

混合油脂中の乳脂肪の定量 — 定量精度の向上と分析法間の比較 —

岩下 伸行, 積田優一郎, 樋野 千寿, 寺内 豊, 辻 恵美, 熊澤 勉

Determination of Milk Fat Content in Mixed Fats — For Accuracy Improvement and Comparison of Analytical Methods —

Nobuyuki IWASHITA, Yuichiro TSUMITA, Chitoshi HINO, Yutaka TERAUCHI, Emi TSUJI and Tsutomu KUMAZAWA
Tokyo Customs Laboratory
2-56, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-8615 Japan

To examine the accuracy of quantitative determination of milk fat in mixed fats by gas chromatography, a conventional way using the least squares method for the triglyceride composition of fats (analytical method A), its improved method (method B), the transesterification of fats by the potassium hydroxide/methanol method followed by determination of butyric acid methyl ester content (method C) and analysis using the least squares method for the fatty acid methyl ester composition (method D) were compared.

The study showed that the analytical methods B, C and D produced better determination results than the conventional method A.

1. 緒 言

関税率表第2106.90号に分類される調製食用脂(調製食用脂は、乳脂肪とその他の油脂の混合物であるので、以下「混合油脂」という。)は、国内産業保護のための関税割当制度の設定等により、関係する統計細分類での税率格差が非常に大きい上に、通関実績が翌年度の割当数量にも影響するため、その関税分類上の所属は、輸入者及び税関の双方において極めて重要な問題である。混合油脂は、乳脂肪分の含有割合を基準として関税分類上の所属が決定されるが、実際の輸入品においては、この分類基準に非常に近接した混合割合で乳脂肪を含有しているケースが多いため、その乳脂肪分の定量には高い精度が要求される。

現在、税関における混合油脂中の乳脂肪分の定量法は、宮城らの方法¹⁾や榎本らの方法²⁾のように、ガスクロマトグラフィーによって得られた混合油脂のトリグリセリド組成及び各原料油脂のトリグリセリド組成からの最小二乗法によって算出する方法を通常用いている。一方、Prechtら³⁾⁴⁾は、混合油脂中の乳脂肪の定量法として、乳脂肪に特異的な構成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。)を試みている。この他にも、油脂の構成脂肪酸をガスクロマトグラフィーによって分離し、脂肪酸の特徴的構成比から求める方法⁵⁾がある。しかし、これらの分析法について定量精度の比較検討を行った報告は見当たらない

ことから、本研究では、より優れた分析法を確立することを目的として、以下の点について検討した。

- ① トリグリセリド組成から最小二乗法により乳脂肪割合を算出する榎本らの方法²⁾(分析法A)の定量精度の検討と、精度の向上を目的とした改良法(分析法B)の試み。
- ② 酪酸法(分析法C)の定量精度と有用性の検討。
- ③ 脂肪酸組成から最小二乗法により算出する方法(分析法D)の定量精度と有用性の検討。

2. 実 験

2. 1 試料及び試薬

乳脂肪(輸入品)、水添大豆油(輸入品)、やし油(純正化学)、吉草酸メチル(和光純薬)、水酸化カリウム(和光純薬)、酢酸(和光純薬)、メタノール(純正化学)、ヘキサン(純正化学)ヘプタン(純正化学)

※溶媒、試薬は全て特級又は1級

2. 2 分析装置及び分析条件

装置: Agilent6890N(GC)

2. 2. 1 トリグリセリド組成分析条件

カラム: Ultra alloy-1(HT) (15m×0.25mmI.D.×0.15 μm)

注入口温度: 380℃

注入量：1 μ l
 スプリット比：40:1
 昇温条件：230℃(3min)-(20℃/min)-280℃-(3℃/min)-380℃(3min)
 線速度：45cm/sec
 検出器：FID, 400℃

2. 2. 2 メチルエステル化物分析条件

カラム：HP-WAX 30m $\times$ 0.25mmI.D. $\times$ 0.25 μ m
 注入口温度：250℃
 注入量：1 μ l
 スプリット比：40:1
 カラム温度：85℃(3min)-(20℃/min)-240℃(8min)
 線速度：34cm/sec
 検出器：FID, 250℃

2. 3 実験方法

2. 3. 1 対照用試料及び定量精度検証用試料の調製

Table.1 に示した割合で、乳脂肪及び植物油脂を精秤し、混合したものを、対照用試料(1~15)及び定量精度検証用試料(Sample 1~3)とした。植物油脂には、水添大豆油及びやし油を用いた。

Table 1 Composition of prepared samples

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Milk fat(%)	0	5	10	15	20	25	30	35	40
Other(%) ¹⁾	100	95	90	85	80	75	70	65	60

	10	11	12	13	14	15	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Milk fat(%)	60	65	70	75	80	100	15	30	70
Other(%) ¹⁾	40	35	30	25	20	0	85	70	30

1) Other = Hydrogenated soy bean oil or Coconut oil

2. 3. 2 分析法 A (トリグリセリド組成 - 最小二乗法)

2. 3. 2 (1) 試料調製

加温して溶解させた検証用試料(乳脂肪の含有量：15%、30%、70%)、乳脂肪及び植物油脂を、それぞれマイクロピペットで 70 μ l 採取し、GC 用バイアルに移した。これにヘキサン 1ml を加えて溶解させた後、2.2.1 の条件でガスクロマトグラフによる測定を行った。

2. 3. 2 (2) 解析方法 (乳脂肪割合の算出)

2. 3. 2 (1) に従って得られたトリグリセリドのクロマトグラムを Fig.1 の点線に示すように 16 区間に分割した。(この、クロマトグラムの区間分割 (積分) においては、対象とする全ての試料のクロマトグラムを同じ解析メソッドで解析するようにして、手作業によるピーク分割及びベースライン設定等を行わないように注意した。)

次に、各区間ごとにピーク面積を合算し、全区間のピーク面積を 100 とした相対面積比(%)で各区間の面積を規格化し、これを重回帰計算に使用する変数とした。各検証用試料に対して、乳脂肪と植物油脂から以下のような重回帰モデルを作成し、乳脂肪割合を算出した。

$$\text{重回帰モデル } Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{mi} + \beta_2 X_{vi} + \varepsilon_i$$

Y_i : 検証用試料の i 番目の区間の相対面積比(%)

X_{mi} : 乳脂肪の i 番目の区間の相対面積比(%)

X_{vi} : 植物油脂の i 番目の区間の相対面積比(%)

β_0 : 定数

β_1, β_2 : 偏回帰係数

ε_i : 残差

この時、残差平方和 $\sum \varepsilon_i^2$ を最小とする β_1 及び β_2 を表計算ソフトウェア Excel2003 の分析ツール【回帰分析】により算出し、次式により乳脂肪割合を算出した。

$$\text{乳脂肪割合(}\%) = \beta_1 / (\beta_1 + \beta_2) \times 100$$

2. 3. 3 分析法 B (改良法 ; トリグリセリド組成—最小二乗法)

2. 3. 3 (1) 試料調製

分析法 B では、各検証用試料(乳脂肪の含有量：15%、30%、70%)に対して、Table2 に示したような乳脂肪割合の対照用試料 A 及び B を用いて定量を行った。対照用試料 A は、検証用試料に対して乳脂肪(%)が 5(%)程度低いものを、これに対し対照用試料 B は、5(%)程度高いものを用いた。各試料は、2.3.2(1)と同様に調製し、ガスクロマトグラフによる測定を行った。

2. 3. 3 (2) 乳脂肪割合の算出

Table 2 Milk fat contents of analysis samples and their corresponding controls used in Method B

Sample	Control A	Control B
70%	65%	75%
30%	25%	35%
15%	10%	20%

各検証用試料に対して、対応する対照用試料 A と対照用試料 B を用いて重回帰モデルを作成し、乳脂肪割合を算出した。

$$\text{重回帰モデル } Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{ai} + \beta_2 X_{bi} + \varepsilon_i$$

Y_i : 検証用試料の i 番目の区間の相対面積比(%)

X_{ai} : 対照用試料 A の i 番目の区間の相対面積比(%)

X_{bi} : 対照用試料 B の i 番目の区間の相対面積比(%)

β_0 : 定数

β_1, β_2 : 偏回帰係数

ε_i : 残差

この時、残差平方和 $\sum \varepsilon_i^2$ を最小とする β_1 及び β_2 を表計算ソフトウェア Excel2003 の分析ツール【回帰分析】により算出し、次式により乳脂肪割合を算出した。

$$\text{乳脂肪割合(}\%) = \{Ma \times \beta_1 / (\beta_1 + \beta_2) + Mb \times \beta_2 / (\beta_1 + \beta_2)\}$$

Ma : 対照用試料 A の乳脂肪割合(%)

Mb : 対照用試料 B の乳脂肪割合(%)

2. 3. 4 分析法 C (酪酸法)

本研究で用いた油脂のエステル交換反応 (メチルエステル化)、及び酪酸法 (分析法 C) は、それぞれ日本油脂化学会ワーキンググループ⁶⁾及び、Precht ら³⁾⁴⁾の報告を参考にした。

2. 3. 4 (1) 試料調製

油脂約 500mg を精秤し、これをあらかじめ調製しておいた、内部標準溶液 10.0ml (1mg/ml:吉草酸メチル - ヘプタン溶液) に溶解し、この 2.0ml を密栓可能な容器に分取し、2M-水酸化カリウム/メタノール溶液 200 μ l を加え 45 秒間ボルテックスミキサーで激しく攪拌する。次に、酢酸 100 μ l を加え数秒間ボルテックスミキサーで混合した後、1500rpm で 5 分間遠心分離して上澄みを GC バイアルに採取し、2. 2. 2 の分析条件でガスクロマトグラフによる測定を行った。

2. 3. 4 (2) 反応の再現性の確認

乳脂肪と水添大豆油の混合油脂 (乳脂肪 70%) を用いて、同一の試料について、2. 3. 4 (1) に従い 10 検体をメチルエステル化し、乳脂肪由来の酪酸メチル(C4)のピークと内部標準として加えた吉草酸メチル(C5)との面積比を基に、反応の再現性の確認を行った。さらに、そのうちの 1 検体について 5 回連続測定を行い、繰り返し精度の確認を行った。

2. 3. 4 (3) 乳脂肪分の算出

各検証用試料 (乳脂肪の含有量: 15%、30%、70%) に対して、Table3 に示したような乳脂肪割合の対照用試料を用いて、酪酸メチル含有量に対して、内部標準法 (内部標準物質: 吉草酸メチル) により 5 点検量線を作成して乳脂肪割合を求めた。

Table 3 Milk fat contents of analysis samples and their corresponding controls used in Method C

Sample	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4	Control 5
70%	60%	65%	70%	75%	80%
30%	20%	25%	30%	35%	40%
15%	5%	10%	15%	20%	25%

2. 3. 5 分析法 D (脂肪酸組成 - 最小二乗法)

2. 3. 5 (1) 試料調製

上記 2. 3. 4 (1) に従って、測定用試料を調製し、測定を行った。その際、検証用試料に対して用いた 2 つの対照用試料は、分析法 B と同様、各検証用試料に対して、対照用試料 A には検証用試料に対して乳脂肪(%)が 5(%)程度低いものを、これに対し対照用試料 B には、5(%)程度高いものを用いた。

2. 3. 5 (2) 乳脂肪分の算出

Fig.2 に示した 1~8 の 8 つのピークを対象として、これらの面積を合算し、全ピーク面積を 100 とした相対面積比で各ピーク面積を規格化し、これを重回帰計算に使用する変数とした。

各検証用試料に対して、対応する対照用試料 A と対照用試料 B を用いて重回帰モデルを作成し、乳脂肪割合を算出した。

$$\text{重回帰モデル } Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{ai} + \beta_2 X_{bi} + \varepsilon_i$$

Y_i : 検証用試料の i 番目のピークの相対面積比(%)

X_{ai} : 対照用試料 A の i 番目のピークの相対面積比(%)

X_{bi} : 対照用試料 B の i 番目のピークの相対面積比(%)

β_0 : 定数

β_1, β_2 : 偏重回帰係数

ε_i : 残差

この時、残差平方和 $\sum \varepsilon_i^2$ を最小とする β_1 及び β_2 を表計算ソフトウェア Excel2003 の分析ツール【回帰分析】により算出し、次式により乳脂肪割合を算出した。

$$\text{乳脂肪割合(\%)} = \{Ma \times \beta_1 / (\beta_1 + \beta_2) + Mb \times \beta_2 / (\beta_1 + \beta_2)\}$$

Ma : 対照用試料 A の乳脂肪割合(%)

Mb : 対照用試料 B の乳脂肪割合(%)

3. 結果及び考察

3. 1 トリグリセリド組成分析

Fig.1 に、2. 2. 1 の分析条件における乳脂肪、水添大豆油、やし油及び混合油脂のクロマトグラムを示す。榎本らの方法²⁾においては、アシル基の炭素数が 50、52、及び 54 を主体とする水添大豆油において、その他のアシル基炭素数部分の相対面積比を 0 とし、最小二乗法に用いる標準油脂データとした。しかし、Fig.1:b の硬化大豆油のクロマトグラムからわかるように、C26、C36 及び C38 付近にもピークが認められ、この他にもピークは小さいが、設定したベースラインに対して積分値を有する区間 (C46、C48 等) があることがわかる。そこで、本研究においてはこれらの区間の相対面積比も正確な混合割合の算出には必要となると考え、最小二乗法に用いる標準油脂データに含めることとした。

3. 1. 1 分析法 A (従来法) 及び分析法 B (改良法)

Table6 及び 7 に分析法 A による定量結果を示す。乳脂肪とクロマトグラムのピークパターンが大きく異なる水添大豆油の場合においても、比較的類似したパターンを示すやし油においても、実際の混合割合から 0.5%~0.7% 程度の誤差を生じていた。榎本らの報告²⁾では、0.4%~3.0% (15m カラムの場合) の誤差であったとしている。

これに対し、分析法 B では、植物油脂の種類に関係なく、乳脂肪割合 15%、30%、70% 付近に調製された全ての検証用試料において、実際の混合割合に対して概ね 0.1% 以内の誤差で精度良く定量出来た。この結果は、検証用試料と乳脂肪割合の近似した対照用試料のクロマトグラムを用いて最小二乗法を行うことで、乳脂肪含有量とクロマトグラムパターンの関係をより精密に評価できたことによるものと考えられる。

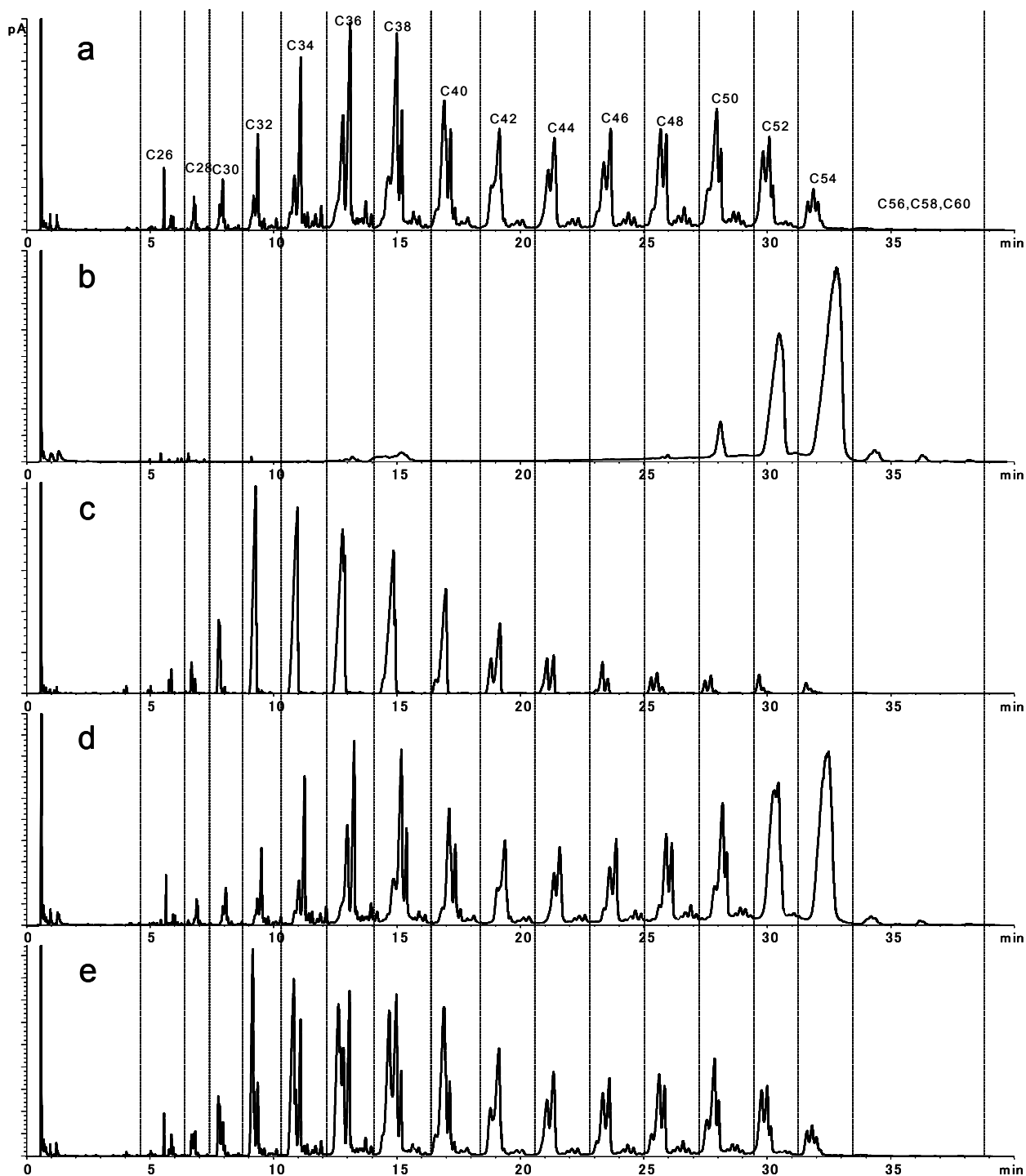


Fig. 1 Gas chromatograms of single fats and mixed fats.

a = Milk fat; b = Hydrogenated soy bean oil; c = Coconut oil; d = Mixed fat (a:b = 7:3); e = Mixed fat (a:c = 7:3)

3. 2 メチルエステル化物分析

3. 2. 1 分析法 C (酞酸法) 及び分析法 D (脂肪酸組成—最小二乗法)

Table4 及び 5 に、酞酸メチルのピークについてエステル交換反応の再現性、及び繰り返し測定精度の確認を行った結果を示す。再現性及び繰り返し性共に良好な結果が得られた。

Table 4 Reproducibility of interesterification confirmed by the peak area ratios of C4 to C5 of 10 samples

sample	Peak area ratio (C4/C5)
No.1	0.953
No.2	0.941
No.3	0.976
No.4	0.960
No.5	0.952
No.6	0.944
No.7	0.967
No.8	0.952
No.9	0.958
No.10	0.949
Mean	0.955
S.D.	0.0104
C.V.(%)	1.09

Table 5 Repeatability of the peak area ratios of C4 to C5 of a sample

Measurement	Peak area ratio (C4/C5)
1st	0.949
2nd	0.947
3rd	0.947
4th	0.947
5th	0.950
Mean	0.948
S.D	0.00140
C.V.(%)	0.148

乳脂肪、水添大豆油、やし油及び混合油脂のメチルエステル化物のクロマトグラムを Fig.2 示す。乳脂肪及び混合油脂からは、保持時間 2min 付近に酞酸メチルのピークが検出され、植物油脂からは検出されないことが確認できる。Fig.3 は、乳脂肪と水添大豆油からなる混合油脂（乳脂肪分 10%～90%）をメチルエステル化したものについて、酞酸メチルと吉草酸メチル（内部標準物質）のピーク面積比と、乳脂肪割合との相関を求めたものであり、これらの間には良好な直線関係が得られた。

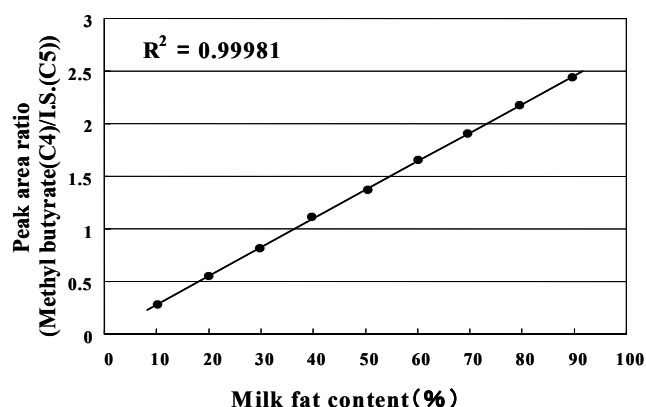


Fig. 3 Relationship between methyl butyrate content and milk fat content in mixed fat. (I.S. = internal standard: Methyl valerate)

2. 3. 4 に従い検量線を作成して、定量を行った結果を Table6 及び 7 に示す。実際の乳脂肪割合に対して、0.2%以内の誤差で定量出来た。

乳脂肪特有の成分である、酞酸という特定の成分に着目して定量を行った分析法 C に対し、油脂に特徴的な構成脂肪酸組成から、最小二乗法を用いて算出を試みた分析法 D の結果を Table6 及び 7 に示す。なお、分析法 A と B の結果から、検証用試料の乳脂肪割合に近似した対照用試料のクロマトグラムを用いて、最小二乗法により乳脂肪割合を算出したほうが良いと判断した。この為、分析法 D について、乳脂肪と植物油脂のクロマトグラムを用いて最小二乗法により乳脂肪割合を求める方法は検討しないこととした。分析法 D は、分析法 B と同様、植物油脂の種類に関係なく、乳脂肪割合 15%、30%、70%付近に調製した全ての検証用試料において、実際の乳脂肪割合に対して 0.1%以内の誤差で定量出来た。

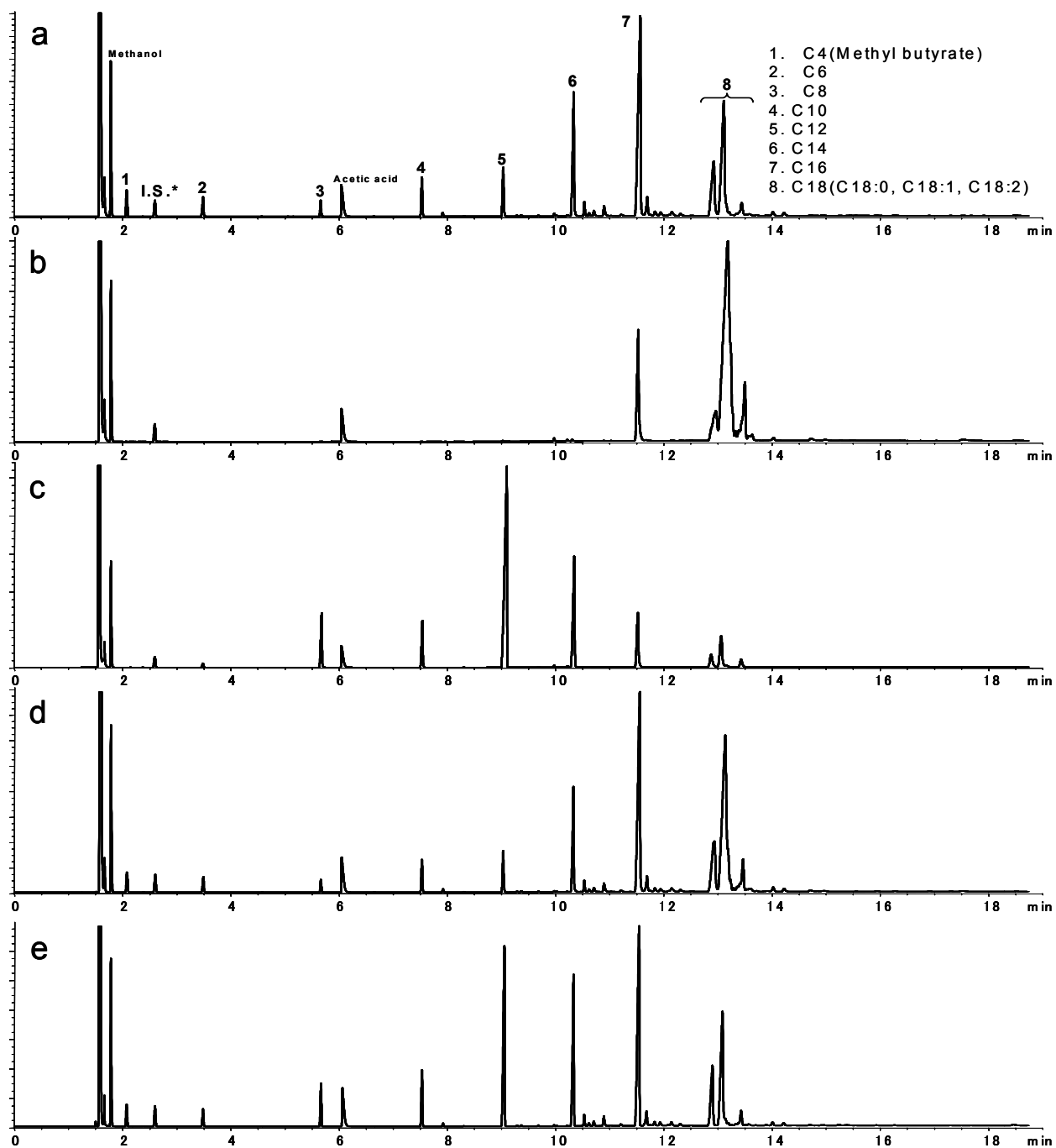


Fig. 2 Gas chromatograms of fatty acid methyl esters derived from single fats and mixed fats with valeic acid methyl ester as an internal standard.
a = Milk fat; b = Hydrogenated soy bean oil; c = Coconut oil; d = Mixed fat (a:b = 7:3); e = Mixed fat (a:c = 7:3)
I.S.* = Internal standard

Table 6 Analytical results of prepared fats (Milk fat & Hydrogenated soy bean oil)

Method ¹⁾	Milk fat content(%)		S.D.	C.V. (%)
	Actual	Determined		
A	69.97	69.27	0.185	0.267
B		69.94	0.042	0.059
C		69.78	0.139	0.200
D		69.93	0.114	0.163
A	29.96	29.49	0.257	0.873
B		30.05	0.078	0.260
C		30.07	0.177	0.589
D		29.91	0.112	0.374
A	15.01	14.50	0.062	0.510
B		15.01	0.076	0.426
C		15.03	0.171	1.139
D		14.99	0.069	0.460

1) Method A (conventional method, determined by analysis of triglyceride composition using method of least squares.n=9) ; Method B (improved method, determined by analysis of triglyceride composition using method of least squares.n=9) ; Method C (determined by analysis of butyric acid content using interesterification. n=6) ; Method D (determined by analysis of fatty acid methyl ester composition using interesterification and method of least squares.n=6)

Table 7 Analytical results of prepared fats (Milk fat & Coconut oil)

Method ¹⁾	Milk fat content(%)		S.D.	C.V.(%)
	Actual	Determined		
A	69.95	70.49	0.143	0.203
B		69.98	0.038	0.054
C		70.13	0.365	0.520
D		69.85	0.043	0.061
A	30.00	30.05	0.369	1.228
B		30.07	0.091	0.302
C		30.11	0.124	0.411
D		29.95	0.134	0.449
A	15.05	15.46	0.061	0.394
B		15.08	0.046	0.305
C		14.88	0.040	0.266
D		15.04	0.056	0.369

1) Method A (conventional method, determined by analysis of triglyceride composition using method of least squares.n=9) ; Method B (improved method, determined by analysis of triglyceride composition using method of least squares.n=9) ; Method C (determined by analysis of butyric acid content using interesterification. n=6) ; Method D (determined by analysis of fatty acid methyl ester composition using interesterification and method of least squares.n=6)

3. 3 分析法間の比較

今回検討した4つの分析法の定量結果 (Table 6 及び 7) を比較すると、分析法 A は、正確さの点で他の3つの分析法に劣る。

分析法 B、C、及び D は、いずれも優れた定量結果を示しているが、分析法 C については、僅かながら分析法 B 及び D よりも誤差及び変動係数 (C.V.%) が大きくなる傾向が認められる。

0.1%以内の優れた定量精度を示した分析法 B 及び D は、それぞれ油脂に特徴的なトリグリセリド組成及び脂肪酸組成を基に、最小二乗法により乳脂肪の算出を行うものであるが、以下の様な違いがある。

試料調製において、分析法 B では油脂をヘキサンに溶解するだけで測定試料とできるのに対し、分析法 D では、エステル交換反応を行う必要がある。しかし、この操作は簡便で時間を要せず、再現性も良い。分析法 D におけるメチルエステル化物のクロマトグラムは、ピークパターンが単純であるため、分析法 B におけるトリグリセリドのクロマトグラムのように、区間ごとに複雑なピークのまとまりを合算するような煩雑な処理を必要としない。また、メチルエステル化物のクロマトグラムの各ピークは鋭いため、カラムブリーディング等によるベースラインの変動が、各ピーク面積の積分値に影響しにくい。さらに、1回の測定時間について

も、メチルエステル化物の GC 分析条件は、トリグリセリド組成分析条件に比べ半分程度である。

これらを総合的に判断すると、分析法 D は、分析法 B に比べて同程度の定量精度有し、安定性及び迅速性においてやや優れていることから、最も有用性が高いと考えられる。

4. 要 旨

ガスクロマトグラフィーによる、混合油脂中の乳脂肪分の定量精度について、油脂のトリグリセリド組成から最小二乗法を用いる分析法 A とその改良法である分析法 B、さらに、油脂を水酸化カリウム-メタノール法によりエステル交換した後に、酪酸メチルエステル含有量から定量する分析法 C と脂肪酸メチルエステルの組成から最小二乗法を用いる分析法 D の4つの分析法で検証を行った。

本研究の結果、分析法 B、分析法 C 及び分析法 D は、従来から用いていた分析法 A よりも良い定量結果を示した。定量精度はもとより、安定性及び迅速性を考えた場合、結果の良好だった分析法 B、C 及び D の中でも、分析法 D は有用な分析法であると考えられる。

文 献

- 1) 宮城好弘, 川端省三, 井上昭朗: 関税中央分析所報, 22, 1 (1981)
- 2) 榎本康敬, 寺内豊, 伊藤茂行, 鑑信雄: 関税中央分析所報, 34, 39 (1995)
- 3) J.Molkentin, D.Precht: *Z Lebensm Unters Forsch A*, 206, 213 (1998)
- 4) J.Molkentin, D.Precht: *Eur.J.Lipid Sci. Technol*, 194 (2000)
- 5) 今村正男, 新谷助, 高木嘉寿子, 松本太郎: 油化学, 16, 618 (1969)
- 6) Y.Hirata, T.Ito, K.Ueyama et al: *J.Oleo Sci.*, Vol.52, No.11, 589 (2003)