

ノート

油脂及び脂肪酸のメチルエステル化法について

廣瀬 達也*，菱木 貴史*，平井 丈功*，岩本 和郎*

Esterification of fatty acids and transesterification of fats and oils

Tatsuya HIROSE*, Takashi HISHIKI*, Takenori HIRAI* and Kazuro IWAMOTO*

*Osaka Customs Laboratory

4-10-3, Chikko, Minato-ku, Osaka-shi, Osaka 552-0021, Japan

Gas chromatography is a simple and quick method for determination of fatty acid methylesters. Fats and oils are converted into fatty acid methylesters by transesterification using ester exchange reagents for glycerides; 1.3~1.6 mol/l solution of phenyltrimethylammonium hydroxide (PTAH) in methanol, 5% solution of m-trifluoromethylphenyltrimethylammonium hydroxide (m-TFPTAH) in methanol or 0.2 mol/l solution of trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) in methanol. These are used as on-column methylesterification reagents for fatty acids. In this paper, some results of the transesterification and the on-column methylesterification with these reagents are compared.

1. 緒 言

実行関税率表において、部及び類の表題を見ると、第3部及び第3部第15類はともに、「動物性又は植物性の油脂及びその分解生成物、調製食用脂並びに動物性又は植物性のろう」と設けられており、油脂を15類に分類するにあたって、何ら問題はないように思われる。しかしながら、[関税率表の解釈に関する通則]にあるように、表題は単に参考上の便宜に過ぎず、分類は部注、類注、項の規定等に従ってなされることとなる。その結果、油脂の分類は、15類にとどまらず、実行関税率表上多岐に渡っているのが実情である。

例えば、カカオ脂は油脂であるにも拘わらず、15類ではなく18類に分類されることや、乳脂が油脂であるにも拘わらず、4類に分類されることなどは、分類される類そのものが大きく異なるよい例として挙げられる。

その他にも、油脂が分類に大きく関係するものの1つとして、調製食料品があり、含有する油脂の種類及び含有率により、その分類が異なることはよく知られている。

次に、油脂と同様に検討を行った脂肪酸については、29類のなかで分類される項が異なることは、説明するまでもないことである。

以上のことから、分類に当たって、油脂や脂肪酸の定性・定量分析は非常に重要となるが、定性分析を行なう場合、油脂に

おいてはその構成脂肪酸のメチルエステル化を 脂肪酸においてはそのメチルエステル化を各々行ない 生成した脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィー (GC) により分析し、油脂や脂肪酸を同定する方法が一般的に行われている。メチルエステル化については様々な方法があり 税関分析指針中にも幾つかの方法が記載されているが 基本的に油脂のメチルエステル化には、エステル基交換剤や酸・アルカリ触媒を用いて直接エステル交換する方法と 油脂をまずケン化分解して脂肪酸を得た後、その脂肪酸をオンカラムメチル化剤やジアゾメタン、酸触媒でエステル化する間接的な方法とが知られている。

いずれの方法を選択するかについては、必要とされる正確さ、時間的制約の有無、実験設備等多くの要因を考え合わせる必要があり、一概に言えるものではないが、安全かつ簡易・迅速の面に重点を置いて検討すると、まず触媒法については、反応後必要となる触媒除去等のステップ増加は、簡易・迅速に反するものであり、必然的に増加したステップ中の脂肪酸や脂肪酸メチルの損失が起こる他、付け加えれば、触媒過多の状況では、不飽和脂肪酸の不飽和部分がメトキシ化してしまうとの報告がある。

次にジアゾメタン法については、試料にジアゾメタンガスを導入する操作のみで簡易・迅速ではあるが、その強い反応性(非常に不安定である)ゆえに、ジアゾメタンガスは使用直前に調製することを必要とし、しかも有毒かつ強い爆発性を有する

ガスであるため危険をともない、操作には細心の注意を要する。これらのことを考えると、エステル基交換剤を用いた“油脂のエステル基交換によるメチルエステル化”，オンカラムメチル化剤を用いた“脂肪酸のオンカラムメチルエステル化”は、両法に対応可能な試薬が市販されており、試料と試薬の混合操作のみで容易に脂肪酸メチルエステルを生成し、閉鎖系での反応で揮発損失の心配もなく、しかも、GCに直接導入できるなど多くの利点があり、安全かつ簡易・迅速の観点において優れているものと思われる。そこで今回、両法に対応可能とされている試薬のうち幾つかのものについて実験を行い、比較・検討したので報告する。

2. 実験

2.1 試薬（市販試薬）

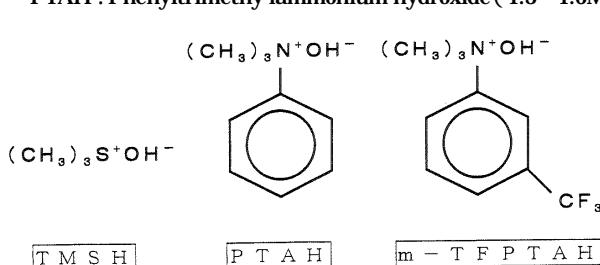
2.1.1 標準品

脂肪酸 3 種類（ミリスチン酸、パルミチン酸、オレイン酸）
脂肪酸メチルエステル 9 種類（カブリル酸、カブリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸の各メチルエステル）
トリステアリン酸グリセロール
トリオレイン酸グリセロール

油脂 3 種類（大豆油、菜種油、豚脂（adeps/suillus））

2.1.2 反応試薬（メタノール溶液・東京化成製）

TMSH : Trimethylsulfonium hydroxide (0.2M)
m-TFPTAH:m-Trifluoromethylphenyltrimethyl ammonium hydroxide (5%)
PTAH : Phenyltrimethyl ammonium hydroxide (1.3~1.6M)



2.2 装置

ガスクロマトグラフィー：島津 GC-15A (FID 検出器)
C-R4A (データ解析)

2.2.1 カラム

キャビラリーカラム

DB-WAX 0.25mm × 30m, 0.25 μm

カラム温度条件 : 100 10 /min 240 (6min)
条件 : 50 (5min) 10 /min 220
(8min)

注入口温度 : 250

検出器温度 : 300

キャリアーガス : He

線速度 40cm/sec スプリット比 25 : 1

パックドカラム

DEGS10%chromosorb W HP 3.0mm × 2m

カラム温度条件 : 50 (5min) 10 /min 220
(8min)

注入口温度 : 250

検出器温度 : 300

キャリアーガス : N₂50 ml/min

パックドカラム

Silicon OV - 101 3%Uniport HP3.0mm × 20cm

カラム温度条件 : 250 10 /min 350 (10min)

注入口温度 : 360

検出器温度 : 360

キャリアーガス : N₂50ml/min

2.3 方法

2.3.1 脂肪酸メチルエステルの検出に対する妨害要素の検討

脂肪酸メチルエステル標準品 9 種類 (C₈; カブリル酸, C₁₀; カブリン酸, C₁₂; ラウリン酸, C₁₄; ミリスチン酸, C₁₆; パルミチン酸, C_{18:0}; ステアリン酸, C_{18:1}; オレイン酸, C_{18:2}; リノール酸, C_{18:3}; リノレン酸の各メチルエステル) の混合物をメタノールに溶かして約 20mg/ml メタノール溶液 (脂肪酸メチルエステル混合重量比各 1) としたものを 0.2ml 取り、それに対して反応試薬を 0.2ml 加えた後 GC に注入し、反応試薬由来のピークによる脂肪酸メチルエステルの検出に対する妨害性について検討した。使用した GC 条件等については、DB-WAX カラム (カラム温度条件) 及び DEGS10% カラム (カラム温度条件) である。

2.3.2 脂肪酸のオンカラムメチルエステル化

脂肪酸標準品 3 種類 (C₁₄; ミリスチン酸, C₁₆; パルミチン酸, C_{18:1}; オレイン酸) の混合物をトルエンに溶かして約 20mg/ml トルエン溶液 (脂肪酸混合重量比 C₁₄:C₁₆:C_{18:1} = 1:2:4) としたものを 0.5ml 取り、それに対して反応試薬を 0.1ml 加えたもの、0.2ml 加えたもの、0.4ml 加えたものの 3 検体を作り、反応時間 0 分、30 分、60 分の順に GC に注入し、時間と試薬量に対する反応の進行程度について検討した。使用した GC 条件等については DB-WAX カラム (カラム温度条件) である。

2.3.3 トリグリセリドのエステル基交換メチルエス

テル化

トリグリセリド標準品 2 種類 (トリステアリン酸グリセロール、トリオレイン酸グリセロール) の混合物をトルエンに溶かして約 20mg/ml トルエン溶液 (混合重量比 1:1) としたものを 0.5ml 取り、それに対して反応試薬を 0.05ml 加えたもの、0.1ml 加えたもの、0.2ml 加えたもの (m-TFPTAH については 0.1ml 加えたもの、0.2ml 加えたもの、0.4ml 加えたもの) の 3 検体を作り、反応時間 0 分、30 分、60 分の順に GC に注入し、時間と試薬量に対する反応の進行程度について検討した。使用した GC 条件等については、DB-WAX カラム (カラム

温度条件) 及び OV - 101 カラム (カラム温度条件)(未反応油脂確認用) である。

2.3.4 油脂のエステル基交換メチルエステル化
脂肪酸のオンカラムメチルエステル化及びトリグリセリドのエステル基交換メチルエステル化を検討した結果、適当と考えられる条件で、油脂標準品 3 種類 (大豆油、菜種油、豚脂) 各々の約 10mg/0.5ml トルエン溶液に対して反応試薬を加え、時間と試薬量に対する反応の進行程度について検討した。使用した GC 条件等については、DB - WAX カラム (カラム温度条件) 及び OV - 101 カラム (カラム温度条件)(未反応油脂確認用) である。

3. 結果及び考察

3.1 脂肪酸メチルエステルの検出に対する妨害要素

脂肪酸のオンカラムメチルエステル化について、その反応機構を Scheme 1 に示した。すなわち、反応試薬と脂肪酸を混合した場合には、酸である脂肪酸と塩基である反応試薬が中和反応を起こし、塩を生じる。生成した塩は、GC に注入する際、熱分解を受け、この時初めて目的とする脂肪酸メチルエステルを生じることとなる。次に油脂のエステル基交換メチルエステル化について、その反応機構を Scheme 2 に示した。反応試薬とトリグリセリドを混合した場合には、エステル基交換反応が起こり、トリグリセリド構成脂肪酸のメチルエスルを生成し、そのままで GC に注入することとなるが、この時、反応試薬そのものも注入され、熱分解されることとなる。いずれの場合も、目的とする脂肪酸メチルエステルの他に、同じ熱分解生成物を

生じる。

各反応試薬と脂肪酸メチルエステルを混合し、GC に注入した結果は Fig.1 に示したとおりである。m - TFPTAH を混合した場合、熱分解生成物のピークにより C_{10} メチルエステルのピーク検出が妨害を受け、PTAH を混合した場合には、熱分解生成物のピークにより C_{10} メチルエステルのピーク検出が妨害を受ける他、 C_{12} 、 C_{14} メチルエステルのピークがショルダーピークとなる等の影響がある。

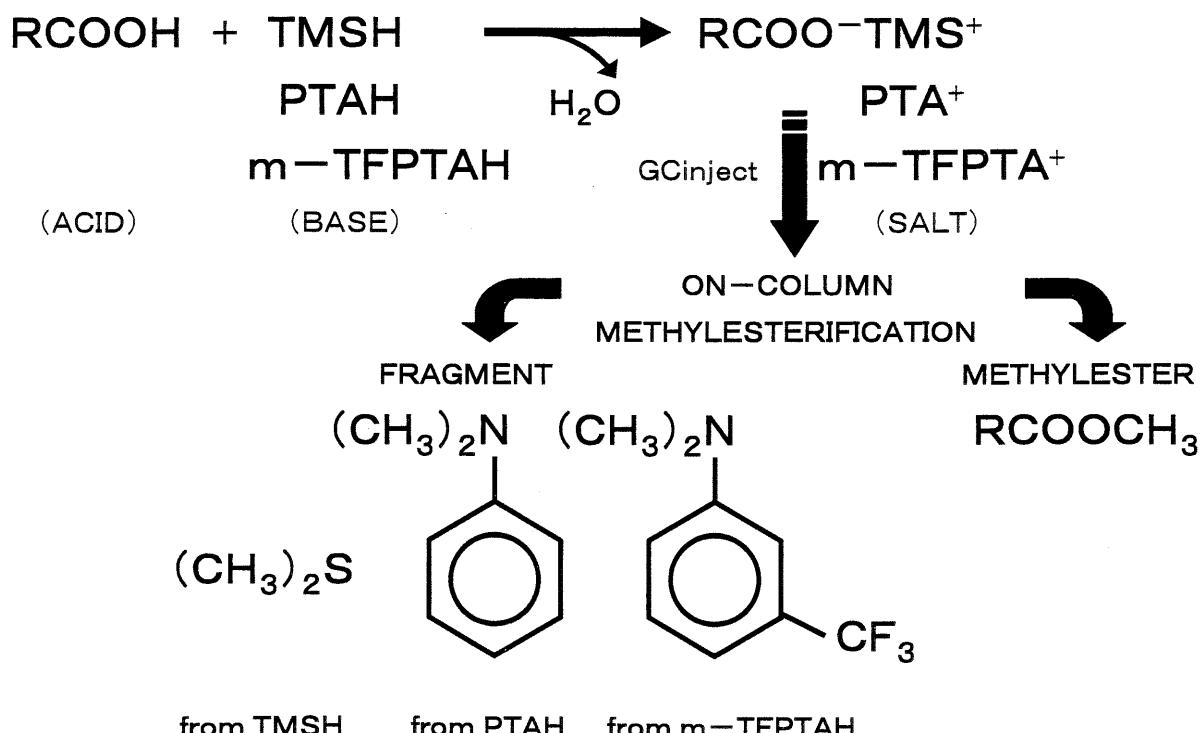
それに対し、TMSH を使用した場合、熱分解生成物のピークによる大きな妨害もなく、良好な結果が得られた。

3.2 脂肪酸のオンカラムメチルエステル化

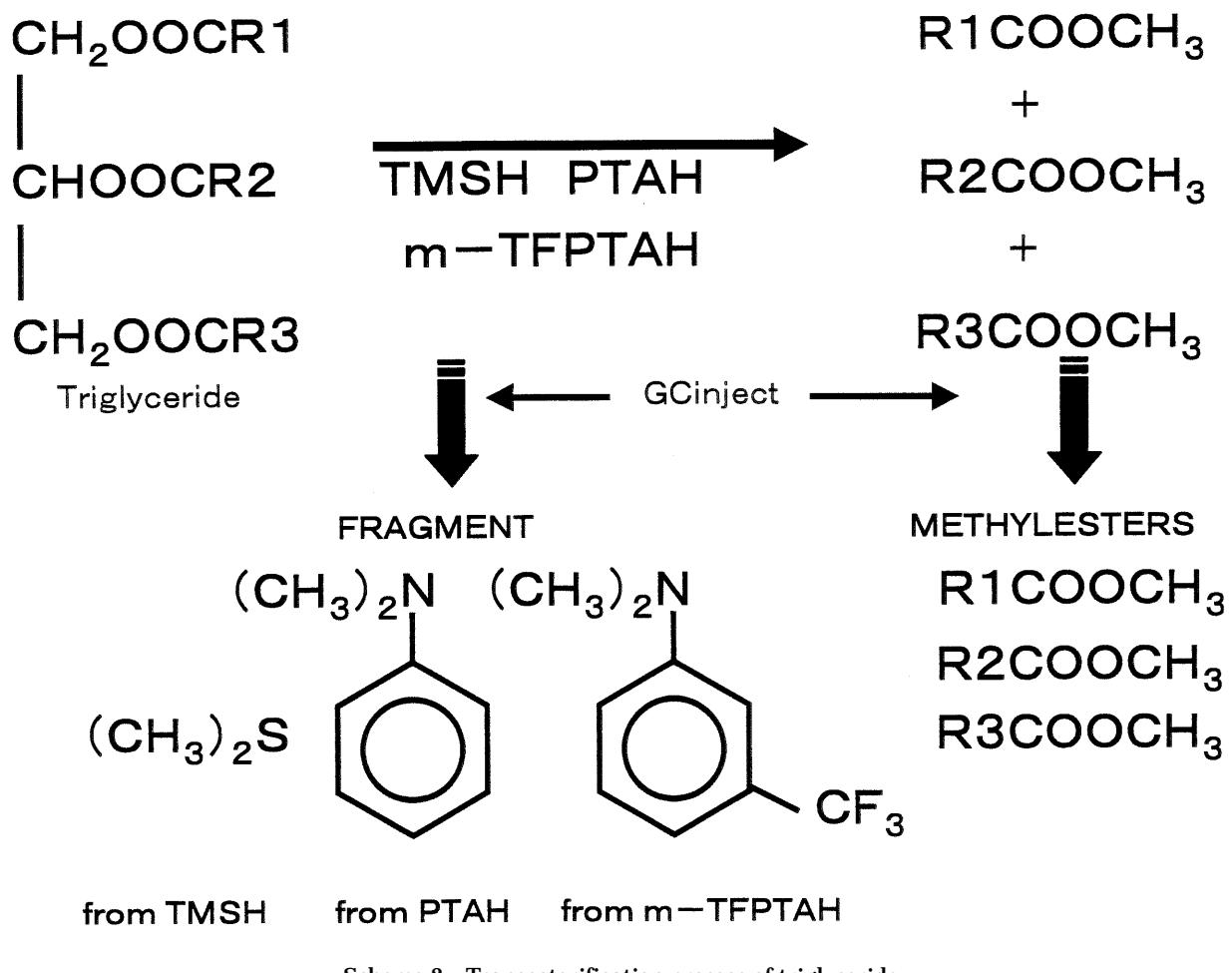
実験の結果は Table 1 に示したとおりであるが、未反応脂肪酸の有無については、DB - WAX カラムを使用した場合、同一のチャート上で確認出来るので、反応後の未反応脂肪酸の量を目安程度に言葉で記載することとした。一番右端の参考欄の数字は、既に確立されているジアゾメタン法による結果で、標準として比較するために実験を行ったものであり、また m - TFPTAH による結果については上手く反応せず、GC による検出は微弱若しくは不可能であったために Table 1 に記載することなく省略した。

PTAH や TMSH については、反応試薬量 0.1ml の場合、脂肪酸の一部が未反応のまま残り、生じた脂肪酸メチルエステルにも標準との差異が生じている。その上、PTAH では液層分離も見られた。

しかし、反応試薬が 0.2ml 以上では、反応は混合後すぐ終了し、生成した各脂肪酸メチルエステルの含有率もほぼ一定で、良好な結果が得られたことから、脂肪酸のオンカラムメチルエ



Scheme 1 On-column methylesterification process of fatty acids



Scheme 2 Transesterification process of triglyceride

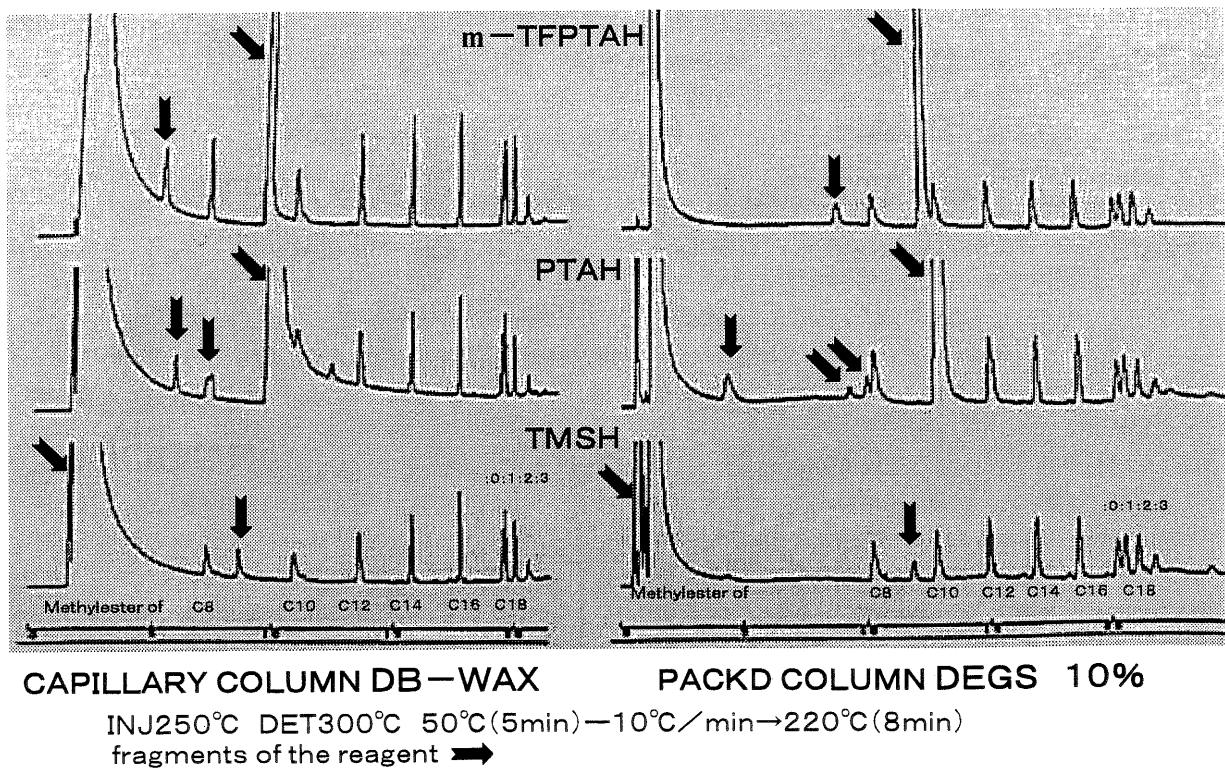


Fig.1 Gas chromatograms of methylesters with reagent

Table 1 Analytical data of on-column methylesterification at fatty acids

reagent value	0. 1 ml			0. 2 ml			0. 4 ml			ref.
reaction time (min)	0	30	60	0	30	60	0	30	60	
C 14 methylester %	25.6	25.4	25.7	29.3	29.6	29.8	29.3	29.3	28.7	29.6
C 16 methylester %	59.3	59.4	59.5	56.6	56.7	56.6	55.7	55.8	55.8	55.9
C 18:1 methylester %	15.1	15.2	14.8	14.1	13.7	13.6	15.0	14.9	15.5	14.5
acid value (residue)	about half			no residue						
PTAH										
C 14 methylester %	27.3	26.8	27.1	29.2	29.3	28.8	29.3	28.3	28.8	29.6
C 16 methylester %	58.9	59.3	59.2	56.8	56.6	56.8	56.7	56.2	55.9	55.9
C 18:1 methylester %	13.8	13.9	13.7	14.0	14.1	14.4	14.3	15.5	15.3	14.5
acid value (residue)	about half			no residue						
TMSH										

ステル化に必要な反応試薬量は 0.2ml(ただし m - TFPTAH は不可能) であることが分かった。

3.3 トリグリセリドのエステル基交換メチルエステル化油脂のエステル基交換メチルエステル化を行うに際し、適当な反応条件をさぐるため、純粋なトリグリセリドのエステル基交換メチルエステル化についてまず検討することとした。

m - TFPTAH による結果を Table 2 に、PTAH による結果を Table 3 に、TMSH による結果を Table 4 に示した。

最初に m - TFPTAH を使用した方法であるが、このものについては、その反応条件について税関分析指針に既に記載、確立されている。その条件は、油脂 10mg/0.5ml トルエン溶液に対し m - TFPTAH を 0.2ml 加え 30 分後 GC に注入するもの

Table 2 Analytical data of transesterification with m-TFPTAH at triglyceride

reagent value	0. 1 ml			0. 2 ml			0. 4 ml		
reaction time (min)	0	30	60	0	30	60	0	30	60
C 18:0 methylester %	not detect	42.6	40.3	41.1	38.6	38.5	37.3	37.6	38.8
C 18:1 methylester %	not detect	57.4	59.7	58.9	61.4	61.5	62.7	62.4	61.2
triglyceride value (residue)	many	many	half	half	little	little	little	little	little

Table 3 Analytical data of transesterification with PTAH at triglyceride

reagent value	0. 05ml			0. 1ml			0. 2ml		
reaction time (min)	0	30	60	0	30	60	0	30	60
C 18 : 0 methylester %	38.2	38.0	36.6	38.2	37.7	37.9	37.3	39.9	39.0
C 18 : 1 methylester %	61.8	62.0	63.4	61.8	62.3	62.1	62.7	60.1	61.0
triglyceride value (residue)	half	little		little			little		

Table 4 Analytical data of transesterification with TMSH at triglyceride

reagent value	0. 05ml			0. 1ml			0. 2ml		
reaction time (min)	0	30	60	0	30	60	0	30	60
C 18 : 0 methylester %	38.3	40.2	39.8	37.9	40.0	40.1	38.0	39.4	37.8
C 18 : 1 methylester %	61.7	59.8	60.2	62.1	60.0	59.9	62.0	60.6	62.2
triglyceride value (residue)	little			little			little		

で、同条件部分の結果を標準値として比較すると、確かにそれ以上の反応時間や反応試薬量で、生じた脂肪酸メチルエステルの含有率やほぼ一定であったことから、反応試薬量 0.2ml、反応時間 30 分が適当であることを確認する結果となった。

次に PTAH では、いずれの反応条件においても、標準値とほぼ同一であり良好な結果であったが、反応試薬量 0.05ml 及び 0.1ml の場合、液層が分離してしまうことから常に攪拌が必要となり、GC 注入に際してもよく攪拌して均一化した後注入する等の注意が必要となるため、反応試薬量 0.2ml、反応時間 0 分が適当と考えられた。

そして TMSH であるが、PTAH 同様いずれの反応条件においても、標準値とほぼ同一であり良好な結果となり、しかも、PTAH のような液層分離も見られなかった。このことから考えれば適当な条件は、反応試薬量 0.05ml、反応時間 0 分となった。

3.4 油脂のエステル基交換メチルエステル化

以上の結果、10mg/0.5ml トルエン溶液とした脂肪酸やトリグリセリドを PTAH や TMSH によりメチルエステルとするためには、反応試薬は 0.2ml 必要（ただし m - TFPTAH は脂肪酸のオンカラムメチルエステル化は不適当）であった。

そこで油脂に対する反応試薬量は 0.2ml とし、反応試薬添加後、PTAH と TMSH について反応時間 0 分と 30 分の 2 回 GC に注入した。m - TFPTAH についても比較するための標準として同じ反応試薬量で実験を行ない、30 分と 60 分の 2 回 GC に注入した。

大豆油に対する結果を Table 5 に、菜種油に対する結果を Table 6 に、豚脂に対する結果を Table 7 に示した。比較標準とした m - TFPTAH による結果では、反応時間 30 分のものと 60 分のものでは予想どおり特に違いは見られなかった。そこで、m - TFPTAH の反応時間 30 分の数字を標準として PTAH と TMSH について、反応時間 0 分のものと 30 分のものの両方の結果を比較したが、いずれの場合も、ほぼ同一

Table 5 Analytical data of transesterification with m-TFPTAH, PTAH, TMSH at soybean oil

reagent	m-TFPTAH		PTAH		TMSH	
reaction time (min)	30	60	0	30	0	30
C 16 : 0 methylester %	10.9	11.0	10.6	10.6	11.0	10.6
C 18 : 0 methylester %	4.2	4.0	4.1	4.1	4.0	4.1
C 18 : 1 methylester %	22.5	22.4	23.0	23.0	22.7	22.9
C 18 : 2 methylester %	54.4	54.6	54.5	54.6	54.5	54.6
C 18 : 3 methylester %	8.0	8.0	7.8	7.7	7.8	7.8
triglyceride value (residue)	many	half	little		little	

Table 6 Analytical data of transesterification with m-TFPTAH, PTAH, TMSH at rape seed oil

reagent	m-TFPTAH		PTAH		TMSH	
reaction time (min)	30	60	0	30	0	30
C 16 : 0 methylester %	4.7	4.8	4.7	4.7	4.5	4.6
C 18 : 0 methylester %	1.9	1.8	1.8	1.7	1.6	1.8
C 18 : 1 methylester %	57.8	57.7	58.4	58.4	58.2	58.0
C 18 : 2 methylester %	24.1	24.3	24.1	24.2	24.3	24.3
C 18 : 3 methylester %	9.8	10.0	9.6	9.5	10.0	9.7
C 22 : 1 methylester %	1.7	1.4	1.4	1.5	1.4	1.6
triglyceride value (residue)	many	many	little		little	

Table 7 Analytical data of transesterification with m-TFPTAH, PTAH, TMSH at pig (adens suillus) oil

reagent	m-TFPTAH		PTAH		TMSH	
reaction time (min)	30	60	0	30	0	30
C16:0 methyl ester %	4.7	4.8	4.7	4.7	4.5	4.6
C18:0 methyl ester %	1.9	1.8	1.8	1.7	1.6	1.8
C18:1 methyl ester %	57.8	57.7	58.4	58.4	58.2	58.0
C18:2 methyl ester %	24.1	24.3	24.1	24.2	24.3	24.3
C18:3 methyl ester %	9.8	10.0	9.6	9.5	10.0	9.7
C22:1 methyl ester %	1.7	1.4	1.4	1.5	1.4	1.6
triglyceride value (residue)	many	many	little		little	

で、良好な結果が得られた。

従って、PTAH と TMSH の反応試薬量 0.2ml で、反応時間は 0 分で充分である結果となった。

4. 要 約

今回、m-TFPTAH, PTAH, TMSH の 3 種類の反応試薬について、油脂のエステル基交換によるメチルエステル化、脂肪酸のオンカラムメチルエステル化を行い、比較・検討したが、分析操作をより簡便にするために、分析試料の調製方法を統一して 10mg/0.5ml トルエン溶液とした。

その結果、m-TFPTAH は、脂肪酸のオンカラムメチルエス

テル化に使用するのは不適当かつ C₁₀ メチルエステルのピーク検出を妨害することが判明した。

PTAH は反応試薬量 0.2ml、反応時間 0 分で良好な結果が得られたが熱分解生成物のピークによる C₁₀ メチルエステルのピーク検出が妨害を受ける他、C₁₂, C₁₄ メチルエステルのピークがショルダーピークとなる等の影響があることが判明した。

それらに対して、TMSH は反応試薬量 0.2ml、反応時間 0 分で良好な結果が得られ、熱分解生成物のピークによる大きな妨害もないことが確認された。

以上より、脂肪酸及び油脂の簡易・迅速かつ安全なメチルエステル化法として、TMSH 試薬による方法が優れていると考えられる結果となった。

文 献

- 1) 土屋 知太郎, 浅原 照三, 橋本 哲太郎ら: 油化学, 19, 337 (1970)
- 2) 清野 肇, 千原 直子, 渡辺 昭一郎: 油化学, 24, 59 (1975)
- 3) 磯部 次男, 清野 肇, 渡辺 昭一郎: 油化学, 26, 236 (1977)
- 4) W. Butte: J. Chromatogr., 261, 142 (1983)
- 5) Harald Farber and Heinz F. Scholer: J. Agric. Food Chem., 41, 217 (1993)
- 6) David G. B. Boocock, Samir K. Konar, V. Mao, C. Lee, and Sonia Buligan: J. Am. Oil Chem. Soc., 75, 1167, (1998)
- 7) ガスクロマトグラフィー応用データ集 (株式会社島津製作所)
- 8) GC DERIVATIZING REAGENTS (東京化成工業株式会社)