

ガスクロマトグラフィーの食品分析への応用

— 脂 肪 酸 —

渡 辺 昭 一 郎*

1. はじめに

油脂は化学的にいうとグリセリンと脂肪酸のエステル、すなわちトリグリセリドである。油脂を構成している脂肪酸は直鎖で炭素数が偶数のものが主であり、飽和あるいは二重結合を数個含んでいる。油脂の性状は、どのような脂肪酸がどの位含まれているかによって決まるので、油脂の脂肪酸組成を知ることは、その油脂を知るための最も手近な、かつ最も確かな道であり、また油脂の鑑別にも利用される場合もある¹⁾。今日脂肪酸組成の分析にはほとんどガスクロマトグラフィー (GLC) が用いられ、脂肪酸メチルが試料とされる。昇温 GLC によるトリグリセリドの分析も行われているが、全炭素数による分離のみで、飽和、不飽和の分離は行われぬ。

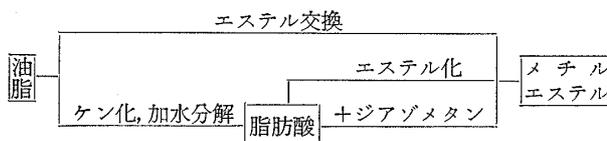
GLC 分析についてあらかじめ注意すべき点をあげると、(1) GLC は混合物中の個々の成分を分離する分離分析の機器であり、各成分が何であるかという知見を独立して得ることは出来ず、定性分析は流出時間 (正しくは保持容量) の比較によるだけである。(2) 後述の様に操作箇所がいくつもあり、それらの条件が適当でない時には誤った結果を生じることがあり、とくに定量分析においてそれが著しい。(3) 分離能力はカラムに大きく依存しており、カラムは使用するにつれて劣化するので常にその性能を管理しなければならない。

2. 試料の調製

2-1 メチルエステルの調製

脂肪酸メチルの調製が正しく行われないと、いかに GLC 分析を適確に行っても得られた結果はもとの油脂の脂肪酸組成と異なってしまう。とくに低級酸 (C₈ 以下) や高度不飽和酸を含む油脂の取扱いは、後述するように慎重を期さねばならない。油脂または脂肪酸からメチルエステルを作る方法はいく通りもあるが、普通はほとんど同じ結果が得られる。したがって各方法の長所、短所を考え、原料の性質などにより最も適した方法を選ぶべきである。つぎにメチルエステルを得る一般的経路を示

す。



なお低級酸や高度不飽和酸が存在する時は次の様な注意が必要である。

(1) 低級酸

メチルエステルとした時、蒸気圧がかなり高く、また水に対する溶解性も高級脂肪酸メチルより大きいので、溶剤留去や水洗などの操作中その一部が失われる恐れがある。そのため飽和食塩水で洗うとか、最終段階での溶剤留去を不完全に行なうなどの注意が必要である (溶剤が残っても GLC 分析の妨げとならない)。またジアゾメタンによる方法、BF₃ を触媒とする方法は前記のような操作がないので低級酸メチルを失う恐れが少ない。

(2) 高度不飽和酸

魚油などに通常含まれており、きわめて不安定であるので、すべての操作を不活性ガス気流中で行い、エステルとしてからもすみやかに分析を行なわねばならない。

2-2 エステル交換

この方法は不ケン化物が多い場合や、遊離脂肪酸が存在していて AV が 1~2 を示すような時には適さない。触媒としては塩酸、硫酸、水酸化ナトリウム、ナトリウムメチラート、三フッ化ホウ素などが用いられるが、酸性触媒では反応速度がおそいので、普通アルカリ性触媒が用いられる。以下にナトリウムメチラートを用いる方法の一例をあげる。200mg の油脂にエステル交換試薬 (無水メタノール 1 l に対し 1 g の割合で金属ナトリウムを加え、水素発生を終るまで完全に反応を行って作る。使用のつど作成することが望ましい) を 10ml の割合で加え、約 2 時間加熱還流を行なう。次に酢酸または塩酸を加えて中和し、減圧下でメタノールを留去、残留をエーテル抽出し、水洗後無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、エーテル留去を行って試料を得る。

* 北里大学衛生学部

2-3 ケン化、加水分解^{2),3)}

反応条件は一定ではないが次にその一例を示す。油脂 100g に約 1N の水酸化カリウムまたは水酸化ナトリウム-エタノール溶液（出来るだけ少量の水でアルカリを溶かし、エタノールを加えて所定の濃度とする）500ml を加え、3時間加熱還流を行なう。つぎに大部分のエタノールを留去してから水を加え、生じた石けんをとく。これに硫酸または塩酸を加えて加温し脂肪酸を遊離させる。エーテルで抽出し、エーテル溶液を水液し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、エーテル留去を行って脂肪酸を得る。もし不ケン化物を除く必要のある時は、硫酸を加える前に石油エーテルまたはエーテルを加えて不ケン化物を抽出する。この抽出は毎回新しい溶剤を用いて 2~3回繰り返して行なう。石けんはこれらの溶剤にとけないが、エタノールがある程度残っていると、溶剤中に多少移行する。

2-4 脂肪酸のメチルエステル化

触媒としては塩化水素、硫酸、*p*-トルエンスルホン酸、三フッ化ホウ素などを用い、脂肪酸とメタノールを反応させる。

(1) 硫酸を触媒とする方法⁴⁾

脂肪酸 2g に 60ml の硫酸メタノール溶液（無水メタノール 230ml に対し濃硫酸を 2ml の割合で加える）を加え、1時間加熱還流を行なう。分液漏斗を用い、水 100ml を加えたのち毎回 50ml のエーテルまたは石油エーテルで 2回抽出し、エーテル溶液を水洗、無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、エーテル留去を行なってエステルを得る。

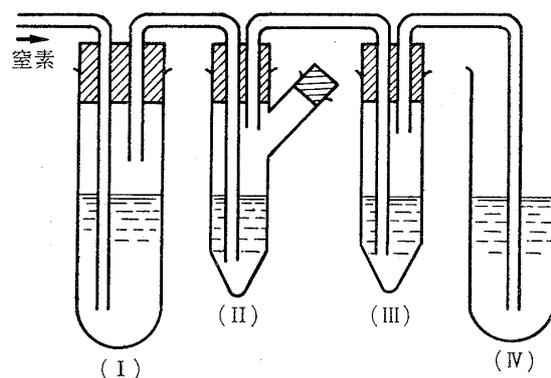
(2) BF_3 を触媒とする方法

脂肪酸 1g をフラスコにとり、10ml の BF_3 -メタノール試薬（1l 中に BF_3 125g を含むメタノール溶液：市販の BF_3 -メタノールコンプレックスまたは BF_3 -エチルエーテルコンプレックスをメタノールでうすめて作る）を加え、2分間加熱還流する。冷却後石油エーテルまたはエーテル 5ml を加えて 1分間煮沸したのち約 100ml の飽和食塩水を加え、浮上したメチルエステルの石油エーテルまたはエーテル溶液を注射器にとり、GLC 装置に注入する。

2-5 脂肪酸とジアゾメタンの反応

原料脂肪酸が少量（10mg でも可）であったり、低級酸や高度不飽和酸を含む時に適した方法である。ジアゾメタンは普通エーテル溶液として用いるが保存出来ないためそのつど *N*-メチル-*N*-ニトロソ-*p*-トルエンスルホンアミドなどから得る。アルカリの存在下でスルホンアミドにアルコールを作用させるとジアゾメタンが発生す

第1図 ジアゾメタン発生装置



(I) エーテル 80ml (II) カルビトール 2ml, 水酸化カリウム水溶液 1ml (水酸化カリウム 3g+水 5ml)
(III) 脂肪酸エーテル溶液 (IV) 水酢酸 50ml

る。原理的に第 1 図のような装置⁵⁾を用いると操作が簡単である。容器 II の横の口からスルホンアミド 2g を 4ml のエーテルにとかしたものを加えすばやく栓をする。ここで発生したジアゾメタンは、III に送られ脂肪酸と反応してメチルエステルを生成する。この反応は数分ないし 10 数分間で完結し、過剰のジアゾメタンにより溶液が黄色を帯びて来たら III をはずし、水浴などでゆるやかに加温してジアゾメタンを留去し、さらにエーテルを蒸留して必要に応じて濃縮し分析試料を得る。なおスルホンアミドは市販されているが合成⁶⁾も容易である。

ジアゾメタンによる方法では上記のように水洗の操作がなく、常温で反応が行われるので低級酸が失われず、また不飽和酸が変化を受けないという利点がある。一方欠点ならびに注意しなければならないことは、(1)猛毒であり、必ずドラフト中で操作する。(2)爆発性があるので 30°C 以下で操作し、火気を近づけてはならない。すり合せ器具も用いてはならない。ガラス管の切口は火であぶって十分平滑しておく。

2-6 標準試料

定性分析の項で述べるように、GLC 分析にはどうしても標準試料が必要であり、出来る限り多種を揃えておくことが望ましい。そのため極めて高純度の脂肪酸メチルの標準試料が市販されているが、高価であり、定性分析で用いる場合にはそれ程純度の高い必要もなく、各人が調製したもので十分役に立つ。例えばパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸はそれぞれ市販品を用い、リノール酸、リノレン酸などはそれぞれサフラワー油、アマニ油を原料とし、尿素付加、低温分別、分留などの操作を適当に組み合わせ、繰返し行なうことによってかなり純度の高いもの（98%以上）が得られる⁷⁾。二重結合を 2 個以上含むものは保存に注意しなければいけない。

3. GLC の操作条件

3-1 操作条件

GLC の操作条件として、キャリアガスの種類、流速、検出器の温度、カラムの長さ、材質、担体の種類、粒度、固定相液体の種類、濃度（固定相液体(g)/担体(g)）、カラム温度、注入口温度、注入量など非常に多くの項目があり、これらは互に関連しているため、1つ1つについて完全な条件を決めることは不可能である。これらのうちとくに結果に対して大きな影響を与えるものとして、固定相液体を別にすると、カラム温度、注入量などがある。普通使われている検出器として水素炎イオン化方式(FID)と熱伝導度方式(TCD)とがあるが、FIDを備えたものは、TCDにくらべ試料注入量が少ないこと、安定化に要する時間が短いことなどの特徴をもつが、このほか後述するように、試料の化学構造や分子量の違いによる相対感度に関して TCD との間に若干の違いがある。

通常の脂肪酸組成の分析に採用されている条件を示す⁸⁾⁹⁾。カッコ内は FID 付きの装置の場合である。

(1) キャリヤガス; He(N₂ または He), 30~60ml/min
 (2) カラム; 銅, ステンレス または ガラス 2m~3m (3) カラム温度; 180~230°C (170~210°C) (4) 検出器温度; カラム温度より 30~50°C 高い温度 (5) 注入口温度; カラム温度より約 50°C 高い温度 (6) 固定相液体, 担体; EGS または DEGS 60~80mesh または 80~100mesh, 普通 20% 前後の濃度のもの (7) 注入量; 約 20% の溶液として 1~5 μ l (0.5~2 μ l)

以上は決定的なものではなく、例えば低級酸についてはカラム温度をもっと低くしなければいけない。

(1) キャリヤガスの流速

装置によって適した流速が大体決められており、それより速すぎても遅すぎても理論段数、相対尖鋭度は低下し、また相対感度も変化する。

(2) 固定相液体

脂肪酸メチルの沸点は一般に高く、沸点以上の温度で GLC 分析を行なうことは不可能である。TCD で 180~230°C, FID で 170~210°C で分析をするので、固定相液体もこの温度で安定なものでなければならない。普通脂肪酸組成の分析に用いられるのは、ポリエステル系の EGS や DEGS である。これらは極性が大で、不飽和度の違いによる分離が可能である。アピエゾン系やシリコン系(SE30 など)のものはポリエステル系より高温に耐え得るが、極性が小さく、不飽和度による分離がほとんど不可能であり、天然油脂の脂肪酸分析には不適である。ポリエステルにも色々なものがあり、分離能に若干の相違があるので目的や試料に応じて適当なものをえらばねばならない。例えば EGS や DEGS のカラムでは

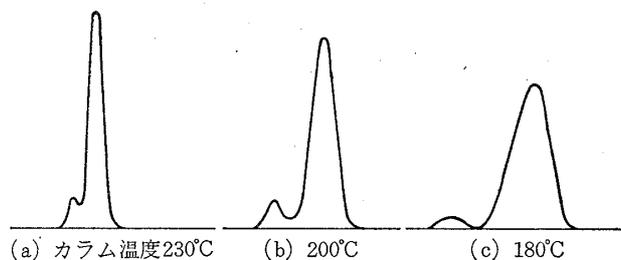
C18:3 と C20:0 または C20:1 との分離が困難な場合があるが(第 1 表参照)、プロピレングリコールまたはジプロピレングリコールとコハク酸のポリエステル¹⁰⁾、ブタンジオールとコハク酸のポリエステル、または α -ブチル- α' -オキシエチルグリセリルジエーテルとアジピン酸またはコハク酸のポリエステル¹¹⁾を用いると分離が良好となる(第 1 表参照)。

固定相液体の濃度は 5~25% のものが多いが、5% 以下のものも市販されている。このようなものは低濃度カラムともいわれ、分析時間の短縮、カラム温度の低下が可能で分析可能な沸点範囲が高くなるといわれるが、注入量が多いと分析が不完全となり、またカラムの寿命も短い。脂肪酸メチルの分析では 20% 前後のものが無難である。

(3) カラム温度

カラム温度を上げると保持時間は短くなり、ピークの幅がせまくなり、高さを増す。またテーリングを若干減少するが温度を上げすぎると分離が悪くなり、固定相液体の劣化がおこりやすくなる。カラム温度とピークの位置や形などとの関係について一例を第 2 図に示す。(a) はピークの重なりが著しく、(c) では小さいピークの形が定量化に適していない。

第 2 図 ステアリン酸メチルとオレイン酸メチル混合物の分析例



DEGS 25%, クロモソルブ W 60~80メッシュ, 2m×3mm
 注入口温度 240°C, 検出器(FID)温度 250°C
 キャリヤガス, N₂ 40ml/min

(4) 試料注入量

検出器の能力に限度があり、注入量が多すぎると誤った定量分析の結果を与えやすい。また一般にピークの重なりも増す。注入量は少ない方が良い結果が得られるようであるが、そのために感度を上げねばならず、ベースラインの安定化に余分の時間がかかることがある。

(5) 注入口温度

試料は注入後ただちに瞬間蒸発するのが理想的であるが、このためにも脂肪酸メチルのように高沸点試料の注入量は少ないほうが良く、注入口温度は試料が分解しない限度まで高い方がよい(リノレン酸メチルは 350°C 以

上で分解する)。温度が低いとピークの尖鋭度は低下し、分離能力も低下する。

3-2 操作条件とクロマトグラムの関係

GLC 分析を行なうと一連のピーク群の描かれたクロマトグラムが得られる。定性分析、定量分析の項で詳しく述べるがこのクロマトグラムからピークの保持容量を測定して何が含まれているかを決め、ピーク面積を測って定量を行なうわけである。したがって正しい分析を行うためには、定性、定量に適したクロマトグラムを得ねばならない。クロマトグラムの良否は通常、ピークの位置、形などで判断し、不良であれば条件を変えて再度分析をすることが必要である。

(1) ピークの位置

定性分析は各成分の保持容量にのみ依存しており、出発点からピークの頂までの距離をはかって判断を下すわけである。その距離が近いことは分析時間が短いという利点はあるが、測定誤差を生じやすくなり、むしろ適当な保持容量が必要である。したがってあまり早くピークが現れる時には、とくにそれが1個でない時、カラム温度をやや低くしたり、記録紙の送り速度を早くする必要がある。しかしカラム温度をあまり低くすると、尖鋭度が小となり、重なりが増し、また後から流出する成分の分離が不良となる。

(2) ピークの形

先端が尖った二等辺三角形であることが望ましい。しかしあまりにも尖りすぎて幅のせまいピークは、定性分析では差し支えないが、定量分析で三角形の面積を測る場合、幅の測定に誤差が大きくなる。ピークの高さの半分の位置における幅(半値幅)が少なくとも約5mm程度は必要である。この場合、0.5mm目盛の物尺を用いることが望ましい。幅を広くするためには、カラム温度を低くしたり、記録紙の送り速度を早くすれば良い。しかしそれにもなる影響については(1)の場合と同様である。なお記録紙の送り速度を途中で変える場合には(始めは速く、途中で遅くする)、あらかじめその速度を正確に測っておくことが必要である。また高さにくらべ幅が広すぎるピークも正しい面積測定が困難である。高さの半分の位置が僅かにずれても、その点における幅がかなり変るためである。この様なピークに対しては、感度を切り替えて高さを増す。この場合、感度切替えが正しく行なわれることをあらかじめチェックしておく必要がある。

テーリングがはなはだしい時は、定量分析で正しい結果が得られない。テーリングの主な原因は、担体が試料を吸着するためともいわれ、操作条件を変えてもほとん

ど除くことは難しいが、注入口温度やカラム温度を上げると多少減らすことが出来る。またテーリングはカラムの劣化が著しい時にもよく見受けられ、カラムを新しくしたり、他の種類のカラムを用いると除くことが出来る。

(3) ピークの形

あまり小さいピークは定量分析で大きな誤差を伴う。とくにベースラインに乱れがあると面積測定の誤差はさらに大きくなる。フルスケールの少なくとも3分の1位の高さをもつピークが望ましく、そのためには注入量を増すことと、感度を上げることが考えられる。試料中に多量の成分と少量の成分が混ざって含まれていると、ピークの高さの差が著しくなり、小さいピークが生ずる。この時、少量成分のピークだけ感度を高くして、見掛け上ピークの高さを大きくそろえることが出来る。しかし天然の脂肪酸組成を分析する時は、成分の数も多く、しかも接近して現われるピーク(例えばC18:0, C18:1)があるので、感度切替が実行出来ない場合が多い。この様な時には多量成分のピークの大きさに合わせた感度で1枚のクロマトグラムを作り、次に少量成分のピークがフルスケールの約3分の1位の高さになるようにして(感度増大または注入量増加)もう1枚クロマトグラムを得る(多量成分のピークはスケールアウトする)。そしてこの2枚のクロマトグラムに共通な、中程度含有率の成分のピークを標準として、一方ではこれと多量成分の比を求め、他方ではこれと少量成分との比を求め、計算により全体についての各成分の比を得ることが出来る。

感度切替を行わない場合、約5%に満たない面積のピークについての分析値は、極めて信頼性が低いといえる。

(4) ピークの重なり

ピークは重ならないことが望ましいが、たとえ重なっても2つのピークの間谷の高さが、両方のピークの高さの半分の位置よりも低ければ大体正しい定量分析が行なわれる。通常の油脂の脂肪酸分析で、一般に微量ないしはそれに近い奇数酸、分枝酸を別にして、飽和酸およびモノエン酸の系列、それに広く存在するリノール酸、リノレン酸の範囲内では、良好なカラムを用い、操作条件が適当ならばほとんどピークの重なりは防げる筈である。したがってピークに大きな重なりがある場合、カラム温度を変えたり、注入量を減らすことにより、多少重なりを減らすことも出来るが、それにも限度があり、カラムを取り換えることが重なりを除く最良の方法とも言えよう。重なりは、カラムの劣化、試料注入量に対し固定相液体の量が少ないこと、固定相液体の選択の誤りなどがその原因である。

ガスクロマトグラフィーの食品分析への応用

カラムの分離能力をしらべる一つの方法として、ステアリン酸メチルとオレイン酸メチルのほぼ等量混合物を試料として GLC 分析を行ない、次式により分離能を求める。

$$\text{分離能} = \frac{2Y}{S+O}$$

Y: 2つのピーク頂点間の距離

S, O: それぞれステアリン酸メチル, オレイン酸メチルのピークの底辺の長さ

上式の分離能の値が 1.0 以上であることが望ましい。

4. 定性分析

各ピークに相当する成分を決めるために、以下に述べるような方法が単独に、あるいは併用して採用される。たとえば大部分のピークを ECL 値で求め、接近したピークは標準試料と比較して決めれば誤りが少ない。しかし微量成分まで検討するような時には、かなり接近した保持容量をもつものがいくつか存在し、たとえば C16:0 と C18:0 の間に現われるピークには、C17:0, C16:1 のほか分枝酸などがあり、簡単に同定することは極めて危険である。試料を水素添加してからまた GLC 分析を行ない、水素添加前のクロマトグラムと比較することにより、不飽和酸のピークを確認することが出来る。

保持時間を測るときの出発点は次のようにして決めても差し支えない。注入器をヘキサンやエーテルで洗った際僅かに注入器内にこれらが残り、試料のクロマトグラムにこれらの溶剤のピークが現われる。また試料をこれらの溶液として分析する時には、当然溶剤のピークが見られる。脂肪酸エステル分析のようにかなり高温で GLC を操作する時はこれらの溶剤のピークを出発点と見なし得る¹²⁾。

4-1 純物質(標準試料)との比較

保持容量はカラムの種類、温度などの操作条件が少しでも変るとかなりの影響を受けるので、分析のつど純物質の保持容量を測り、これと比較して同定を行なう。試料中の成分の数が多く、それらをすべてこの方法で同定することは実際上困難であり、また余り意味もない。

4-2 グラフによる方法

保持容量の対数と炭素数との間には直線関係があるので、炭素数の異なる任意の飽和酸メチルを 2 種以上えらび、これらの保持容量を測り、その対数と炭素数とを両軸とするグラフを画く。次に未知試料を分析して各ピークの保持容量を測り、その対数を求め、このグラフから炭素数を知り得る。この場合保持容量のかわりに、出発点からピーク頂点までの距離の数値を用い得る。このグラフは飽和酸メチル、モノエン酸メチル、ジエン酸メチル

につき、それぞれ独立した別の直線となるので、飽和酸メチルで得たグラフをモノエン酸メチルに適用することは出来ない。ジエン酸については 2 種類以上の標準試料を入手することが難しく、そのグラフを画くことは困難である。なお標準試料を入手しにくい飽和奇数酸の同定には、この方法は極めて有効である。なおこのグラフも操作条件による影響をうけるので分析の度毎に作らねばならない。

4-3 相対保持容量(相対保持時間)

上述の様に保持容量は操作条件で変わり、分析のつど、純物質と比較したり、グラフを作らねばならない。この手数を省くために相対保持容量(実際には相対保持時間として求める場合が多いので、以下相対保持時間とする)が提唱された。これはカラム温度やキャリヤガスの流速が多少変わっても同一カラムについては、各脂肪酸メチル間の保持時間の比は一定であることを基としたものである。あらかじめ成分のわかった混合脂肪酸メチルのクロマトグラムを作り(各ピークが何であるかを知っておく)、各ピークの保持時間を求める。そのなかの一成分(中央位置に流出するものが良い)を標準成分とし、これの保持時間を 1 とし、他成分の保持時間を 1 に対する数値に換算する。この換算した値を各脂肪酸メチルの相対保持時間という。標準成分としては、C14:0 や C16:0 が多く用いられる。未知試料のクロマトグラムで前記の標準成分のピークを見出し(予想から分ることがある。あるいは標準成分の純物質を用いて保持時間を求めておく)、このピークの保持時間を 1 として他のピークの相対保持時間を求め、前に求めておいた値と比較して未知試料中の成分を決める。したがって出来る限り多種の脂肪酸メチルについて相対保持時間を求めておくことが必要である。相対保持時間の一例を第 1 表に示す。

第 1 表 相対保持時間¹¹⁾

脂肪酸メチル	カラム	EGS	S*	A**
C16:0***		1	1	1
C16:1		—	1.06	1.07
C18:0		1.55	1.76	1.77
C18:1		1.78	1.83	1.88
C18:2		2.18	2.10	2.13
C18:3		2.82	2.50	2.53
C20:1		2.82	3.34	3.31
C22:1		4.39	6.20	5.57

* α-ブチル α'-オキシエチルグリセリルジエーテルとコハク酸のポリエステル

** 上記ジエーテルとアジピン酸のポリエステル

*** 標準成分

操作条件

カラム温度: 235°C 流速: 54ml/min 注入口温度: 350°C

4-4 ECL 値 (Equivalent Chain Length value) または Carbon number

4-2 のようにして飽和酸メチルの保持容量の対数と炭素数のグラフを作り、次に既知の不飽和酸メチルの保持容量を求め、このグラフから炭素数何個 (小数点以下も読む) の飽和酸メチルに相当するかを求めた値を ECL 値または Carbon number といい、相対保持時間を炭素数で表現した値である。したがってこれもカラム温度や流速などの影響をあまり受けず、同一カラムについてそれぞれ一定値を示し、不飽和酸、とくに 4-2 のグラフから同定することが困難なりノール酸やリノレン酸の分析に利用される。ECL 値の例を第 2 表に示すが、既法のデータに頼ることは危険で、各人がそれぞれのカラムについて求めねばならない。

ECL 値は相対保持時間と同じく、流出順序を示すわけであり、この値が近いことは分離が不完全であることを意味する。たとえばアピエゾン L における C_{18:1}~C_{18:3} がその例である。

第 2 表 各種脂肪酸の ECL 値

脂肪酸 メチル	カラム	MAE* (185°C)	アピエゾン L (203°C)
C16:1		16.4	15.75
C18:1		18.3	17.65
C18:2		18.9	17.5
C18:3		19.65	17.55
C20:4		21.6	18.95
C22:1		22.2	21.6

* マレイン酸、アジピン酸とエチレングリコールから成るポリエステル

5. 定量分析

5-1 面積の測定

GLC による定量分析は各成分の量が、ピーク面積と比例関係にあることを基としている。したがってすでに述べたように、面積の測定が正しく行なわれるようなピークの位置、形、大きさが得られるに操作条件をえらぶことが正しい定量分析を行なうための第一条件である。

面積測定法としては、ピークを三角形と見なし、半値幅法 (高さ×高さの半分の位置の幅) など物尺を使って測定する方法やインテグレーターなど電気的に求める方法がある。物尺は検定付きのものをいい、プラスチック製のものは絶対に用いてはならない。

5-2 定量法

一般には内標準法、絶対検量線法などもあるが、脂肪酸の GLC 分析では面積百分率法が多く用いられる。これは各成分のピーク面積を測り、その合計を 100 として

各ピーク的面積比を計算し、組成を知る方法である。前に述べたように、途中で感度切替や記録紙送り速度を変えた時は、求めた面積を補正することを忘れてはならない。

5-3 相対感度、補正係数

GLC 分析では一般に、互に似た物質の混合物を試料とした時、重量混合%とピーク面積%とはほとんど一致するが、互に似ていない物質などの混合物の場合、両百分率の間に差が出ることもある。これは混合物中の各成分の相対感度が同じでないために起るもので、相対感度の逆数である補正係数が分っていれば、これをピーク面積に乗ずることによって補正することが出来る。すなわち、1 より大きな相対感度をもつ脂肪酸メチルは、実際以上に大きなピークを生じ、1 以下のものはその逆となるわけである。相対感度は物質の化学構造や分子量の違いによって影響を受ける。TCD や FID について相対感度に関する報告は極めて数が多い。TCD と FID の相対感度の間には明らかに違いがあり、最近我が国で行なわれた多数の研究機関の参加による合同実験の結果によると、TCD の場合¹³⁾、第 3 表に示すように各機関によって求められた各脂肪酸メチルの相対感度 (表では補正係数として示してある) は、機関によっても異なり、しかも同一機関でも組成の異なる 2 種の試料から別々に求めた値が一致しない例もあった。しかし炭素数が増すと相対感度が減少する傾向がすべて機関について認められ、今迄に報告されている多くの実例と一致した傾向を示した。したがって TCD を使って分析を行なった場合、より正確な結果を得るためには当然補正係数を用いた方が良いが、その補正係数を求めることが問題である。天然油脂に似た脂肪酸組成をもつ GLC 用混合脂肪酸メチル標準試料 (各脂肪酸メチルの重量混合%が明示されている) も市販されており、これを GLC 分析し、その装置、

第 3 表 各機関によって求められた補正係数¹³⁾

機関番号	試料	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1
1	A	0.912	0.952	0.984	1.075	1.091
1	C	0.912	0.963	0.980	1.070	1.074
3	A	0.983	0.973	0.969	1.029	1.059
3	C	0.942	0.980	0.990	1.026	1.082
4	A	0.941	0.962	0.973	1.075	1.059
4	C	0.890	1.000	1.054	1.087	0.948
5	A	0.922	0.967	0.981	1.059	1.085
5	C	0.993	0.983	0.980	1.007	1.051
6	A	0.898	0.967	0.988	1.059	1.098
6	C	0.935	0.958	0.990	1.042	1.107
7	C	0.966	0.980	1.000	1.007	1.082
8	A	0.967	0.973	0.988	1.029	1.053
重量混合%	A	17.50	17.80	25.20	21.40	17.90
	C	14.50	33.90	9.70	27.40	14.50

ガスクロマトグラフィーの食品分析への応用

操作条件についての各脂肪酸メチルの補正係数を求めることが出来るが、この試料は高価であり、一般的に入手し易いとはいえない。いずれにしても他人の求めた補正係数が利用出来ないことは確かである。したがって面積百分率からそのまま組成を求めるのが普通となっているが、炭素数にかなり差のある混合脂肪酸の場合には、とくに炭素数の少ない成分は真の値より多少大きい値が、また炭素数の多い成分は小さい値が得られる。第3表から見れば、 C_{12} から C_{18} までの混合物で、 C_{12} および C_{18} について大体5%前後のカタヨリがあることが分り、分析の目的によってはこれで十分といえよう。

FID の場合¹⁴⁾、各機関によって求められた相対感度は必ずしも一定ではなく、また TCD の時のように炭素数による傾向も認められなかった。この様なバラツキは、注入量、カラム温度など検知器以外の操作条件によることも考えられる。しかし適当な操作条件を選べば、補正を行わずに面積百分率で脂肪酸組成を求めても、真の値にほとんど一致した結果が得られる筈である。なお幾種類かの純粋な脂肪酸メチルをまぜて組成の分った試料を作り、これを分析することにより、カラムや操作条件が適当であり、検知器が正しく作用しているか否かをチェックすることは、正しい分析を行なうための極めて有効な手段である。

参考文献

- 1) 日本油化学協会編：“油脂化学便覧(改2版)”p.346 (1971) 丸善
- 2) 同上 p.430
- 3) 日本油化学協会編：“基準油脂分析試験法”2・4・10-71
- 4) 同上 2・4・20-71
- 5) 舟阪・池川編著：“最新ガスクロマトグラフィー〔Ⅱ〕”p.649 (1965) 広川書店
- 6) Becker de Boer: Org. Synthesis **34**, 96 (1954)
- 7) 日本油化学協会編：“油脂化学便覧(改2版)”p.519 (1971) 丸善
- 8) 日本油化学協会編：“基準油脂分析試験法”2・4・21-71
- 9) 同上 2・4・21・2-73
- 10) 伊東・福住：工化 **65**, 1963 (1962)
- 11) 渡辺・佐藤・北村：油化学 **16**, 570 (1967)
- 12) E. C. Horning et al.: “Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids” Vol 7. p.171 (1964) Pergamon Press (London)
- 13) 渡辺他：油化学 **22**, 102 (1973)
- 14) 渡辺他：油化学 **22**, 95 (1973)