

高速液体クロマトグラフィーを用いた混合油脂中の乳脂肪の定量

東内 一博*, 早川 彬*, 平元 秀和*, 氏原 寛*

Quantitative Determination of Milk Fat Contained in Mixed Fats using High Performance Liquid Chromatography

Kazuhiro TONAI*, Akira HAYAKAWA*, Hidekazu HIRAMOTO* and Satoru UJIHARA*

*Osaka Customs Laboratory

4-11-28, Nankohigashi, Suminoe-ku, Osaka 559-0031 Japan

In customs laboratories, for quantitative analysis of the milk fat content in mixed fats, we analyze triglyceride composition or fatty acid composition by gas chromatography (GC), and determine them quantitatively by using the least squares method. However, these GC methods involve the risk of the accuracy of the results being affected. To avoid such problems when using GC, we investigated a new quantitative analytical method using high performance liquid chromatography. By using butyric acid, a specific component of milk fat, as an indicator, we found that it is possible to do quantitative analysis with small errors.

1. 緒 言

乳脂肪とその他の油脂の混合物である調製食用脂（以下、「混合油脂」という。）は、主に関税率表第 2106.90 号に分類されるが、乳脂肪の含有率によって税表細分が数種類に分かれ、それらの税率格差は非常に大きなものとなっている。このため混合油脂の関税分類上の所属は重要な問題であり、またそ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。

現在税関においては、混合油脂中の乳脂肪の定量分析は、ガスクロマトグラフィー (GC) を用いて得られたトリグリセリド組成又は脂肪酸組成から最小二乗法により算出する方法によって行われている。しかし、これらの分析法において正確に定量を行うためには、構成油脂の原料全てが必要であり、その原料が 1 つでも欠けると正確な定量結果を得ることが困難である。また、GC を用いた脂肪酸組成による定量分析法では脂肪酸をメチルエステル化する必要があるため、揮発等による損失に注意しなければならない。

一方、乳脂肪の定量分析法として、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。）が知られている。この方法は酪酸のみを指標とするため、原料としては乳脂肪さえあれば正確な定量分析が可能であり、また、構成油脂が 3 成分以上の系であっても乳脂肪を定量することが可能である。

過去に GC により酪酸法が検討された事例¹⁾は報告されている

が、今回、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いることでメチルエステル化の必要のない、酪酸法による混合油脂中の乳脂肪の定量分析法について検討を行った。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

バター（食塩不使用）：雪印乳業製

パーム核油：輸入品

やし油：山桂産業製

酪酸、吉草酸：試薬特級、東京化成工業製

0.5 N 水酸化カリウム-エタノール溶液、0.5 N 塩酸、りん酸、0.1

N 硝酸銀溶液：試薬特級、キシダ化学製

蒸留水：HPLC 用、キシダ化学製

アセトニトリル：HPLC 用、Honeywell 製

2.2 分析装置及び分析条件

装置：Agilent 1100 (HPLC)

カラム：YMC Hydrosphere C18 (250 mm×4.6 mmI.D.)

ガードカラム：YMC Packed Column

カラム温度：50℃

移動相：5 mM りん酸水溶液/アセトニトリル (25/75, 50/50, 2/1)

流速：1.0 ml/min

検出波長：210 nm

注入量：20 µl

* 大阪税関業務部分析部門 〒559-0031 大阪府大阪市住之江区南港東 4-11-28

2.3 実験方法

2.3.1 試料調製法

2.3.1(1) 乳脂肪の抽出²⁾

バター約 10 g を湯浴上で加温融解させ、約 50 ml のエーテルで 3 回抽出を行った。エーテル抽出物は、湯浴上でエーテルの大部分を蒸発させた後、105℃の乾燥機中で 3 時間乾燥させ、乳脂肪を得た。

2.3.1(2) 内標準溶液の調製

内標準物質として炭素数が酪酸に近く、油脂由来の脂肪酸には含まれていない吉草酸を選択した。

吉草酸 5 g を 1000 ml 容メスフラスコに正確に量り取り、蒸留水で定容しこれを内標準溶液（0.5%吉草酸水溶液）とした。

2.3.1(3) イオン交換フィルターの調製

試料前処理用カートリッジ（TOYOPAK IC-SP M、TOSOH 製）に 0.1 N 硝酸銀溶液 10 ml を滴下する程度の速さで通した後、蒸留水 20 ml で洗浄しイオン交換フィルターとした。

2.3.1(4) 試料調製法³⁾

100 ml 容ナスフラスコに 2.3.1(1)で抽出した乳脂肪約 1.5 g を精秤し、0.5 N 水酸化カリウム-エタノール溶液 25 ml を加え、空気冷却管を接続して 30 分間 90℃湯浴中で還流し、油脂をけん化した。室温まで放冷した後、60 mmHg、40℃の条件で 10 分間エバポレーターで溶媒を留去し、2.3.1(2)で調製した内標準溶液 5 ml を加え、固形物を全て溶解させた後、0.5 N 塩酸 25 ml を加え中和し、移動相で 100 ml に定容した。沈殿物をろ紙でろ過し、塩化物イオンを除去するため 2.3.1(3)で調製したイオン交換フィルターを通した後、メンブレンフィルターを通して検液とし、HPLC による測定を行った。

2.3.2 分析条件の検討

2.3.2(1) HPLC 条件の検討

標準の酪酸-吉草酸水溶液（濃度：各 500 ppm）を調製し、これを用いて移動相である 5 mM リン酸水溶液/アセトニトリルの組成比の検討を行った。

2.3.2(2) 繰返し性及び再現性の確認

2.3.1(4)に従って 10 検体の試料を並行して調製し、以下の繰返し性及び再現性についての確認を行った。

繰返し性の確認

調製した試料の内 1 検体について 5 回繰返し測定を行い、乳脂肪由来の酪酸と吉草酸のピーク面積比から、繰返し性の確認を行った。

再現性の確認

調製した 10 検体の試料についてそれぞれ測定を行い、乳脂肪由来の酪酸と吉草酸のピーク面積比から、再現性の確認を行った。

2.3.3 乳脂肪の定量

2.3.3(1) 検量線の作成

本研究では分類の基準となる、乳脂肪含有率 30%及び 70%付近の正確な定量を行うことを目的とした。

無塩バター由来の脂質中に酪酸は 3.3%程度含まれていると想定される^{4), 5)}ことから、2.3.1(4)の条件で試料を調製した場合、酪

酸濃度は乳脂肪含有率が 30%の場合で約 150 ppm、70%の場合で約 350 ppm となる。この付近を正確に定量するために以下のように試料を調製した。

乳脂肪含有率 30%付近の検量線の作成

酪酸 500 mg を 500 ml 容メスフラスコに正確に量り取り、蒸留水で定容しこれを標準原液とした（0.1%酪酸水溶液）。この標準原液 12, 13, 14, 15, 16, 17 ml をそれぞれ 100 ml 容メスフラスコに採り、内標準溶液（0.5%吉草酸水溶液）5 ml を加えた後、蒸留水で定容し標準液とした。これらの標準液を測定し、酪酸と吉草酸の濃度比と測定して得たピーク面積比から検量線を作成した。

乳脂肪含有率 70%付近の検量線の作成

2.3.3(1) i と同様に、標準原液 33, 34, 35, 36, 37, 38 ml から標準液を調製した。これらの標準液を測定し、酪酸と吉草酸の濃度比と測定して得たピーク面積比から検量線を作成した。

2.3.3(2) 標準混合油脂の調製

2.3.1(1)で抽出した乳脂肪と植物油（パーム核油、やし油）をそれぞれ湯浴上で加温融解させ、Table 1 で示す割合で混合したものを標準混合油脂とした。

Table 1 Mixture rates of standard mixed fats

No.	Mixture Rates of Standard Mixed Fats		
	Milk Fat (%)	Palm Kernel Oil (%)	Coconut Oil (%)
1	30.03	69.97	-
2	70.01	29.99	-
3	30.01	-	69.99
4	70.01	-	29.99
5	29.97	20.01	50.02

2.3.3(3) 2成分の混合油脂における乳脂肪の定量

2.3.3(2)で作成した標準混合油脂 No.1~4 について、2.3.1(4)と同様の手法で試料を調製し、測定を行った。得られたピーク面積比と 2.3.3(1)で作成した検量線から酪酸濃度を算出し、同様に求めた原料乳脂肪中の酪酸濃度と比較することで乳脂肪の定量を行った。

2.3.3(4) 3成分の混合油脂における乳脂肪の定量

標準混合油脂 No.5 について、2.3.3(3)と同様の手法で乳脂肪の定量を行った。

3. 結果及び考察

3.1 HPLC 条件

移動相に組成比が 25 対 75 の 5 mM リン酸水溶液とアセトニトリルの混合溶媒を用いた場合、酪酸の保持時間が溶媒によると考えられるピークと近接しているため、この組成比においてカラムは酪酸をほとんど保持しておらず、定量分析には不適当と判断した。

組成比を 50 対 50 として測定したクロマトグラムを Fig.1 に示す。この場合、酪酸は溶媒によると考えられるピークとは十分に分離しており、また酪酸と吉草酸のピークの分離度は 9.7 と良好な値を示した。

組成比が 2 対 1 の場合では分離度は 24.0 と良好であったが、高級脂肪酸の保持時間が長くなり、結果として分析時間が長くなる

虞があった。

以上の結果から、移動相の組成比は 50 対 50 として以降の測定を行った。

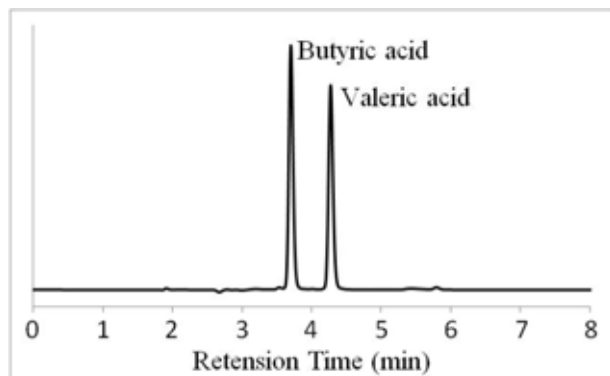


Fig. 1 Chromatogram of butyric acid and valeric acid at set conditions

3.2 繰返し性及び再現性

Table 2 に繰返し性の確認を行った結果を、Table 3 に再現性の確認を行った結果を示す。相対標準偏差が繰返し性の場合で 0.226%、再現性の場合においても 0.849% と良好な結果が得られた。なお、Fig.2 に乳脂肪けん化物のクロマトグラムを示す。

Table 2 Repeatability for the same sample

Measurement	Peak Area Ratio Per Weight
1st	1.4623
2nd	1.4614
3rd	1.4635
4th	1.4639
5th	1.4698
Average	1.4642
S. D.	0.0033
C. V. (%)	0.226

Table 3 Reproducibility for 10 samples

Sample No.	Peak Area Ratio Per Weight
1	1.4290
2	1.4448
3	1.4658
4	1.4371
5	1.4419
6	1.4430
7	1.4467
8	1.4413
9	1.4636
10	1.4623
Average	1.4475
S. D.	0.0123
C. V. (%)	0.849

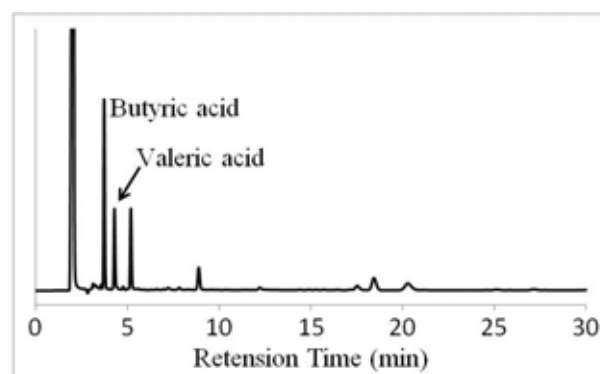


Fig. 2 Chromatogram of saponified milk fat with internal standard (valeric acid)

3.3 乳脂肪の定量

3.3.1 検量線の直線性

2.3.3(1)に従って調製した標準液の酪酸濃度は、i の場合で 120 ~170 ppm であり、ii の場合で 330~380 ppm である。酪酸濃度、酪酸濃度から算出した乳脂肪含有率、酪酸と吉草酸の濃度比を Table 4 に示す。また、作成した検量線を Fig.3 及び Fig.4 に示す。今回検討した濃度範囲において相関係数 R^2 は 0.99991 及び 0.9997 と良好な直線性が得られた。

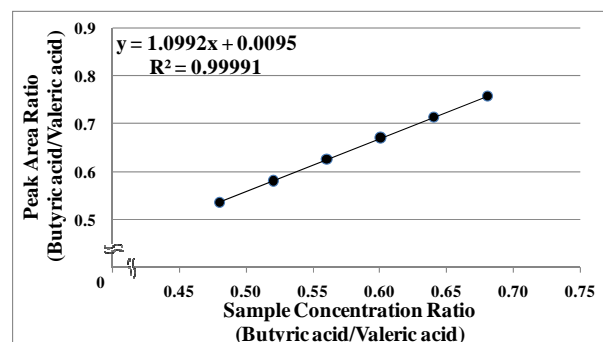


Fig. 3 Standard curve for determination of milk fat content (set milk fat content: about 30%, internal standard: valeric acid (250 ppm))

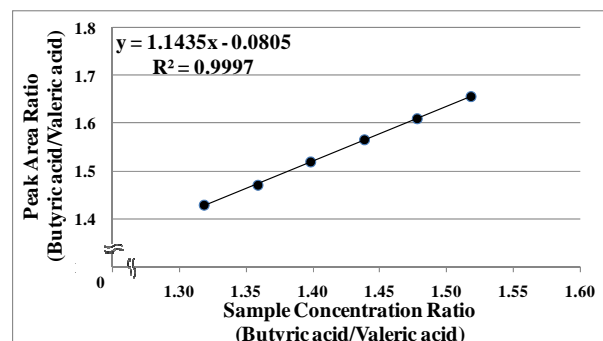


Fig. 4 Standard curve for determination of milk fat content (set milk fat content: about 70%, internal standard: valeric acid (250 ppm))

Table 4 Relationships between butyric acid concentration, milk fat content and sample concentration ratio (butyric acid/valeric acid)

(a)

Butyric acid Concentration (ppm)	Milk Fat Content (%)	Sample Concentration Ratio (Butyric acid/Valeric acid)
120	24	0.48
130	26	0.52
140	28	0.56
150	30	0.60
160	32	0.64
170	34	0.68

(a): Milk fat content is around 30%.

(b)

Butyric acid Concentration (ppm)	Milk Fat Content (%)	Sample Concentration Ratio (Butyric acid/Valeric acid)
330	66	1.32
340	68	1.34
350	70	1.36
360	72	1.38
370	74	1.40
380	76	1.42

(b): Milk fat content is around 70%.

3.3.2 2成分の混合油脂における乳脂肪の定量

標準混合油脂 No.1 及び 3 のけん化物のクロマトグラムを Fig.5 及び Fig.6 に示す。また、パーム核油けん化物及びやし油けん化物のクロマトグラムを Fig.7 及び Fig.8 に示す。

3.3.1 で作成した検量線を用いて、標準混合油脂 No.1~4 における乳脂肪の定量を行った結果を Table 5 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結果の誤差は 0.1%未満であり、また、標準偏差も 0.1%未満であった。

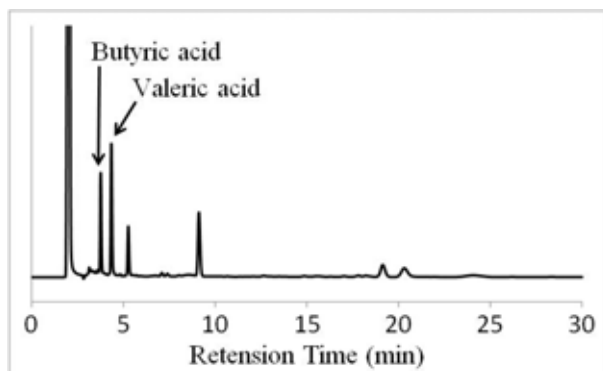


Fig. 5 Chromatogram of saponified standard mixed fat No. 1 (milk fat/palm kernel oil = 30/70) with internal standard

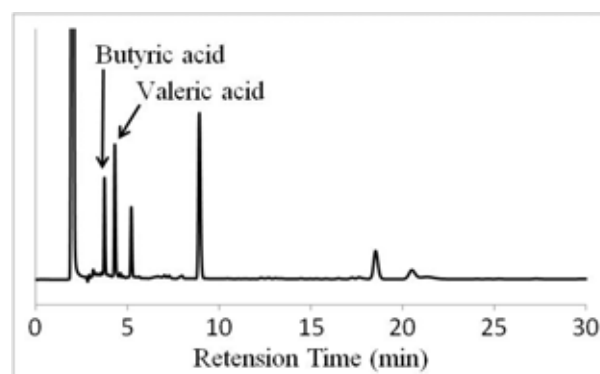


Fig. 6 Chromatogram of saponified standard mixed fat No. 3 (milk fat/coconut oil = 30/70) with internal standard

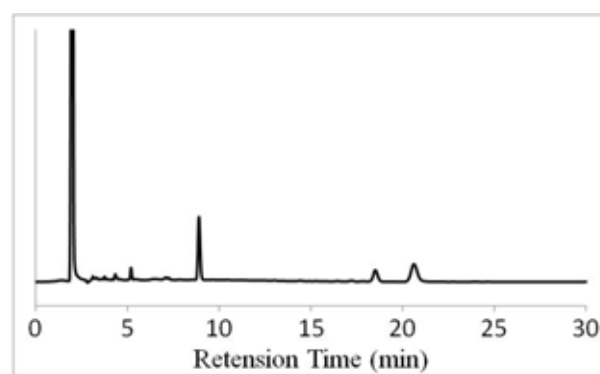


Fig. 7 Chromatogram of saponified palm kernel oil

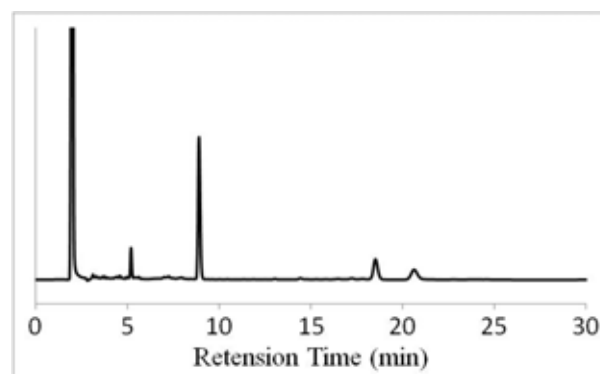


Fig. 8 Chromatogram of saponified coconut oil

Table 5 Analytical results of milk fat content for standard mixed fat No. 1-4 (n = 5)

Added Fat	Milk Fat Content			
	Actual (%)	Determined (%)	S. D. (%)	C. V. (%)
Palm Kernel Oil	30.03	30.03	0.0917	0.305
	70.01	70.07	0.0798	0.114
Coconut Oil	30.01	29.96	0.0992	0.331
	70.01	70.01	0.0955	0.136

3.3.3 3成分の混合油脂における乳脂肪の定量

標準混合油脂 No.5 のけん化物のクロマトグラムを Fig.9 に示す。

3.3.2 と同様に標準混合油脂 No.5 における乳脂肪の定量を行っ

た結果を Table 6 に示す。2成分の場合と同様に、実際の乳脂肪含有率と定量結果の誤差は0.1%未満であり、また、標準偏差も0.1%未満であった。

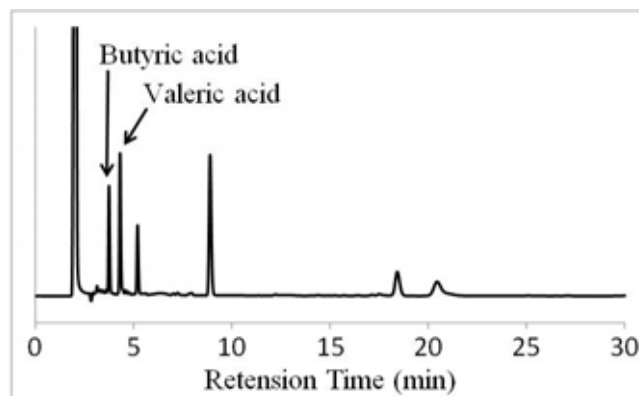


Fig. 9 Chromatogram of saponified standard mixed fat No. 5 (milk fat/palm kernel oil/coconut oil = 30/20/50) with internal standard

Table 6 Analytical results of milk fat content for standard mixed fat No. 5 (n = 5)

Added Fat Content (%)		Milk Fat Content			
Coconut oil	Palm Kernel Oil	Actual (%)	Determin (%)	S. D. (%)	C. V. (%)
50.02	20.01	29.97	29.95	0.0589	0.197

4. 要 約

HPLC を用いた酪酸法による混合油脂中の乳脂肪の定量分析法について検討を行った。今回検討した方法において繰返し性及び

再現性はともに良好であり、また、植物油脂としてパーム核油及びやし油を用いた場合の2成分及び3成分の混合油脂において、誤差及び標準偏差共に小さい定量が可能であった。特に現行法では困難である、3成分の混合油脂においても正確に乳脂肪を定量することが可能であった。

文 献

- 1) 岩下伸行, 積田優一郎, 樋野千寿, 寺内豊, 辻恵美, 熊澤勉: 関税中央分析所報, **47**, 25 (2007).
- 2) 日本薬学会編: “乳製品試験法・注解【改訂第2版】”, P.290 (1999), (金原出版).
- 3) 日本油化学会編: “基準油脂分析試験法 (I)”, 2.3.2.1-1996 (1996).
- 4) 科学技術庁資源調査会編: “五訂 日本食品標準成分表”, P.262 (2000), (大蔵省印刷局).
- 5) 文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会報告: “五訂増補 日本食品標準成分表 脂肪酸成分表編”, P.122 (2005), (国立印刷局).