

報 文

ボルタンメトリーによる油脂中の総遊離脂肪酸の定量

布施 哲男*, 楠 文代*, 高村喜代子®*

(1994 年 7 月 26 日受付)

(1994 年 9 月 7 日審査終了)

油脂中に含まれる遊離脂肪酸の定量のために、ボルタンメトリーによる新しい方法を開発した。過塩素酸リチウムを支持電解質として含む、2-メチル-1,4-ナフトキノン（ビタミン K_3 ）のエタノール溶液に高級脂肪酸が存在すると、ボルタモグラム上にキノンの還元波よりも正電位に前置波が現れる。この波高は、 $8 \times 10^{-6} \sim 6 \times 10^{-3}$ M の範囲で高級脂肪酸濃度に比例して良い直線関係 ($r=0.992$) を示した。8 種類の油脂試料を用いて遊離脂肪酸の含量を求めたところ、定量値の相対標準偏差は 2.5% ($n=5$) 以下であった。本法は、従来の滴定法よりも感度、精度共に優れた方法であることが明らかになった。

1 緒 言

油脂中の遊離脂肪酸の含量は、日本薬局方、JIS、衛生試験法などの公定法では酸価として表現されており、その値は油脂の精製や劣化の度合いを知る重要な指標とされている。酸価の測定には、通常フェノールフタレインなどを指示薬としてアルカリによる中和滴定法が用いられている^{1)~4)}。しかし、この方法では、測定対象の油脂試料の種類によって指示薬誤差を生じたり、試料の着色により指示薬の変色の識別が困難な場合があるため、測定値に誤差を生じやすいという問題点が従前から指摘されてきた⁵⁾。特に濃色試料については、指示薬法に代わって電位差滴定法による測定が推奨されている¹⁾。

既に著者らは、キノンの電気化学的酸化還元挙動について詳細に検討した。その結果、微量酸の共存時のボルタモグラムには、キノンの還元波よりも正電位に前置波が現れ、その波高が酸濃度に比例することを見いだした⁶⁾⁷⁾。この事実に基づいて油脂中の遊離脂肪酸が定量できるならば、発色試料にも適用可能であり、従来法の難点を解決し、かつ試料の少量化も図れると期待される。そこで本報では、キノンの還元前置波を利用する、油脂中遊離脂肪酸の新しい定量法を考案した。

2 実 験

2.1 試 薬

支持電解質溶液: 過塩素酸リチウム（特級，和光純薬工業製）をエタノールに溶解して 5.0×10^{-2} M に調製する。これをエタノールで適宜希釈して 3.8×10^{-2} M とし、ボルタモグラム測定時の支持電解質溶液とした。

ビタミン K_3 (2-メチル-1,4-ナフトキノン, VK_3 と以下略記する) 溶液: VK_3 (特級，和光純薬工業製) をエタノールに溶解して 2.5×10^{-2} M に調製し、冷暗所に保存した。 VK_3 溶液は 2 週間ごとに調製し、これを使用時に希釈し 3×10^{-3} M とした。

高級脂肪酸標準溶液: パルミチン酸 (99.5% 以上), オレイン酸 (99% 以上), ステアリン酸 (99.5% 以上), リノール酸 (99% 以上) (すべて和光純薬工業製) をそれぞれエタノールで希釈して 100 mM の標準溶液を調製し、これを適宜希釈して使用した。

油脂: カカオ脂 (藤沢アストラ製), ツバキ油 (司生堂製薬製), モノステアリン酸グリセリン (和光純薬工業製), コーン油 (林市次商店製), オリーブ油, ゴマ油 (宮澤薬品製), ピーナッツ油 (小堺製薬製) をそのまま分析試料として使用した。

キノンは: *p*-ベンゾキノン (和光純薬工業製), 1,4-ナフトキノン (東京化成工業製), アントラキノン (和光純薬工業製) をそのまま使用した。

* 東京薬科大学薬学部: 192-03 東京都八王子市堀之内 1432-1

2・2 ボルタモグラムの測定

ボルタモグラムの測定には、ポテンシオスタット（北斗電工製，HA-301），ファンクションジェネレーター（北斗電工製，HB-104），液抵抗補正器（北斗電工製，HI-203）及びレコーダー（横河電機製，X-Y 3077）を使用した。グラッシーカーボン（直径 6 mm，東海カーボン製，GC-30）を作用電極，飽和カロメル電極（SCE）を参照電極，白金を対極とする 3 電極方式により，25°C で測定を行った。初回使用時にグラッシーカーボン電極は金属研磨用アルミナ（0.3 μm 径，続いて 0.06 μm 径を使用）で研磨後，超音波洗浄を行った。2 回目以降は電極をエタノール中で超音波洗浄してから使用した。このような洗浄を行った上で 1.0×10^{-4} M リノール酸を含む溶液で得た VK₃ の還元前置波高の測定値の相対標準偏差は 1% 以下（ $n=30$ ）であった。電位掃引速度は 5 mV s^{-1} とした。

VK₃ 溶液はボルタモグラム測定のために新しく希釈したものを使用し，窒素を通気して除酸素後，直ちに測定した。窒素はあらかじめエタノールの入った洗気瓶を通し，通気による測定溶媒の揮発を防いだ。

3 結果及び考察

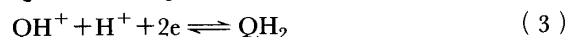
3・1 ボルタモグラム測定条件の検討

まず，本実験に最も適したキノンを選定するために，*p*-ベンゾキノン（BQ），1,4-ナフトキノン（NQ），VK₃，及びアントラキノン（AQ）のボルタモグラムを比較した。これらキノンの還元波の半ピーク電位（ $E_{P/2}$ ）は，それぞれ -0.24，-0.51，-0.58，及び -0.79 V であった。これらのうち BQ はエタノール溶液中で非常に不安定であり，1~2 時間で分解し，ボルタモグラムが著しく変形した。AQ はエタノールに溶けにくく，かつその還元電位における残余電流が大きいため，使用が望ましくない。一方，NQ と VK₃ の還元波はほぼ同電位に現れ，残余電流も比較的小さいので，波高測定には都合がよい。しかし，NQ よりも VK₃ のほうが溶液中ではるかに安定であり，ボルタモグラムは遮光時，室温において 48 時間，4°C において 2 週間にわたり一定波高を示した。以上のことから，本実験では VK₃ を使用することとした。

測定溶媒には，高級脂肪酸及び VK₃ の溶解性，並びに測定可能な電位範囲などを考慮して，エタノールを用いることとした。高級脂肪酸共存時に生じる VK₃ の還元前置波のピーク電位は -0.35 V 付近であるので，0.0 V から -0.5 V までを掃引電位範囲に定めた。

3・2 脂肪酸共存時の VK₃ の還元前置波

既に著者らは，酸（HA）共存時のキノン類（Q）の電極還元反応について詳細に検討した⁶⁾⁷⁾。水，アルコール類などのプロトン性溶媒中で得た Q のポーラログラムには，Q が 2 電子還元してハイドロキノ（QH₂）を生成する反応による 1 段の還元波が現れた。溶液中に少量の酸が共存するとき，この還元波よりも正電位に前置波が生じた。その前置波の特徴として，波高は酸濃度に比例し，電解生成物は主波と同様に QH₂ であること，又半波電位（ $E_{1/2}$ ）は酸の強度の減少と共に負電位に移行し， $E_{1/2}$ と酸の pK_a との間には直線関係が成り立つことを見いだした。これらの事実を基に，Q が電極表面でプロトン付加体形成を経て電子移動すると仮定して，前置波の電極反応は式（1）~（3）で表されると考察した。



これより式（4）が導かれ，

$$E_{1/2} = (RT/2F) \ln K_a + \text{const.} \quad (4)$$

実験結果が矛盾なく説明された。

本実験条件においても，VK₃ の還元波には既報と同様に種々の酸共存により前置波が現れた。一例として Fig. 1 に，リノール酸共存下で得た VK₃ のボルタモグラムを示す。VK₃ の還元波よりも正電位側に前置波が出現した（半ピーク電位， $E_{P/2} = -0.30 \text{ V}$ ）。

同様な現象は，ギ酸，酢酸，プロピオン酸，酪酸などによっても認められたが，弱酸になるほど前置波の $E_{P/2}$ は負電位側に移行し， $E_{P/2}$ と酸の pK_a との間には直線関係が見られた（Fig. 2）。又，前置波のピーク高さ（ i_H ）は酸濃度に比例して増大した。

これらの事実は既報⁶⁾⁷⁾と一致する。よって本実験における還元前置波の出現も既報と同様な電極反応に起因すると考えられる。

3・3 検量線

リノール酸濃度 $8 \times 10^{-6} \sim 6 \times 10^{-3} \text{ M}$ の範囲において，還元前置波の波高と酸濃度は良い直線性（ $r=0.992$ ）を示した。又，リノール酸濃度 $1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ における繰り返し実験の相対標準偏差は，1.1%（ $n=10$ ）であった。

油脂中に含まれている可能性の大きい高級脂肪酸⁸⁾として，リノール酸のほか，パルミチン酸，ステアリン

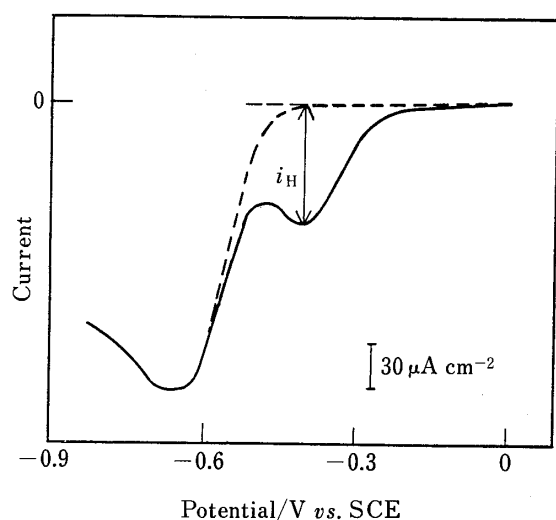


Fig. 1 Voltammograms of 3×10^{-3} M VK_3 with (-----) 0 M and (—) 2.4×10^{-3} M linoleic acid in an ethanol solution containing 3.8×10^{-2} M $LiClO_4$ at a glassy carbon electrode

Scan rate: 5 mV s^{-1}

酸, 及びオレイン酸についてもボルタモグラムの測定を行った. いずれの場合にも Fig. 1 と同様なボルタモグラムが得られ, どの脂肪酸 (1.0×10^{-4} M) による還元前置波の $E_{p/2}$ も, i_H もほぼ同じ値であり (Table 1), 酸濃度と i_H の間に比例関係が認められた. $E_{p/2}$ 値が互いに等しいことは, これらの酸の電離定数は同程度であることを示唆している. 従って, 数種の脂肪酸が含まれる場合, 前置波のピーク電流値を測定することから含有脂肪酸の総濃度が求められることになる. 実際に, 種々の高級脂肪酸を混合した VK_3 溶液で得たボルタモグラムには一段の前置波のみが認められ, その波高は総酸濃

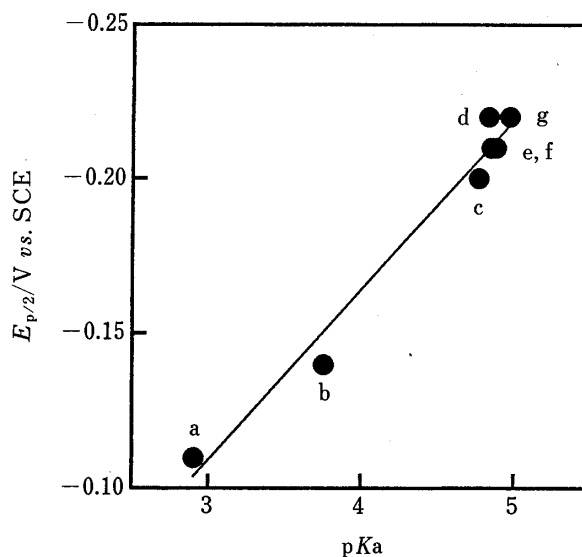


Fig. 2 Relation between half-peak potential of pre-peak and pK_a

(a) bromoacetic acid; (b) formic acid; (c) acetic acid; (d) butyric acid; (e) valeric acid; (f) propionic acid; (g) nonanoic acid. Acid concentration: 1.0×10^{-4} M

Table 1 Half-peak potentials ($E_{p/2}$) and peak currents (i_H) for the prepeaks caused by various higher fatty acids

Fatty acid	$E_{p/2}$ (V vs. SCE)	i_H ($\mu\text{A cm}^{-2}$)
Palmitic acid	-0.22	3.5
Stearic acid	-0.22	3.5
Oleic acid	-0.22	3.4
Linoleic acid	-0.22	3.4

Acid concentration: 1.0×10^{-4} M

Table 2 Comparison of free fatty acid content in fats and oils obtained by the present and titration methods

Sample	Free fatty acid content/mol g ⁻¹		
	Present method	Titration method	
		Potentiometry	Phenolphthalein color change
Cacao butter	4.1×10^{-5}	4.1×10^{-5}	4.3×10^{-5}
Camellia oil	3.9×10^{-5}	4.1×10^{-5}	4.1×10^{-5}
Glyceryl monostearate	1.6×10^{-5}	1.6×10^{-5}	1.8×10^{-5}
Butter	1.1×10^{-5}	1.2×10^{-5}	1.6×10^{-5}
Corn oil	2.3×10^{-6}	2.3×10^{-6}	2.8×10^{-6}
Olive oil	2.1×10^{-6}	2.8×10^{-6}	3.2×10^{-6}
Peanut oil	9.4×10^{-7}	9.4×10^{-7}	1.1×10^{-6}
Sesame oil	8.9×10^{-7}	1.1×10^{-6}	1.2×10^{-6}

度に比例することを確認した。

3・4 種々の油脂試料中の総遊離脂肪酸含量の測定

本法を実際の油脂試料に適用するため、油脂をエタノールに溶解して試料溶液とした。エタノールに溶解しない場合には、いったんエーテルに溶解してから、エタノール溶液とした。この試料溶液を VK_3 を含む支持電解質溶液に添加し、ボルタモグラムを測定した。リノール酸を標品として、標準添加法により油脂中の総遊離脂肪酸を定量した。又、オリーブ油及びツバキ油にリノール酸を添加して行った回収試験による結果は、それぞれ 98 及び 102% ($n=5$) であった。これより、試料中の共存物質が本定量法に及ぼす影響は事実上無視できることが分かった。

本法により種々の油脂試料中の総遊離脂肪酸を定量した結果を Table 2 に示す。又、本法の妥当性を検討するために、水酸化カリウムのエタノール溶液による滴定法の結果と対比した。この際、滴定終点は、電位差法及びフェノールフタレイン指示薬法により決定し、それぞれ Table 2 中に併記した。本法と電位差滴定法による定量値はおおむねよく一致しているが、指示薬法による値とは多少とも相違が見られる。これは指示薬の変色が含有する脂肪酸の中和点を必ずしも適切に反映していないためと考えられる。

このことを明らかにするために、Fig. 3 にはカカオ脂 (a)、コーン油 (b) 及びピーナッツ油 (c) に対して得られた電位差滴定曲線を示し、本実験条件で観察された指示薬の変色域、並びに本法による定量値とを比較してみた。Fig. 3 中の矢印は、本法により求めた各油脂中の脂肪酸量を 0.1 M の水酸化カリウム消費量に換算した値である。この値は、電位差滴定曲線と比べていずれの場合も含有脂肪酸の中和点に対応していると見られる。本法と電位差滴定法による定量値とが良好な相関性 ($r=0.999$) を示すことは、Fig. 4 の関係からも明らかである。一方、Fig. 3 のように指示薬の変色域は中和点と必ずしも一致せず、特に (b) 及び (c) の場合には従前の指示薬法では脂肪酸量を過大に見積もる結果になることが分かった。

油脂試料中の総遊離脂肪酸の定量値の相対標準偏差は、本法、電位差滴定法及び指示薬滴定法において、それぞれ 2.5、2.7 及び 5.0% ($n=5$) 以下であり、本法は三者の中で最も精度が優れていることが分かった。又、本法による検出限界は 8×10^{-6} M であり、滴定法の 10 倍以上の感度を得られた。このため、試料量も従来法に規定されている約 0.1~20 g¹⁾ に比べ、本法は約

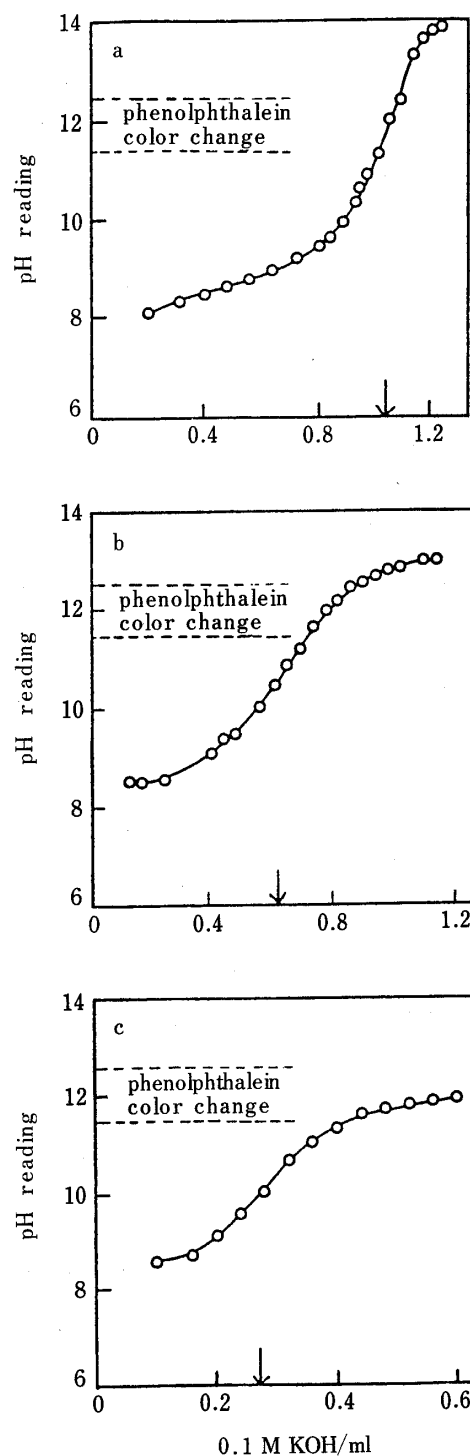


Fig. 3 Potentiometric titration curves of (a) cacao butter, (b) corn oil and (c) peanut oil with 0.1 M KOH

Each arrow shows the end point converted from the free fatty acid content obtained by the present method.

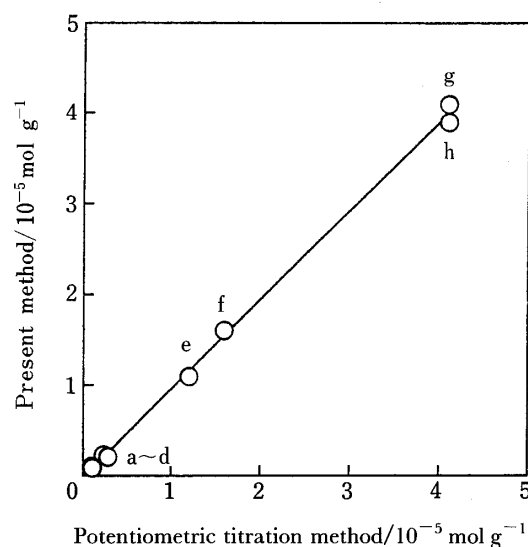


Fig. 4 Correlation between the present and potentiometric titration methods

(a) sesame oil; (b) peanut oil; (c) olive oil; (d) corn oil; (e) butter; (f) glyceryl monostearate; (g) cacao butter; (h) camellia oil

0.002~2 g で定量可能である。従って、本法は油脂試料中の総遊離脂肪酸の定量法として、従来法に比べて有用性が高いことが明らかになった。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金（一般研究 B No. 06453072）によって行われた。記して謝意を表する。

（1992 年 5 月，第 53 回分析化学）
（討論会にて一部発表）

文 献

- 1) "Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists' Society", Method Cd 3d-63 (1989), (American Oil Chemists' Society, Champaign).
- 2) "Official and Tentative Methods of the Japan Oil Chemists' Society", Methods 2.4.1-83 (1990), (Japan Oil Chemists' Society, Tokyo).
- 3) "U. S. Pharmacopoeia XXII", p. 1535 (1990), (United States Pharmacopoeial Convention, Inc.).
- 4) 日本公定書協会監修: 第十二改正 日本薬局方, B-448 (1991), (廣川書店).
- 5) 日本油化学協会編: "油脂化学便覧", p. 285 (1990), (丸善).
- 6) K. Takamura, Y. Hayakawa: *Anal. Chim. Acta*, **43**, 273 (1968).
- 7) K. Takamura, Y. Hayakawa: *J. Electroanal. Chem.*, **31**, 225 (1971).
- 8) 日本油化学協会編: "油脂化学便覧", p. 104, 112 (1990), (丸善).



Voltammetric determination of free fatty acid content in fats and oils. Tetsuo FUSE, Fumiyo KUSU and Kiyoko TAKAMURA (Tokyo University of Pharmacy and Life Science School of Pharmacy, 1432-1, Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo 192-03)

A new method for determining free fatty acid content in fats and oils is proposed. The method is based on the measurement of the reduction prepeak current of 2-methyl-1,4-naphthoquinone (VK_3) caused by higher fatty acids in ethanol solution containing $LiClO_4$. The measurement was made by potential sweep voltammetry using a glassy carbon electrode. The prepeak current height was found to be proportional to the total concentration of free fatty acid in oil samples ranging from 8×10^{-6} to 6×10^{-3} M ($r=0.992$). The free fatty acid content of 8 oil samples was determined. The relative standard deviation of content values for 5 replicates of each sample was less than 2.5%. The present method was proved to be far superior to the conventional titration method in sensitivity and precision.

(Received July 26, 1994)

(Accepted September 7, 1994)

Keyword phrases

determination of free fatty acids content; fats and oils; acid values of fats and oils; voltammetry of quinones; voltammetry of vitamin K_3 ; reduction prepeak.