 (1958).
- 3) CRAIG, B. M. and MURTY, N. L.: J. Am. Oil Chem. Soc., **36**, 549 (1959).
- 4) STOFFEL, W., INSULL, W. and AHRENS, E. H.: Proc. Soc. Expt. Biol. and Med., **99**, 238 (1958).
- 5) HERB, S. F., MAGIDMAN, P. and RIEMENSCHNEIDER, R. W.: J. Am. Oil Chem. Soc., **37**, 127 (1960).
- 6) INSULL, W. and AHRENS, E. H.: Biochem. J., **72**, 27 (1959).
- 7) KOROLY, J. E. and BEAVERS, E. M.: Ind. Eng. Chem., **45**, 1060 (1953).
- 8) 雨宮良三: ガスクロマトグラフィー, p. 136 (1959).
- 9) HORWITZ, W.: Official Method of Analysis A. O. A. C., p. 367 (1960).
- 10) 秋谷年見: 食糧研究所報告, **12**, 77 (1957).