

Gas Chromatography 에 의한 米糠油의 脂肪酸分析

鄭 泰 明

晉州農科大學

申 棕 銖

釜山稅關分析室

(1967年 12月 15日 受理)

Analysis of Fatty Acid in Rice Bran Oil by Gas Chromatography

T. M. Chung

Jinju Agricultural College

J. S. Shin

Section of Analysis, Pusan Custom-House

SUMMARY

Through an experiment with gas chromatography carried out using diethylene glycol succinate(DEGS) as the packing material of the column, we have obtained the correction factor between the weight ratio and the peak dimension of the saturated fatty acid methyl esters of C10, C12, C14, C16, and C18 and unsaturated fatty acid methyl esters of oleic acid, linoleic acid, and linolenic acid, employing the detector of thermal conductivity type.

Quantitative analysis of the fatty acids contained in rice Bran oil was performed with the above correction factor and the results are as follows;

1. Main components were found to be palmitic acid, oleic acid and linolenic acid. No traces of capric acid (C10) lauric acid (C12) were found.
2. It was confirmed that there were straight line relation between the logarithm retention time of each fatty acid and the number of carbon of saturated fatty acid or the number of double bond of other fatty acids having the same number of carbon.
3. The correction factor became larger as the number of carbon increased up to C18 in case of saturated fatty acids, and as for other fatty acids, and as for other fatty acids of the same carbon number, it became larger according as the number of double bond increased.

緒 言

脂肪酸 ester 의 Gas Chromatography 에 의한 分析은 이미 Cropper 와 Heywood,¹⁾ James 와 Martin²⁾ 等의 研究를 비롯해서 Beerthusis³⁾, Khan⁴⁾, Adlard⁵⁾ 等의 研究가 있지만 Lipsky⁶⁾ 및 Orr⁷⁾ 等은 固定液相으로서 Poly ester 系의 樹脂를 써서 飽和, 不飽和 Ester 의 分離에 처음으로 좋은 結果를 얻었다. 最近 Craig⁸⁾ 들은 Di-Ethylene Glycol Succinate 의 Polyester(DEGS)를 使用했으나 이 D EGS 는 分離能은 大端히 좋지만, 分子中에 Ester 結合이 存在하는 故로 熱에 對해서 不安定하며⁹⁾ 高溫에 있어서의 Column 의 壽命이 짧다고 한다. 이 點은 Ethylene Glycol, Butane diol 等의 琥珀酸 Poly ester 가 有利하다고 하지만⁸⁾ 이 들은 常溫에서 固體이며 合成할때는 取扱이 不便하고 分離能도 DEGS 에 比해서 떨어진다 고한다.

Gas chromatography 에 의한 脂肪酸 Ester 의 分析은 最近까지 飽和酸으로서는 C₃₀ 以上까지 行해지고 있지만 不飽和酸으로서는 事實上 Linolenic acid 까지 이며, 또 定量分析에 있어서 peak 面積을 補正하지 않고 (即 補正係數는 같다고 보고) 計算되는 수가 있었다. 이 點에 關해서는 Killheffer Jr.¹⁰⁾ 들이 C₆~C₁₄ 의 飽和酸 methyl 의 補正係數를 求하고 이들의 값이 各成分에 따라서 差異가 있다는 것을 提示하였다.

著者들은 前記 DEGS 를 Column 充填劑로서 쓰고 C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈ 의 飽和酸 및 C₁₈F, C₁₈F₂, C₁₈F₃ 의 不飽和酸 methyl ester 의 peak 面積補正係

數를 求하고 米精油의 成前 總脂肪酸를 鹼化, 分離, methyl 化하여 Gas Chromatography 로 定量分析한 結果를 報告한다.

實 驗

1. 使用機器 및 實驗條件

Gas chromatography; 日本島津社製 Model:GC-28
Detector: Thermal Conductivity Cell.

Column; Diethylene Glycol Succinate(DEGS)
10%

/Shimalite 60~80mesh, dia;3mm, /length 3m,

Carrier Gas; He

Flow rate; 30ml/min

Column & Detector Tem; 196°C

Bridge Current; 200mA

Sensitivity; 2mV

Chart Speed; 10m/mmin

試料注入量; Ether로서 2倍로 稀釋해서 1~2 μ l.

2. 標準 脂肪酸 Ester 의 調製

定量用 標準 脂肪酸 Ester 는 各各 다음과 같은 方法으로 調製하였다.

Methyl Caprate; SV=301.1 (301.2)^{*1}

// Laurate; SV=261.0 (261.3)

// Myristate; SV=231.2 (231.5)

// Palmitate; SV=207.5 (207.5)

// Stearate; SV=180.0 (180.0)

以上은 市販의 脂肪酸을 反復해서 分別結晶시키고 methylation 한後 減壓蒸溜를 되풀이해서 調製하였다.

Methyl Oleate; SV=189.0(189.2),

IV=85.47(85.60)^{*2}

// Linoleate; SV=190.8(190.5),

IV=172.0.0(172.4)

// Linolenate; SV=(191.9),

IV=260.0(260.3)

市販 一級試藥을 Methylation 한 後 減壓蒸溜로서 精製하였음.

※1 ()內는 理論值

※2 Wijs 法에 依함

3. Methyl Esterfication

Esterfication 은 脂肪酸의 Gas chromatography 分析이 前處理로서 有効한 手段이며 脂肪酸 그대로로서는 分析이 不可能한 高沸點 試料도 Esterfication 에 依해서 蒸氣壓을 低下시켜 分析을 容易케 할 수 있다.

Esterfication 法으로는 여러가지 方法이^{11,12)} 있으나

어떤 Esterfication 法이 가장 適合한가는 個個의 試料의 性質에 따라 다르다. Vorbeck¹³⁾ 등은 各種 Esterfication 을 써서 揮發性脂肪酸, 長鎖脂肪酸의 Esterfication 을 定量的으로 比較 檢計한바 있지만 本實驗에서는 試料油脂를 常法에 依해서 鹼化시켜 混合脂肪酸을 分離하고 Esterfication 試藥으로서 1% P-toluene Sulfo 酸-無水 Methanol 溶液¹¹⁾ 을 使用하였다.

試料米精油에서 分離調製된 混合脂肪酸 1g 을 50 ml 平底 Flash 에 取하고 前記 Esterfication 試藥 3 ml 를 加하여 Water bath 에서 1hr. 還流한後 內容物을 蒸溜水 10ml 와 함께 100ml 分液漏斗에 옮기고 若干의 Ether 로서 抽出한다. Ether 層을 蒸溜水 5ml 로서 2回 洗淨한後 Ether 溶液을 50ml Flask 에 옮기고 Water bath 에서 減壓으로 Ether 를 溜去, Methyl Ester 를 얻는다. 水分이 殘溜할 때는 少量의 acetone 을 加하고 減壓下에서 加熱하여 殘溜水分을 acetone 과 함께 除去한다.

4. 補正係數 決定

一般으로 Chromatogram 에 나타난 各成分이 peak 面積과 그 成分量과의 사이에는 比例關係가 成立한다. 이때문에 peak 面積에서 各成分이 定量이 可能한 것이다. 그러나 實際로는 注入하는 試料의 量을 恒常 正確하게 할 수 있다면 注入量과 peak 面積과의 關係에서 各成分의 定量이 可能하지만 注入試料量이 極히 微量이므로 正確을 期하기란 困難하다. 그러므로 分析코져하는 試料의 成分과 같은 脂肪酸 Ester 를 높은 純度로서 調製하고 이들의 一定量을 混合한 重量比와 이 混合된 標準脂肪酸의 Chromatogram 의 peak 面積比와의 比로서 補正係數를 決定하였다.

結果 및 考察

1. 標準脂肪酸 Methyl 의 Retention Time(Rt)

앞서 調製한 標準脂肪酸 Methyl Ester 에 對한 Rt 는 前記 機器條件에서 Table 1 과 같으며 log Rt 와 飽和脂肪酸의 炭素數, 또 log Rt 와 同一炭素數에 있어서의 二重結合數와의 關係를 나타낸 것이 Fig. 1 이다. Fig 1 의 結果가 直線을 나타낸다는 것은 여러 文獻에서^{14,15)} 이미 報告된 바와 같다.

8種의 標準脂肪酸 Methyl Ester 를 適當量 混合하여 各各의 Retention Time 를 알아보기 爲한 Chromatogram 이 Fig. 2 이다. (勿論 이것은 個個의 標準脂肪酸 Methyl 의 Retention Time 와 比較해서 그 成分이 確定지어 진다.

2. Peack 面積의 補正係數

混合된 標準脂肪酸 Methyl 의 Chromatogram 의

Table 1 : Retention Time of Methyl Ester of Standard fatty acids

Component	Carbon Number	Retention Time	log Rt
Caprate	10	1.9	0.28
Laurate	12	2.6	0.42
Myristate	14	3.7	0.57
Palmitate	16	5.6	0.75
Stearate	18	9.0	0.95
Oleate	18F ₁	10.3	1.01
Linoleate	18F ₂	12.5	1.10
Linolenate	18F ₃	16.2	1.21

Peak 面積比와 重量比와의 比를 求한것이 Table 2 이다. 이 補正係數를 써서 Chromatogram의 各成分面積(%)에서 重量(%)을 換算하여 定量하였다. 一般적으로 熱傳導型 檢出器로서는 脂肪酸 methyl는 다른 많은 物質들과 같이 Peak 面積比는 成分의 重

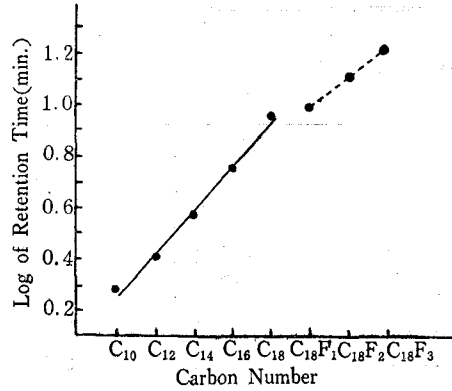


Fig. 1. Relation between log Rt and Carbon number of Fatty acid

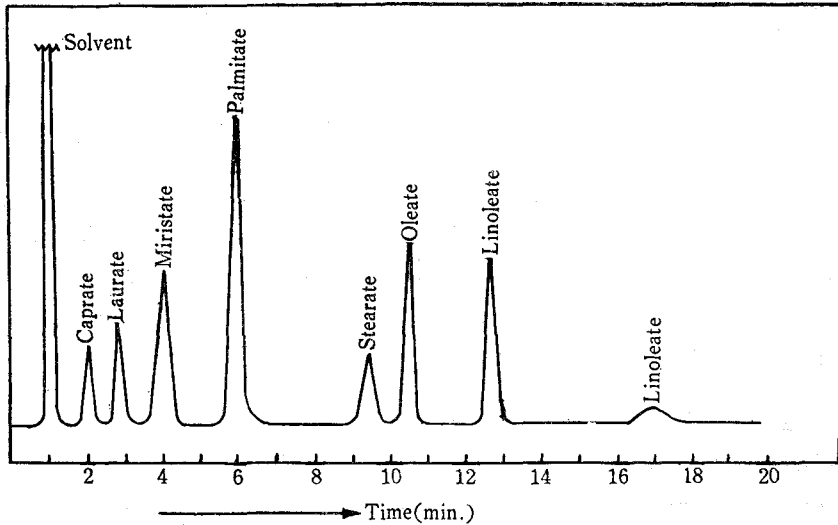


Fig. 2. Chromatogram of Methyl ester of Standard Fatty acids

量比와 大體로 같다. 即 補正係數 그것 自體에 大差없으며 特히 C₁₈~C₂₂의 飽和酸 Methyl의 그것은 1에 가까우므로¹⁵⁾ 普通 Peak 面積을 補正하지 않아도 無妨하다고 하나 低級酸에 있어서는 補正係數에 相當한 差가 있으므로¹⁵⁾ 역시 Peak 面積比는 補正해줄이 可하다고 하겠다.

Table 2에서 보는바와 같이 이 補正係數는 飽和酸에 있어서 C₁₈까지는 炭素數의 增加에 따라 커지고, 同一 炭素數에 있어서는 二重結合數가 增加함에 따라 커진다. 또 Messner¹⁶⁾는 同族體에 있어서는 이들 數值가 分子量에 對하여 直線의으로 變化한다고 하였는데 脂肪酸族에 있어서도 이 傾向을

認定할 수 있다.

3. 米糠油의 總脂肪酸 定量

II-3에서 Methyl Esterfication 한 米糠油 試料를 II-1의 實驗條件에서 Chromatography를 實施한 結果는 Table 3과 같으며 이때의 Chromatogram은 Fig. 3과 같다.

固定液相으로 쓰인 DEGS는 機器條件에 따라서 Stearate와 Oleate의 分離能이 不良하다고¹²⁾ 하지만 本 實驗에서는 別로 支障이 없었다.

要 約

1. 米糠油中の 含存脂肪酸은 Oleic acid, Linoleic

acid, palmitic acid의 順으로 含量이 많으며 以上 3種의 脂肪酸이 主成分을 이루고 있다. Stearic acid, myristic acid와 Linolenic acid는 極少量 含 有되어 있을 뿐이며 C₁₂ 以下の 酸은 그 痕跡이 보

Table 2 : The Correction Factors of Known Fatty Acids Methyl Ester (19)

脂肪酸 Methyl	例 : 1			例 : 2		
	Area(%)*	Weight (%)	Correction Factor	Area(%)*	Weight (%)	Correction Factor
Caprate C ₁₀	1.38	1.22	0.884	1.34	1.18	0.880
Laurate C ₁₂	2.33	2.12	0.906	1.84	1.67	0.908
Myristate C ₁₄	3.68	3.49	0.948	4.05	3.84	0.948
Palmitate C ₁₆	19.66	19.34	0.984	20.39	20.18	0.990
Stearate C ₁₈	7.26	7.24	0.997	6.69	6.66	0.996
Oleate C ₁₈ F ₁	31.67	31.99	1.010	30.59	30.88	1.009
Linoleate C ₁₈ F ₂	29.80	30.28	1.016	30.67	31.05	1.012
Linolenate C ₁₈ F ₃	4.23	4.32	1.021	4.43	4.54	1.025

※ 各各 4個의 chromatogram의 平均値임.
面積計算은 半值幅法에 依함.

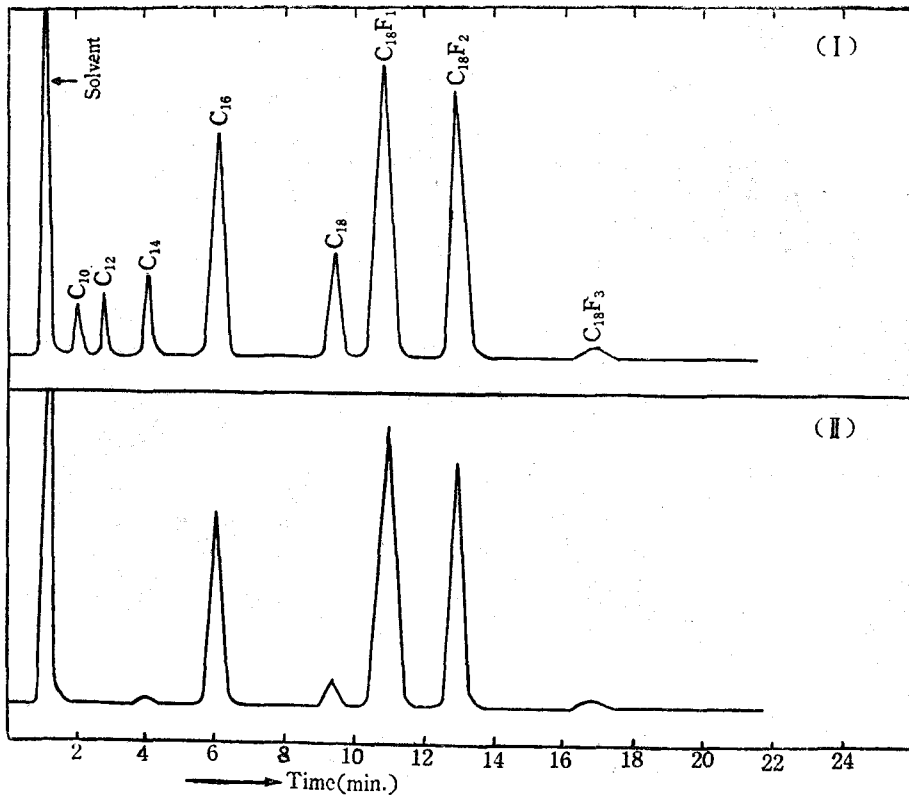


Fig. 3. Comparison of the Chromatogram of Standard Fatty acid methyl esters(I) and that of Total Fatty acid methyl esters in Rice Bran Oil. (II)

Table 3. Fatty Acid Methyl Ester of Rice Bran Oil

Methyl Ester	Area(%)	Correction Factor	Corrected Weight(%)
Myristate	0.45	0.948	0.43
palmitate	19.92	0.990	19.60
Stearate	1.16	0.996	1.15
Oleate	40.72	1.009	40.84
Linoleate	37.13	1.012	37.35
Linolenate	0.62	1.025	0.63

이지 않았다.

2. 標準 脂肪酸 Methyl 로서 求한 補正係數는 飽和脂肪酸에 있어서 C₁₈ 까지는 炭素數가 增加함에 따라 커지고 또 同一炭素數의 脂肪酸에 있어서는 二重結合의 數에 따라 커지고 있다.

3. 脂肪酸 Methyl Ester 의 Retention time 의 對數值는 飽和酸의 炭素數, 또는 같은 炭素數의 脂肪酸에 있어서 그 二重結合의 數와의 사이에 直線關係가 있다는 것을 確認했다.

參考文獻

1. F.R. Cropper, A. Heywood, Nature **172** 1101 (1953).
2. A.T. James, A.J.P. Martin, Biochem. J. **63**, 144(1956)
3. R.K. Beerthusis, J.C. Keppler, Nature **179**, 731(1957)
4. M.A. Khan, B.T. Whitham, J. Appl. Chem. **8**, 549(1958)
5. E.R. Adlard, B.T. Whitham, "Gas Chromatography" p. 351(1958); D.H. Desty, Ed, London,

Butterworths Scientific publications.

6. S.R. Lipsky, Chem. Eng. News **36**, No.5, 48(1958)
7. C.H. Orr, J.E. Callen. J. Am. chem. Soc. **80**, 249(1958)
8. B.M. Craig, N.L. Murthy, J. Am. Oil Chem. Soc. **36**, 549(1959)
9. H.A. Pohl, J. Am. Chem. Soc. **73**, 5,660(1951)
10. J.V. Killheffer Jr., E. Jungermann, J. Am. Oil Chem. Soc. **37**, 456(1960)
11. 臼井, 吉富; 油化學(日本) **11**, 551(1962)
12. 成, 金, 崔; 國立工業研究所報告, 第12輯(2), 44(1962)
13. M.L. Vorbeck, L.R. Mattick, Anal. Chem., **33**, 1512(1961)
14. 森田, 東谷; 分析化學(日本) **11**, 282(1962)
15. 伊東, 福住; 工化, **65**, 1963(1962)
16. A.E Messner, D.M. Rosie; Anal. Chem., **31**, 239(1959)