

ノート

ガスクロマトグラフィーによるさめ肝油中の スクアレンの定量方法の迅速化について

桜井輝孝^{*}, 中込昇^{**}, 越膳昭^{*}, 大沢邦夫^{***}

Rapid Determination of Squalene in Shark Liver Oils by Gas Chromatography

Terutaka SAKURAI^{*}, Noboru NAKAGOME^{**},
Akira ECHIZEN^{*} and Kunio OHSAWA^{***}

^{*}Yokohama Customs Laboratory, 1-1, Kaigandori,
Naka-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken, 231 Japan

^{**}Formerly, Yokohama Customs Laboratory

^{***}Present address : Honmoku Wharf Sub-Branch,
Yokohama Customs, 2, Honmoku-futo, Naka-ku,
Yokohama-shi, Kanagawa-ken, 231 Japan

Rapid gas chromatographic determination of squalene in shark liver oils has been investigated.

Squalene was separated by using a 2 m glass column packed with 2% OV-101 and at 260°C. Squalane was used as the internal standard. Squalene content was obtained rapidly by one point calibration curve method or normalized calibration curve method within 1% range of accuracy compared with the ordinary method.

Standard solutions for calibration curve and solutions were not effected by the storage under the room temperature for two weeks. In this case, hexane solution is recommended.

- Received Aug. 24, 1983 -

1 緒言

さめ肝油は、フィリピン、インドネシアなど、東南アジア方面から輸入され、多量に含まれるスクアレンは、主として、化粧品基材、食品、潤滑油等に使用される。

このさめ肝油の関税率表の分類はスクアレンの含有量によって規定されるため、境界値（スクアレン含有量 90%）近辺のものの分析には慎重を要する。

ガスクロマト法によるスクアレンの分離定量については、すでに出来ら¹⁾が、カラム充てん剤の検討、内部標準物質の選定、グリセリド、ステロイド等の妨害物質の検討など、基礎的な研究を報告しており、著者らもそれらの諸条件をそのまま利用し良好な結果を得てきたところである。

ガスクロマト法における内部標準法は、修正面積

* 横浜税關 輸入部分析室 〒231 横浜市中区海岸通り1の1

** 前、横浜税關 輸入部分析室

*** 現、横浜税關 本牧埠頭出張所

百分率法や、絶対検量線法と比較して、精度の高い定量ができ、ガスクロマト法では、最も確かな定量方法と考えられる。しかし、その反面、その都度検量線を作成したり、標準物質を添加するなど操作の上で若干手間を必要とするので、より簡便な方法にするため、検量線の直線性、安定性及び、内部標準（スクアレン）を含むスクアレンの検量線用溶液、さめ肝油液の経時変化等について、検討したところ、二、三の知見を得たので報告する。

2 実験方法

2・1 試薬、装置及び分析条件

標準スクアレン：純度 98% min. 東京化成工業

KK

標準スクアラン：純度 98% min. 東京化成工業

KK

さめ肝油：スクアレン含有量の異なる 10 種の輸入品を用いた。

ガスクロマトグラフ：島津 GC-7A 島津製作所製

データ処理：島津 C-RIB, 島津製作所製

充てんカラム：OV-101, 2% Chromosorb W-AW 60/80 mesh, 2m × 3mm ガラスカラム

カラム温度：260, 気化室温度：300

検出器温度：300, キャリヤーガス：N₂ 60ml/min.

検出器：FID

2・2 輸入さめ肝油の赤外線吸収スペクトル

Fig.1 の(1)は、標準スクアレン、(2)及び(3)はさめ

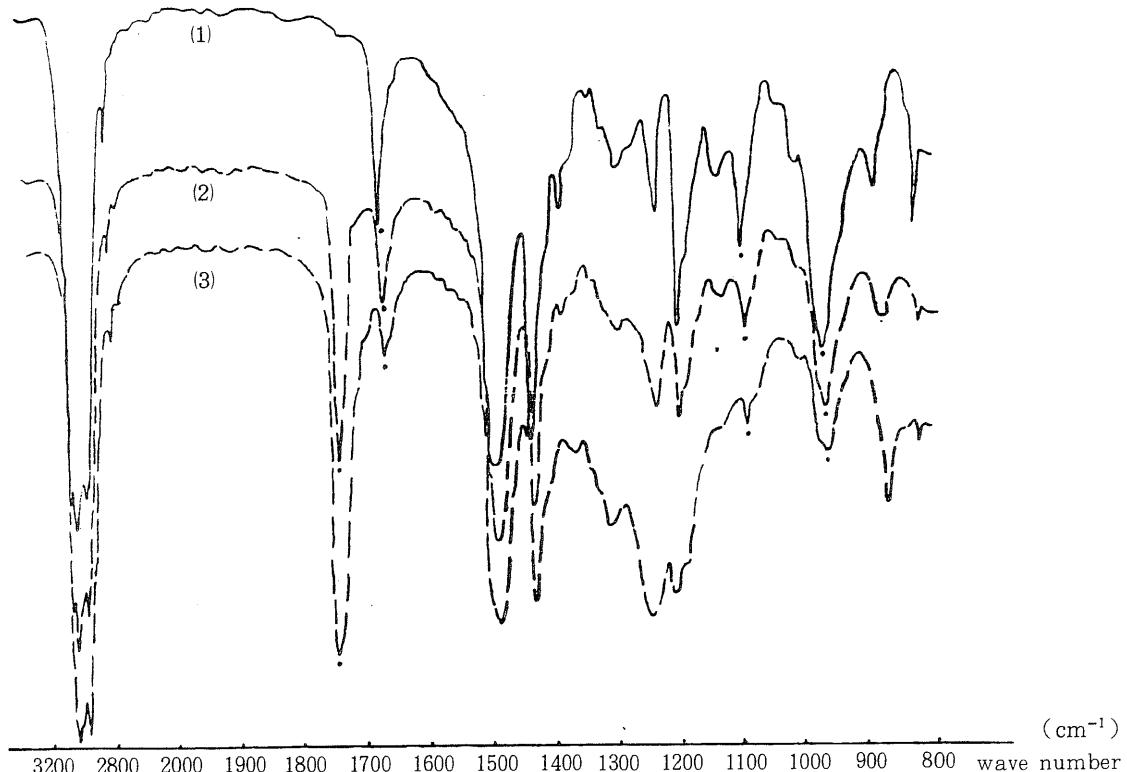


Fig.1 Infrared spectra of squalene and shark liver oil .

(1) : Standard squalene

(2) : Shark liver oil (Squalene content : 82.6%)

(3) : Shark liver oil (Squalene content : 45.2%)

ノート ガスクロマトグラフィーによるさめ肝油中のスクアレンの定量方法の迅速化について

肝油(輸入試料)の赤外線吸収スペクトルの1例を示したものである。

Fig.1(2)ならびに(3)はスクアレンのほか、トリグリセリドによる吸収が認められる。1670cm⁻¹, 970cm⁻¹, 830cm⁻¹, 付近の吸収は、スクアレンの含有量の高いものほど強く、逆に、1740cm⁻¹では弱くなる傾向にあり、これらの吸収帯の強弱、さめ肝油の透明度等から、ガスクロマトグラフへ注入する前に、あらかじめスクアレンのおよその含有量を知ることは、試料の採取量の決定及び検量線法の選定等の点から望ましい。

2・3 検量線の作成

標準スクアレン(X)、及び標準スクアラン(S)を既知量比(重量比)X:Sを含む試料3種類(0.5g:0.5g, 0.375g:0.5g, 0.25g:0.5gの3点)をヘキサン約5~6mlに溶解(濃度15~20%)し、それぞれについて0.1~0.2μlをガスクロマトグラフに注入して、クロマトグラムをとり、ピーク面積Ax, Asを測る。横軸にX/S、縦軸にAx/Asをとって最小二乗法により、検量線を作成した。

2・4 定量操作

さめ肝油約0.5g、標準スクアラン約0.5gを正確にはかり、混合し、ヘキサン約5~6mlに溶解(濃度15~20%)して、0.1~0.2μlをガスクロマトグラフへ注入する。得られたクロマトグラムから、X,

Sについてのピーク面積、A'x, A'sを求めて、次式に従いXの含有%を求めた。

$$\text{スクアレンの含有量 } X (\%) = \frac{n}{A} \times \frac{R + b}{a}$$

- a: 検量線の勾配
- b: 検量線の切片
- R: A'x / A's × 100
- n: 標準スクアランの重量
- A: さめ肝油の重量

3 結果及び考察

3・1 検量線の選択

別々に調製した検量線用標準溶液について2・3により求めた5本の検量線の測定結果と、その値から求めた検量線の式をTable 1に示す。

ピーク面積比 Ax/Asは、いずれも繰り返し分析した測定値(5回)の平均で、各濃度における測定値のバラツキは小さい。すなわち、標準偏差0.002以下、変動係数0.12%以下であり、再現精度は極めて良好である。

(1)~(5)までの検量線の式をそれぞれ部分的に拡大して直線であらわせばFig.2のとおりで斜線部分の細い1本の帶となる。

特に、境界値(スクアレン含有量90%)近辺(x/s 0.8~0.9)では、巾が狭くなっている。

Table 1 Analytical data for Calibration Curve

Calib. Curve x / s	(1)		(2)		(3)		(4)		(5)	
	Ax/As	x / s								
1:1	1.083	1.032	1.086	1.034	1.087	1.029	1.031	0.984	0.997	0.955
0.75:1	0.774	0.744	0.796	0.764	0.771	0.731	0.743	0.702	0.752	0.717
0.5:1	0.528	0.510	0.545	0.522	0.553	0.525	0.522	0.497	0.559	0.527
Equation	y=1.063X-1.559		y=1.062X-1.262		y=1.060X-0.438		y=1.044X+0.514		y=1.025X+1.817	
r	0.99997		0.99996		0.99999		0.99988		0.99999	

Ax/As: Area ratio of Squalene and Squalane

x/s : Weight ratio of Squalene and Squalane

y = Ax/As, X = x/s

r = Coefficient of correlation

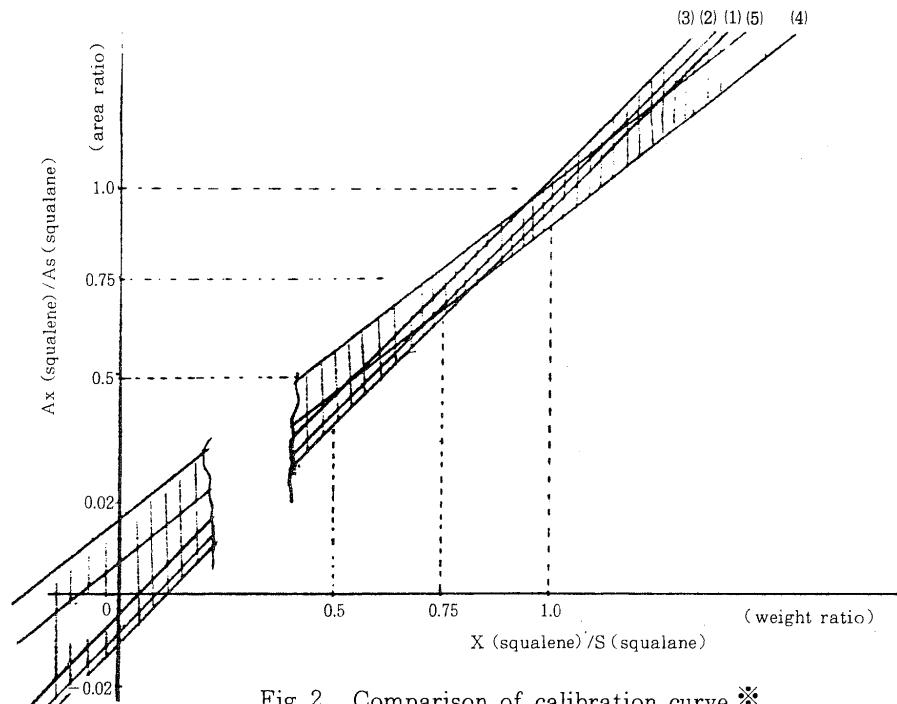


Fig. 2 Comparison of calibration curve \ddagger
 \ddagger Practical calibration curve are
modified for explanation

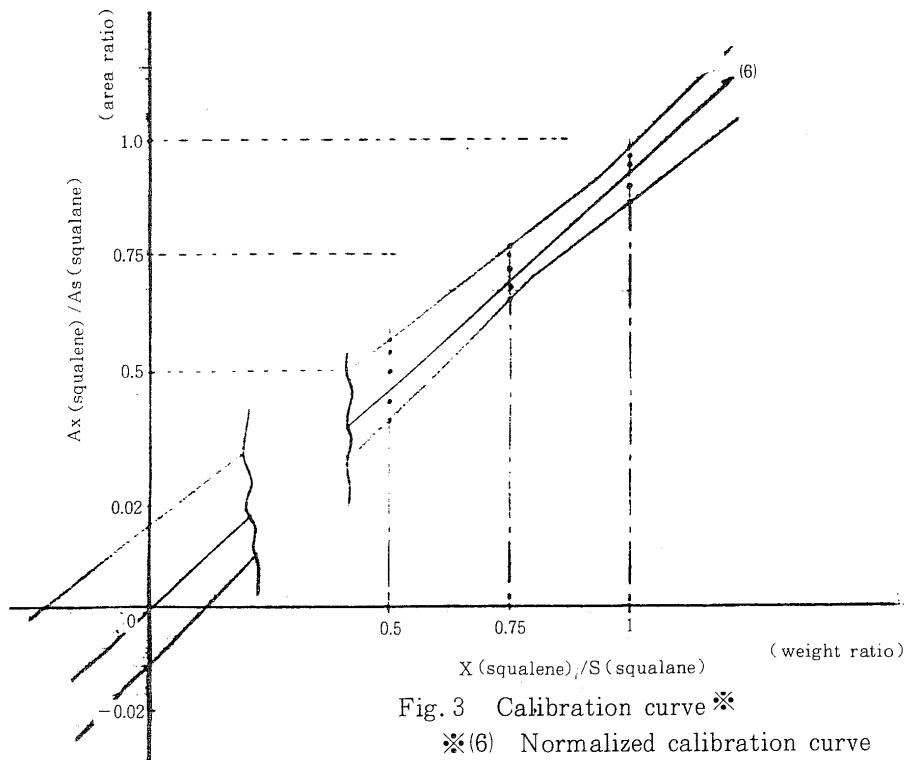


Fig. 3 Calibration curve \ddagger
 \ddagger (6) Normalized calibration curve

$$y = 1.051x - 0.185, \\ r = 0.99998$$

Table 2 Analytical results of shark liver oils

Shark liver oil	Method 1	Method 2	Method 3
	Squalene (%)	Squalene (%)	Squalene (%)
57-A	64.0	63.2	63.4
57-B	84.8	84.3	84.4
57-C	88.0	88.9	87.8
57-D	84.4	84.4	83.5
58-E	72.1	71.7	71.8
58-F	86.9	86.3	86.5
58-G	82.8	82.4	82.0
58-H	81.5	81.1	80.8

Method 1 : Three points calibration curve method

Method 2 : One point calibration curve method

Method 3 : Normalized calibration curve

57 : Shark liver oil imported in 1982

58 : Shark liver oil imported in 1983

は、検量線を作成する分析条件を同一にすれば、いつ作成しても常に細い帯状部分の中にあるものと考えることができる。

これらのことから、帯状部分の平均的検量線（規格化した検量線）の作成を試みた。

x/s を固定値 ($1:1, 0.75:1, 0.5:1$) とし、各点におけるそれぞれの検量線から Ax/As を求めて、各点毎の平均値 3 点と固定値 3 点から、最小二乗法により、平均検量線を求める $y = 1.051 X - 0.185, r = 0.99998$ となる。

次に、スクアレン含有量の異なる 8 種のさめ肝油を用いて、3 点検量線、1 点検量線、及び平均検量線の式から、スクアレンの含有量を求めた結果を Table 2 に示す。

即ち、この表から、3 点検量線で得られた定量値が最も真の値に近似するものと仮定するならば、1 点検量線、平均検量線で得られた値は、 $\pm 1\%$ 以内の誤差範囲にある。従って、さめ肝油中のスクアレン量が 89 ~ 91% 以外の範囲にあるときは、1 点検量線又は平均検量線を適用できるものと考えられる。

3・2 標準溶液及び試料溶液の安定性

検量線用標準溶液及び、試料溶液の調製にクロロ

ホルムを用いた場合には、調製後 5 日を経過した時点で Ax/As に大きな変化が生じ、定量操作に障害となつた。

この原因については明らかでないが測定用溶液の安定性については溶媒の選択と共に考慮する必要があると考えられる。ここではスクアレンと同族であること、及び誘電率あるいは溶解パラメータ等を考慮してヘキサンを選び溶液の経時変化を検討してみた。

3・1 で調製した検量線用標準溶液及び試料溶液を調製直後から、2 日、5 日、9 日及び 15 日を経過させて、それぞれスクアレンとスクアランのピーク面積比 Ax/As を測定したものが Table 3 である。

溶媒にヘキサンを用いた場合は検量線用標準溶液、試料溶液ともに調製後、2 週間の保存でも面積比の変動や偏りが見られず、この程度の保存では、酸素吸収等に伴うスクアレンの劣化はほとんどないとみることができる。従って、溶媒として、ヘキサンを用いれば通常の分析条件では、溶液の安定性について考慮する必要のないことが判明した。

4 要 約

スクアランを内部標準に用いて、ガスクロマトグ

Table 3 Variation of standard solution for calibration curve and sample solution

	Days Area ratio	0	2	5	9	15
1 : 1	Ax / As*	1 0 8. 6	1 0 8. 5	1 0 8. 4	1 0 8. 5	1 0 8. 4
0.75 : 1	Ax / As*	7 9. 6	7 9. 5	7 9. 8	7 9. 7	7 9. 8
0.5 : 1	Ax / As*	5 4. 4	5 4. 1	5 4. 6	5 4. 9	5 4. 7
58 - I ***	Ax / As**	8 3. 2	8 2. 7	8 3. 1	8 2. 9	8 2. 7
58 - J ***	Ax / As**	8 5. 5	8 5. 4	8 5. 8	8 6. 1	8 5. 5

* : Standard solution for calibration curve

** : Area ratio of squalene in shark liver oil and squalane

58 : Shark liver oil imported in 1983

ラフィーにより、さめ肝油中のスクアレンを定量する場合、1点検量線、あるいは平均的検量線を用いて定量でき、分析時間の短縮化が可能になった。

また、溶媒にヘキサンを用いることにより、検量線用標準溶液は、約2週間室温で安定であり酸化重

合等の影響はみられなかった。

なお、本研究に当たり、ご指導くださいました大蔵省関税中央分析所、首席分析官、大野幸雄氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 出来三男、佐藤宗衛、小口盛重：本誌 14, 165 (1973)