

報 文

バターフレーバーのキャラクタリゼーション (第2報) グリセリドと脂肪酸の分析

加 藤 時 信^{*}, 岩 本 和 郎^{**}

Characterization of Butter Flavor (2)
- Analysis of Glycerides and Fatty Acids -

Tokinobu KATO^{*} and Kazuro IWAMOTO^{**}

^{*}Central Customs Laboratory, Ministry of Finance
531, Iwase, Matsudo-shi, Chiba-ken, 271 Japan

^{**}Osaka Customs Laboratory
4-10-3, Chikko, Minato-ku, Osaka-shi, 552 Japan

Analytical techniques of glycerides and free fatty acids in butter flavor were investigated.

Gas chromatography and mass spectrometry were useful for the qualitative analysis of flavor components.

In case lactones and emulsifier such as mono and diglyceride are contained in butter flavor, special technique which is not disturbed by these substances is necessary for the quantitative analysis of glycerides and fatty acids.

In this respect, we propose gas chromatography without pretreatment of the samples for the quantitative analysis of fatty acids and gel permeation chromatography for the quantitative analysis of glycerides.

The conditions of gas chromatography are the same as the method of analysis of lactones⁴⁾.

The conditions of gel permeation chromatography are as follows; column: JAIGEL 2H, eluant: chloroform.

- Received June 20, 1984 -

1 緒 言

輸入バターフレーバーには香気性物質とともにグリセリド (又は油脂) と脂肪酸が含まれているものが多い。グリセリドとしては乳脂の部分分解物でモノ、ジ及びトリグリセリドからなるもの、植物油、

水素添加した植物脂の部分分解物でモノ、ジ、トリグリセリドからなるもの等が単独又は組み合わせて使用されている。また、脂肪酸としては乳脂を分解して得られたもの、2~3 種類の低級脂肪酸のみからなるもの等がある。

グリセリドや脂肪酸の分析は、一般に成書^{1)~3)}に

^{*}大蔵省関税中央分析所 〒271 千葉県松戸市岩瀬 531

^{**}大阪税関 輸入部分析室 〒552 大阪市港区築港 4-10-3

記載されている油脂分析法で行われているが、著者が前報⁴⁾で指摘したとおり、ラクトン類が共存する場合には酸価及びけん化価はグリセリドや脂肪酸の量を反映しない値になる。また、モノ及びジグリセリドが共存するとこれらが非常に強い乳化作用を有するので溶媒抽出等の操作を妨害する。更に脂肪酸には蒸気圧の高い低級脂肪酸が含まれているので、その定量的な取扱いを困難にしている。したがって、バターフレーバー中のグリセリドと脂肪酸を分析するには、共存成分を配慮した分析法の選択が必要である。

そこで本報ではいくつかのタイプのバターフレーバーを用いて、一般に行われている油脂分析法等によって分析し、バターフレーバーのタイプ別に分析上の問題点を考察すると共に、適当と思われるグリセリドと脂肪酸の分析法の選択を試みたのでその結果を報告する。

2 実 験

2・1 試薬及び試料

各種有機溶媒及び規定液は市販の試薬特級を用いた。バターフレーバーはいずれも輸入品で、次のタイプのものを用いた。

Type 1: 輸入品 A...新鮮な牛乳にリパーゼを作用させたもの(米国産)

Type 2: 輸入品 B...乳脂にリパーゼを作用させたものと少量の脂肪酸メチルエステル類からなる混合物(米国産)

Type 3: 輸入品 C...落花生油、ラクトン類及び低級脂肪酸からなる混合物(デンマーク産)

Type 4: 輸入品 D...乳脂、植物油脂、乳脂分解脂肪酸及びラクトン類からなる混合物(英国産)

Type 5: 輸入品 E...水素添加したパーム油の部分分解物、乳脂分解脂肪酸及び香料からなる混合物(オランダ産)

2・2 装置

ガスクロマトグラフは島津製作所製の GC - 7 A 型にクロマトパック C - R1B を接続したもの、

ゲルパ - ミエ - ションクロマトグラフィ - 用の液体クロマトグラフは日本分析工業製の LC - 08 型にギルソン社製のモデル 201 フラクションコレクターを接続したもの、赤外分光器は日立製作所製の 295 型、質量分析計は島津製作所製の島津 - LKB9000 型に沖電気製のデ - タ処理装置 GC - MSPAC300 を接続したものを使用した。

2・3 共存成分のスクリーニング

試料がどのタイプのバターフレーバーであるかを確認するために、次のような方法で組成分析を行った。

a 赤外吸収スペクトル

赤外吸収スペクトルの測定は主として臭化カリウム結晶板を用いたサンドウィッチ法又は臭化カリウム錠剤法により行った。

赤外吸収スペクトルの特性吸収から多量成分に関する情報が得られる。

b 薄層クロマトグラフィー

薄層クロマトグラフィーの条件は次のとおりである。

プレート: シリカゲル 60, 厚さ 0.25mm, 20 × 20 cm (メルク製)

展開溶剤: ヘキサン・エチルエーテル・酢酸 (70 : 30 : 1)

検出 : よう素蒸気

この条件で約 14cm 展開した。モノ、ジ及びトリグリセリド並びに脂肪酸が存在すれば分離して検出できる。

c グリセリドのガスクロマトグラフィー

試料中のグリセリドの起源油脂を推定するため、次の 2 種類の条件によって分析した。なお、ガスクロマトグラフィー用の検体は、試料をクロロホルムに溶解したものをを用いた。

条件 1 笹川らの推奨したカラム⁵⁾を用い次の条件により行った。すなわち、カラム: Silicone OV - 1, 3% on Uniport HP, 80 ~ 100 mesh, 3 mm × 25 cm, カラム温度: 220 ~ 340 /min 昇温, 注入口温度: 350 ,

報 文 バターフレーバーのキャラクタリゼーション(第2報)グリセリドと脂肪酸の分析

キャリアガス：He, 60ml/min, 検知器：FID

条件 2 今回設定した次の条件により行った。すなわち, カラム：DEXIL 300GC, 3% on Chromosorb WAW DMCS, 100 ~ 120 mesh, 3 mm × 50 cm, カラム温度：200 ~ 350, 6 / min 昇温, 注入口温度：360, キャリアガス：He, 50 ml/min, 検知器：FID

d 香気性物質のガスクロマトグラフィー及び GC-MS

遊離の脂肪酸及びラクトン類等の香気性物質の分析はガスクロマトグラフィーと GC-MS によって行った。ガスクロマトグラフィーは著者らが前報で推奨した条件により行った。すなわち, カラム：Silicone OV-101, 5% on Chromosorb GAW DMCS, 80 ~ 100 mesh, 3 mm × 200 cm, カラム温度：100 ~ 340, 6 / min 昇温, 注入口温度：350, キャリアガス：He, 50 ml/min, 検出器：FID。ガスクロマトグラフィー用の検体は試料をクロロホルムに溶解して調製した。

香気性物質の同定は, 試料の水蒸気蒸留液からエチルエーテルを用いて抽出・回収したものを検体として GC-MS によって行った。GC-MS におけるガスクロマトグラフィーの条件は上記の条件に近似させ, 質量スペクトル測定のためのイオン化電圧は 70 eV で行った。

2・4 酸価及びけん化価の測定

酸価及びけん化価は“農芸化学実験書”²⁾に準じて測定した。

2・5 脂肪酸の組成分析

遊離の脂肪酸の組成分析は次の2つの方法によって行った。

方法 1 常法により試料をアルカリ(5%炭酸ナトリウム)処理して分画した遊離の脂肪酸を三ふっ化ほう素-メチルアルコール法でメチルエステル化し, ガスクロマトグラフィーにより分析した。この時のガスクロマトグラフィーの条件は次のとおりである。カラム：Poly-

diethylene glycol succinate, 15% on Chromosorb W NAW, 80 ~ 100 mesh, 3 mm × 200 cm, カラム温度：70 ~ 220, 4 / min 昇温, 注入口温度：230, キャリアガス：He, 50 ml/min, 検出器：FID

方法 2 試料のクロロホルム溶液を直接ガスクロマトグラフィーにより分析した。この時のガスクロマトグラフィーは, 2・3-d に記載した条件によって行った。

一方, グリセリド構成脂肪酸組成は, 常法により試料をけん化し, 分画して得た脂肪酸を三ふっ化ほう素-メチルアルコール法によりメチルエステル化し, 上記の方法1と同一の条件でガスクロマトグラフィーによって行った。

2・6 ゲルパーミエーションクロマトグラフィー

グリセリドと香気性物質の分離分析のため次の条件によりゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)を行った。

カラム：JAIGEL 2H, 検出器：紫外線検出器と示差屈折計, 溶媒：クロロホルム。

試料は約5%のクロロホルム溶液とし, その3mlを注入分離し, ピークごとに分取した。

2・7 アセトン分別沈殿

乳化作用の強い試料の分析のための前処理にアセトンによる分別沈殿を行った。その操作は次のとおりである。試料をエチルエーテルに溶解し, 等量のアセトンを加えて生じた沈殿(モノ及びジグリセリドの大部分)をろ別した。

3 結果及び考察

3・1 共存成分のスクリーニング

3・1・1 赤外吸収スペクトル

バターフレーバーの赤外吸収スペクトルは Fig.1 に示した。試料そのものの赤外吸収スペクトルは 2・1 に記載したタイプ毎に特徴的な吸収パターンが観察される。すなわち, Type 1 のスペクトルはたんぱく質のアミド結合による吸収と糖質(乳糖)の水酸基による吸収が強く, Type 3 のスペク

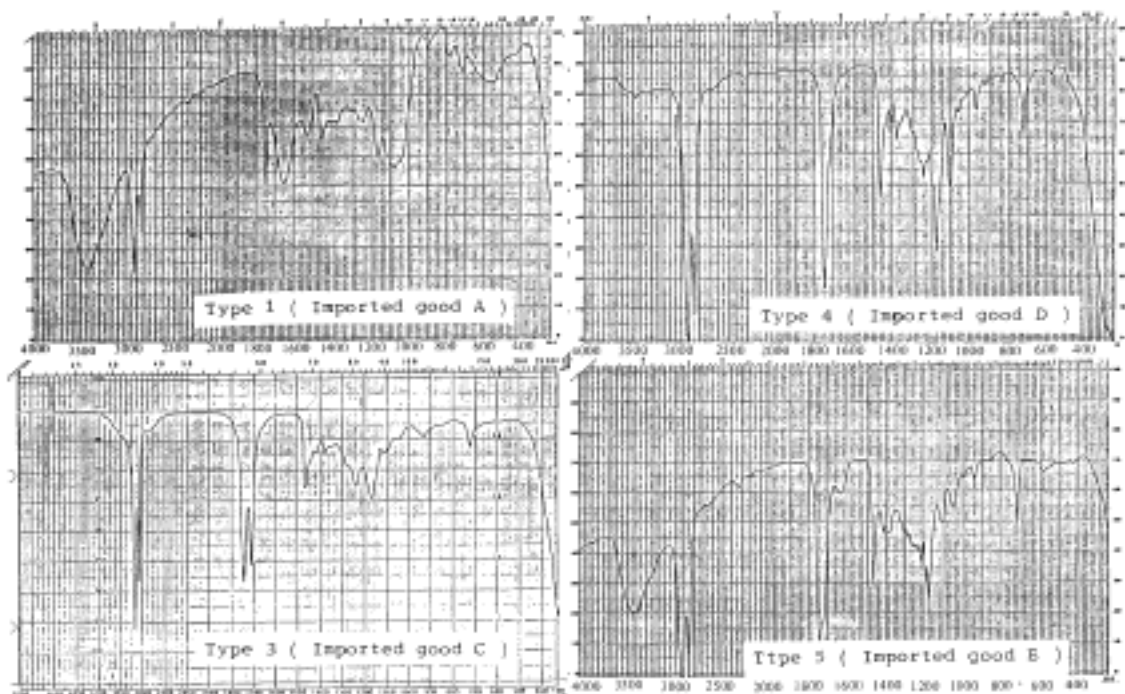


Fig.1 Infrared spectra of four types of butter flavors

トルはトリグリセリドのエステル結合による吸収と脂肪酸のカルボキシル基による吸収が強く現れている。また、Type 4 のスペクトルはトリグリセリドの吸収にほぼ一致し、Type 5 のスペクトルはグリセリドの吸収を示すが、カルボキシル基の吸収も強いことからモノ及びジグリセリドが多量に含まれていることを示唆している。なお、Type 2 の試料は多量の水を含んでいたため、その赤外吸収スペクトルは水の吸収が他の成分に関する情報を妨害した。

このように赤外吸収スペクトルは試料中の多量成分に関する情報が得られるので、その後の分析手段を選択する上で有効である。なお、グリセリドの多い試料の赤外吸収スペクトルからはラクトン類の存在に関する情報を得るのは困難であった。

3・1・2 薄層クロマトグラフィー

各種バターフレーバーの薄層クロマトグラムを Fig.2 に示した。これによればバターフレーバー中のグリセリドと脂肪酸組成に関して赤外吸収スペクトルよりも具体的な情報が得られる。すなわち、モノ、ジ及びトリグリセリドのおおよその量的関

係、乳脂が存在するか否かなどを知ることができた。なお、Fig.2 の中でスポット No.6 はラクトン類が多量に存在する場合に検出される。

3・1・3 グリセリドのガスクロマトグラフィー

リパーゼによって部分的に分解された乳脂を含む Type 1 と Type 2 及び天然の乳脂のガスクロマトグラムは Fig.3 に示した。このガスクロマトグラフィーの条件 (2・3・c の条件 2 参照) では、グリセリドはアシル基の炭素数の違いによって分離される。天然の乳脂に検出されるピークは、Type 1 と Type 2 のバターフレーバーからも検出されるが、ピークの数と強度関係はそれぞれ異なっている。このことは、これらのバターフレーバー中の乳脂が何らかの方法で部分的に分解されていることを示している。また蟹沢らの報告⁶⁾にもあるとおり、乳脂がリパーゼによって部分分解される際に遊離する脂肪酸はリパーゼの起源と反応条件によって異なることが知られており、このような Type 1 と Type 2 のクロマトグラムの相違は、リパーゼの種類又は反応条件の違いによるものと推定される。

報 文 バターフレーバーのキャラクタリゼーション (第2報) グリセリドと脂肪酸の分析

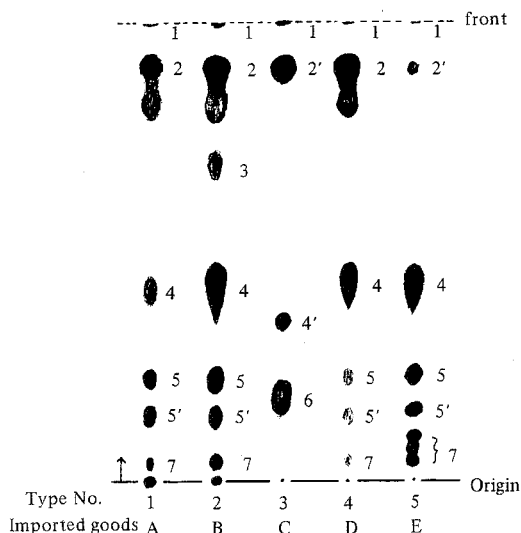


Fig.2 Thin layer chromatograms of five types of butter flavors

TLC conditions are cited in "b" of 2·3.

Spot No.2 : Triglyceride from milk fat , No.2 : Triglyceride from vegetable oil or hydrogenated vegetable fat , No.4 : Fatty acid , No.4 : Short chain fatty acid , No.5 : 1,3-Diglyceride , No.5 : 1,2-Diglyceride , No.7 : Monoglyceride , other (Aromatic substance etc.).

Fig.4 には Type 3 のバターフレーバーと落花生油のガスクロマトグラムを示した。両者のクロマトグラムパターンは良く一致しており、Type 3 の輸入品 C にはグリセリドとして落花生油が含まれていることが確認できた。

Fig.5 には Type 4 と Type 5 のバターフレーバー、乳脂及びパーム油のガスクロマトグラムを示した。Type 4 (輸入品 D) のガスクロマトグラムは乳脂に比較してアシル基の炭素数の多いものが相対的に強くなっており、乳脂以外の異種脂肪が含まれていることが示唆される。なお、輸入品 D には不けん化物のガスクロマトグラフィーによって植物ステロイドが検出され、植物油脂が添加されていることが確認された。Type 5 (輸入品 E) のガスクロマトグラムはモノ、ジ及びトリグリセリドによるピークが検出され、これには部分分解された油脂が

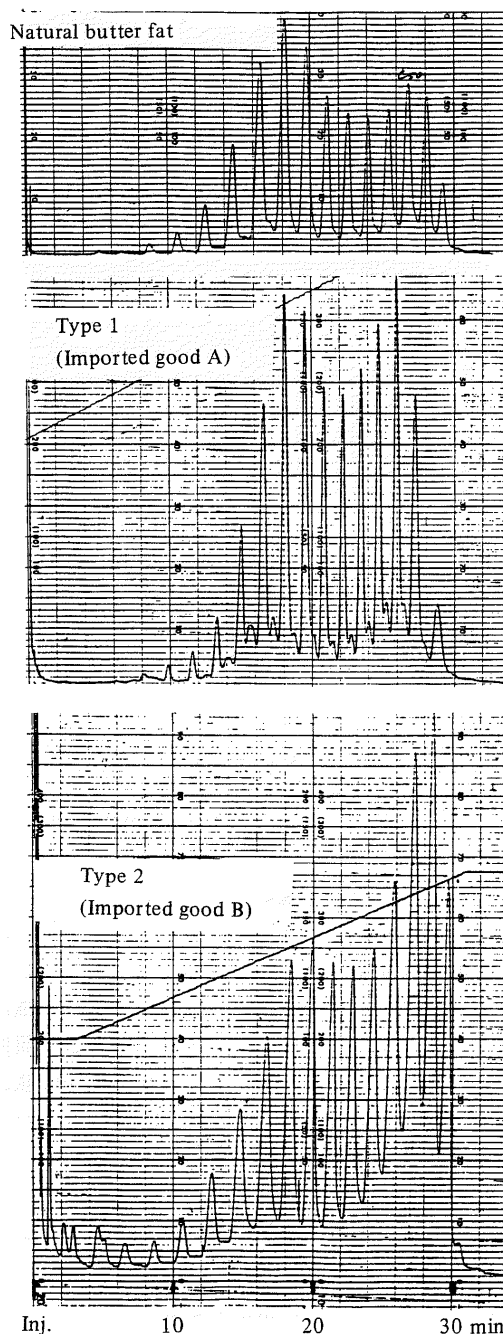


Fig.3 Gas chromatograms of natural butter and butter flavors

Conditions are cited in condition 2 of 2·3-c.

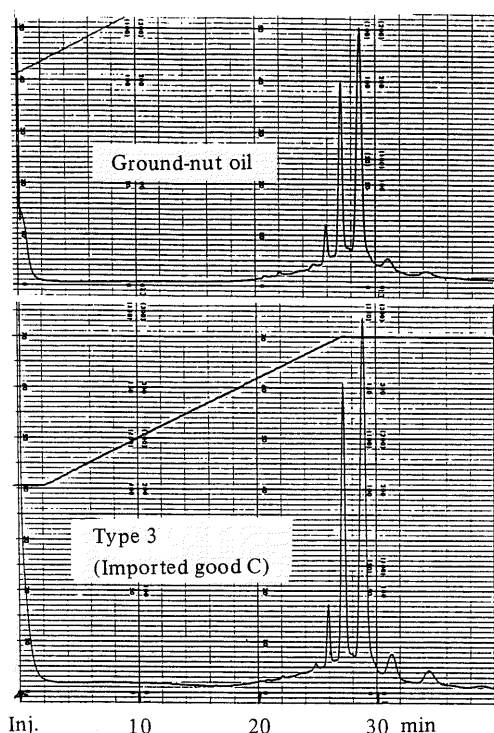


Fig.4 Gas chromatograms of ground-nut oil and imported good C

Conditions are cited in condition 2 of 2.3-c.

含まれていることが確認された。各ピークのうちトリグリセリド部分のピークパターンから部分分解油脂の原料が推測できるが、このトリグリセリドのピークパターンは浅野らにより報告された各種油脂のガスクロマトグラム⁷⁾の中ではパーム油に類似していた。なお、後述のグリセリド構成脂肪酸組成の検討結果等から輸入品 E には水素添加したパーム油の部分分解物が含まれていることが判明した。

3・1・4 香気性物質のガスクロマトグラフィー及び C-G-MS

試料のクロロホルム溶液を直接ガスクロマトグラフィーにより分析した結果の例を Fig.6 に示す。成分の同定は水蒸気蒸留留出物の GC-MS によった。Type 3 には、炭素数 4, 8 及び 10 の低級脂肪酸と - ラクトン類及びメチルケトン類の香料成分が含まれていた。

この方法によって容易に香気成分の確認が可能で

ある。香気成分の中でもラクトン類の確認は、グリセリド及び脂肪酸の分析に先立って分析法の選択のため特に重要である。なお、輸入品 A 及び B の香気性物質は大部分が乳脂分解脂肪酸であり、ラクトン類は検出されなかった。

3・1・5 酸価及びけん化価

酸価及びけん化価は通常の油脂の場合には脂肪酸の平均分子量の測定結果とともに、試料中の脂肪酸及びグリセリドの量を知ることができる重要なファクターとなる。

輸入品 A 及び B はラクトン類のような妨害物質を含んでいないので、試料中のグリセリドと脂肪酸の量を反映した酸価とけん化価が得られた。

一方、輸入品 C の組成はガスクロマトグラフィー及びゲルパーミエーションクロマトグラフィー（後述）により定量した結果、グリセリド：71%（落花生油）、脂肪酸：17.2%、ラクトン類：10.6%、その他：1.2%（メチルケトン類等）であり、脂肪酸の平均分子量は 170.6 であった。常法によって測定した酸価は 96.5、けん化価は 233.1 であった。輸入品 C の酸価と脂肪酸の平均分子量との関係から次式によって脂肪酸含有量を求めた。

$$\text{脂肪酸(\%)} = \frac{100 \times \text{酸価} \times \text{平均分子量}}{56108} = 29.3\%$$

その結果、脂肪酸含有量は 29.3% となり、ガスクロマトグラフィーによって求めた脂肪酸とラクトン類の含量(27.8%)に近い値となった。このことは、酸価測定時にラクトン類の大部分が相当するオキシ酸に変化してアルカリを消費している結果によるものと考えられ、前報の実験事実を裏づけている。このようなラクトン類の挙動は、けん化価の測定時にも見られ、けん化価も異常に高い値を示した。

以上のことから試料中にラクトン類が共存する場合には酸価及びけん化価はラクトンの量にほぼ比例して高い値を示し、グリセリドと脂肪酸の定量分析が妨害されることが判明した。

3・1・6 脂肪酸の組成分析

輸入バターフレーバーに含まれている遊離の脂肪酸組成は乳脂の分解脂肪酸のものと、炭素数 10 以下の数種の低級脂肪酸のみを含むもの、まれには酪

報 文 バターフレーバーのキャラクタリゼーション (第2報) グリセリドと脂肪酸の分析

酸のみを含むものとがあった。

この脂肪酸組成の分析は多くの場合、一般に広く用いられている 2・5 の方法 1 に記載した分析法が適用可能である。また、グリセリド構成脂肪酸組成もこの方法によることができる。しかしながら、輸入品 E は多量のモノ及びジグリセリド (水素添加したパーム油の部分分解物) を含んでいるため、その強い乳化作用によりアルカリ処理による遊離脂肪酸の分別ができなかった。このような試料からの脂肪酸の分析は 2・7 に記載したアセトン分別沈殿によって大部分のモノ及びジグリセリドを除去した後、アルカリ分別を行うことにより、容易に脂肪酸を分取できることが判明した。この方法によって分

別した遊離の脂肪酸とグリセリド構成脂肪酸のメチルエステル化物のガスクロマトグラムを Fig.7 に示す。遊離の脂肪酸組成は乳脂の脂肪酸組成に類似しており、グリセリド構成脂肪酸はステアリン酸とパルミチン酸が主体であった。グリセリドは水素添加された油脂である。

2・5 の方法 2 により得られたガスクロマトグラムは Fig.6 に示されている。この方法では飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の分離が困難であった。

なお、バターフレーバー中の脂肪酸は、蒸気圧の高い低級脂肪酸を含んでいるので、その定量的な分析はこれらの低級脂肪酸の損失を生じ易い前処理 (分別, エステル化等) は可能な限り避けて行うこ

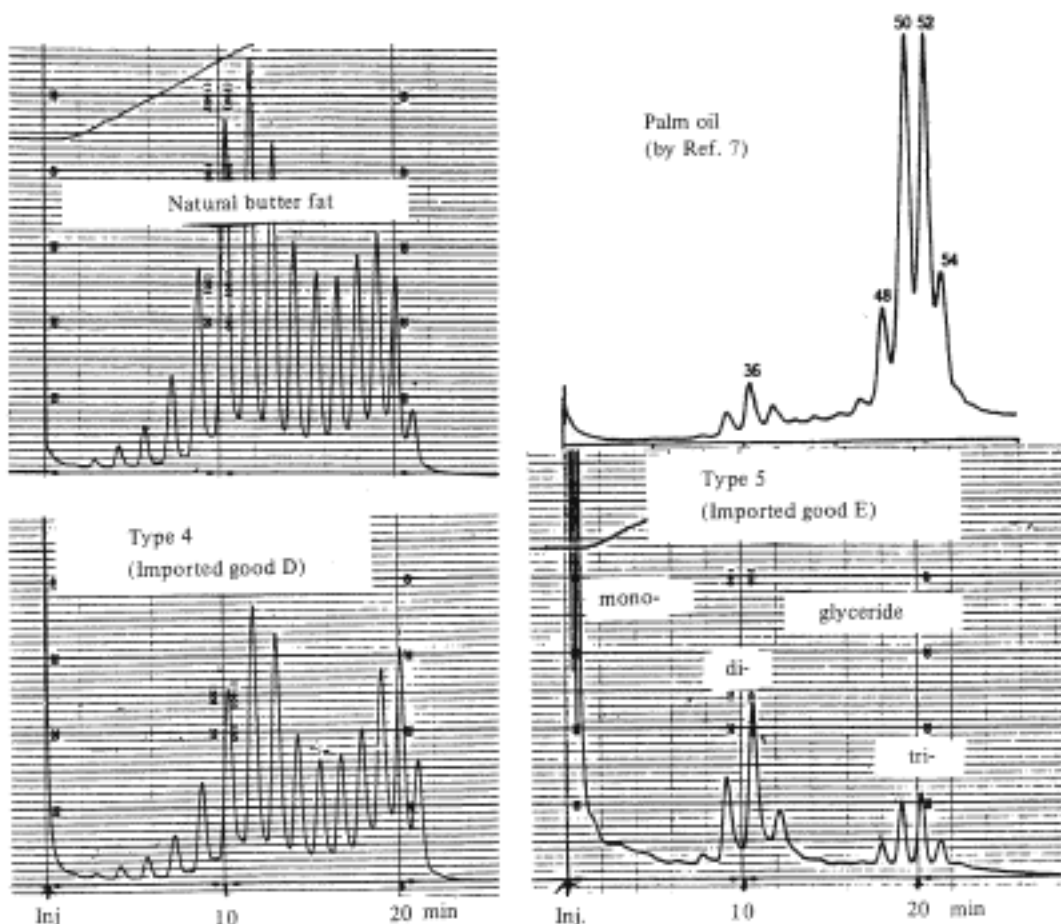


Fig.5 Gas chromatograms of butter flavors,
natural butter and palm oil
Conditions are cited in condition 1 of 2.3-c

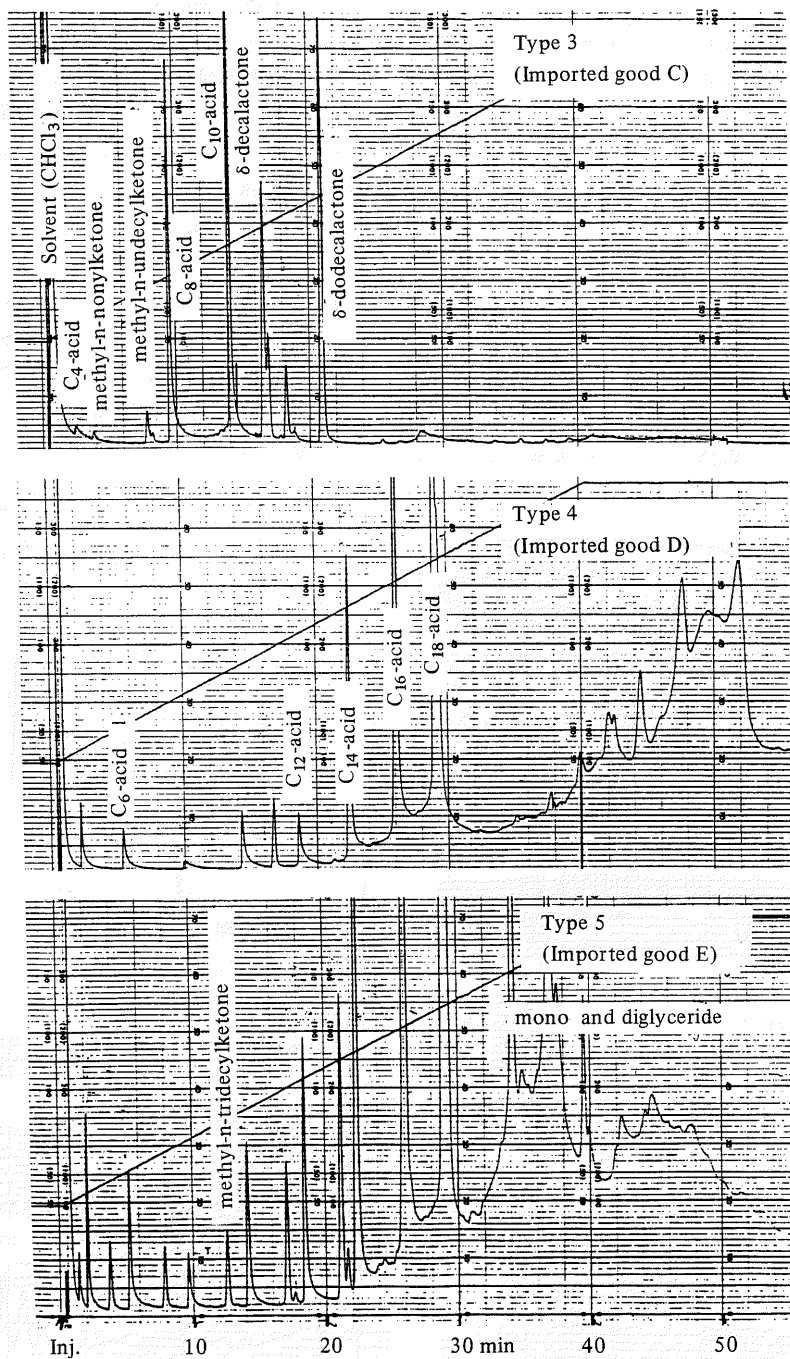


Fig.6 Gas chromatograms of butter flavors

Conditions are cited in 2·3-d.

Components are identified by GC-MS

とが望ましいと考え、現在、2・5の方法2による定量分析法について検討中である。次報ではこの方法によりラクトン、ケトン、エステル等の香気成分と遊離の脂肪酸を同時に定量する方法について報告すべく準備している。

3・1・7 ゲルパーミエーションクロマトグラフィー

バターフレーバーのクロロホルム可溶物について行ったゲルパーミエーションクロマトグラムをFig.8に示した。そのクロマトグラムは試料の組成バランスによって特徴的なパターンを示した。モノ及びジグリセリドのほとんど存在しない輸入品 C と D の最強ピークを示す成分は、分取してガスクロマトグラフィーにより分析した結果、トリグリセリドであった。これらの試料のグリセリドは注入量と最強ピーク画分の回収量の関係から中性脂肪の定量ができた。脂肪酸と香料成分は連続して一部重なりあって流出した。モノ、ジ及びトリグリセリドを含む輸入品 E はトリ及びジグリセリド、モノグリセリド及び脂肪酸が重なり合って完全分離ができなかった。

ゲルパーミエーションクロマトグラフィーは、モノ及びジグリセリドがほとんど存在しない試料中の油脂の定量法として有効であることが判明した。

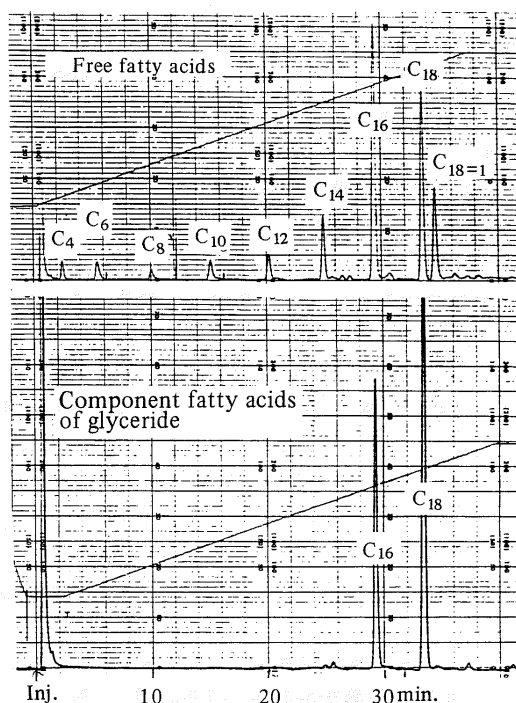


Fig.7 Gas chromatograms of fatty acid methyl esters of free fatty acids and component fatty acids of glyceride in imported good E.

Conditions are cited in method 1 of 2・5.

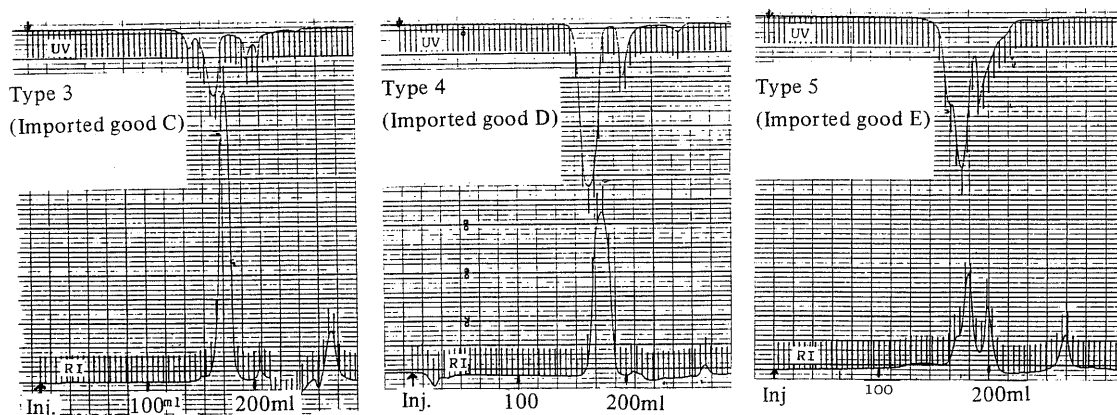


Fig.8 Gel permeation chromatograms of butter flavors
Column : Jaigel 2H , Eluant : CHCl_3

4 要 約

バターフレーバー中のグリセリドと脂肪酸の分析法について検討した。

特にラクトン類が存在する試料及び乳化作用の強い試料の分析は通常の油脂分析法では困難であり、分析法の選択に注意が必要であった。

Type 1～5 のバターフレーバー中のグリセリドと脂肪酸分析法について検討した結果、それぞれ次の方法が適していると考えられた。

まず、バターフレーバーのタイプの決定は、2・3 の c と d に記載したグリセリドと香気性物質のガスクロマトグラフィーにより最も迅速、適確に行うことができる。

Type 1 と 2 については通常の油脂分析法がそのまま適用できる。Type 3 と 4 のグリセリドの定量にはゲルパーミエーションクロマトグラフィーが適している。また、脂肪酸の定量には前処理を行わずに直接ガスクロマトグラフィーによるのが望ましいと考えられた。Type 5 はアセトン分別沈殿法により前処理することにより通常の油脂分析法が適用可能となった。

なお、全タイプのバターフレーバー中の脂肪酸の定量法としては、他の共存する香気性物質とともにガスクロマトグラフィーにより直接同時定量するのが迅速、適確な方法と考え、その方法について現在検討中である。

文 献

- 1) 日本油化学協会制定：“基準油脂分析試験法”，(1977) (日本油化学協会)
- 2) 京都大学農学部農芸化学教室編：“新改版 農芸化学実験書 第 2 巻”，(1983) (産業図書)
- 3) 日本食品工業学会食品分析法編集委員会編：“食品分析法”，(1982) (光琳)
- 4) 加藤時信，関川義明：本誌，25，1 (1985)
- 5) 笹川邦雄，大野幸雄：本誌，24，51 (1983)
- 6) 蟹沢恒好，山口雄三，服部達彦：日本食品工業学会誌，29,693 (1982)
- 7) 浅野成子，達家清明：本誌，15，141 (1975)