

# 大豆子実中油脂の迅速定量法

誌名	北海道農業試験場彙報
ISSN	00183415
著者名	新田,一彦
発行元	北海道農業試験場
巻/号	71号
掲載ページ	p. 109-113
発行年月	1956年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



# 大豆子実中油脂の迅速定量法

新田 一彦\*

## RAPID METHOD FOR THE DETERMINATION OF OILS IN SOYBEAN SEEDS

By Kazuhiko NITTA

### 緒 言

大豆子実中の油脂を定量するには一般にエーテルによる抽出法を用いるが、この方法は分析に数日を要するので多数の育種系統を取扱う場合とかこれに類した多数の材料の脂肪含量を調べる場合には非能率的である。1948年 VAN DE KAMER 等は鹼化法を用いて糞中の脂肪を極めて短時間に定量する研究を行つたが、最近福場等は食品中の脂肪の定量に VAN DE KAMER 等の方法を殆どその儘応用出来ることを発表した。著者は脂肪含量既知の大豆子実を用い VAN DE KAMER 等の方法を大豆の脂肪定量に適用することの可否について検討した結果、得られる値は常に既知の値よりも低く（成績第2表参照）、誤差も大きく、大豆に応用するにはこの定量法に若干の改良又は補正を加えねばならぬことを知つた。即ちこの方法に於ける第一の欠陥は鹼化後遊離した脂肪酸を完全に捕獲することが出来ないため、実験値は真の値よりも幾分低く、従つて計算に際して1.04を乗じて値を補正している点である。大豆の如く脂肪量が多い場合には当然伴う誤差も大きく、これを小さくするには、遊離した脂肪酸を出来る限り完全に捕獲出来るように工夫しなければならない。又計算に用いる脂肪の平均分子量は、やはり試料によつて異なるべきで一率に284を用いるということは理論的にも無理があり、従つて大豆に於ても大豆油の平均分子量を求めて用いなければならないと考える。以上の2点に関してその改良に成功したのでここに報告する。

### 実験の部

\* 作物部作物第3研究室

1. 試薬 96% Ethyl alcohol  
33% KOH  
25% HCl  
Petroleum ether b.p. 40~60°C  
N/20 NaOH  
1% Thymol blue

### 2. 定量法

A. 操作 粉碎試料の一定量（2g）を200mlのエーレンマイヤーフラスコに秤取した後、96%エチルアルコール40ml及び33%KOH10mlを加え、逆流冷却器を付けて30分間加熱沸騰させて脂肪を鹼化する。鹼化後50mlの蒸溜水を加え、暫時放冷後25%HCl15mlを徐々に加え脂肪酸を遊離させる。この酸性液を再び冷却し50mlの石油エーテルを正確に加え、フラスコをゴム栓で密閉してから約1分間激しく振盪し、遊離脂肪酸を石油エーテル層に移行させる。静置して完全に石油エーテル層を分離した後この石油エーテル層から一定量（10ml）をピペットで採り、100mlのビーカーに入れる。次に濾紙片を加えて突沸に注意しながらエーテルを徐々に蒸発せしめる。蒸発後残渣に中性エチルアルコール約10mlを加え、Thymol blueを指示薬としてN/20NaOHで滴定する。

B. 計算 大豆油脂の平均分子量を292とし、次のような計算式によつて計算する。

$$\text{大豆の脂肪含有率(\%)} = \frac{T \times 292 \times 5 \times 100}{2 \times W \times 10,000} = \frac{T}{W} \times 7.3$$

T: 滴定に要したN/20NaOHの容積(ml)

W: 分析に用いた試料の重量(g)

### 3. エーテル抽出法との比較

大豆16品種を用い上記の方法に従つて脂肪の定量を行つたが、その値をエーテル抽出法に拠る

値と比較すれば次のとおりである(第1表)。

第1表 大豆子実の脂肪定量値に関するエーテル抽出法と鹼化法との比較

Table 1 Comparison of oil contents in soybean seeds by extraction method and saponification method.

品 種	脂 肪 含 量 %		B/A · 100
	エーテル抽出法(A)	鹼化法(B)	
克 霜	21.26	21.28	100.1
国 育 44	20.74	20.75	100.0
中 生 光 黒	19.39	19.31	99.6
秋 田 大 豆	19.06	19.14	100.4
リンカーン	19.06	19.14	100.4
小金黄1号	18.14	18.24	100.6
十勝長葉	17.83	17.89	100.0
大谷地2号	17.84	17.89	100.3
黄 宝 珠	17.42	17.35	99.6
丸 小 粒	17.19	17.16	99.8
北見長葉	16.98	16.99	100.0
早生黒千石	16.80	15.56	92.6
混保系大豆	16.18	16.17	99.9
銀 大 豆	16.05	16.27	101.4
中 生 裸	15.46	15.56	100.6
茶 小 粒	13.73	13.77	100.2

第1表に於てエーテル抽出法による定量値と鹼化法の定量値(「早生黒千石」を除き)とは極めて近似しており、大豆の脂肪定量に際し前記の定量法を以つて充分にエーテル抽出法に代用出来ることを示している。「早生黒千石」のみエーテル抽出法の値と鹼化法による値の差が大きいが、これは「早生黒千石」は緑色大豆であり葉緑素含量が高く、エーテル抽出法ではその葉緑素がエーテル浸出物中に混入するためであつて、定量値はむしろ鹼化法の方が正しい値を示しているものと思う。

次に上記の定量法に於て VAN DE KAMER 或いは福場等の用いた方法を改良した点について述べよう。

吟 味

1. 鹼化後の蒸溜水の添加

既述の定量操作に於て鹼化後 50 ml の蒸溜水を添加し暫時放冷後 25% HCl を加えるが、一方 VAN DE KAMER 等の方法に於ては鹼化放冷後直ちに 25% HCl を添加している。この鹼化後 50

ml の蒸溜水を添加するという操作が、如何に重要であるかは次の実験結果がこれを証明している。即ち前述の定量操作に於て鹼化後に加える蒸溜水の量を 0 ml から 60 ml まで7段階に分けた場合、各処理の定量値に及ぼす影響は第2表の如くである(計算は前述の方法に拠つた)。

第2表 鹼化後添加する蒸溜水の量の脂肪定量値に及ぼす影響

Table 2 Effect of distilled water added after saponification on values of oil contents in soybean seeds.

添加した蒸溜水量 ml	定 量 値 ( 脂 肪 含 量 ) %		
	大谷地2号	北見長葉	小金黄1号
0 (福場氏法)	14.49	13.06	16.10
10	16.28	15.20	16.45
20	17.35	16.45	17.17
30	17.53	16.63	17.89
40	17.71	16.81	18.06
50 (改良法)	17.89	16.99	18.24
60	17.89 (17.84)	16.99 (16.98)	18.24 (18.14)

括弧内の数字はエーテル抽出法による 定量値を示す。

第2表に於て鹼化後添加する蒸溜水の量が増すにつれ定量値は次第に増大し 50 ml 添加後は値が一定となつている。鹼化後添加する蒸溜水量の増大と共に定量値が大きくなるのは、一般に脂肪酸はアルコールにも石油エーテルにも溶解する性質を持つているが、蒸溜水の添加によつてアルコールの濃度が小さくなれば HCl の添加によつて遊離した脂肪酸のアルコール層への溶解度も小となり、石油エーテル層へ移行する量がそれだけ増大するためと考えられる。

このようにアルコール層のアルコールの濃度は石油エーテル層に移行する脂肪酸の量を支配すると考えられるので、この点を更に吟味するため、大豆油を構成している重要な 2, 3 の脂肪酸を使用し、脂肪酸のアルコール層と石油エーテル層への分配の様相についてアルコールの濃度を種々に変えて試験を行つた。即ち 200 ml のエルレンマイヤーフラスコに一定量の脂肪酸をとり、これを 50 ml の種々の濃度のアルコールに溶解させ、石油エーテル 50 ml を添加し、フラスコを密栓して激しく振盪し静置後石油エーテル層から一定量をビーカーに採取し、エーテル蒸発後 Thymol blue

を指示薬として  $N/20$  NaOH で滴定しその結果から石油エーテル層に移行した脂肪酸の量を算定した(第3表)。

第3表 アルコールの濃度の石油エーテル中に移行する脂肪酸の量に及ぼす影響

Table 3 Effect of concentration of alcohol on the amount of fatty acids translocating into ether layer.

アルコール濃度 %	石油エーテル中に移行する脂肪酸の量 (g)		
	Linoleic acid	Oleic acid	Palmitic acid
80	0.134	0.122	0.156
70	0.170	0.150	0.180
60	0.182	0.157	0.186
50	0.190	0.162	0.190
40	0.197	0.168	0.190
30	0.199 (0.202)	0.171 (0.173)	0.190 (0.190)

括弧内の数字は三角フラスコに採取した各脂肪酸の既知量を示す。

第3表に於てアルコールの濃度が小さくなるにつれ石油エーテル層に移行する脂肪酸の量が次第に多くなり、アルコールの濃度が40%以下になればアルコール層中に残存する脂肪酸が極めて少なくなり、脂肪酸はほぼ完全に石油エーテル層に移行することがわかる。前述の定量操作に於て鹼化後50mlの蒸溜水を添加し、放冷後更に25% HCl 15mlを加えるがこの時のアルコール層のアルコールの濃度は大体30%強に相当している。

## 2. 脂肪の平均分子量

一般に大豆油を構成している脂肪酸は不飽和酸がその大半を占めるが、従来の分析結果を総合してその含有割合を Linoleic acid 50%, Oleic acid 30%, Palmitic acid 8%, Linolenic acid 7%, Stearic acid 5% として計算し、脂肪酸の平均分子量を279と定め、大豆の脂肪の平均分子量として292を採用した。福場等は脂肪を構成している脂肪酸の分子量としてVAN DE KAMER等と同様に284 (Stearic acidの分子量に相当する)を用い、これを大豆その他の食品の鹼化法による脂肪定量に適用しているが、既述の如く脂肪酸の平均分子量は試料によつて異なるのが当然であり、しかも計算に際してはこれを脂肪の分子量に換算しなければならない。両計算式を比較すると次のとおりである。

福場氏の用いた計算式

$$\text{大豆の脂肪含有率, \%} = \frac{T \times 284 \times A \times 1.04 \times 100}{W \times a \times 10,000}$$

改良法による計算式

$$\text{大豆の脂肪含有率, \%} = \frac{T \times 292 \times A \times 100}{W \times a \times 10,000}$$

T: 滴定に要した  $N/10$  NaOH の ml 数

W: 分析に用いた大豆の g 数

A: 添加した石油エーテルの ml 数

a: ビーカーに採取した石油エーテルの ml 数

福場等の計算式に於ける係数1.04はアルコール層に溶解残存する脂肪酸量等に関する係数であるが、かかる係数は材料の種類とか個人によつて変動するおそれがある。

## 考察及び結論

既述の如く、VAN DE KAMER 等によつて提唱された鹼化法による油の迅速定量法を、大豆に適合するように若干改良を加えたが、操作上改良した主要な点は、試料を鹼化した後50mlの蒸溜水を添加するという点である。50mlの蒸溜水を加える意味は前述のとおりであるが、仮にVAN DE KAMER 等の方法をそのまま大豆の脂肪定量に適用した場合、定量値は多少低くあらわれるが、もしその値に変動がないとすれば最後に適当な係数を乗じて値を補正すれば結果的には何等不満はないことになる。しかしながら添加するアルコール或いは苛性カリ或いは塩酸の量の僅かな変動或いは鹼化中のアルコールの損失量の多少、その他の原因によつてアルコールの濃度は分析の都度多少変動すると考えねばならない。即ちこの場合アルコールの濃度は60%を前後することとなり、かかる高濃度に於ては第2表及び第3表の成績の示す如く、遊離脂肪酸の石油エーテル層とアルコール層への分配率も多少変動し滴定値に誤差を生ずるのである。しかるに鹼化後50mlの蒸溜水を添加すれば塩酸添加後アルコールの濃度は約30%となる。アルコールの濃度が30%前後まで薄められれば、遊離脂肪酸は殆どアルコール層に溶解せず従つて滴定値には影響がないのである。

計算式に於て脂肪の平均分子量として一応292を採用したが、これは厳密には大豆の種類によつ

て異なるものと思う。特に比較的分子量の小さい Palmitic acid の含量の多少は、脂肪の平均分子量に影響を及ぼすから材料によつては脂肪の平均分子量を 293 或いは 291 とした方がより良い場合もあろう。しかし第 1 表に掲げた品種は、その特性が色々異なるにもかかわらず鹼化法の値とエーテル抽出法による値が極めて近似しており、大豆油の構成脂肪酸の含有割合は少なくとも品種によつて大差はないものと考えられる。

滴定の際に用いる NaOH の濃度は福場等の場合は  $N/5$  であるがこれは誤差が大きくなると思われるので  $N/20$  とした。

分析に要する時間は、石油エーテルの膨脹係数が比較的大きいため温度の変化による誤差を防ぐ意味で、定量操作に於ける溶液の冷却時間に余裕をとれば全操作を完了するのに 60~90 分を要するであろう。

以上の如く VAN DE KAMER 等が糞に用いた鹼化法による迅速脂肪定量法を若干改良して、大豆子実中の脂肪の定量に応用した結果、鹼化法を以て十分にエーテル抽出法に代用出来ることが明かとなつた。従つて今後は従来エーテル抽出法により数日を要した脂肪の分析も極めて短時間にこれを行うことが出来ることは色々な意味に於て有利であると思う。

### 参考文献

- 1) 福場博保・山沢伸江・稲垣長典 (1954): 食品中の脂肪簡易定量法, 日・農・化, 28, 59~62.
- 2) VAN DE KAMER, J. H. TEN BOKKEL, H. and WEYERS, H. A. (1948): Rapid method for the determination of fat in feces. J. Biol. Chem., 177, 347~355.
- 3) GEPHAT, F. C. and CSONKA, F. A. (1914): On the estimation of fat in feces. J. Biol. Chem., 19, 521~531.
- 4) SAXON, G. J. (1914): A method for the determination of the total fats of undried feces and other moist masses. J. Biol. Chem., 17, 99~102.
- 5) FOLIN, O. and WENTWORTH, A. H. (1909): A new method for the determination of fat and fatty acids in feces. J. Biol. Chem., 7, 421~426.

### Résumé

In breeding soybean for high oil contents, a large number of oil determinations are required.

The ether extraction method hitherto used for such determinations is too time-consuming to be practical.

Recently, however FUKUBA et al.<sup>1)</sup> reported the rapid saponification method for oil estimation of soybean seeds, modifying the method of VAN DE KAMER<sup>2)</sup>. Their method is based on the principle that the fatty acids derived from the neutral oils can be extracted almost quantitatively with petroleum ether from an acidic alcoholic solution of about 60 per cent ethanol. But from the results of retrieval to ascertain if their method might give correct results for estimation of oil contents of soybean seeds, the writer found that the results were always different from those obtained by extraction method, because of imperfect extraction of fatty acids and unsuitable calculation formula to represent the oil content of soybean seeds.

Applying the principles published by VAN DE KAMER and others, the author proposes some modifications of the saponification method and succeeded in establishing an accurate and rapid method for determination of oil contents in soybean seeds. The procedure is as follows:

About 2 gm of pulverized soybean seeds are weighed in a 200 ml Erlenmeyer flask. After adding 40 ml. of 96% ethanol and 10 ml. of 33% KOH, the mixture is boiled for 30 minutes under reflux condenser, and then 50 ml. of distilled water is added to reduce the concentration of ethanol in the solution, after that the mixture is cooled. Fifteen ml. of 25% HCl are added, and then cooled again. Exactly 50 ml. of petroleum ether are added and the flask is stoppered with a rubber stopper and shaken strongly for 1 minute. After complete

separation, 10 ml. of the petroleum ether layer are transferred into 100 ml. beaker by using a pressure pipette. After adding a piece of filter paper, the petroleum ether is evaporated and 10 ml. of neutral ethanol are added. The fatty acids are titrated with 0.05 N NaOH from a microburette, using thymol blue as indicator, until the yellow color changes to green. The calculation is carried out according to VAN DE KAMER, assuming that the fatty acid contents of soybean oils are 50 % linoleic,

30 % oleic, 8 % palmitic, 7 % linolenic, 5 % stearic acids, and the average molecular weight of soybean oils is 292. When T is the volume of 0.1 N NaOH used for the titration and W is the gms. of soybean seeds, the oil contents can be calculated by the following formula.

$$\frac{T \times 292 \times 5 \times 100}{W \times 10,000} = \text{neutral oil in gm. per 100 gm. of soybean seeds.}$$

By the method described above the oil contents in soybean seeds can be determined within 60 to 90 minutes.