

エステル基交換剤を用いた菜種油中のエルカ酸の定量

廣瀬 達也*, 隅野 隆永*, 明渡 計晃*, 川口 利宗*

Determination of Erucic Acid in Rapeseed Oil by Ester Exchange Reagents in Transesterification

Tatsuya HIROSE*, Takanaga SUMINO*, Kazuaki AKEDO*, and Toshimune KAWAGUCHI*

*Osaka Customs Laboratory

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

For quantitative determination of erucic acid in rapeseed oil, the Customs Analytical Method No. 123 "Method of Quantitative Analysis of Erucic Acid in Rapeseed Oil" is used. The method refers to only methods using catalysts for the methylesterification of oils and fatty acid mixtures. Nevertheless, techniques of methylesterification of oils and fatty acid mixtures have progressed and in addition to the catalyzed esterification method, the method using ester exchange reagents is widely known. Therefore, we examined the determinability of erucic acid through methylesterification of oils and fatty acid mixtures by using trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) as an ester exchange reagent. This paper reports the results.

1. 緒 言

2002年HS改正に伴い、税番第15.14項に分類される菜種油において、菜種油中のエルカ酸含有率が2%未満であるか否かでその分類される号が異なることとなったことから菜種油中のエルカ酸の定量が必要となり、平成13年12月、税関分析法No123 “菜種油中のエルカ酸の定量分析法”が定められた。¹⁾

この定量分析法は、菜種油及び脂肪酸（エルカ酸定量に際して内標準物質として使用する。）混合物をメチルエステル化し、ガスクロマトグラフィー（以下GCと略記する。）で定量分析を行うもので、その際のメチルエステル化法として、触媒（硫酸）下エステル基交換し脂肪酸メチルエステルを得る方法（硫酸-メタノール法と記載されている。）（以下H₂SO₄-MeOH法と略記する。）と、油脂をケン化・分解した後触媒（三フッ化ホウ素）下メチルエステル化して脂肪酸メチルエステルを得る方法（三フッ化ホウ素-メタノール法と記載されている。）（以下BF₃-MeOH法と略記する。）が併記されている。これらの方法は、基準油脂分析試験法にも記載されているもので、旧来から広く知られかつ使用されている方法である。^{2), 3), 4), 5)}

しかしながら、化学技術の発展とともにメチルエステル化技術も大きく進歩し、これらの様に触媒を用いる方法のみならずエ斯特ル基交換剤を使用する方法も良く知られるところとなっ

て大いに利用されているのが現実である。^{6), 7), 8), 9)}

著者らにおいても、油脂及び脂肪酸のメチルエ斯特ル化について幾つかのエ斯特ル基交換剤を用いて比較・検討を行い、Trimethylsulfonium Hydroxide (0.2M Methanol solution)（以下TMSH試薬と略記する。）が優れているとの結果を得たことは既に報告済みである。¹⁰⁾

そこで今回、エ斯特ル基交換剤としてTMSH試薬を用いたトリオレイン、エルカ酸及びその混合物のメチルエ斯特ル化を行い、この様なトリグリセリド、脂肪酸及びその混合物に対するメチルエ斯特ル化反応の反応性についてそのメチルエ斯特ル回収率から検証するとともに、本試薬を用いて菜種油及び脂肪酸混合物（エルカ酸定量に際して内標準物質として使用するもので今回n-ノナデカン酸を使用）のメチルエ斯特ル化を行い（以下TMSH法と略記する。）、エルカ酸の定量について税関分析法No123に記載されているH₂SO₄-MeOH法との比較・検討を行ったところ、良好な結果が得られたので報告する。

2. 実 験

2. 1 分析試料

菜種油（山桂産業、味の素、リノール油脂、村山製油各社製）

2. 2 試 薬

エルカ酸（東京化成）

* 大阪税関業務部 〒552-0021 大阪府大阪市港区築港4-10-3

n-ノナデカン酸（東京化成）
 ヘンエイコサン（東京化成）
 トリオレイン（東京化成）
 トリステアリン（東京化成）
 オレイン酸メチル（シグマ）
 エルカ酸メチル（東京化成）
 Trimethylsulfonium Hydroxide (0.2 M Methanol solution)
 （東京化成）

2.3 分析装置及び測定条件

GC : HP6890 (Hewlett Packard社製)

検出器 : FID

カラム : DB-WAX (30 m × 0.25mm × 0.25 μm) (J&W社製)
 注入口温度 : 250°C
 検出器温度 : 300°C
 オーブン温度 : 210°C 定温
 キャリアガス : ヘリウム
 注入法 : スプリット注入法 (スプリット比50:1)
 注入量 : 0.5 μl
 線速度 : 30cm/sec

2.4 実験方法

2.4.1 TMSH試薬のメチルエステル化反応性検討

2.4.1.1 背景

TMSH試薬による油脂及び脂肪酸のメチルエステル化においては、試料10 mg/0.5mlトルエン溶液に対しTMSH試薬を0.2ml若しくは0.4ml添加混合した場合、脂肪酸については混合後すぐに、また油脂やトリグリセリドについては混合後30分で、GC分析上そのクロマトグラムから試料そのものすなわち脂肪酸や油脂及びトリグリセリドのピークが消失することは既に報告済みである¹⁰⁾が、その際メチルエステル化が完全に行われているかについてメチルエステルの回収率から検証した。

2.4.1.2 試料調製及び分析

エルカ酸のみの試料（約0.5gを精秤する。）、トリオレインのみの試料（約0.5gを精秤する。）、トリオレイン及びエルカ酸混合試料（各々約0.25gを精秤し混合する。）の3点を用意し、内標準トルエン溶液（ヘンエイコサン約1gをトルエンに溶かして100mlとする。）10mlを加え、トルエンで25mlに定容する（これらはいずれも試料10mg/0.5mlトルエン溶液となる。）。定容した溶液の約0.5mlを2mlバイアルに採取したものを各々2本ずつ用意し、一方にはTMSH試薬を0.2ml添加し、他方にはTMSH試薬を添加量が大過剰となる場合を想定して1.0ml添加する。添加後どちらも良く混合してそのまま30分放置したものを分析試料とした。

2.4.1.3 検量線作成

エルカ酸メチル及びオレイン酸メチルを各々約0.2g精秤し混合したもの、各々約0.5g精秤し混合したもの、各々約0.8g精秤し混合したものの3点を用意し、2.4.1.2で調製した内部標準トルエン溶液10mlをそれぞれ加え、トルエンで25mlに定容した後GCで分析した。GCで分析した結果得られたエルカ酸メチルのGCピーク面積と内標準物質のGCピーク面積の比（エルカ酸

メチルのGCピーク面積／内標準物質のGCピーク面積）をx軸に、エルカ酸メチルの重量と内標準物質の重量の比（エルカ酸メチルの重量／内標準物質の重量）をy軸にとり検量線を作成した。同様にしてオレイン酸メチルについても検量線を作成した。

2.4.1.4 回収率の計算

2.4.1.2で調製した分析試料をGCで分析し、得られたエルカ酸メチルのGCピーク面積と内標準物質のGCピーク面積の比から2.4.1.3で作成した検量線を用いてエルカ酸メチルの重量と内標準物質の重量の比を求める。内標準物質の重量は既知であり、エルカ酸メチルの重量が求められる。同様にしてオレイン酸メチルについても重量が求められる。求められた重量を実験回収重量とした。メチルエステル化がほぼ完全であれば、理論上、エルカ酸1モルからエルカ酸メチル1モルが、トリオレイン1モルからオレイン酸メチル3モルが生成するはずであることから各メチルエステルの理論回収重量が求まり、理論回収重量に対する実験回収重量を回収率として百分率で計算した。

2.4.2 H₂SO₄-MeOH法による菜種油中のエルカ酸定量

2.4.2.1 定量分析用試料の調製

菜種油約500mgをなす型フラスコに精秤し、エルカ酸標準石油エーテル溶液（エルカ酸約200mgを精秤し、石油エーテルに溶かして100mlとする。）10ml、内標準石油エーテル溶液（内標準物質としてn-ノナデカン酸約200mgを秤量し、石油エーテルに溶かして100mlとする）10mlを加えたものをH₂SO₄-MeOH法による定量分析用試料とした。定量分析用として菜種油は、A.B.C.D.Eの5種類を用意した。

2.4.2.2 検量線作成用試料の調製

なす型フラスコを4個用意し、それぞれにトリステアリン約500mgを量り採る。2.4.2.1で調製したエルカ酸標準石油エーテル溶液をそれぞれ3ml、5ml、10ml及び15ml加え、更に2.4.2.1で調製した内標準石油エーテル溶液を各々10mlずつ加え、H₂SO₄-MeOH法による検量線作成用試料とした。

2.4.2.3 試料のメチルエステル化

ロータリーエバポレーターを用いて試料から石油エーテルを除去した後、硫酸-ベンゼン-メタノール溶液（ベンゼン-メタノール1:3（容積比）混合液230mlに濃硫酸2mlを注意して加える。）30mlを加えて溶解し、冷却器を付けて加熱、2.5時間沸騰させた後冷却する。冷却後、全量を分液ロートに移し、水50ml及び石油エーテル50mlを加えて振とう抽出する。しばらく放置した後石油エーテル層を分取して少量の無水炭酸ナトリウムを添加し、脱水・脱酸を行ったものを分析用試料とした。

2.4.2.4 検量線の作成

2.4.2.2で調製した検量線作成用試料を2.4.2.3の方法でメチルエステル化した分析用試料をGCで分析し、GCで分析した結果得られたエルカ酸メチルのGCピーク面積と内標準物質メチルエステルのGCピーク面積の比（エルカ酸メチルのGCピーク面積／内標準物質メチルエステルのGCピーク面積）をy軸に、エルカ酸の重量と内標準物質の重量の比（エルカ酸の重量／内標準物質の重量）をx軸にとり検量線を作成した。

2.4.2.5 菜種油中のエルカ酸含有率の計算

2.4.2.1で調製した定量分析用試料を2.4.2.3の方法でメチルエステル化した分析用試料をGCで分析し、得られたエルカ酸メチルのGCピーク面積と内標準物質メチルエステルのGCピーク面積の比から2.4.2.4で作成した検量線を用いてエルカ酸の重量と内標準物質の重量の比を求める。内標準物質の重量は既知であり、エルカ酸の重量が求められる。求められたエルカ酸重量から添加している分を差し引けば、菜種油中のエルカ酸含有量が求められる。

2.4.3 TMSH法による菜種油中のエルカ酸定量

2.4.3.1 定量分析用試料の調製

菜種油約500mgを三角フラスコに精秤し、エルカ酸標準トルエン溶液（エルカ酸約200mgを精秤し、トルエンに溶かして100mlとする。）10ml、内標準トルエン溶液（内標準物質としてn-ノナデカン酸約200mgを秤量し、トルエンに溶かして100mlとする。）10mlを加えたものをTMSH法による定量分析用試料とした。定量分析用として菜種油は、2.4.2.1と同じ菜種油A.B.C.D.Eの5種類を用意した。

2.4.3.2 検量線作成用試料の調製

三角フラスコを4個用意し、それぞれにトリステアリン約500mgを量り採る。2.4.3.1で調製したエルカ酸標準トルエン溶液をそれぞれ3ml、5ml、10ml及び15ml加え、更に2.4.3.1で調製した内標準トルエン溶液を各々10mlずつ加え、TMSH法による検量線作成用試料（トリステアリン添加）とする。別に三角フラスコを4個用意し、2.4.3.1で調製したエルカ酸標準トルエン溶液をそれぞれ3ml、5ml、10ml及び15ml加え、更に2.4.3.1で調製した内標準トルエン溶液を各々10mlずつ加え、TMSH法による検量線作成用試料（トリステアリン不添加）とした。

2.4.3.3 試料のメチルエステル化

試料にトルエンを加えて約50mlとする。2mlバイアルに0.5mlを採取してTMSH試薬を0.4ml添加し、良く混合してそのまま30分放置したものを分析用試料とした。

2.4.3.4 検量線の作成

2.4.3.2で調製した検量線作成用試料を2.4.3.3の方法でメチルエステル化した分析用試料をGCで分析し、エルカ酸の重量と内標準物質の重量の比（エルカ酸の重量／内標準物質の重量）をx軸に、得られたエルカ酸メチルのGCピーク面積と内標準物質メチルエステルのGCピーク面積の比（エルカ酸メチルのGCピーク面積／内標準物質メチルエステルのGCピーク面積）をy軸にとり、検量線を作成した。

2.4.3.5 菜種油中のエルカ酸含有率の計算

2.4.3.1で調製した定量分析用試料を2.4.3.3の方法でメチルエステル化した分析用試料をGCで分析し、得られたエルカ酸メチルのGCピーク面積と内標準物質メチルエステルのGCピーク面積の比から2.4.3.4で作成した検量線を用いてエルカ酸の重量と内標準物質の重量の比を求める。内標準物質の重量は既知であり、エルカ酸の重量が求められる。求められたエルカ酸重量から添加している分を差し引けば、菜種油中のエルカ酸含有量が求められる。

3.結果及び考察

3.1 TMSH試薬のメチルエステル化反応性検討

2.4.1.3で作成したエルカ酸メチルの検量線をFig.1に、オレイン酸メチルの検量線をFig.2に示す。いずれも直線性の良い検量線が得られている。Fig.3は検量線を作成するために分析したガスクロマトグラムの1例（エルカ酸メチル及びオレイン酸メチルを各々約0.2g精秤し混合したものによる。）である。次にこれらの検量線を用いて2.4.1.2で調製した試料3点について、分析した結果求められたエルカ酸メチル及びオレイン酸メチルの回収率をTable 1に示す（繰返し分析回数はいずれも4回）。Fig.4は回収率を求めるために分析したガスクロマトグラムの1例（混合試料による。）である。メチルエステルの回収率について、いずれのメチルエステルについてもほぼ100%回収されている。すなわち、TMSH試薬による油脂及び高級脂肪酸のメチルエステル化について、サンプル10mg/0.5mlトルエン溶液に対しTMSH試薬を0.2ml及び1.0ml添加混合した場合、高級脂肪酸やトリグリセリドのピークがGC分析上そのクロマトグラムから消失することが確認されている30分後には、メチルエステル化がほぼ完全に行われているとの結果が得られた。

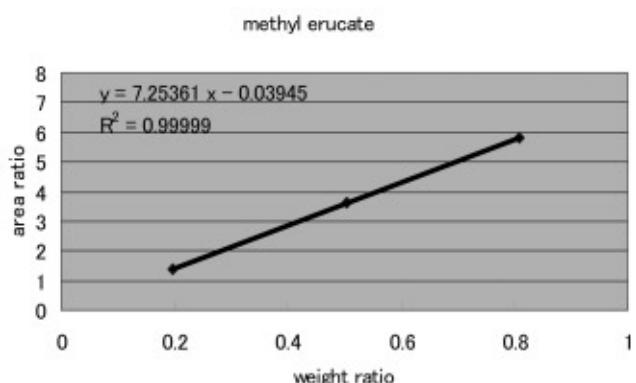


Fig. 1 Calibration curve of standard methyl erucate

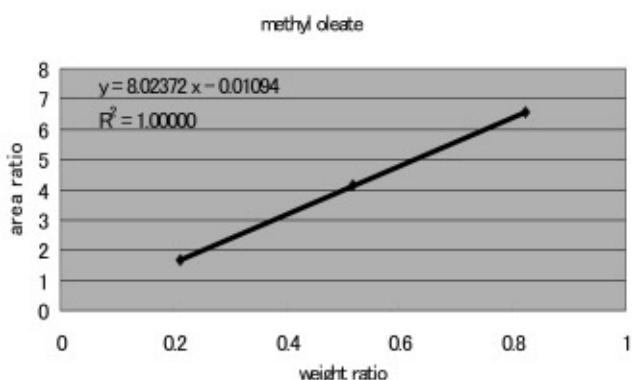


Fig. 2 Calibration curve of standard methyl oleate

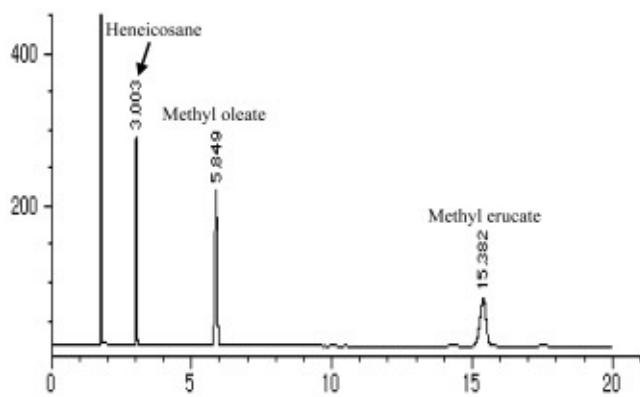


Fig. 3 Gas chromatogram of standard methyl erucate and methyl oleate

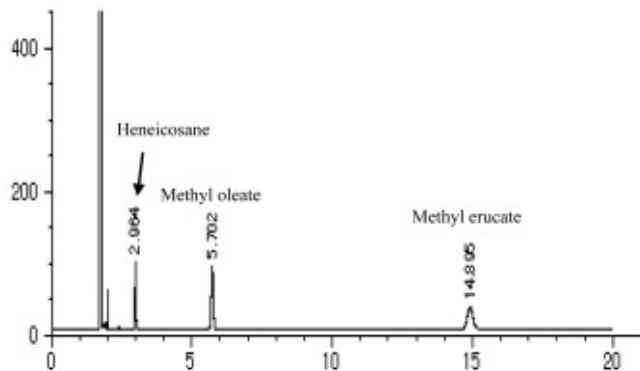


Fig. 4 Gas chromatogram of methylesterification result at erucate and oleate mixture

3. 2 菜種油中のエルカ酸の定量

H_2SO_4 -MeOH法で作成した検量線をFig.5に、TMSH法で作成した検量線（トリステアリンを添加した検量線作成用試料によるもの、トリステアリン不添加の検量線作成用試料によるもの）をFig.6及び7に示す。いずれの方法においても直線性の良い検量線が得られている。次に5種類の菜種油（A,B,C,D,E）について、エルカ酸の定量を行った結果をTable 2に示す（繰返し分析回数はいずれも5回）。Fig.8は H_2SO_4 -MeOH法によるメチルエステル化を行ったもののガスクロマトグラムの1例（菜種油Eによる。）を、Fig.9はTMSH法によるメチルエステル化を行ったもののガスクロマトグラムの1例（菜種油Eによる。）を示した。 H_2SO_4 -MeOH法、TMSH法（トリステアリン添加、不添加）のいずれにおいても、これら5種類の菜種油に含有されて

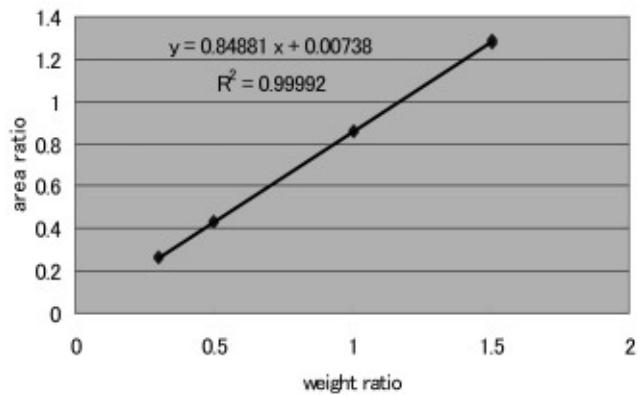


Fig. 5 Calibration curve of methyl erucate at sulfuric acid-methanol method

Table 1 Recovery of methyl ester at TMSH method

sample weight(g) triolein:erucate	recovery(%) methyl oleate:methyl erucate (coefficient of variation n=4)	
	TMSH reagent 0.2 ml	TMSH reagent 1.0 ml
sample A 0 : 0.5	- : 100.50 - : (0.46)	- : 100.26 - : (0.24)
sample B 0.5 : 0	99.36 : - (0.12) : -	99.02 : - (0.61) : -
sample C 0.25 : 0.25	99.39 : 100.40 (0.35) : (0.60)	99.23 : 100.04 (1.01) : (0.35)

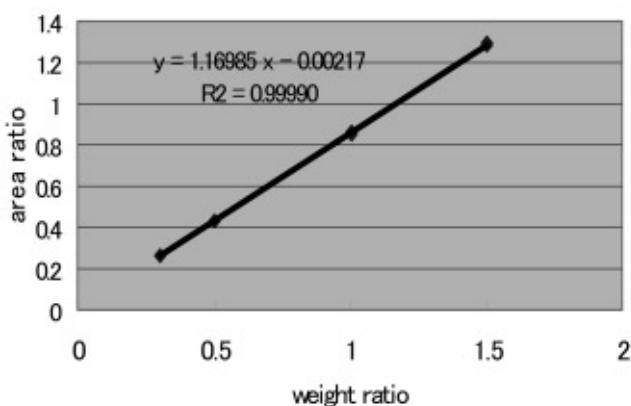


Fig. 6 Calibration curve of methyl erucate at TMSH method (contain tristearin)

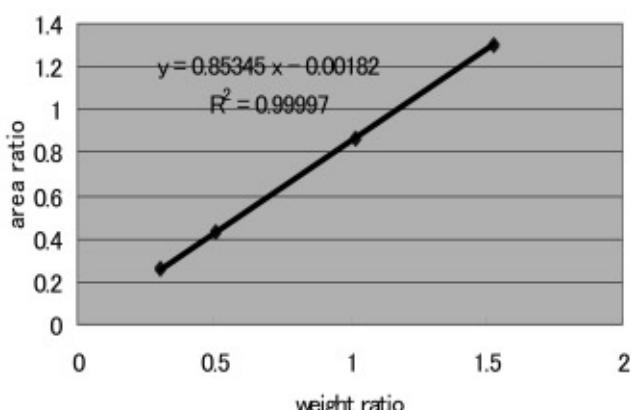


Fig. 7 Calibration curve of methyl erucate at TMSH method (not contain tristearin)

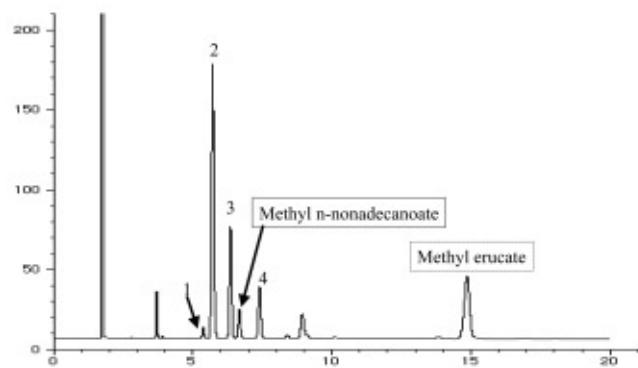


Fig. 8 Gas chromatographic profile of fatty acids from rape oil obtained by sulfuric acid-methanol method
(1:Methyl stearate, 2:Methyl oleate, 3:Methyl linoleate, 4:Methyl linolenate)

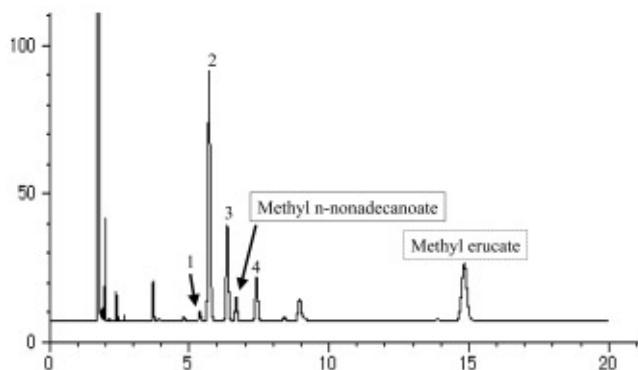


Fig. 9 Gas chromatographic profile of fatty acids from rape oil obtained by TMSH method
(1:Methyl stearate, 2:Methyl oleate, 3:Methyl linoleate, 4:Methyl linolenate)

Table 2 Determination results of erucate in rape oil

sample	erucate contents%		
	(coefficient of variation n=5)		
A	0.097% (3.993)	0.097% (3.673)	0.096% (3.329)
B	0.305% (1.876)	0.305% (2.166)	0.304% (2.265)
C	1.318% (1.003)	1.322% (1.086)	1.320% (0.623)
D	2.269% (1.070)	2.294% (1.048)	2.280% (0.875)
E	5.183% (0.686)	5.190% (0.564)	5.202% (0.672)

Table 3 Comparison of each method

comparison subjects	H ₂ SO ₄ -MeOH method	BF ₃ - MeOH method	TMSH method
water resist	good	no good degradation	no good degradation
sample volume of esterification	possible	not possible	not possible
GC interfering substance	nothing	nothing	low boiling point obstacle
reaction time	150 minutes	15 minutes	30 minutes
extraction	need	need	no need
volatile of methyl ester	little	little	nothing
malignant matter	strong acid benzene	strong alkaline	little

いるエルカ酸含有率の定量結果について差異は見られなかつた。また定量性における繰返し変動係数についてもいずれの方法でも数%以内で定量性は良好かつ方法間での大きな差異は見られなかつた。

3. 3 メチルエステル化法の比較

最後に、現行の税関分析法No123に記載されているH₂SO₄-MeOH法、BF₃-MeOH法とTMSH法のそれぞれについて、良く知られている利点、欠点を簡単に表にまとめたのがTable 3である。各方法で一長一短があり、油脂や脂肪酸をメチルエステル化する目的によっていずれの方法が良いか選択する必要性のあることは言うまでもないことである。ところで、今回行った菜種油中のエルカ酸含有率の定量においては、H₂SO₄-MeOH法とTMSH法にその定量結果に差異はなく、したがつてこれら3法のいずれをメチルエステル化法として選択し用いても問題はないこととなる。定量性が同じであるならば、分析試料は油脂で

あることから多量の水分を含有することは考えられず、GCによる分析であることから多量の試料を処理する必要もなく、エルカ酸メチル及び内標準物質として使用したn-ノナデカン酸メチルのいずれもが比較的高沸点であり低沸点部分の妨害は関係ないことを考え合わせると、TMSH法は菜種油中のエルカ酸の定量に際し、メチルエステル化法としてより簡便で優れているものであると言える。

4. 要 約

TMSH法はH₂SO₄-MeOH法と比較して菜種油中のエルカ酸の定量において差異はなく、メチルエステル化法と比較して簡便であり、さらに検量線作成試料へのトリステアリン添加の必要性もないとの結果が得られたことから、菜種油中のエルカ酸の定量においてTMSH法を使用することにより、その定量操作が大いに簡便となることが判明した。

文 献

- 1) 関税中央分析所：“税関分析法No123 “菜種油中のエルカ酸の定量分析法”（2001.12）.
- 2) 日本油化学会：“基準油脂分析試験法 I ”, 2.4.1 (1996) .
- 3) 土屋知太郎, 浅原照三, 橋本哲太郎：油化学,19,337 (1970) .
- 4) 清野肇, 千原直子, 渡辺昭一郎：油化学,24,59 (1975) .
- 5) 磯部次男, 清野肇, 渡辺昭一郎：油化学,26,236 (1977) .
- 6) W.Butt: *J.Chromatogr.*,261,142 (1983).
- 7) Harald Farber and Heinz F.Scholer: *J.Agric.Food Chem.*, 41,217 (1993) .
- 8) ガスクロマトグラフ応用データ集(株式会社島津製作所) .
- 9) GC DERIVATIZING REAGENTS (東京化成工業株式会社) .
- 10) 廣瀬達也, 隅野隆永, 井上純：関税中央分析所報,41,1 (2001) .