

ガスクロマトグラフィーによる乳脂肪の定量分析法について

松岡 夏実*, 小川 浩史*, 馬越 秀一*, 松本 啓嗣*

Quantitative determination of milk fat content in mixed fats by gas chromatography

MATSUOKA Natsumi*, OGAWA Hirofumi*, UMAKOSHI Shuichi*, and MATSUMOTO Yoshitsugu*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba, 277-0882 Japan

For quantitative determination of milk fat content in mixed fats in customs laboratories, the least squares method for triglyceride composition of fats separated by gas chromatography is used. However, this method requires complicated calculations and involves the risk of not being able to attain quantitative reproducibility and accurate results. To avoid such problems, we used a quantitative analytical method using butyric acid, a specific component of milk fat, as an indicator. We determined the butyric acid content as propyl butyrate by capillary gas chromatography using propyl esterification instead of methyl esterification, which causes loss of short chain methyl esters during sample preparation. As a result, it was proven possible to perform a quantitative analysis of milk fat content with minor errors in prepared fats, achieving superior reproducibility.

1. 緒 言

乳脂肪とその他の油脂からなる混合油脂（以下、「混合油脂」という。）は、主に調製食料品として第 2106.90 号に分類されるが、乳脂肪の含有率によって関税分類が異なり、その税率格差は非常に大きい。また、混合油脂は関税割当制度の対象品目でもあることから、適正に関税分類することが重要であり、乳脂肪の定量を正確に行うことが税関分析において必要とされている。

現在、税関における混合油脂中の乳脂肪の定量は、主にガスクロマトグラフィーによって得られたトリグリセリド組成のピーク面積比から最小二乗法により算出する方法（以下、「現行法」という。）を用いている。この方法では、混合油脂に含まれるすべての原料油脂を入手する必要があるが、また、トリグリセリドのクロマトグラムが複雑であるため、定量の再現性や正確性に課題が残っている。

他の定量法としては、乳脂肪に特異的な脂肪酸である酪酸を指標とした定量法（以下、「酪酸法」という。）や、油脂の構成脂肪酸をガスクロマトグラフ（以下、「GC」という。）で分離し、脂肪酸の組成比から最小二乗法により求める方法（以下、「脂肪酸組成法」という。）などが知られている。現行法及び脂肪酸組成法は混合油脂の原料すべてを入手する必要があるが、3 成分以上の混合油脂には適用できないのに対し、酪酸法は原料乳脂肪さえ入手できればよく、3 成分以上の混合油脂であっても定量可能であるため有用性が高い方法であり、東内らは高速液体クロマトグラフィーによる酪酸法の定量分析について報告している¹⁾。

一方、岩下らは GC を用いて現行法、酪酸法及び脂肪酸組成法について定量精度の比較を行い、酪酸法は他の二法と比較して僅かながら誤差及び変動係数が大きくなる傾向があると報告してい

る²⁾が、このとき油脂から脂肪酸エステルを得る方法として利用したのが、油脂の組成分析で一般的なメチルエステル化である。しかし、酪酸のような短鎖脂肪酸を含有する油脂のメチルエステル化は、エステル交換後の抽出操作における損失が大きいため、不適当であるとの報告があり³⁾、基準油脂分析試験法 2.4.1 においても酪酸を含む油脂に適用できないことが明記されている⁴⁾。

このようにメチルエステル化が適用できない乳脂肪等については、基準油脂分析試験法の参考法においてプロピルエステル化を用いるよう規定されている⁵⁾。しかし、当試験法に規定されているのは脂肪酸組成の定量のためのプロピルエステル化法であるため、特定の脂肪酸の定量を行うには内標準物質の添加や定容操作を追加する必要がある。越らは、混合油脂について、エステル交換により生じた酪酸プロピルを分離定量しているが、この方法は現在一般的でないパックドカラムを使用したものであり、定量精度はあまり良くない⁶⁾。そこで、本研究ではこの参考法に準拠して油脂の構成脂肪酸をプロピルエステル化し、税関に配備されているキャピラリーカラムを装備した GC を用いて混合油脂中の乳脂肪の定量を行ったところ、いくつかの知見が得られたので報告する。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

乳脂肪	: 輸入品
パーム油	: 工業用, 和光純薬
ヤシ油	: 一級, 和光純薬
o-ジクロロベンゼン, 水酸化カリウム, 塩化ナトリウム, 酢酸, 1-プロパノール, ヘキサン	: 特級, 和光純薬

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

硫酸ナトリウム : 特級, 関東化学
 酪酸プロピル : 純度 99%, ARDRICH

2.2 装置及び測定条件

装置 : Agilent 7890B (GC)
 カラム : DB-5MS (30 m× 0.25 mmI.D. ×0.25 µm)
 注入口温度 : 250°C
 注入量 : 3 µl
 スプリット比 : 100:1
 カラム温度 : 80°C(3 min)-20°C/min-200 °C(0 min)-10 °C/min
 -300°C(5 min)
 線速度 : 30 cm/s
 検出器 : FID, 250°C

2.3 実験方法

2.3.1 内標準物質の検討

本研究では、汎用の微極性カラムである DB-5 又は DB-5MS を用いて分析を行うため、微極性カラムでの分離に適する物質として炭化水素（炭素数 8-12）及び芳香族化合物（1,2,4-トリメチルベンゼン及び *o*-ジクロロベンゼン）などを検討した。これらの物質はエステル交換時に水酸基及びカルボキシル基と反応を起こさず、また、オクタノール-水分配係数がいずれも酪酸プロピルと同程度以上であることから、有機層に十分に抽出できると考えられる。

2.3.2 乳脂肪の定量

2.3.2(1) 内標準溶液の調製

2.3.1 で選択した内標準物質 0.1 g 及び 1 g を別の 50 ml メスフラスコに精秤し、ヘキサンで定容したものをそれぞれ試料用及び検量線用の内標準溶液とした。

2.3.2(2) 試料検液調製

乳脂肪約 0.5 g を加温し融解して 10 ml メスフラスコに精秤し、試料用内標準溶液で定容し、この 2 ml を密栓可能なスクリーバイアル (13.5ml) に分取した。2.5%水酸化カリウム-1-プロパノール

ル溶液 500 µl を加え、数秒間ボルテックスミキサーで攪拌した。さらに酢酸 15 µl, 飽和食塩水 1 ml を順に加え、その都度内容液をボルテックスミキサーで攪拌した。数分間室温に静置した後、ヘキサン層を採取し、無水硫酸ナトリウムで脱水したものを GC 検液とした。

2.3.2(3) 検量線の作成

酪酸プロピル 1 g を 200 ml メスフラスコに精秤し、ヘキサンで定容して標準原液とした。これを 25 ml メスフラスコにそれぞれ 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ml 採り、検量線用内標準溶液を 2.5 ml ずつ加えた後、ヘキサンで定容し標準溶液とした。これらを測定し、酪酸プロピルと内標準物質の濃度比及びピーク面積比から検量線を作成した。なお、ピーク面積比は 3 回の測定の平均値を用いた。

2.3.2(4) 繰返し性及び再現性の確認

2.3.2(2)に従って 6 検体の試料を調製し、3 回ずつ測定を行い、得られたピーク面積比から 2.3.2(3)で作成した検量線を用いて各検体の酪酸プロピル濃度を求め、プロピルエステル化の再現性の確認を行った。また、そのうちの 1 検体について 5 回繰り返し測定を行い、繰返し性の確認を行った。

2.3.2(5) 混合油脂における乳脂肪の定量

Table 1 に示す割合で、乳脂肪に植物油脂（パーム油、ヤシ油）を添加した油脂について、2.3.2(2)と同様の手順で調製し、測定を行った。得られたピーク面積比から、検量線を用いて酪酸プロピル濃度を算出し、2.3.2(4)で求めた乳脂肪中の酪酸プロピル濃度の平均値と比較することで定量を行った。

Table 1 Mixture rates of prepared fats

No.	Milk fat (%)	Palm oil (%)	Coconut oil (%)
1	70	30	-
2	70	-	30
3	30	20	50

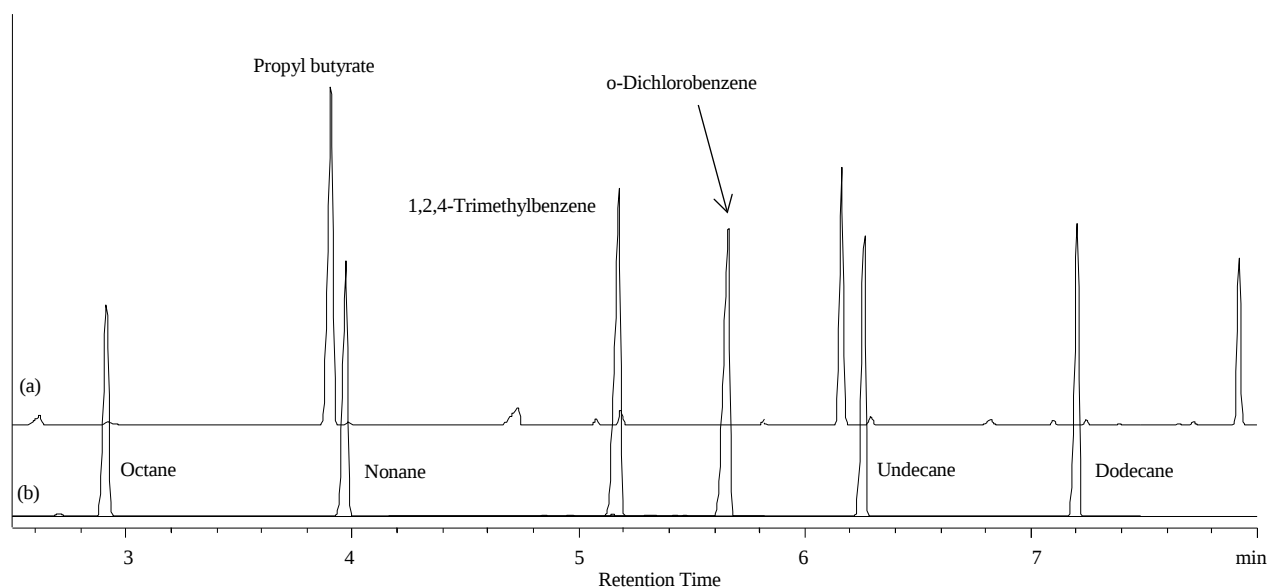


Fig. 1 Gas chromatogram of (a)propyl ester derivatives of milk fat and (b)internal standards

3. 結果及び考察

3.1 内標準物質の検討

内標準物質候補及びプロピルエステル化した乳脂肪のクロマトグラムを Fig. 1 に示す. 乳脂由来のいずれのピークとも重ならず, 酪酸プロピルと近い保持時間で検出された *o*-ジクロロベンゼンを内標準物質とした.

3.2 乳脂肪の定量

3.2.1 検量線

2.3.2(3)に従い作成した検量線を Fig. 2 に示す. 検量線は酪酸プロピル濃度 0.2-3.2 mg/ml の範囲において, 原点付近を通る良好な直線性を示した.

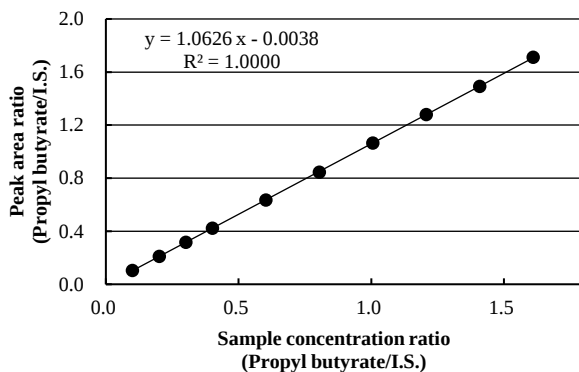


Fig. 2 Calibration curve for milk fat content (I.S.=*o*-dichlorobenzene)

3.2.2 再現性及び繰返し性

Table 2 及び Table 3 に, ピーク面積比から求めた酪酸プロピル濃度の再現性及び繰返し性の確認を行った結果を示す. 再現性, 繰返し性ともに良好な結果が得られた.

Sample No.	Propyl butyrate content rate (%)
1	5.71
2	5.71
3	5.70
4	5.72
5	5.71
6	5.70
Average	5.71
S.D.	0.0063
C.V.(%)	0.11

Table 3 Repeatability of a sample

Measurement	Propyl butyrate content rate (%)
1st	5.71
2nd	5.72
3rd	5.72
4th	5.71
5th	5.70
Average	5.71
S.D.	0.0088
C.V.(%)	0.15

3.2.3 2 種混合油脂における乳脂肪の定量

3.2.1 で作成した検量線を用いて, 2 種混合油脂中の乳脂肪の定量を行った. 各混合油脂について 4 検体ずつ調製し, 各検体につき 3 回の測定を行い, その平均値から乳脂肪含有率を算出した. また, 実際の乳脂肪使用重量に対する, 酪酸プロピル濃度から求めた乳脂肪実測重量の割合を回収率として算出した. これらの結果を Table 4 に示す. いずれの場合においても, 実際の乳脂肪含有率と定量値の誤差は 0.4% 以内であり, 回収率及び変動係数についても良好な結果が得られた. なお, 乳脂肪, パーム油及びヤシ油のプロピルエステル化物のガスクロマトグラムを Fig. 3 に示す

Table 4 Analytical results of milk fat content for prepared fats No.1 and 2 (n=4)

No.	Added fat	Milk fat content(%)			
		Actual	Determined	Recovery rate	C.V.
1	Palm oil	69.42	69.11	99.55	0.032
2	Coconut oil	69.92	69.57	99.50	0.138

3.2.4 3 種混合油脂における乳脂肪の定量

3.2.3 と同様に 3 種混合油脂中の乳脂肪の定量を行った結果を Table 5 に示す. 実際の含有率と定量値の誤差は 4 検体平均で 0.1% であり, 変動係数は 2 種混合油脂の場合より大きいものの, 良好な結果が得られた.

Table 5 Analytical results of milk fat content for prepared fats No.3 (n=4)

Added fat content(%)		Milk fat content(%)			
Coconut oil	Palm oil	Actual	Determined	Recovery rate	C.V.
49.48	19.50	31.02	31.12	100.33	0.278

4. 要 約

本研究では, 基準油脂分析試験法に規定された参考法に準拠した方法により, 乳脂肪を含む混合油脂の構成脂肪酸をプロピルエステル化し, DB-5MS カラムを装備した GC を用いて混合油脂中の乳脂肪由来の酪酸プロピルを定量することで乳脂肪の定量を行った.

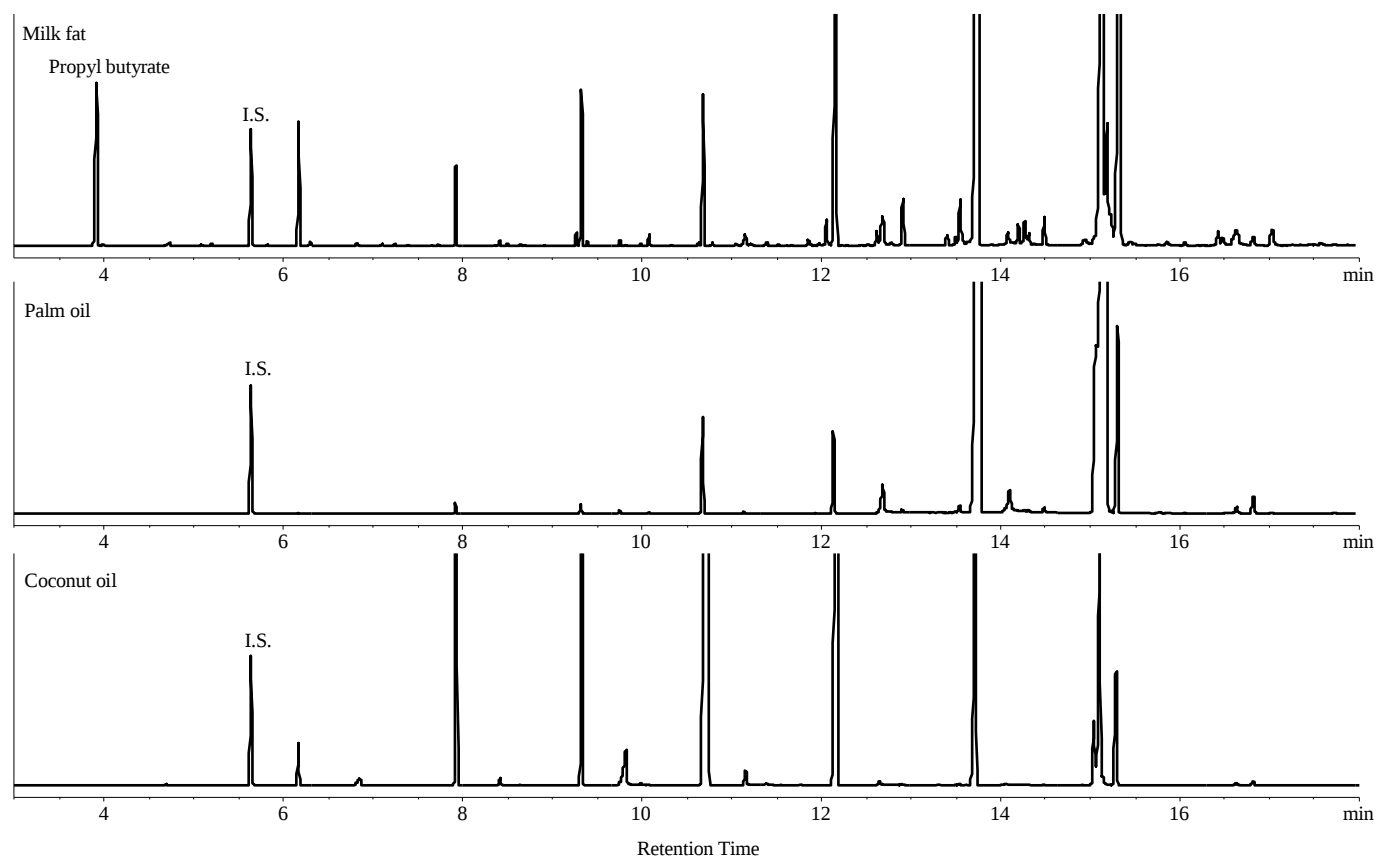


Fig. 3 Gas chromatogram of propyl ester derivatives of fats (I.S. = o-dichlorobenzene)

乳脂肪にパーム油及びヤシ油を加えた2種及び3種の混合油脂について、上記の方法で乳脂肪分を算出したところ、いずれも誤

差の小さい定量が可能であり、変動係数も0.3%以内の良好な再現性を示した。

文 献

- 1) 東内一博, 早川彬, 平本秀和, 氏原寛: 関税中央分析所報, **51**, 39(2011)
- 2) 岩下伸行, 積田優一郎, 樋野千寿, 寺内豊, 辻恵美, 熊澤勉: 関税分析中央所報, **47**, 25(2007)
- 3) 磯部次男, 清野肇, 渡辺昭一郎: 油化学, **28**, 109(1979)
- 4) 日本油化学会編: "基準油脂分析試験法(Ⅰ)", 基準法2.4.1(2013)
- 5) 日本油化学会編: "基準油脂分析試験法(Ⅰ)", 参考法2.2.2.2-2016(2016)
- 6) 越膳昭, 出来三男: 関税中央分析所報, **15**, 111(1975)