

ノート

ガスクロマトグラフィーによるスクアレンの分離定量

出来三男, 佐藤宗衛, 小口盛重*

1. 緒言

魚肝油に多量に含まれるスクアレンは, 化粧品工業や潤滑剤など化学工業製品の原料として用途が広く, その輸入量も多い。これらのスクアレンは, 関税率表では非環式不飽和炭化水素として, 第 29.01 号に分類されるが, その分類はスクアレンの含有量によって規定されている。

スクアレンの定量法については報告が少なく, George¹⁾らは吸光光度法による方法を報告している。吸光光度法は魚肝油のように高度の不飽和結合をもつ油脂を含むものに適用するには困難が伴う。

これまで, スクアレンの定量にカラムクロマトグラフィーによる分離定量法を利用してきたが, この方法は長時間を要する欠点がある。

ここでは, ガスクロマトグラフィーによりグリセリド, 炭化水素及びステロイドなどと共存する魚肝油のスクアレンを分離定量するための条件を検討し, 二・三の知見を得たので報告する。

2. 実験方法

2・1 試薬及び装置

標準スクアレン: 東京化成工業 K.K.(純度 99%以上)

スクアレン: 東京化成工業 K.K.(純度 99%以上)

グルコースベンタアセテート, シュクロースオクタアセテート, テストステロン, コレスタン, コレステロール: 生化学工業

ガラスカラム: 2m × 3mm

充てん剤の種類: DEXSIL 300GC (2%), SE-30 (3%), SE-52 (5%), シリコン OV-101 (5%), APG-L (10%)

ガスクロマトグラフ: 島津 GC-5A

インテグレーター: ITG-1A

2・2 試料の物理化学恒数と赤外線吸収スペクトル

実験に用いた標準スクアレン及び輸入試料の物理化学恒数と赤外線吸収スペクトルを Table 1 及び Fig.1 に示す。スクアレンの赤外線吸収スペクトルは, 脂肪族不飽和炭化水素の吸収スペクトルを示しているが, 輸入試料の赤外線吸収スペクトルは, いずれもスクアレンによる吸収のほか, グリセリドによる吸収が顕著である。

2・3 定量操作

試料はクロロホルムに溶解し, 内部標準物質の一定量を加えて定容し, その 2~4 µl をガスクロマトグラフに注入した。クロマトグラムに現れた内部標準物質とスクアレンのピーク面積比はデジタルインテグレーターの数値を用いて計算し, この面積比から検量線により重量比を求めた。

試料中に含まれるスクアレンの含有量は次式により計算する。

$$S(\%) = \frac{R \times I_w}{S_w} \times 100$$

ここに R: 検量線より求めたスクアレンとスクアレンの重量比

I_w : 内部標準物質の採取量 (g)

S_w : 試料の採取量

$S(\%)$: 試料中のスクアレンの重量%

3. 結果及び考察

3・1 スクアレンの定量条件の検討

3・1・1 充てん剤の検討

スクアレンの良効な分離能を得るために充てん剤の選択を行なった。

Gelpi²⁾はシリコン OV-17 を用いており, Alam³⁾は, シリコンゴムにより植物油中のスクアレンを定量している。

スクアレンは高度不飽和炭化水素であることから, 二・三の無極性, 微極性の充てん剤について, 主として分

* 大蔵省関税中央分析所 271 千葉県松戸市岩瀬 531

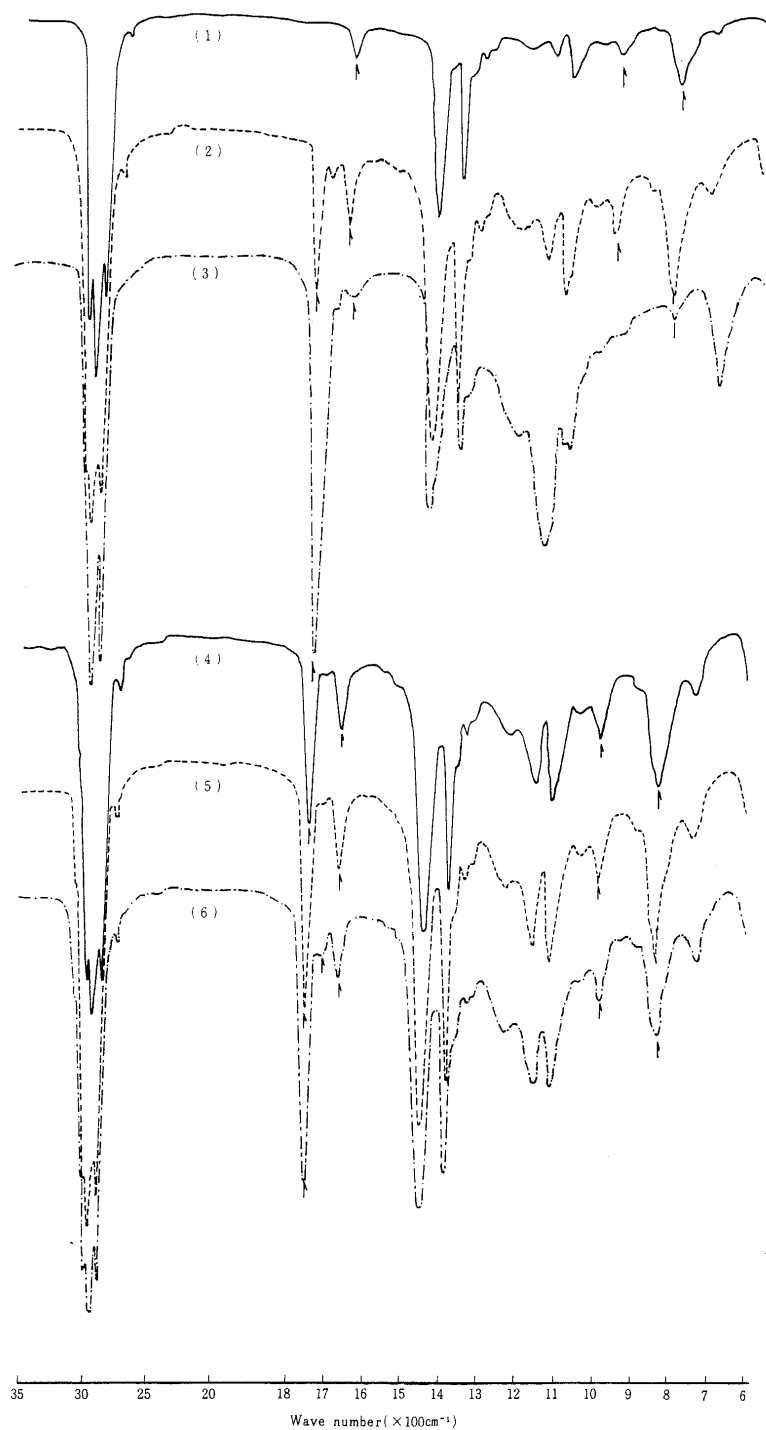


Fig. 1 Infrared spectra of squalene and imported goods
 (1): Standard squalene (2): Y - 134 (3): Y - 135
 (4): Y - 234 (5): Y - 295 (6): Y - 323
 Liquid film method

離能を検討した。

Fig. 2 に示すように、DEXSIL 300GC (2%)では、スクアレンの保持時間は短く、溶媒のピークに近接している。また、APG - L (10%)では保持時間が長く、Rtが35分でスクアレンが現われ、かなりテーリングしている。一方、SE - 30(3%)、SE - 52(5%)及びシリコン OV - 101(5%)などのシリコン系の充てん剤ではスクアレンの保持時間が、SE - 30で2分、SE - 52で5分、シリコン OV - 101で9分であり、テーリングのない良好なピークを示し、とくにシリコン OV - 101はスクアレンの分離に適している。

Table 1 Chemical Data

Sample	n_D^{20}	I. V
Squalene	1.4941	146
Y-134	1.4921	132
Y-135	1.4777	149
Y-234	1.4923	147
Y-295	1.4917	195
Y-323	1.4888	162

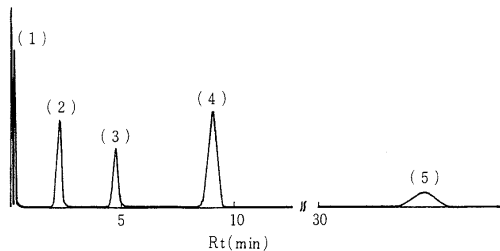


Fig. 2 Effect of column packing on separation of squalene

(1): DEXSIL - 300GC (2%) (2):SE - 30 (3%) (3): SE - 52(5%) (4) : Sili - cone OV - 101 (5%) (5): APG - L(10%)

Column length: 2m, Glass column

Column temp: 280

Injection temp: 320 , He: 65ml/min.

H₂: 45ml/min , Air: 0.8l/min. ,

Detector : FID ,Chart speed : 10mm/min. ,

3・1・2 内部標準物質の検討

内部標準物質としてグルコースペンタアセート及びシュクロースオクタアセートの糖アセート、テストステロン並びに炭化水素のスクアランなどについて検討

した。

シリコン OV - 101 をカラム充てん剤として 内部標準物質とスクアレンとの保持時間の関係をみると Fig.3 に示すようにグルコースペンタアセートのピークは1分間で現われ、スクアレンの保持時間と著しく異なる。シュクロースオクタアセートは保持時間が長く、さらにピークがテーリングしている。一方、テストステロン及びスクアランは、ほぼ同じ保持時間であり、スクアレンのピークに近接している。テストステロンは、この条件でわずかにテーリングが見られる(Fig.3)。

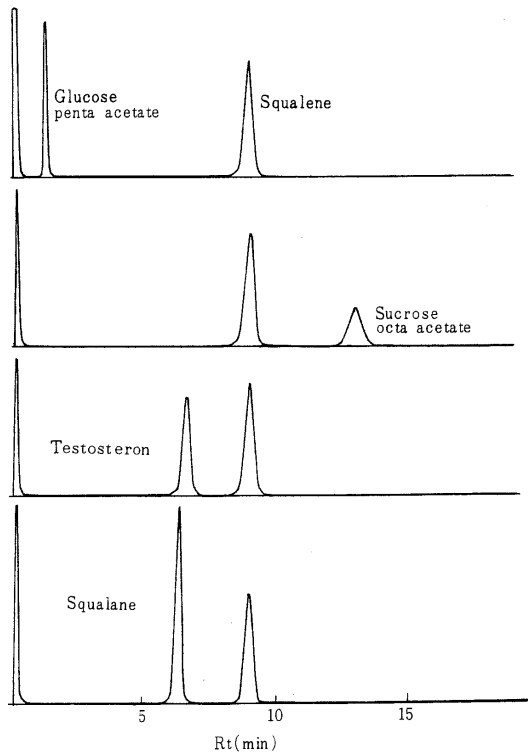


Fig. 3 Gas chromatograms of internal standard substance

Column : Silicone OV - 101 (5%) , 2m , glass column , Column temp: 280

Injection temp.: 320 , He: 65ml/min.

H₂:45ml/min. , Air: 0.8l/min.

Detector : FID , Chart speed:10mm/in.

Table 2 にこれらの内部標準物質のスクアレンに対する相対モル感度を示した。

Table 2 からわかるように、テストステロンは、スクアレンとモル感度に大きな差があり、一方、スクアラン

はほぼ等しいモル感度を示している。したがって、ここではスクアレンと化学構造の近似するスクアランを内部標準物質とした。

Table 2 Relative molar sensitivity of internal standard substance to squalene

Internal standard substance	Relative molar sensitivity
Glucose penta acetate	0.3080
Sucrose octa acetate	0.5068
Testosterone	0.6748
Squalane	1.0250

3・1・3 カラム温度の選択

充てん剤にシリコン OV - 101 を用いたときのスクアレンとスクアランとの分離能に及ぼすカラム温度の影響について検討した。

Fig. 4 に示すように、カラム温度を 300 とすると、溶出が早く、内部標準物質であるスクアランとスクアレンの分離は良好でない。260 においては、スクアレンのピークの保持時間が長く、テーリング現象がみられ、良好な分離を示さない。

一方、カラム温度を 280 にすると、スクアランとスクアレンの相互分離が良く、ピークの対称性も良く、良い分離能を示している。この条件では、コレスタン、コレステロールの共存は定量を妨害しない(Fig.5)。

これらの実験結果からスクアレン定量のガスクロマトグラフィーの条件を次のようにした。

Packed column : Silicone OV - 101 (5%) ,

Glass column : 2m × 3mm

Support : Chromosorb GAW. DMCS

Mesh : 80 ~ 100

Column temp. : 280 , Inject. temp. : 320

He : 65ml/min. , H₂ : 45ml/min.

Air : 0.8l/min. , Chart Speed : 10mm/min.

Digital Integrator

Threshold : 200 μ V , Peak detect : 0.03mV/min.

3・2 検量線の作成

スクアレンと内部標準物質のスクアランをそれぞれクロロホルムに溶かし、任意の重量比で混合し、数種の混合溶液を調製する。これらの混合液について、3・1のガスクロマトグラフィーの条件により分離する。スクアランとスクアレンの面積比を求め、重量比と面積比の

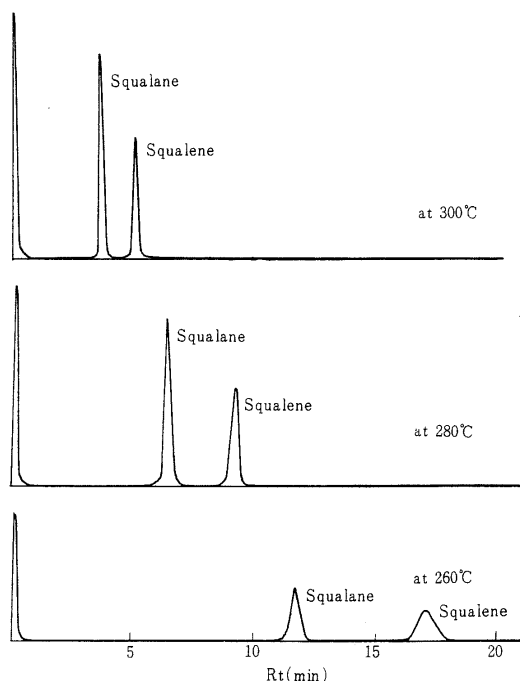


Fig.4 Effect of column temp. on separation of squalane and squalene

Column : Silicone OV - 101 (5%) , 2m , glass column , injection temp.:320

He: 65ml/min. , H₂: 45ml/min. , Air: 0.8l/min. , Detector : FID , Chart speed :10mm/min.

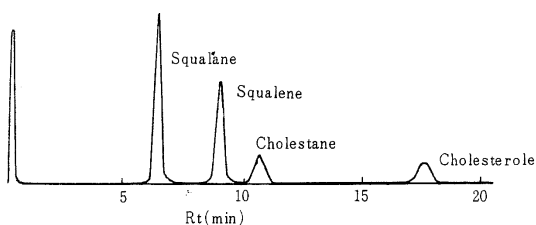


Fig.5 Interference of cholestane and cholesterol for separation

GC conditions are same as cited in

Fig. 2

関係から検量線を作成する。繰り返し分析した結果は、Table3 に示す。

Table 3 に示すように、各濃度における測定値のパラツキはいずれも少なく、標準偏差として 0.05、変動係数

Table3 Analytical data for calibration curve

NO	1	2	3	4	5	6
1	0.560	0.829	1.090	2.104	2.627	3.207
2	0.560	0.834	1.082	2.077	2.666	3.218
3	0.561	0.831	1.097	2.081	2.657	3.227
4	0.561	0.824	1.092	2.097	2.753	3.176
5	0.563	0.828	1.130	2.037	2.633	3.183
\bar{X}	0.561	0.829	1.088	2.079	2.667	3.202
σ	0.0011	0.0033	0.0063	0.0233	0.0453	0.0197
C. V. (%)	0.195	0.400	0.583	1.122	1.698	0.616

1.7%以下であり、再現性は良い。

5 回の測定値の平均値から作成した検量線は Fig.6 に示すように、重量比と面積比の間に直線関係がある。

3・3 回収率の検討

標準添加法による回収率の検討を行なった。

すなわち、グリセリド、コレスタン、コレステロールなどを含む輸入試料（スクアレンの含有量 23.51%）に標準スクアレンを一定濃度に添加したものを調製し、添加したスクアレンの回収率を求めた。

Table4 に示すように、スクアレンを 30% 添加したときのスクアレンの回収率は最も低い値で 96%、最も高い値で 98.9% であり 5 回の測定値の平均は 98% 程度である。一方、スクアレンを 50～60% 添加したときの回収率は最低 100%、最高 105% となっており、平均回収率は、103% である。

3・4 応用

この方法を輸入試料に応用した。各試料中のスクアレ

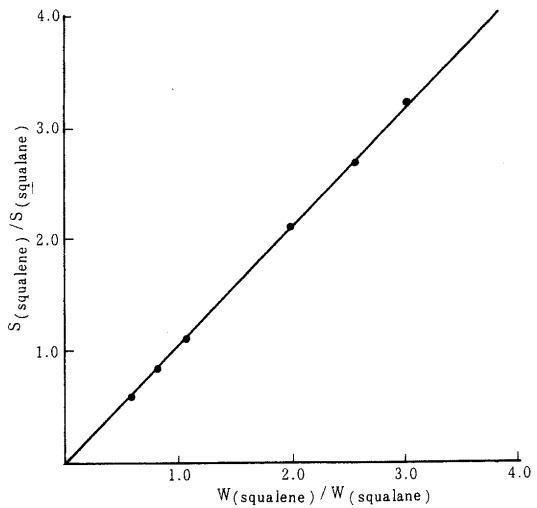


Fig.6 Calibration curve、

ンの含有量は Table5 に示すとおりである。

輸入試料は Fig.1 の赤外線吸収スペクトルに示すように、いずれもスクアレンのほかグリセリドを含んでいるがこの方法では、グリセリドの共存はスクアレンの定量に全く影響を与えなかった。

4．総 括

ガスクロマトグラフィーにより、さめ肝油中のスクアレンを分離定量する方法について、充てん剤、内部標準物質、カラム温度などの諸条件を検討した結果、さめ肝油中に共存するグリセリド、ステロイドなどの妨害なしにスクアレンを分離定量することができた。

スクアレンの回収率は、ほぼ 100% である。

この方法の繰り返し精度は変動係数 1.7% であり、再

Table 4 Recovery of squalene by standard addition method

NO	A	B	C
1	98.91	101.36	103.90
2	97.59	101.36	100.46
3	98.91	104.20	102.92
4	96.24	103.73	105.62
5	98.91	103.25	104.15
\bar{x}	98.11	102.78	103.41
σ	1.068	1.198	1.710
C. V. (%)	1.088	1.165	1.653

A: About 30% squalene added to Y - 135

B: About 50% squalene added to Y - 135

C: About 60% squalene added to Y - 135

Table5 Squalene contents of imported goods

NO	Y-134	Y-135	Y-234	Y-295	Y-323
1	92.30	23.24	88.63	88.44	73.05
2	93.12	23.58	88.63	88.44	74.01
3	90.67	23.24	87.79	89.68	73.05
4	91.49	23.58	90.30	89.06	73.05
5	92.30	23.92	87.79	89.06	74.01
\bar{x}	91.98	23.51	88.63	88.94	73.43
σ	0.832	0.254	0.917	0.464	0.470
C. V. (%)	0.904	1.082	1.034	0.522	0.641

現性はよい。実際の試料として、数種の輸入魚肝油のスクアレンを本法により定量した。

文 献

- 1) George. H.Rothblat, Dolores S.Martak and David Kritchevsky: *Anal. Biochem.*, 4, 52 (1962).
- 2) E.Gelpi and J.Oro: *J.Amer. Oil Chemists Soc.*, 45, 144 (1968).
- 3) S.Q.Alam, J.Brossard and G.Mackinny: *Nature*, 194, 479 (1962).

Quantitative Determination of Squalene in Fish Liver Oil by Gas Chromatography

Mitsuo DEKI, Soei SATO and Shigemori OGUCHI
 Central Customs Laboratory, Ministry of Finance,
 531, Iwase, Matsudo - shi, Chiba - ken, Japan.

- Received June 30, 1973 -