

第5章

脂肪酸及びコレステロール

38 脂肪酸定量及び脂肪酸組成分析法

38-1 脂肪酸組成分析のための脂質の抽出と定量

38-1-1. クロロホルム-メタノール混液抽出法 (1)

適用

菓子類 (主原料が穀類, 砂糖類以外), 種実類 (多脂質), 豆類 (だいず及びだいず製品), 魚介類, 肉類, 卵類, 乳類, 調味料類 (マヨネーズ, ドレッシング), 調理加工食品類 (主原料が穀類以外のもの), 香辛料類に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

遠心分離機

ホモジナイザー (ウルトラタラックス)

ロータリーエバポレーター

水浴

なす形フラスコ: 容量300 mL, 100 mL

冷却管

遠心管: 共栓, 容量50 mL

減圧デシケーター

(2) 試 薬

クロロホルム-メタノール混液 (2 : 1 v/v): 窒素ガスを通気し酸素を除去したもの

石油エーテル

硫酸ナトリウム (無水): 特級

(3) 操 作

試料 2~10 g (W) (注1) を容量300 mL なす形フラスコに正確にはかりとり, クロロホルム-メタノール混液90~150 mL を加え, ホモジナイザー (ウルトラタラックス) で均質化する。クロロホルム-メタノール混液10~20 mL で溶媒に触れたホモジナイザーの先端部を洗い, 洗液もなす形フラスコに合わせる。冷却管の上部から窒素ガスを吹き込みながら水浴上で1時間還流抽出する。

冷後, ガラスろ過器 (11G4 にろ紙 JIS5種C を敷く) を用いて還流抽出液をろ過 (受器: 容量300 mL なす形フラスコ) する。次いで, クロロホルム-メタノール混液50 mL を数回に分けて, 抽出に用いたフラスコ及びろ過器を順次洗い, 受器のフラスコに捕集する。捕集したろ液をロータリーエバポレーターで濃縮した後, 水浴 (65~70 °C) 中で, 窒素ガスを吹き込みながら内容物を乾固させない程度 (厳守) まで溶媒を蒸発させる。冷後, 石油エーテル50 mL (V) を正確に加え, 次いで, 硫酸ナトリウム (無水) 30 g を加えて直ちに栓をして 2分間激しく振り混ぜる。石油エーテル層を遠心管に移し, 遠心分離 (3000回転/分, 5分間) する。

質量既知 (W_0) の容量100 mL なす形フラスコに, 上澄み液の一定量 (D) (注2) をとり, ロータリーエバポレーターで濃縮した後, 窒素ガスを吹き込みながら石油エーテルを留去し, 減圧デシケ-

ター中に一夜放置した後、質量 (W_1) を測定 (注3) し、脂肪酸測定用の脂質とする。

(4) 計 算

$$\text{脂肪酸測定用の脂質量 (g/100 g)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times \frac{V}{D} \times 100$$

W_1 : 減圧デシケーターで乾燥後のなす形フラスコの質量 (g)

W_0 : 容量100 mL なす形フラスコの質量 (g)

W : 試料採取量 (g)

V : 残留物の溶解に用いた石油エーテル量 (mL)

D : 分取した石油エーテルの量 (mL)

注 解

(注1) 脂質の量が50~500 mg になるようにする。水分含量が低い試料は少量の水を加え膨潤させる。

(注2) 脂質の量が少ないと思われるときは、全量を用いてもよい。

(注3) 脂質の量が100 mg 未満の場合は、容量100 mL なす形フラスコから恒量としたアルミニウム製はかり容器に移して測定すると、精度のよい結果が得られる。

38-1-2. クロロホルム-メタノール混液抽出法 (2)

適 用

調味料類 (しょうゆ類, 食酢類などの液体を除く) 及び香辛料類 (多水分) に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

遠心分離機

ホモジナイザー (ウルトララックス)

ロータリーエバポレーター

水浴

なす形フラスコ: 容量100 mL, 300 mL

トールビーカー: 容量300~500 mL

冷却管

遠心管: 共栓, 容量50 mL

減圧デシケーター

(2) 試 薬

クロロホルム-メタノール混液 (2:1 v/v): 窒素ガスを通気し酸素を除去したもの

石油エーテル

硫酸ナトリウム (無水): 特級

(3) 操 作

試料50~100 g (W) (注1) をトールビーカーに正確にはかりとる。ホモジナイザー (ウルトララックス) で均質化する。さらに、ケイソウ土を適量 (5~10 g: 水に一樣に分散する程度) 加え、よく混和して試料分散液をつくる。ケイソウ土5 g を50 mL の水にけん濁し、ろ紙 (JIS 5種B, 9 cm) を敷いたブフナー漏斗の上に注ぎ込み、吸引ろ過して均一なケイソウ土の層をつくる。これに試料分散液を静かに注ぎ込み、吸引ろ過する。さらに、水50 mL を数回に分けて、ビーカーとろ過層を洗い、充分に吸引して水を切る。ろ紙上の残さをろ紙ごと容量300 mL なす形フラスコに移し、クロロホルム-メタ

ノール混液150 mLを加え、冷却管を付け、水浴上で1時間還流抽出する。冷後、ガラスろ過器（11G 4にろ紙 JIS 5種Cを敷く）を用いて還流抽出液をろ過（受器：容量300 mLなす形フラスコ）する。次いで、クロロホルム-メタノール混液50 mLを数回に分けて、抽出に用いたフラスコ及びろ過器を順次洗い、受器のフラスコに捕集する。捕集したろ液をロータリーエバポレーターで濃縮した後、水浴（65～70℃）中で、窒素ガスを吹き込みながら内容物を乾固させない程度（厳守）まで溶媒を蒸発させる。冷後、石油エーテル50 mLを加えて内容物を溶かし、次いで、硫酸ナトリウム（無水）30 gを加えて直ちに栓をして、2分間激しく振り混ぜる。質量既知（ W_0 ）の容量100 mLなす形フラスコにろ過器（11G 4にろ紙 JIS 5種Cを敷く）を用いてろ過し、石油エーテル10～20 mLを数回に分け、フラスコ及びろ過器を洗い、洗浄液も先のろ液と合わせる。ロータリーエバポレーターで濃縮した後、窒素ガスを吹き込みながら石油エーテルを留去し、減圧デシケーター中に一夜放置した後、質量（ W_1 ）を測定し、脂肪酸測定用の脂質とする。

（4）計 算

$$\text{脂肪酸測定用の脂質量 (g/100 g)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100$$

W_1 ：減圧デシケーターで乾燥後のなす形フラスコの質量 (g)

W_0 ：容量100 mLなす形フラスコの質量 (g)

W ：試料採取量 (g)

注 解

（注1）うまく分散するように加水してもよい。

38-1-3. 酸分解法

適 用

穀類、いも及びでん粉類、菓子類（穀類、いも及びでん粉類、砂糖類を主原料としたもの）、野菜類、果実類、種実類（少脂質）、豆類（だいず及びだいず製品を除く）、きのこ類、藻類、調味料類（トマト加工品）、嗜好飲料類（茶葉、粉末コーヒーなど）、調理加工食品類（穀類を主原料としたもの）に用いる。

測定方法

（1）装置及び器具

ロータリーエバポレーター

水浴

分液漏斗：容量500 mL

なす形フラスコ：容量300 mL

ビーカー：容量50 mL, 100～200 mL

減圧デシケーター

（2）試 薬

エタノール

ジエチルエーテル

石油エーテル

ジエチルエーテル-石油エーテル混液（1：1 v/v）

塩酸溶液：水11容と濃塩酸25容を混合したもの（a）、または、濃塩酸そのまま（b）を用いる。

硫酸ナトリウム（無水）：特級

（3）操 作

粉碎均質試料 2～40 g (W) (注1) を容量100～200 mL ビーカーに正確にはかりとり、エタノール 2～5 mL を加え、ガラス棒で混和する。塩酸溶液 50 mL を加え (注2)、ビーカーを時計皿で覆って水浴中 (約80℃) でときどきかき混ぜながら30分間加温する。放冷後、酸分解溶液を分液漏斗に移し、エタノール 8～30 mL (注3) とジエチルエーテル 60 mL を加えて1分間振り混ぜる。次いで、石油エーテル 60 mL を加えて1分間振り混ぜ、静置する。水層を別の分液漏斗に移し、ジエチルエーテル-石油エーテル混液 60 mL を加えて1分間振り混ぜ、静置して水層を別の分液漏斗に移す。この操作を2回行い、ジエチルエーテル-石油エーテル混液 (脂質抽出液) をすべて集める。

脂質抽出液に水 50 mL を加え、30～60秒間振り混ぜたのち静置し、下層の水を捨てる。さらにこの操作を2回行い、抽出液を水洗する。漏斗に脱脂綿を詰め (注4)、硫酸ナトリウム (無水) 約 40 g をのせ、脂質抽出液を脱水ろ過する (受器：なす形フラスコ)。ジエチルエーテル約 40 mL を数回に分け、分液漏斗及び、漏斗を洗浄し、洗浄液も先のろ液に合わせる。ろ液をロータリーエバポレーターで濃縮後、既知質量 (W_0) の容量 50 mL ビーカーに、ジエチルエーテルで定量的に移す。ビーカーを水浴上に置き、窒素ガスを吹き込みながら溶媒を完全に蒸散させる。ビーカーを減圧デシケーター中に一夜放置した後、質量 (W_1) を測定し、脂肪酸測定用の脂質とする。

（4）計 算

$$\text{脂肪酸測定用の脂質量 (g/100 g)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100$$

W_1 : 減圧デシケーターで乾燥後のビーカーの質量 (g)

W_0 : 容量 50 mL ビーカーの質量 (g)

W : 試料採取量 (g)

注 解

(注1) 脂質の量が 50 mg 以上あることが望ましいが、20 mg 程度でも測定は可能である。乾燥品は 1 g 程度でもよいが、果実類や生鮮野菜類など水分が多い試料は 40～50 g 程度採取する必要がある。脂質含量が少なく脂質量として 50 mg 以下と予想されるときは、あらかじめ2個のビーカーを用意し、それぞれに同質量の試料を採取し、まったく同じ操作を並行して行い、2個の脂肪酸測定用の脂質を得、そのうち1個を内標準物質添加用脂質とする。

(注2) 穀類、でん粉などの乾燥試料は塩酸溶液 (a)、果実類、生鮮野菜類などの水分の多い試料は塩酸溶液 (b) を用いる。

(注3) 分解の前に加えるエタノールは試料が塊になるのを防ぐのが目的である。乾物として、試料 1 g に対して 2 mL が適当である。分解後に加えるエタノールは液-液分配時にエマルジョンの生成を防ぐためである。下層の水とエタノールの比は 1 : 1 がよい。したがって、水分含量の高い試料ではエタノールの添加量を増やす。

(注4) 脱脂綿は漏斗の脚の付け根に詰めるが、きつくしないようにする。きつく詰めすぎると、ろ過速度が遅くなり、効率が悪くなると同時に、脱脂綿に脂質が吸着したままの状態になることがある。

38-1-4. 液-液抽出法

適 用

調味料類 (しょうゆ類、みりん、めんつゆなど)、嗜好飲料類 (インスタントコーヒー、茶浸出液、

アルコール飲料など) に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

ロータリーエバポレーター

水浴

分液漏斗：容量1000 mL

なす形フラスコ：容量500 mL

ビーカー：容量50 mL, 500 mL

減圧デシケーター

(2) 試 薬

エタノール

ジエチルエーテル

石油エーテル

ジエチルエーテル-石油エーテル混液 (1 : 1 v/v)

硫酸ナトリウム (無水)：特級

(3) 操 作

インスタントコーヒーは50 g (W) を容量500 mL ビーカーに正確にはかりとり、水220 mL を加えて、温めて溶かした後、エタノール180 mL を用い、分液漏斗に移す。しょうゆ類、アルコール飲料などの液体試料は300 g (W) を直接分液漏斗にはかりとる。ジエチルエーテル150 mL を加えて10分間振り混ぜる。さらに、石油エーテル150 mL を加えて、10分間振り混ぜ、静置する。下層を別の分液漏斗に移し、ジエチルエーテル-石油エーテル混液200 mL を加え、10分間振り混ぜ、静置する。下層をさらに別の分液漏斗に移し、ジエチルエーテル-石油エーテル混液200 mL を加え、10分間振り混ぜたのち静置し、下層は捨てる。ジエチルエーテル-石油エーテル混液を合わせ、水150 mL を加えて10分間振り混ぜ、静置して下層は捨てる。この操作を3回行う。漏斗に脱脂綿を詰め、硫酸ナトリウム (無水) 約40 g をのせ、脂質抽出液を脱水ろ過する (受器：なす形フラスコ)。ジエチルエーテル約40 mL を数回に分け、分液漏斗及び漏斗を洗浄し、洗浄液も先のろ液に合わせる (注1)。ろ液 (脂質抽出液) をロータリーエバポレーターで濃縮後、既知質量 (W_0) の容量50 mL ビーカーにジエチルエーテルを定量的に移す。ビーカーを水浴上に置き、窒素ガスを吹き込みながら溶媒を完全に蒸散させる。ビーカーを減圧デシケーター中に一夜放置した後、質量 (W_1) を測定し、脂肪酸測定用の脂質 (注2) とする。

(4) 計 算

$$\text{脂肪酸測定用の脂質量 (g/100 g)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100$$

W_1 ：減圧デシケーターで乾燥後のビーカーの質量 (g)

W_0 ：容量50 mL ビーカーの質量 (g)

W ：試料採取量 (g)

注 解

(注1) 脂質抽出液 (溶媒) の総量が約750 mL になるので、容量300 mL なす形フラスコではろ液が一度では全部入らない。ある程度ろ液がたまった時点で、ロータリーエバポレーターで濃縮し、さらに同じ容器にろ液をとり、順次濃縮し、最後に洗浄液も合わせて濃縮する。

(注2) 脂質の量として50 mg 以上あることが望ましいが、20 mg 程度でも測定は可能である。乾燥品

は1 g程度でもよいが、果実類や生鮮野菜類など水分が多い試料は、40～50 g程度採取する必要がある。脂質含量が少なく脂質量として50 mg以下と予想される時は、あらかじめ2個のビーカーを用意し、それぞれに同重量の試料を採取し、まったく同じ操作を並行して行い、2個の脂肪酸測定用の脂質を得、そのうち1個を内標準物質添加用脂質とする。

38-2. ガスクロマトグラフ法

38-2-1. メチルエステル化法(1)

適用

対象とする脂肪酸をC₁₀～C_{24:1}とし、穀類、種実類、豆類、魚介類、肉類、卵類、乳類、野菜類、果実類、嗜好飲料類に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

ガスクロマトグラフ(水素炎イオン化検出器付き、キャピラリーカラムを使用する場合はスプリット/スプリットレス注入口付き)

共栓三角フラスコ：容量50 mL

冷却管

クロマト管(内径10 mm)

水浴(又はホットプレート)

ロータリーエバポレーター

(2) 試薬

ヘプタデカン酸(内標準用)：純度98%以上(注1)

三フッ化ホウ素-メタノール試薬：濃度約14%，ガスクロマトグラフ用

n-ヘキサン

ジエチルエーテル-*n*-ヘキサン混液(2：98 v/v)

飽和食塩水

硫酸ナトリウム(無水)：特級

0.5 mol/L 水酸化ナトリウム-メタノール溶液：水酸化ナトリウム2 gをメタノール100 mLに溶解して調製する。

シリカゲル：精製クロマトグラフ用，C-200(130℃，16時間活性化したもの)

(3) 操作

共栓三角フラスコ2個に、抽出脂質20～300 mg(*G*)を正確にはかりとる。2個のうち1個に、内標準物質としてヘプタデカン酸(脂質の約1/5量，*F*)を正確に加える。それぞれに0.5 mol/L 水酸化ナトリウム-メタノール溶液を、表38-1に従って加える。冷却管を付け、油滴が消失し均質な溶液となるまで加熱してけん化する(5～10分間)。三フッ化ホウ素-メタノール試薬を表38-1に従って加える。2分間沸とうさせた後、*n*-ヘキサン2～5 mLを冷却管の上から加え、1分間沸とうさせる。加熱を止め、冷却後、*n*-ヘキサン溶液がフラスコの頸に達するまで、飽和食塩水を加える。*n*-ヘキサン層(メチルエステル溶液)2～5 mLをとり、硫酸ナトリウム(無水)を加えて脱水する。シリカゲル8 gを*n*-ヘキサンにけん濁し、クロマト管に充填する。このカラムに脱水したメチルエステル溶液をのせて吸着させる。*n*-ヘキサン100 mLで洗浄した後、ジエチルエーテル-*n*-ヘキサン混液(5：95 v/v)100 mLでメチルエステル化物を溶出する。溶媒を留去後、*n*-ヘキサンに溶解する(10～40 mg/mL程度の濃度にする)。精製したメチルエステル化物の*n*-ヘキサン溶液1～2 μLを、ガスクロマトグラフ

に注入する。

表38-1 脂質量と試薬使用量

脂質量 (mg)	0.5 mol/L 水酸化ナトリウム-メタノール溶液 (mL)	三フッ化ホウ素-メタノール試薬 (mL)
20~100	2	2.5
100~250	4	5.0
250~500	6	7.0

1) ガスクロマトグラフの操作条件例

カラム：内径0.20~0.32 mm, 長さ15~30 m, フューズドシリカキャピラリーにシアノプロピル系又はポリエチレングリコール-20Mなどの液相を結合させたもの, 膜厚は0.25 μm (注2)。

温度：注入口及び検出器250℃, カラム60℃ (1分間保持) →160℃ (6℃/分, 昇温) →200℃ (1.8℃/分, 昇温)

流量：2.0 mL/分 (ヘリウム)

注入モード：スプリットレス

(4) 計 算

$$1) \text{ 脂質中の各脂肪酸含量 (mg/g)} = \frac{A \times E \times F \times H}{(A \times D - B \times C) \times G} \times 1000 \quad (\text{注3})$$

A：内標準物質無添加のバルミチン酸の面積 (注4)

B：内標準物質無添加の内標準物質の保持時間に一致するピーク面積

C：内標準物質添加のバルミチン酸の面積

D：内標準物質添加の内標準物質の面積

E：内標準物質添加の被定量脂肪酸の面積

F：内標準物質添加量 (mg) (注5)

G：脂質採取量 (mg)

H：各脂肪酸の内標準物質に対する感度補正係数 (注6)

$$2) \text{ 脂質中の総脂肪酸含量 (mg/g)} = \text{各脂肪酸含量 (mg/g) の総和}$$

$$3) \text{ 脂肪酸組成 (\%)} = \frac{\text{各脂肪酸含量 (mg/g)}}{\text{総脂肪酸含量 (mg/g)}} \times 100$$

注 解

(注1) 内標準物質のみをメチルエステル化し, 事前に不純物の有無を確認する。

(注2) Quadrex社 CPS-1, 0.32 mm × 15 m, 膜厚0.25 μm を使用したときの操作例である。液相の種類によっては C_{22:6} と C_{24:0} または C_{24:1} が重なる場合があるので, 事前に調べておく必要がある。なお, キャピラリーカラムでスプリットレス注入を行う場合, メチルエステル溶液の濃度を 4 mg/mL 程度まで, n-ヘキサンで希釈する。

(注3) 植物油などのヘプタデカン酸が含まれない脂質では, 空試験補正が不要となり, 以下の式で計算できる。

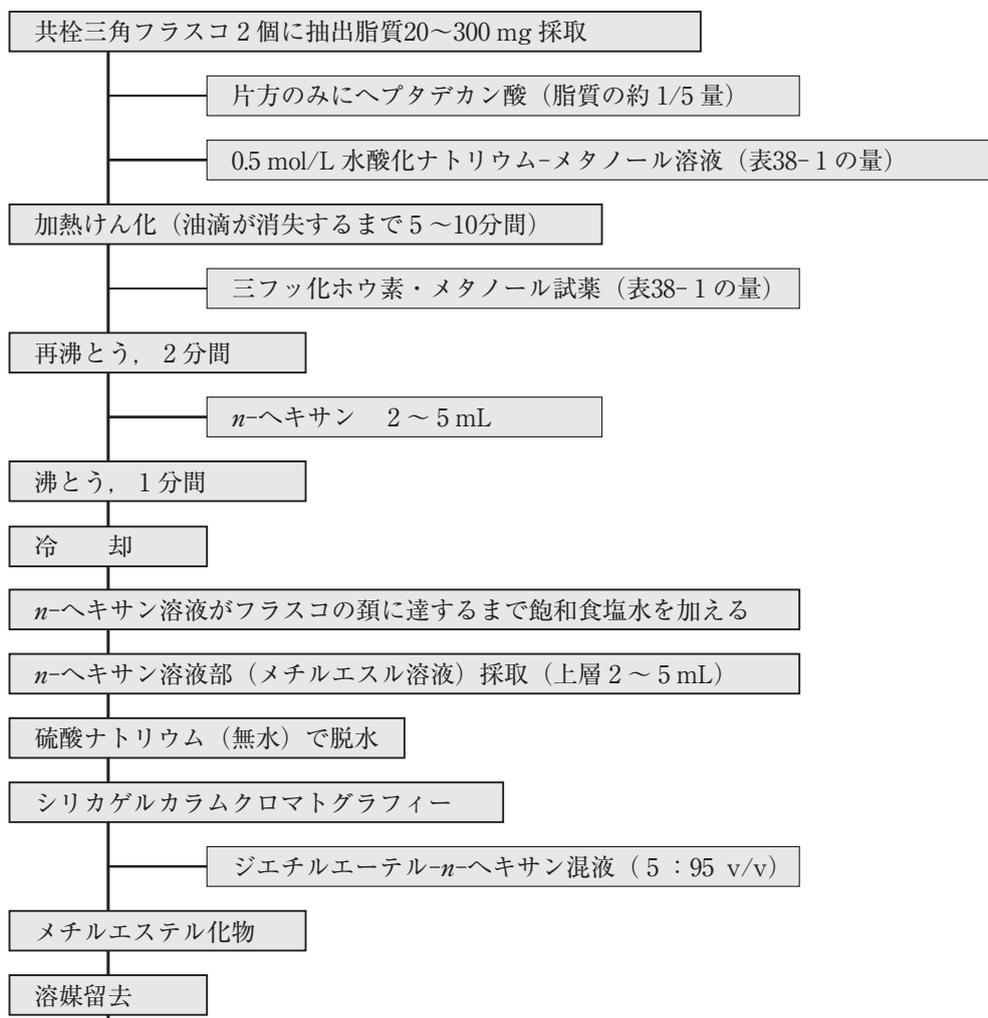
$$\text{脂質中の各脂肪酸含量 (mg/g)} = \frac{E \times F \times H}{D \times G} \times 1000$$

(注4) 空試験補正のための基準のピークとしてパルミチン酸を用いる。主要な脂肪酸であり、ほとんどすべての試料に含まれるものであれば、他の脂肪酸を基準としてもよい。

(注5) 内標準の添加量は純度を考慮すること。

(注6) すべての脂肪酸について、厳密に言えば感度補正係数を求めることが望ましいが、標準品として市販されていない脂肪酸も少なくない。そのため、そのような脂肪酸については、感度補正係数を1として計算してもよい。

脂肪酸定量法・フローチャート —ガスクロマトグラフ法・メチルエステル化法(1)—



n -ヘキサンに溶解

1～2 μ L をガスクロマトグラフに注入，測定

38-2-2. メチルエステル化法（2）

適用

対象とする脂肪酸を $C_{10} \sim C_{24:1}$ とし，主に貝類など，不けん化物の除去が必要な試料に用いる。

測定方法

（1）装置及び器具

38-2-1. メチルエステル化法（1）に同じ。

（2）試 薬

1 mol/L 塩酸溶液

1 mol/L 水酸化カリウム-エタノール溶液：水酸化カリウム6.6 g を95 % エタノール100 mL に溶解する。

石油エーテル

メチルオレンジ指示薬：メチルオレンジ100 mg を95 % エタノール100 mL に溶解する。

その他の試薬は，38-2-1. メチルエステル化法（1）に同じ。

（3）操 作

共栓三角フラスコ2個に，抽出脂質20～300 mg (G) を正確にはかりとる。2個のうち1個に，内標準物質としてヘプタデカン酸（脂質の約1/5量， F) を正確に加える。それぞれに1 mol/L 水酸化カリウム-エタノール溶液15 mL を加える。冷却管を付け，30分間加熱して，けん化する（注1）。けん化溶液を水15 mL で分液漏斗に洗い込んだ後，石油エーテル30 mL で2回振り混ぜ抽出して，不けん化物を除去する。水層に水30 mL 及びメチルオレンジ指示薬を数滴加えて，1 mol/L 塩酸溶液で酸性とした後，ジエチルエーテル30 mL を加えて振り混ぜ，脂肪酸を抽出する。この操作を2回行う。ジエチルエーテル層を合わせ，水洗し，硫酸ナトリウム（無水）で脱水した後，ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧留去する。得られた脂肪酸に三フッ化ホウ素-メタノール試薬を表38-1に従って加える。2分間沸とうさせた後， n -ヘキサン2～5 mL（脂肪酸量によって異なる）を冷却管の上から加え，1分間沸とうさせる。加熱を止め冷却後， n -ヘキサン溶液がフラスコの頸に達するまで，飽和食塩水を加える。 n -ヘキサン層（メチルエステル溶液）2～5 mL をとり，硫酸ナトリウム（無水）を加えて脱水する。さらに， n -ヘキサンを加えて，メチルエステルの濃度を10～40 mg/mL に希釈し，その1～2 μ L をガスクロマトグラフに注入する。

1) ガスクロマトグラフィー

[操作条件例]

38-2-1. メチルエステル化法（1）に同じ。

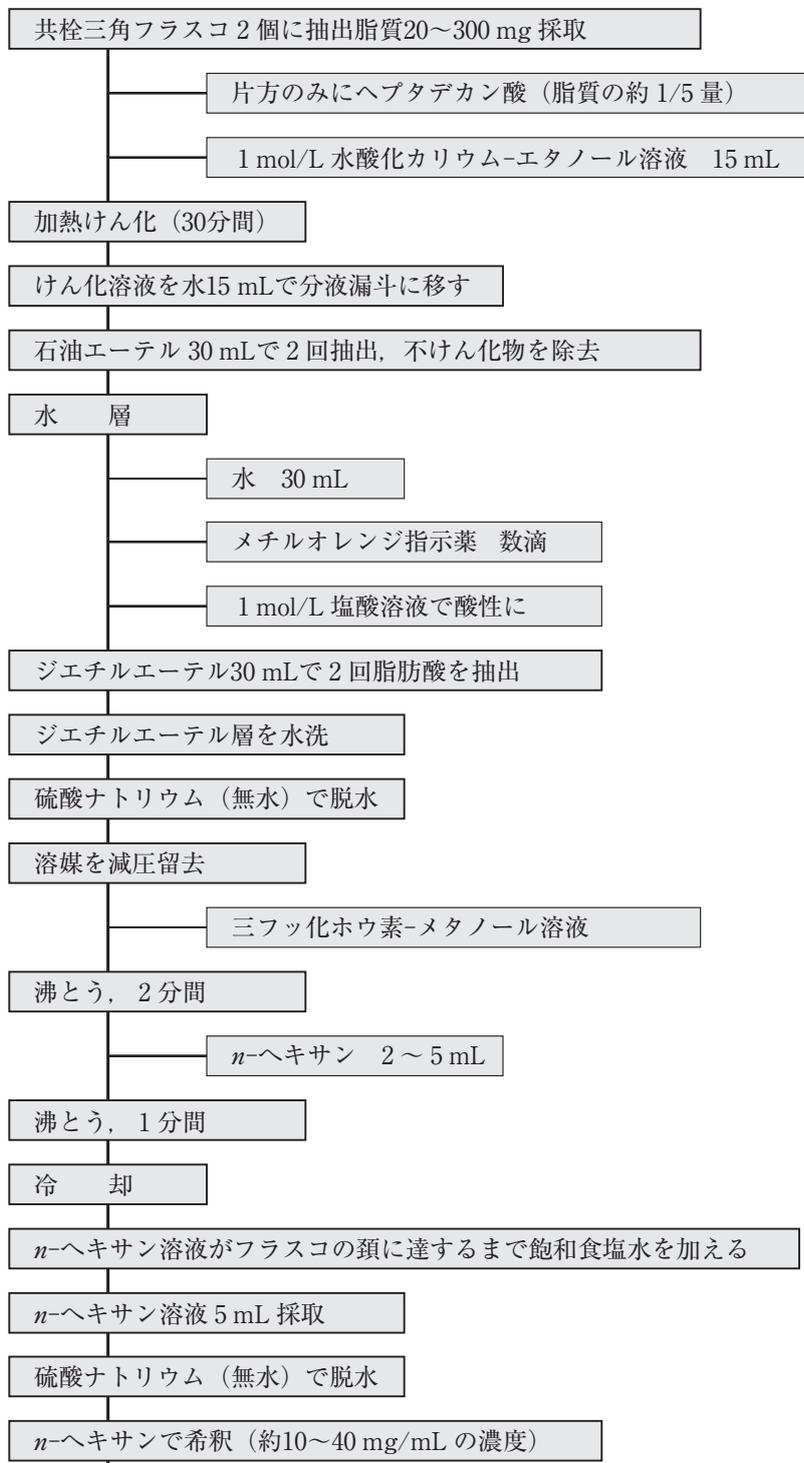
（4）計 算

38-2-1. メチルエステル化法（1）に同じ。

注 解

（注1）穏やかに沸とうさせながら行う。

脂肪酸定量法・フローチャート
ーガスクロマトグラフ法・メチルエステル化法（2）ー



試料溶液

1～2 μL をガスクロマトグラフに注入，測定

38-2-3. プロピルエステル化法

適用

菓子類，乳類などの乳脂肪を含む脂質に用いる（注1）。

測定方法

(1) 装置及び器具

ガスクロマトグラフ（水素炎イオン化検出器付き）

全量フラスコ：容量20 mL

水浴

(2) 試薬

ナトリウムプロピレート溶液：金属ナトリウム0.1 g をプロパノール30 mL に溶解する。

飽和食塩水

(3) 操作

容量20 mL 全量フラスコに，抽出脂質100～200 mg をはかりとる。ナトリウムプロピレート溶液1 mL を加え，約80℃の水浴中で1～2分間振り混ぜる。次いで，飽和食塩水10 mL を加えて振り混ぜた後，さらに飽和食塩水を全量フラスコの頸まで加えて，40℃の水浴中に脂肪酸プロピルエステル層と下層が分離するまで放置する。脂肪酸プロピルエステル層0.1～0.2 μL をガスクロマトグラフに注入する。

1) ガスクロマトグラフィー

[操作条件例]

カラム：内径3 mm，長さ2 m，5 % Thermon3000/Chromosorb W (AW-DMCS)（注2），80～100メッシュ

温度：注入口および検出器270℃，カラム100℃→250℃（4℃/分，昇温）

流量：30 mL/分（窒素）（ラウリン酸プロピルの相対保持時間16～19分間）

(4) 計算

$$1) \text{ 脂質中の } C_4 \sim C_8 \text{ の脂肪酸含量 (mg/g)} = \frac{A \times C}{B}$$

A：プロピルエステル化法における各脂肪酸の面積（ $C_4 \sim C_8$ ）

B：プロピルエステル化法におけるラウリン酸の面積

C：メチルエステル化法（1）におけるラウリン酸の脂肪酸含量（mg/g）

$$2) \text{ 脂質中の総脂肪酸含量 (mg/g)} = A + B$$

A：プロピルエステル化法における各脂肪酸（mg/g）の合計（ $C_4 \sim C_8$ ）

B：メチルエステル化法（1）における各脂肪酸（mg/g）の合計（ C_{10} ）

$$3) \text{ 脂肪酸組成 (\%)} = \frac{A}{B} \times 100$$

A: プロピルエステル化法(C₄~C₈)又は38-2-1.メチルエステル化法(1)(C₁₀~)における各脂肪酸量 (mg/g)

B: 総脂肪酸含量 (mg/g)

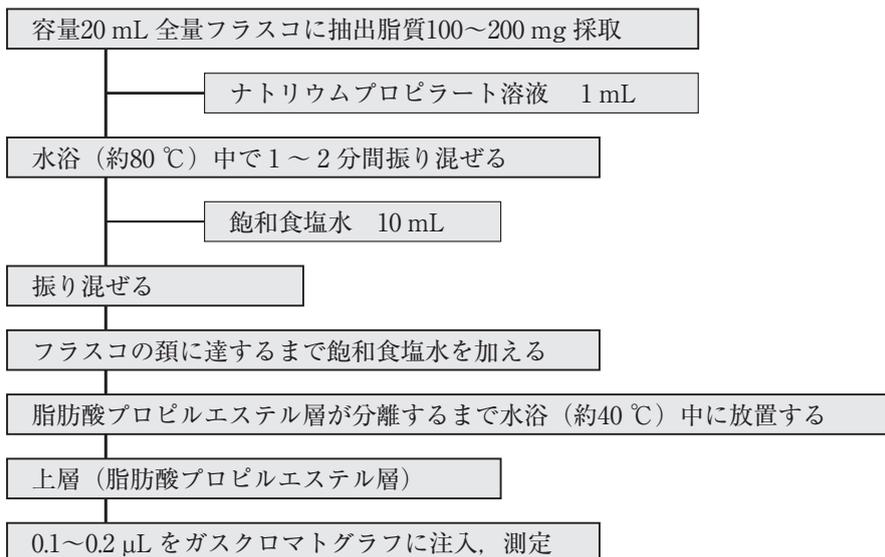
注 解

(注1) 乳脂肪に含まれる酪酸などの脂肪酸は炭素鎖長が短く、水への溶解による損失が大きいため、プロピルエステル化した後、脂肪酸を分析する。C₁₀以上の脂肪酸については38-2-1.メチルエステル化法(1)により分析する。

(注2) Chromosorb W (AW-DMCS) は現在入手困難なため、同等以上の性能を有するカラムを用いてもよい。

脂肪酸定量法・フローチャート —ガスクロマトグラフ法・プロピルエステル化法—

(C₁₀以上の脂肪酸については、38-2-1.メチルエステル化法(1)による)



39 コレステロール

39-1. ガスクロマトグラフ法 (1)

適用

魚介類 (さつま揚げは除く)、肉類、乳類、卵類に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

ガスクロマトグラフ (水素炎イオン化検出器付き)

共栓三角フラスコ：容量100 mL

冷却管

水浴 (又はホットプレート)

分液漏斗

ロータリーエバポレーター

(2) 試薬

コレステロール標準品：純度99 % 以上

コレステロール標準溶液：コレステロール0.20 mg, 1.0 mg 及び2.0 mg に、それぞれ5 α -コレスタン0.5 mg を加え、*n*-ヘキサンで10 mL とする (注1)。

5 α -コレスタン-エタノール溶液 (内標準物質用)：5 α -コレスタンをエタノールに溶解して、0.5 mg/mL とする。

石油エーテル

n-ヘキサン

1 mol/L 水酸化カリウム-エタノール溶液：水酸化カリウム6.6 g を95 % エタノール100 mL に溶解する。

硫酸ナトリウム (無水)

(3) 操作

共栓三角フラスコに、試料0.3~5 g (*W*) (ただし、卵黄は0.1~0.15 g) を正確にはかりとる。内標準物質として、5 α -コレスタン-エタノール溶液1 mL を正確に加える。次に1 mol/L 水酸化カリウム-エタノール溶液50 mL を加え、冷却管を付け1時間加熱してけん化する (注2)。冷却後、水50 mL 及び石油エーテル50 mL で分液漏斗に移し、振り混ぜ抽出する。さらに石油エーテル50 mL で2回抽出する。石油エーテル層を集め、水40 mL で4回洗う。石油エーテル層を硫酸ナトリウム (無水) で脱水し、ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧留去する。残留物に *n*-ヘキサン10 mL を加えて溶解した後、ガスクロマトグラフに1 μ L を注入する。

1) ガスクロマトグラフィー

[操作条件例]

カラム：内径0.53 mm, 長さ15 m, フェーズドシリカキャピラリーに5 % ジフェニル-95 % ジメチルシロキサンを結合させたもの、膜厚1.0~1.5 μ m。

温度：注入口及び検出器280 $^{\circ}$ C, カラム250 $^{\circ}$ C

流量：15 mL/分 (ヘリウム, コレステロールの保持時間約8.5分)

注入モード：スプリットレス

2) 検量線の作成

各濃度の標準溶液 1 μL をガスクロマトグラフに注入し、内標準物質に対するコレステロールの面積比を求め、検量線を作成する。

(4) 計 算

$$\text{コレステロール含量 (mg/100 g)} = \frac{A \times 100}{W}$$

A: 検量線より求めた試料溶液中のコレステロール量 (mg)

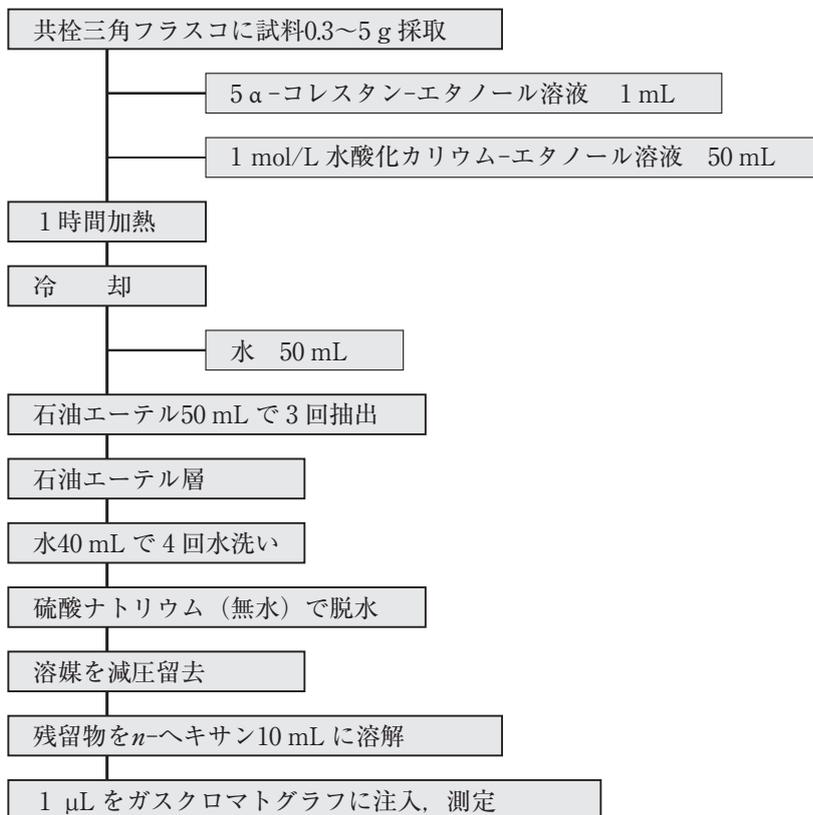
W: 試料採取量 (g)

注 解

(注1) コレステロール含量が低い食品の定量にはコレステロール0.02 mg の標準溶液を使用する。

(注2) 穏やかに沸とうさせながら行う。

コレステロール定量法・フローチャート —ガスクロマトグラフ法(1)—



39-2. ガスクロマトグラフ法 (2)

適 用

さつま揚げ, 豆類, 野菜類, 果実類, きのこと類, 藻類, 油脂類, 菓子類, し好飲料類, 調味料類に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

共栓三角フラスコ: 容量200 mL

クロマト管 (内径15 mm)

その他は39-1. ガスクロマトグラフ法 (1) に同じ。

(2) 試 薬

シリカゲル: クロマトグラフ用 (130 °C, 16時間活性化したもの)

ジエチルエーテル-*n*-ヘキサン混液 (1 : 4 v/v)

ジエチルエーテル-*n*-ヘキサン混液 (35 : 65 v/v)

その他の試薬は, 39-1. ガスクロマトグラフ法 (1) に同じ。

(3) 操 作

共栓三角フラスコに, 試料1~10 g (*W*) を正確にはかりとる。1 mol/L 水酸化カリウム-エタノール溶液100 mL を加え, 冷却管を付け, 1時間加熱してけん化する (注1)。冷却後, 水100 mL 及び石油エーテル100 mL で分液漏斗に移し, 振り混ぜ抽出する。さらに石油エーテル50 mL で2回抽出する。石油エーテル層を集め, 水40 mL で4回洗う。石油エーテル層を硫酸ナトリウム (無水) で脱水し, ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧留去する。シリカゲル8 g を *n*-ヘキサンにけん濁させ, かき混ぜながらクロマト管に充填する。このカラムに, 残留物の *n*-ヘキサン溶液を注ぎ, 吸着させる。次いで, ジエチルエーテル-*n*-ヘキサン混液 (1 : 4 v/v) 150 mL で洗浄した後, ジエチルエーテル-*n*-ヘキサン混液 (35 : 65 v/v) 150 mL を用いてステロール画分を溶出する。ステロール溶出画分に, 5 α -コレスタン-エタノール溶液1 mL を正確に加え, ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧留去する。残留物を *n*-ヘキサン10 mL に溶解し, その1 μ L をガスクロマトグラフに注入する。

1) ガスクロマトグラフィー

[操作条件例]

39-1. ガスクロマトグラフ法 (1) に同じ。

2) 検量線の作成

39-1. ガスクロマトグラフ法 (1) に同じ。

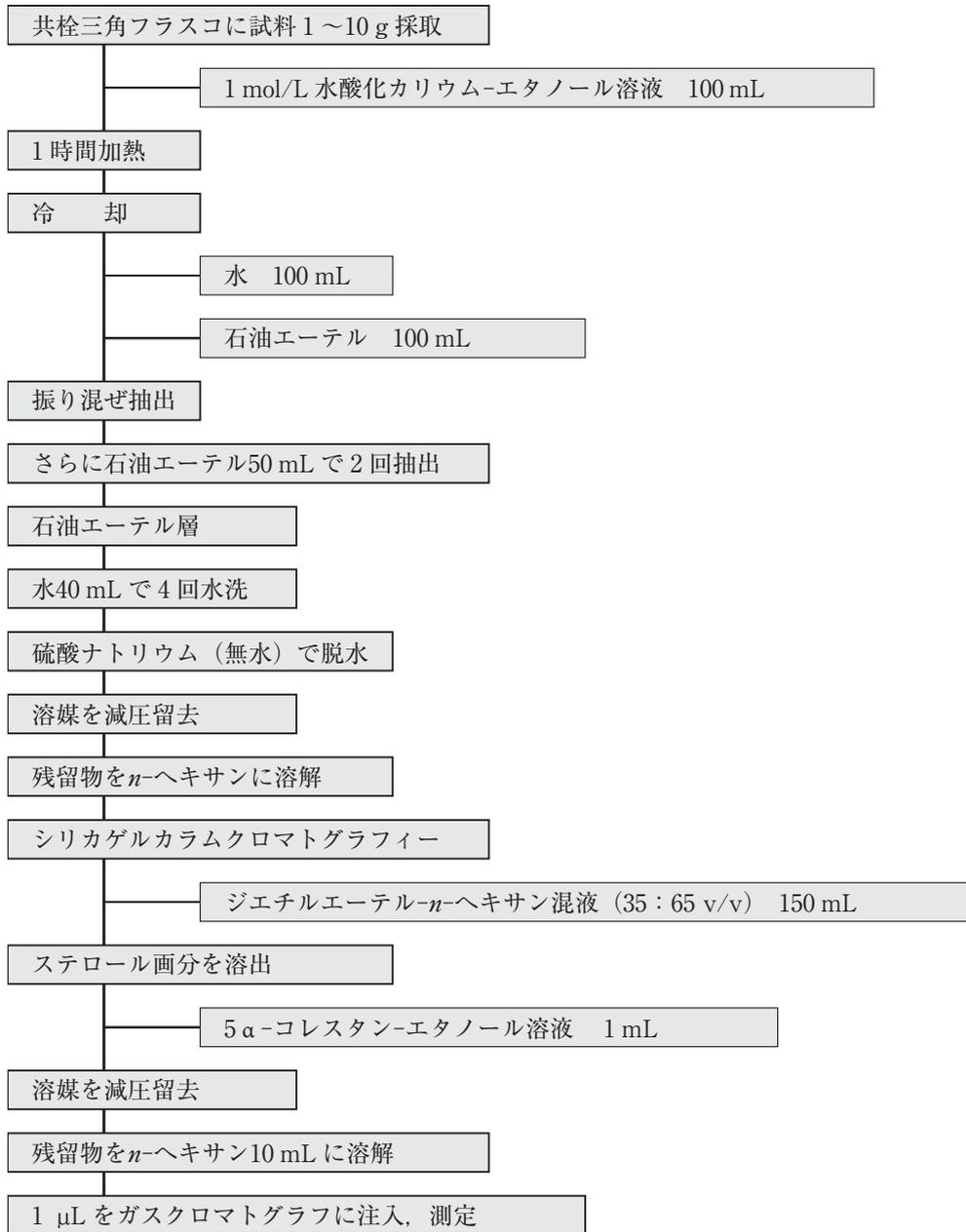
(4) 計 算

39-1. ガスクロマトグラフ法 (1) に同じ。

注 解

(注1) 穏やかに沸とうさせながら行う。

コレステロール定量法・フローチャート
ーガスクロマトグラフ法（2）ー



39-3. ガスクロマトグラフ法 (3)

適用

穀類、いも及びでん粉類に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

39-2. ガスクロマトグラフ法 (2) に同じ。

(2) 試薬

エタノール

95%エタノール

水酸化カリウム

5 mol/L 塩酸：水70 mL に塩酸50 mL を加える。

その他の試薬は、39-2. ガスクロマトグラフ法 (2) に同じ。

(3) 操作

共栓三角フラスコに、試料1～3 g (W) を正確にはかりとる。エタノール2 mL を加え、ガラス棒で混和する。5 mol/L 塩酸10 mL を加え、30分間加熱して酸分解を行う。放冷後95 % エタノール50 mL、水酸化カリウム6.6 g を加え、冷却管を付け、1時間加熱してけん化する(注1)。冷却後、水150 mL 及び石油エーテル100 mL で分液漏斗に移し、振り混ぜ抽出する。さらに石油エーテル50 mL で2回抽出する。石油エーテル層を集め、水40 mL で4回洗う。石油エーテル層を硫酸ナトリウム(無水)で脱水し、ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧留去する。シリカゲル8 g を *n*-ヘキサンにけん濁させ、かき混ぜながらクロマト管に充填する。このカラムに、残留物の *n*-ヘキサン溶液を注ぎ、吸着させる。次いで、ジエチルエーテル-*n*-ヘキサン混液 (1 : 4 v/v) 150 mL で洗浄した後、ジエチルエーテル-*n*-ヘキサン混液 (35 : 65 v/v) 150 mL を用いてステロール画分を溶出する。ステロール溶出画分に、5 α -コレスタン-エタノール溶液1 mL を正確に加え、ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧留去する。残留物を *n*-ヘキサン10 mL に溶解し、その1 μ L をガスクロマトグラフに注入する。

1) ガスクロマトグラフィー

[操作条件例]

39-1. ガスクロマトグラフ法 (1) に同じ。

2) 検量線の作成

39-1. ガスクロマトグラフ法 (1) に同じ。

(4) 計算

39-1. ガスクロマトグラフ法 (1) に同じ。

注解

(注1) 穏やかに沸とうさせながら行う。

コレステロール定量法・フローチャート —ガスクロマトグラフ法 (3)—

共栓三角フラスコに試料1～3 g 採取

エタノール 2 mL

