

食用植物油の脂肪酸に占める オレイン酸の割合測定方法手順書

1. 適用範囲

この測定方法は日本農林規格に定める食用植物油に適用する。

2. 測定方法の概要

試料から脂肪酸メチルエステルを調製し、水素炎イオン化検出器付きガスクロマトグラフを用いて測定する。脂肪酸について記録された各成分のピーク面積を測定し、ピーク面積の総和に対するオレイン酸のピーク面積の百分率をもって脂肪酸に占めるオレイン酸の割合とする。

3. 注意事項

- (a) 試験を行う際には、適切な保護衣、保護メガネ及び手袋を使用すること。特に手袋の耐薬品性、耐熱性には注意をすること。
- (b) 脂肪酸メチルエステルの調製は、有機溶媒対応のドラフト内で行うこと。
- (c) エステル化フラスコ内の廃液は流しに捨てず、決められた廃棄方法に従い、容器等に回収し適切に処理すること。
- (d) 三フッ化ホウ素・メタノール試薬は冷蔵保存すること。
- (e) 加熱装置を取り扱う際は火傷に注意し、耐熱手袋を着用すること。
- (f) ガスクロマトグラフ使用前に、ガス配管の接続部や、その他流路系からのガス漏れがないかどうかを十分に検査すること。特に水素ガスを使用する場合は、厳重に検査し、使用後はボンベの栓を確実に閉めること。また可能であれば、ボンベは室外に設置し、室内に流入するガスの最大流量を制限する装置を設置するか、水素ガス発生装置を用いる。
- (g) ガスクロマトグラフ使用中は、注入口部、検出器部が高温になっているので、火傷をするおそれがあるため手を触れないこと。

4. 試薬等

試薬は、以下のものを用いる。JIS 番号を記載している試薬は、JIS に規定するもの又はこれと同等以上のものを用いる。

- (a) 水酸化ナトリウム：JIS K 8576 に規定するもの。
- (b) メタノール：JIS K 8891 に規定するもの。
- (c) 三フッ化ホウ素・メタノール試薬⁽¹⁾：ガスクロマトグラフ用又は同等以上のもの。
- (d) n-ヘキサン：JIS K 8848 に規定するもの。
- (e) 塩化ナトリウム：JIS K 8150 に規定するもの。
- (f) 水：蒸留法もしくはイオン交換法によって精製したもの又は逆浸透膜法、蒸留法、

イオン交換法などを組み合わせた方法によって精製したもので、JIS K 8008 に規定する A2 以上の品質を有するもの。

(g) 硫酸ナトリウム：JIS K 8987 に規定するもの。

(h) 脂肪酸メチルエステル標準品：表 1 の脂肪酸メチルエステルを含むもの。

(1) 古い製品を用いた場合、炭素数20から22までの脂肪酸のメチルエステルの間に疑似ピークを示すものがあるので、使用しないこと。

5. 器具及び装置等

器具及び機器は、以下のものを用いる。JIS 番号を記載している器具及び機器は、JIS に規定するもの又はこれと同等以上のものを用いる。

5.1 脂肪酸メチルエステル調製に使用する器具及び機器

(a) メスシリンダー：呼び容量 100 mL 及び 1000 mL。JIS R 3505 に規定するクラス A のもの又はそれ以上のグレードのもの。

(b) 電子天びん：0.1 mg の桁まで量ることが出来るもの。

(c) エステル化用フラスコ：呼び容量 50 mL。丸底、平底、なす形又は三角フラスコですり合わせ式のもの。

(d) 冷却器：JIS R 3503 に規定するもので、リービッヒ型、長さ200 mm以上のもの又は同等のもの。エステル化用フラスコとすり合わせ接続が可能なもの。

(e) 加熱装置：電気恒温水槽又は電気式ヒーター。電気恒温水槽の場合は、90 °C以上に水温が調節可能なもの。電気式ヒーターの場合は、出力調節が可能で、エステル化用フラスコを熱することが可能なもので、冷却器を付けたエステル化用フラスコにメタノール 9 mL を入れ、2 分間沸騰させた時に、メタノールが還流すること。

(f) 栓付試験管：共栓又はスクリューキャップ等でふたができるもので、容量 20 mL 以下のもの⁽²⁾。

(g) オートピペット：JIS K 0970 に規定するプッシュボタン式液体用微量体積計の構成を有するもので、2 mL、4 mL、5 mL を採取できるもの。

(h) 駒込ピペット：呼び容量 5 mL 又は 10 mL

5.2 ガスクロマトグラフによる測定に使用する器具及び機器

(a) ガスクロマトグラフ：JIS K 0114 に規定するもので、水素炎イオン化検出器付きのもの。キャピラリーカラムが使用可能なもの。

(b) カラム：金属、ガラス、石英ガラス又は合成樹脂等の細管に、50 %シアノプロピルフェニルメチルシリコン、2-ニトロテレフタル酸処理ポリエチレングリコール、50 %シアノプロピルメチルシリコン、ポリエチレングリコール又は同等以上の分離能をもつものをコーティングしたもの。

(2) 褐色のものが望ましい。

6. 試薬の調製

試薬調製は、次のとおり行う。試薬調製量は必要に応じて変更してよい。また、同一組成の市販品を使用してもよい。

- (a) 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 を量りとり、メスシリンダーでメタノール 100 mL を加えて溶解する。耐アルカリ性の容器に入れて保存する。
- (b) 塩化ナトリウム飽和溶液：塩化ナトリウム 500 g を量りとり、メスシリンダーで水 1000 mL を加えて塩化ナトリウムの溶解が確認できなくなるまで攪拌する。一晩放置して安定させる。
- (c) 脂肪酸メチルエステル標準溶液：脂肪酸メチルエステル標準品を表 1 の重量を量りとり、ヘキサン 10 mL を加えて溶解する。溶液は容器内の空気を窒素に置換し、密栓して冷凍保存する。標準品は表 1 以外のものが混合されていても、分析に支障がないことが確認されていれば、使用してもよい。また、量り取る重量も分析に支障のない範囲で変更してよい。
- (d) 約40 µg/ml⁽³⁾脂肪酸メチルエステル溶液：アラキジン酸メチルエステル、エイコセン酸メチルエステル又はベヘニン酸メチルエステルのいずれか 1 種類を約40 µg/ml となるようにヘキサンの希釈し調製する。また、脂肪酸メチルエステル標準溶液を希釈して調製してもよい。ガスクロマトグラフの検出限界の確認のために用いる。

(3) 0.2 g の脂肪酸を5 ml のヘキサンに溶解したときの濃度を100 %としたとき0.1 %に相当する濃度である。

表1. 脂肪酸メチルエステル標準溶液調製重量

脂肪酸メチルエステル標準品	重量
パルミチン酸メチルエステル	5 mg以下
ステアリン酸メチルエステル	5 mg以下
オレイン酸メチルエステル	50~70 mg
リノール酸メチルエステル	10~15 mg
α - リノレン酸メチルエステル	5 mg以下
アラキジン酸メチルエステル	5 mg以下
エイコセン酸メチルエステル	5 mg以下
ベヘニン酸メチルエステル	5 mg以下
リグノセリン酸メチルエステル	5 mg以下
バクセン酸メチルエステル	5 mg以下

7. 測定手順

7.1 脂肪酸メチルエステルの調製

- (a) 試料約 0.2 g をエステル化用フラスコに量り取る。
- (b) エステル化用フラスコに 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム・メタノール溶液 4 mL を加え

る。

- (c) エステル化用フラスコを冷却管に連結し⁽⁴⁾、試料が均一に溶解する⁽⁵⁾まで加熱する。
- (d) 冷却管の上端から三フッ化ホウ素・メタノール試薬 5 mL を加え、溶液が沸騰していることを確認し、2 分間沸騰を継続する。
- (e) 冷却管の上端から n-ヘキサン 5 mL を加え、溶液が沸騰していることを確認し、1 分間沸騰を継続する。
- (f) 加熱を止めてエステル化用フラスコを冷却管から外し⁽⁶⁾、上層（ヘキサン層）がエステル化用フラスコの首に達するまで塩化ナトリウム飽和溶液を加える。
- (g) 上層約 2 mL を栓付試験管に移し、これに少量の硫酸ナトリウムを加え、ときどき振り混ぜながら 30 分間以上静置し、溶液が透明になったもの⁽⁷⁾を試験溶液とする^{(8), (9)}。

(4) 必要に応じてクランプ等で冷却管又はエステル化フラスコを固定する。

(5) 溶液内の油滴が見えなくなった状態をいう。

(6) 安全のため、沸騰が収まるのを待ってから外すこと。

(7) 溶液が濁っている場合はまだ水分を含んでいる。必要に応じて硫酸ナトリウムを追加してもよい。

(8) ガスクロマトグラフ用の専用バイアル等がある場合は、上澄み液を詰め替える。

(9) 調製した脂肪酸メチルエステルは原則として当日中に分析する。やむを得ず翌日に分析する場合は、容器中の空気を窒素置換して密栓し、冷凍庫に貯蔵する。分析の際は必ず常温に戻してから分析する。

7.2 ガスクロマトグラフの設定及び安定性の確認の方法

ガスクロマトグラフの分析条件の変更やカラムを新しいものに付け替えた場合等、必要に応じて確認すること。

- (a) ガスクロマトグラフの取扱説明書に従い、測定条件を設定する。この際脂肪酸メチルエステル標準溶液(表 1)の各脂肪酸の保持時間が 5 ～ 30 分の間に、オレイン酸メチルの保持時間が 8 ～ 15 分の間となるように設定する。
- (b) ベースラインが測定に支障のないことを確認した後、約 40 µg/ml 脂肪酸メチルエステル溶液を注入し、ピークが検出していることを確認する。その際、ピークとベースラインを拡大し、ピークの高さがベースラインのノイズ幅の 10 倍以上のピークであることを確認する⁽¹⁰⁾。
- (c) ベースラインが測定に支障のないことを確認した後、脂肪酸メチルエステル標準溶液を注入し、全ての成分が流出し終わった後クロマトグラムを調べ、各脂肪酸のピークが隣接するピークと重複しないことを確認する。オレイン酸メチルとバクセン酸メチル以外に重複するピークがある場合は、ピーク間の谷の高さが低い方のピークの高さの 10 % 未満であることを確認する⁽¹¹⁾。
- (d) 各脂肪酸のピークを拡大して、ピーク形状を確認する。重複していないピークの形状は出来るだけ二等辺三角形に近い形のピークが得られるようにする。
- (e) 同一条件で測定した場合の保持時間は、3 回測定した時、オレイン酸メチルのピークの保持時間の最大値と最小値の差が、最大値の 2 % 以下とする。

(10) ノイズ幅及びピーク高さの確認方法は、JIS K 0114 図11による。ただし、図の中で信号はピーク

高さに読み替える。

- (11) 基本的にバクセン酸メチルはオレイン酸メチルの直後に検出するため、上記の条件により両者を分離することが難しい。そのため、ピーク間の谷の高さがバクセン酸メチルのピークの高さの概ね50%未満であることを確認する。

(事務局で実施したGC測定条件)

装置：Agilent 6890N (Agilent Technologies社)

カラム：DB-23 (Agilent Technologies社)、内径 0.25 mm×30 m、膜厚 0.25 μm

カラム恒温槽温度：170 °Cで3分間 → 4 °C/分 → 240 °Cで10分間

試料注入口温度：240 °C

キャリアーガス及び流量：ヘリウム、1.0 mL/分

検出器及び検出器温度：水素炎イオン化検出器 (FID)、240 °C

注入方式：スプリット (スプリット比：1:100)

注入量：1 μL

オレイン酸メチルエステルの保持時間：約10.3分

7.3 ガスクロマトグラフによる測定

- (a) 標準溶液及び試験溶液を注入する。各脂肪酸の同定は標準溶液と同一条件により測定したときの保持時間を比較して行う。
- (b) 各脂肪酸のピークを拡大して、ピークの切り方 (積分) を確認する。ピークが重複している場合は、JIS K 0114 11.3(b)の備考に記載されている方法によりピークを分割する。

8. 計算

表2の脂肪酸について記録された各成分のピーク面積を測定し、ピーク面積の総和に対するオレイン酸メチルとバクセン酸メチルのピーク面積の百分率をもって脂肪酸に占めるオレイン酸の割合とする。

目的のピークとベースラインを拡大し、ピークの高さがベースラインのノイズ幅の10倍以上のピークを計算に用いる⁽¹²⁾。

表2. ピーク面積の測定対象である脂肪酸一覧

サフラワー油 (ハイオレイック)	ひまわり油 (ハイオレイック)
パルミチン酸 (16:0)	パルミチン酸 (16:0)
ステアリン酸 (18:0)	ステアリン酸 (18:0)
オレイン酸 (18:1 (9))	オレイン酸 (18:1 (9))
バクセン酸 (18:1 (11))	バクセン酸 (18:1 (11))
リノール酸 (18:2 (9, 12))	リノール酸 (18:2 (9, 12))
α-リノレン酸 (18:3 (9, 12, 15))	—
アラキジン酸 (20:0)	アラキジン酸 (20:0)
エイコセン酸 (20:1)	エイコセン酸 (20:1)

ベヘニン酸 (22:0)	ベヘニン酸 (22:0)
リグノセリン酸 (24:0)	リグノセリン酸 (24:0)

計算式

・ サフラワー油 (ハイオレイック)

$$\text{脂肪酸に占めるオレイン酸の割合 (\%)} = \frac{\text{Area}_{\text{オレイン}} + \text{Area}_{\text{バクセン}}}{(\text{Area}_{\text{パルミチン}} + \text{Area}_{\text{ステアリン}} + \text{Area}_{\text{オレイン}} + \text{Area}_{\text{バクセン}} + \text{Area}_{\text{リノール}} + \text{Area}_{\alpha\text{-リノレン}} + \text{Area}_{\text{アラキジン}} + \text{Area}_{\text{エイコセン}} + \text{Area}_{\text{ベヘニン}} + \text{Area}_{\text{リグノセリン}})} \times 100$$

・ ひまわり油 (ハイオレイック)

$$\text{脂肪酸に占めるオレイン酸の割合 (\%)} = \frac{\text{Area}_{\text{オレイン}} + \text{Area}_{\text{バクセン}}}{(\text{Area}_{\text{パルミチン}} + \text{Area}_{\text{ステアリン}} + \text{Area}_{\text{オレイン}} + \text{Area}_{\text{バクセン}} + \text{Area}_{\text{リノール}} + \text{Area}_{\text{アラキジン}} + \text{Area}_{\text{エイコセン}} + \text{Area}_{\text{ベヘニン}} + \text{Area}_{\text{リグノセリン}})} \times 100$$

Area_x : x × 酸メチルのピーク面積

(12) ノイズ幅及びピーク高さの確認方法は、JIS K 0114 図11による。ただし、図の中で信号はピーク高さに読み替える。

試験用試料の調製

製品をよく振り混ぜて均質化し試料とする。

共同試験結果

- (1) 参加試験室数 : 8
- (2) マテリアル数 : 6
- (3) 濃度 : 51 ~ 86 %
- (4) 併行標準偏差 (S_p) : 0.03 ~ 0.35
- (5) 室間再現標準偏差 (S_R) : 0.42 ~ 0.73
- (6) 併行相対標準偏差 (RSD_p) : 0.05 ~ 0.49 %
- (7) 室間再現相対標準偏差 (RSD_R) : 0.81 ~ 1.03 %

※共同試験は従前の規格に従ったため、サフラワー油 (ハイオレイック) は以下の計算式

を用いた。

$$\begin{aligned} \text{脂肪酸に占める} & \\ \text{オレイン酸の割合 (\%)} & = \frac{\text{Area}_{\text{オレイン}} + \text{Area}_{\text{バクセン}}}{(\text{Area}_{\text{パルミチン}} + \text{Area}_{\text{ステアリン}} + \text{Area}_{\text{オレイン}} + \text{Area}_{\text{バクセン}} + \text{Area}_{\text{リノール}} \\ & \quad + \text{Area}_{\alpha\text{-リノレン}} + \text{Area}_{\text{アラキジン}} + \text{Area}_{\text{エイコセン}} + \text{Area}_{\text{ベヘニン}} + \text{Area}_{\text{エルシン}})} \times 100 \end{aligned}$$