

技術論文

フーリエ変換赤外分光法による米糠の脂肪酸度の測定

佐藤 健二^{®1}, 丹野 宏美¹, 佐藤 潤哉¹, 田中 誠之¹Determination of Fat Acidity in Rice Bran by Fourier Transform
Infrared SpectrometryKenji SATO¹, Hiromi TAN-NO¹, Jyunya SATO¹ and Shigeyuki TANAKA¹¹ Department of Life and Environmental Science, College of Science and Engineering, Iwaki Meisei University,
5-5-1, Iino, Chuodai, Iwaki-shi, Fukushima 970-8551

(Received 1 November 2004, Accepted 30 March 2005)

A rapid and simple method for determining fat acidity in rice bran based on Fourier-transform infrared (FT-IR) spectrometry is described. Fat acidity is utilized as one possible deterioration indicator for changes of rice qualities during storage. The extraction of free fatty acids in rice bran was carried out using carbon tetrachloride as an organic solvent. A carbon tetrachloride solution containing free fatty acids in 1.0 mm KBr cell was measured by FT-IR spectrometry. The rice bran sample was stored at 30°C with 55~65% humidity. The absorbance of the C=O stretching vibration band at 1710 cm⁻¹ for free fatty acids in the FT-IR spectra increases linearly with storage periods of from 0 to 55 days. However, the absorbance of the C=O stretching vibration band at 1745 cm⁻¹ for ester decreased. Fat acidities obtained by the present method showed a good correlation with an acid-based titration method ($r = 0.997$). The relative standard deviation (RSD, $n = 6$) of the measured fat acidity was less than 9%. The present method proved to be simple and rapid, and allowed measurements with small amounts of the sample and the extracting solvent compared with the previously acid-based titration method.

Keywords : FT-IR spectrometry; fat acidity; rice bran; free fatty acid; rice quality.

1 緒 言

我が国では米の安定供給を目的に約 150 万トンの米が備蓄・保管されているが、その間に食味が低下することを防ぐため低温で貯蔵・保管されている。食味の低下を含む米の劣化は、米中の脂質やデンプンの分解によって生成する遊離脂肪酸や還元糖の増加によって、あるいは、米中に混入する害虫や微生物など外的な損害により徐々に進行する。米の劣化の中で遊離脂肪酸の増加が米品質に大きく影響することから、米品質の劣化度合いを判定する指標として脂肪酸度が利用されている¹⁾。

脂肪酸度は、ベンゼンやトルエン等の有機溶媒を用い米試料から抽出した各種遊離脂肪酸を中和するのに必要な水

酸化カリウム量 (mg KOH/100 g 試料) として定義されている。そのため、遊離脂肪酸の総量を求める方法として、これまで酸-塩基滴定法により脂肪酸度が測定されてきている²⁾。しかし、比較的多量の米試料や有機溶媒を必要とし、滴定の際の終点も確認しにくいことなどが問題点として指摘されているため、比色法¹⁾による脂肪酸度の測定法も報告されている。

一般に各種油脂中の遊離脂肪酸の定量法には、各種遊離脂肪酸を高感度、かつ個別に定量分析できるガスクロマトグラフィー (GC) 法³⁾や高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法^{4)~6)}があり、ボルタンメトリー⁷⁾による総遊離脂肪酸の定量法も報告されている。しかし、米の劣化指標である脂肪酸度では、遊離脂肪酸の総量で判定されるため GC 法や HPLC 法のように遊離脂肪酸を個別に同時定量する必要性はなく、むしろ個別定量することで分析時間も長

¹ いわき明星大学科学技術学部生命環境学科: 970-8551 福島県
いわき市中央台飯野 5-5-1

時間となる恐れがある。また、ボルタンメトリーによる総遊離脂肪酸の定量や比色法による脂肪酸度の測定は比較的簡便な方法といえるが、電極の洗浄の必要性や発色試薬の添加など操作が煩雑になりやすい。

本報では、フーリエ変換赤外分光 (FT-IR) 法による脂肪酸度の測定を試みた。FT-IR 法においては、各種遊離脂肪酸とそのエステル化合物では分子中の C=O 伸縮振動が FT-IR スペクトル上に異なるピークとして現れる。したがって、米中の脂質が分解し生成する各種遊離脂肪酸の C=O 伸縮振動によって 1710 cm^{-1} 付近に現れるピークの吸光度を測定することで遊離脂肪酸の総量が求められ、その値から米品質の劣化指標となる脂肪酸度が算出できると考えた。

従来の酸-塩基滴定法や比色法では、米中の脂質及び各種遊離脂肪酸を有機溶媒で抽出後、水酸化カリウム標準溶液の滴定量や発色試薬を添加した後の吸光度から脂肪酸度を求めなくてはならない。しかし、FT-IR 法では有機溶媒で抽出後、直ちに FT-IR 測定を行い吸光度を測定できることから、より簡便な脂肪酸度の測定法となり得る。

そこで本報では、精白米や玄米に比べ多くの脂質量を含む米糠⁸⁾では、比較的短期間の保存期間で遊離脂肪酸の生成が顕著にあらわれると考え、米糠を試料として用いて FT-IR 法による脂肪酸度の測定を試み、酸-塩基滴定法との相関関係について検討したところ、比較的良好な結果が得られたので報告する。

2 実 験

2・1 試薬及び米糠試料

FT-IR 測定のための標準試料としてパルミチン酸 (99%, アルドリッチ製), オレイン酸 (99%, シグマ製), リノール酸 (99%, アルドリッチ製) を使用した。その他、米糠中からの脂質や各種遊離脂肪酸を抽出するための有機溶媒や、酸-塩基滴定法で脂肪酸度を求めるための各種有機溶媒や水酸化カリウム標準溶液はすべて特級品試薬を用いた。

一方、福島産コシヒカリ米を精米して得た米糠約 200 g をトレイ (300 × 250 × 60 mm) に入れ、温度 30℃、湿度 55~65% に調節した恒温室内に貯蔵した。貯蔵期間中、米糠試料の均一性を保つために毎日混合した。経日的に一定量を採取する際には、米糠試料を十分混合した後、3~5 か所から同量採取し混合したものを測定試料として用いた。

2・2 装 置

FT-IR 測定は、フーリエ変換赤外分光光度計 (日本分光製, Herschel, FI/IR-300s 型) を使用し、積算回数 128 回、分解能 4 cm^{-1} 、移動鏡速度 2 cm/s で行った。その他、米

糠中の脂質及び各種遊離脂肪酸の抽出には振とう機 (国産遠心器製, H-108NA 型)、その後の米糠と有機溶媒との分離には遠心分離器 (大洋科学製, SR-II 型) を使用した。

2・3 測定方法

2・1 で述べた条件下で一定期間貯蔵した米糠試料を約 0.2 g 採取し精ひょうした後、30 ml 容量のガラス製共栓付遠沈管に入れた。これに四塩化炭素を 10 ml 添加し、300 回/分で 1 時間上下振とうすることで米糠試料中の脂質及び各種遊離脂肪酸を抽出した。その後、2000 rpm で 10 分間遠心分離の後、四塩化炭素溶液を孔径 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ のマイクロフィルターで濾過したものを FT-IR 測定試料とした。FT-IR 測定は、光路長 1.0 mm の KBr セルを用い溶液法で行った。バックグラウンド測定は、抽出前の四塩化炭素溶液を同じ KBr セルに入れて行った。

酸-塩基滴定法による脂肪酸度の測定は、約 5 g 採取し精ひょうした米糠試料を 100 ml 容量のスクリー管に入れ、ベンゼンを 50 ml 添加し、約 10 分ごとに強く振り混ぜながら 30 分間以上放置した。ベンゼン層 5 ml を 50 ml 容量のスクリー管に採取し、0.04% (w/v) フェノールフタレインを含むエタノール溶液を添加し混合した。この混合溶液を 0.1 N 水酸化カリウム標準溶液で滴定して脂肪酸度 (mg KOH/100 g) を算出した。

3 結果及び考察

3・1 FT-IR 測定のための抽出溶媒

各種穀物や種皮類からの油脂の抽出や乳製品中の遊離脂肪酸の抽出にはジエチルエーテル、あるいは、ヘキサンとジエチルエーテルの混合溶媒が用いられている⁶⁾⁹⁾¹⁰⁾。これは脂質や遊離脂肪酸のこれら溶媒への抽出率が他の有機溶媒に比べ高いことが大きな理由である。また、従来法である酸-塩基滴定法では抽出溶媒としてベンゼンを用いているが、FT-IR 法では赤外領域に吸収の少ない有機溶媒として、二硫化炭素、四塩化炭素、クロロホルムを用いるのが一般的である。更に、本研究の場合、遊離脂肪酸の C=O 伸縮振動による吸収波数領域 1710 cm^{-1} に現れるピークの吸収度を測定することから、 1710 cm^{-1} 及び周辺波数領域に吸収を持つ有機溶媒は使用できない。そこで米糠試料からの各種遊離脂肪酸の抽出に適した溶媒を検討するために、これら 3 種の有機溶媒に溶解した同濃度のオレイン酸溶液について、 $1800\text{ cm}^{-1} \sim 1650\text{ cm}^{-1}$ の波数範囲で FT-IR 測定を行った。その結果を Fig. 1 に示す。クロロホルムを用いた場合、 1750 cm^{-1} 付近にショルダーが見られ、他の溶媒に比べて 1710 cm^{-1} におけるピークの吸光度が低いことが分かった。二硫化炭素と四塩化炭素では、どちらも良好なピーク形状であり同程度の吸光度が得られた。これらの有機溶媒を用いて米糠の脂質及び遊離脂

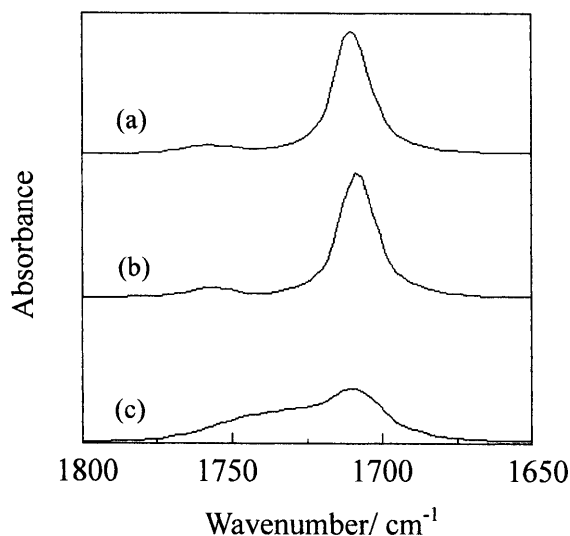


Fig. 1 FT-IR spectra of 1×10^{-2} M oleic acid in three kinds of organic solvents

(a) carbon tetrachloride, (b) carbon disulfide, (c) chloroform

脂肪酸を抽出して得た FT-IR スペクトルを比較した結果, 四塩化炭素の方が二硫化炭素に比べ安定なベースラインが得られたため, 本研究では抽出溶媒として四塩化炭素を選択し更に基礎的な検討を行った。

3.2 遊離脂肪酸の種類とモル吸光係数の関係

食用米油の中に含まれる主要な脂肪酸は, パルミチン酸, オレイン酸, リノール酸の3種類で, その組成割合は, それぞれ約18%, 約41%, 約36%である¹¹⁾。したがって, 脂質が分解し遊離する脂肪酸もこれら3種類が主であると考えられる。そこで四塩化炭素を溶媒として用い, これら遊離脂肪酸の 1710 cm^{-1} における吸光度を測定しモル吸光係数を求めた。その結果, いずれの遊離脂肪酸でも $7.6 \times 10^3\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ となり同じ値を示した。したがって本法は, 構成割合の異なる遊離脂肪酸を含む各種米糠試料の総遊離脂肪酸量の測定に利用可能であると考えられる。食用米油には, パルミチン酸, オレイン酸, リノール酸の脂肪酸のほかに, ステアリン酸やリノレン酸などが極少量含まれているが, 本研究では, FT-IR 測定の結果から脂肪酸度を求める際に必要なモル吸光係数として $7.6 \times 10^3\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ を使用した。

3.3 振とう時間の影響

米糠の中の各種遊離脂肪酸を抽出する際の振とう時間について検討した。貯蔵期間27日目の米糠試料を用い, これに四塩化炭素を添加し20分~2時間振とうして抽出を行った。振とう時間に対する 1710 cm^{-1} におけるピークの吸光度を Fig. 2 に示した。振とう時間20分以上で,

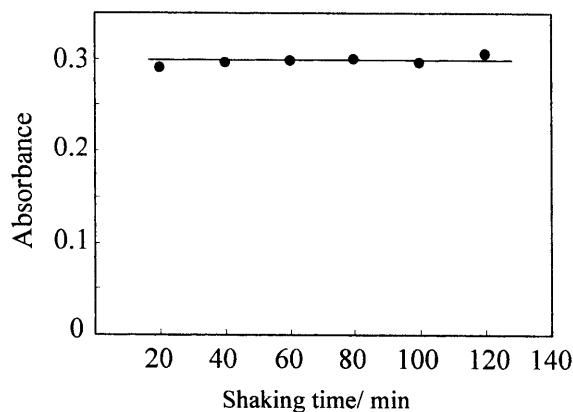


Fig. 2 Effect of shaking time on the absorbance at a wavenumber of 1710 cm^{-1}

ほぼ最大一定の吸光度が得られたことから, 比較的短時間で抽出平衡に達しているものと考ええる。しかし, 貯蔵期間が長期間になれば生成する遊離脂肪酸の量も増加することも考慮し, 本研究では振とう時間を1時間として抽出操作を行った。

3.4 貯蔵期間による FT-IR スペクトル変化

温度 30°C , 湿度 55~65% で貯蔵した米糠試料を経日的に一定量採取し2.3の測定方法に従い FT-IR 測定を行った。その結果, Fig. 3 に示したように貯蔵期間が長くなるのに伴い, 1745 cm^{-1} のエステル結合に由来する C=O 伸縮振動によるピークの吸光度が減少し, 一方, 遊離脂肪酸の C=O 伸縮振動に由来して現れる 1710 cm^{-1} のピークの吸収度が増加することが確認できた。このことは貯蔵期間内に米糠の脂質が分解し各種の遊離脂肪酸が生成, 増加したことを示している。Fig. 4 には 1710 cm^{-1} のピークの吸光度と貯蔵期間との関係を示した。その結果, ほぼ一次の比例関係となる直線となったことから, 比較的短期間の貯蔵では, 脂質の分解する割合が非常に少ないと考えられる。長期間の貯蔵においては, 生成した遊離脂肪酸が更に酸化分解し, ケトンやアルコールが生成すると考えられ¹²⁾, その場合には Fig. 4 に示される直線関係にはならないと予想される。

3.5 酸-塩基滴定法との相関

酸-塩基滴定法によって脂肪酸度を求める従来法と本法との相関関係について検討するために, 本法で得られた 1710 cm^{-1} における吸光度から脂肪酸度 (mg KOH/100 g) を次式によって求めた。

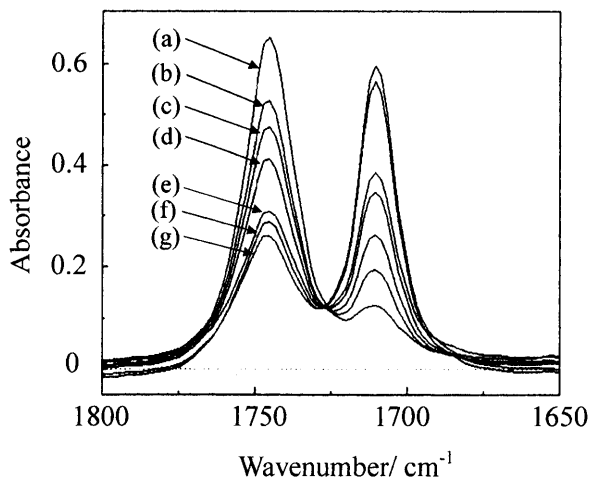


Fig. 3 FT-IR spectra of rice bran at various storage periods from 0 to 55 days

(a) 0 day, (b) 6 days, (c) 14 days, (d) 21 days, (e) 27 days, (f) 49 days, (g) 55 days

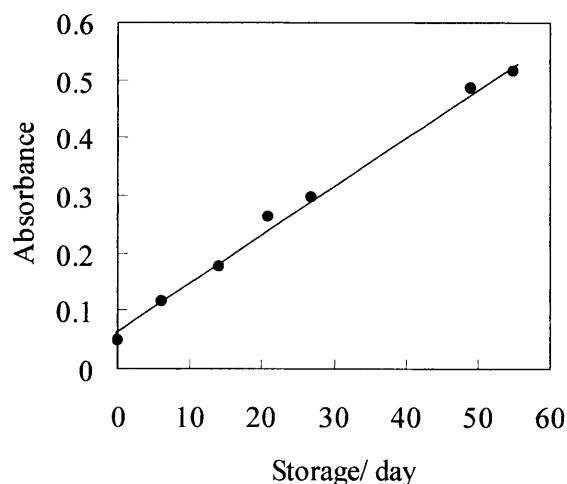


Fig. 4 Change of absorbance at a wavenumber of 1710 cm^{-1} vs. storage period

$$\text{脂肪酸度} = \frac{\text{吸光度}}{\text{モル吸光係数}} \times 1000 \times 56.11 \\ \times \frac{\text{抽出溶媒量}}{1000} \times \frac{100}{\text{試料採取量}}$$

ここで吸光度は、光路長 1.0 mm セルを使用して得られた 1710 cm^{-1} のピークの吸光度を 10 倍した値である。モル吸光係数は $7.6 \times 10^2\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ を使用した。抽出溶媒量は抽出の際に用いた四塩化炭素量 10 ml である。

FT-IR 法によって求めた脂肪酸度と酸-塩基滴定法で求めた脂肪酸度との相関関係を Fig. 5 に示した。従来法である酸-塩基滴定法と同様な値が得られ相関係数 (r) は 0.997 であり、相対標準偏差 (RSD, $n = 6$) は 9% であっ

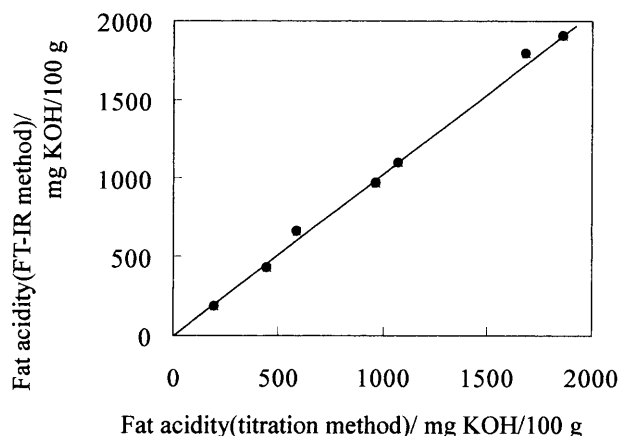


Fig. 5 Correlation of fat acidities obtained by the FT-IR method with those obtained by the titration method

た。また、1.0 mm の KBr セルを使用した場合、実験で得られたモル吸光係数: $7.6 \times 10^2\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ から遊離脂肪酸の検出下限 (1% 吸収) を求めたところ $5 \times 10^{-5}\text{ mol/dm}^3$ となり、本法による脂肪酸度の測定下限は 14 mg KOH/100 g であった。大坪ら¹⁾の報告では、玄米や精白米の場合、貯蔵期間中の脂肪酸度は半年間で 7 から 40 mg KOH/100 g に増加している。このように貯蔵前の脂肪酸度は一けた台にとどまっておき、本法を玄米や精白米に応用することは困難である。そこで、光路長の異なる KBr セルを用い吸光度と光路長との関係について検討したところ、吸光度が 1 以下であれば Bouger-Beer の法則に従うことが分かった。したがって、KBr セルの光路長を大きくすれば玄米や精白米の中の脂肪酸度を十分測定できると考えられる。

以上、本研究は、FT-IR 法による米糠試料の脂肪酸度の新規測定法について検討した。その結果、従来法である酸-塩基滴定法との相関は良好であり、比較的簡便に脂肪酸度を測定できたことから、玄米や精白米にも本法が応用できるものと考えられる。その際、本研究では振とう時間を 1 時間としたが、米糠に比べ玄米や精白米の中の脂質量は米糠に比べ約 10 分の 1 程度であることを考慮すれば抽出操作も短時間で済み、全体の測定時間も短縮できると考える。また、本法は使用する抽出溶媒も従来法に比べ少なく済む利点がある。

文 献

- 1) 大坪研一, 柳瀬 肇, 石間紀男: 食総研報, **1987**, 59.
- 2) 鶴田 理, 遠藤 勲, 高橋信吉, 竹生新次郎: 食総研報, **1977**, 11.
- 3) H. C. Deeth, C. H. Fitz-Gerald, A. J. Snow: *J. Dairy Sci.*, **67**, 1521 (1983).
- 4) 西村一彦, 鈴木敏之, 板橋 豊: 食衛誌, **43**, 230 (2002).

- 5) M. Terasaki, Y. Itabashi, T. Suzuki, K. Nishimura: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **79**, 1181 (2002).
- 6) 戸塚新一, 松田 恒, 佐藤孝義, 皆川憲夫: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 927 (1996).
- 7) 布施哲男, 楠 文代, 高村喜代子: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **44**, 29 (1995).
- 8) 科学技術庁資源調査会編: 食品成分表, p. 14, (1975), (一橋出版).
- 9) 日本油化学会編: 基準油脂分析試験法 (I), 参 3.1 脂質の定量法 (1996).
- 10) 日本薬学会編: 衛生試験法・注釈 2000, 2.1.4 脂質 (2000), (金原出版).
- 11) 秋谷年見, 越智愛子, 安藤 恵, 山崎 恵: 食糧研, **1970**, 37.
- 12) E. N. Frankel: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 1908 (1984).

要 旨

米品質の劣化度合いを判定する指標として利用されている脂肪酸度の簡易分析法として, 米試料の中でも比較的脂質量が多い米糠^{ぬか}を試料としてフーリエ変換赤外分光 (FT-IR) 法の応用を試みた. 本法は, 抽出溶媒として四塩化炭素を用い米糠中の遊離脂肪酸を抽出後, それを光路長 1 mm の KBr セルに入れて 1710 cm^{-1} 付近に現れる C=O 伸縮振動由来のピーク強度を測定することで脂肪酸度を算出するものである. 構成割合の異なる各種遊離脂肪酸を含む各種米糠に対して本法を応用するためには, 各種遊離脂肪酸のモル吸光係数が同じでなければならない. 米油の中に含まれる主要な脂肪酸であるパルミチン酸, オレイン酸, リノール酸の 3 種脂肪酸についてモル吸光係数を求めたところ, いずれも $7.6 \times 10^2\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ となり同様な値を示した. 貯蔵期間 0~55 日間における脂質及び遊離脂肪酸の FT-IR スペクトル変化は, 米糠中の脂質が分解し遊離脂肪酸が生成, 増加していることを示した. 従来法の酸-塩基滴定法による脂肪酸度と本法により求めた脂肪酸度との相関係数 (r) は 0.997 であり, 相対標準偏差 (RSD, $n = 6$) は 9% であった. 本法は, 従来法の酸-塩基滴定法に比べ少量の試料や抽出溶媒で測定することが可能であり, 操作も簡便であった.