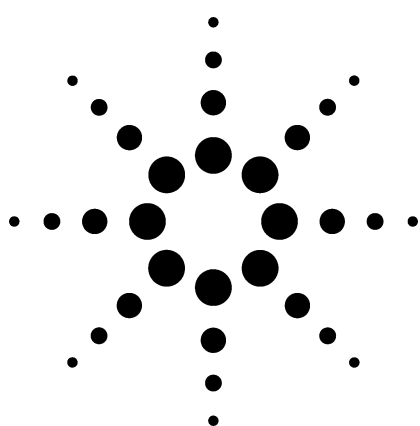


脂肪酸メチルエステル分析に使用する カラムの選択 アプリケーション



食品分析

著者

Frank David
Research Institute for Chromatography
President Kennedy Park 20
B-8500 Kortrijk,
Belgium

Pat Sandra
University of Gent
Krijgslaan 281 S4,
B-9000 Gent
Belgium

Allen K. Vickers
Agilent Technologies, Inc.
91 Blue Ravine Road
Folsom, CA 95630-4714
USA

要旨

食品から誘導体化した脂肪酸メチルエステル (FAME) の分析は、食品の特性評価として非常に重要な手順です。このエステルは通常、ポリエチレングリコールやシアノプロピルシリコンなどの極性固定相でコーティングしたカラムで分析し、炭素数、不飽和度、*cis-trans* 構造、および二重結合の位置に応じた脂肪酸の分離が可能です。

このアプリケーションノートでは、FAME の分離について 3 種類の固定相を比較します。ポリエチレングリコールのカラムを使用した場合、あまり複雑でないサンプルでは良好に分離されましたが、*cis-trans* 異性体は分離されませんでした。中極性のシアノプロピルカラム (DB23) では、複雑な FAME 混合物が非常に良好に分離され、*cis-trans* 異性体もある程度分離できました。*cis-trans* のより詳細な分離については、極性の高いシアノプロピルカラム HP-88 が適しています。

はじめに

脂肪酸メチルエステル (FAME) の分析は、食品中の脂質成分を特性評価する際に用いられ、最も重要な食品分析の 1 つとなっています。脂質は主に、グリセリン 1 分子と脂肪酸 3 分子のエステルで構成されるトリグリセリドです。食品用の油脂は主に、ラウリン酸 (ドデカン酸) からアラキジン酸 (エイコサン酸) までの範囲の脂肪酸が含まれます。直鎖飽和脂肪酸の他にも、分岐脂肪酸、モノ不飽和脂肪酸、ジ不飽和脂肪酸、高度不飽和脂肪酸があります。その中でも最も重要な脂肪酸とその略名を表 1 に示します。



Agilent Technologies

表 1 脂肪酸の慣用名と略号

脂肪酸	慣用名	略号
ブタン酸	酪酸	C4:0
デカン酸	カブロン酸	C10:0
ドデカン酸	ラウリン酸	C12:0
テトラデカン酸	ミリスチン酸	C14:0
ヘキサデカン酸	パルミチン酸	C16:0
ヘキサデセン酸	パルミトレイン酸	C16:1
オクタデカン酸	ステアリン酸	C18:0
<i>cis</i> -9-オクタデセン酸	オレイン酸	C18:1- <i>cis</i> (n9)
<i>trans</i> -9-オクタデセン酸	エライジン酸	C18:1- <i>trans</i> (n9)
<i>cis</i> -9,12-オクタデカジエン酸すべて	リノール酸	C18:2 - <i>cis</i> (n6)
<i>trans</i> -9,12-オクタデカジエン酸すべて	リノールエライジン酸	C18:2 - <i>trans</i> (n6)
<i>cis</i> -9,12,15-オクタデカトリエン酸すべて	α -リノレン酸	C18:3 (n3)
<i>cis</i> -6,9,12-オクタデカトリエン酸すべて	γ -リノレン酸	C18:3 (n6)
エイコサン酸	アラキジン酸	C20:0
<i>cis</i> -11-エイコセン酸		C20:1 (n9)
<i>cis</i> -11,14-エイコサジエン酸すべて		C20:2 (n6)
<i>cis</i> -11,14,17-エイコサトリエン酸		C20:3 (n3)
<i>cis</i> -8,11,14-エイコサトリエン酸	ジホモ- γ -リノレン酸	C20:3 (n6)
<i>cis</i> -5,8,11,14-エイコサテトラエン酸	アラキドン酸	C20:4 (n6)
<i>cis</i> -5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸すべて	EPA	C20:5 (n3)
ドコサン酸	ベヘン酸	C22:0
<i>cis</i> -13-ドコセン酸	エルカ酸	C22:1 (n9)
<i>cis</i> -7,10,13,16-ドコサテトラエン酸		C22:4 (n6)
<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸すべて	DHA	C22:6 (n3)
テトラコサン酸	リグノセリン酸	C24:0
<i>cis</i> -15-テトラコセン酸	ネルボン酸	C24:1 (n9)

脂質成分を特性評価するには、トリグリセリドをグリセリンと遊離脂肪酸に加水分解 (鹼化) します。こうした遊離脂肪酸の分析は HP-FFAP などの極性固定相カラムに直接注入しても分析できますが、より安定した再現性の良いクロマトグラフデータを得るには、遊離脂肪酸をメチルエステルに誘導体化します。加水分解やメチル化の過程を含む誘導体化には、さまざまなメソッドがあります [1]。こうしたメソッドは簡易に使用でき、高価な試薬や装置を必要としません。一般的な試料調製メソッドは、試料調製のセクションで説明します。

FAME に誘導体化すると、それらは炭素数 (メチルエステル炭素を除いた脂肪酸鎖内の炭素原子数) と不飽和度に応じて分離されます。さらに、二重結合の位置と幾何構造 (*cis/trans*) も重要なパラメータで、これらの測定は、食品に含まれる脂質成分の特性を評価する上でのより詳細な情報となります。

このアプリケーションノートでは、FAME の分離について 3 種類の固定相を比較します。最初のメソッドは、ポリエチレングリコールカラム DB-Wax で、C4 (酪酸) から C24 (リグノセリン酸) までの FAME を炭素数と不飽和度に応じて分離できます。このカラムでは、*cis*- と *trans*- 異性体の分離はできません。魚油などの複雑な混合物の場合、一部の FAME の分離が困難です。しかし、ポリエチレングリコールカラムで FAME を分離する方法は広く使用されており、穀物、トウモロコシ、オリーブ、大豆から得られた植物油などといった“古典的な”サンプルの特性評価に用いられています。さらには、動物油の分析も可能です。乳脂肪では、酪酸の分析が重要なアプリケーションの 1 つとなっています。乳中の酪酸濃度は、乳の質を示す重要な指標の 1 つであるため、乳の分析は牛乳、乳製品、チョコレート製品にとって非常に重要です。

魚油などの複雑なサンプルの分析では FAME をさらに詳細に分離することが必要で、これを行うには、DB-23 などのシアノプロピル固定相でコーティングしたキャピラリーカラムを使用します。このカラムでは、*cis*-5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸メチルエステル (EPA、C20:5 ω 3) および *cis*-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸メチルエステル (DHA、C22:6 ω 3) などの高度不飽和脂肪酸がすべて、他の FAME から分離されます。この分析は、近年関心の高いオメガ-3 脂肪酸測定フレームワークとして非常に重要です。シアノプロピルカラムでは、*cis*- と *trans*- 異性体の分離も可能です。シアノプロピルカラムでは、*cis*- 異性体のシアノ双極子との相互作用が強力であるため、*trans*- 異性体は *cis*- 異性体よりも前に溶出します。この方法によって *trans*- 脂肪酸の分離も不可能ではありませんが、この固定相の極性は、複雑な *cis-trans* 混合物を完全に分離するには不十分です。

trans- 脂肪酸が比較的少量に含まれている複雑な FAME 混合物を分離するには、高極性カラム HP-88 が適しています。この高極性カラムでは、*cis*- 異性体と *trans*- 異性体との良好な分離ができますが、一部の高分子量脂肪酸では分離が困難となります。

カラムの概要とそれらカラムのアプリケーションデータを図 1 にまとめました。

実験

サンプル

FAME のリファレンス標準品は、溶液または原体としてさまざまな入手源から得られます。分析用の標準品は一般的に、0.01%~0.1% (w/v) の濃度でヘキサンに溶解されています。

カラムの検証には、37 成分の標準品混合液 (Supelco #18919) を使用しました。この混合液は 100 mg の原体混合物で、C4~C24 の FAME (相対濃度 2%~4%) が含有されています。サンプル全体を 10 mL ヘキサンで希釈し、使用前の最終濃度を FAME あたり 0.2~0.4 mg/mL にしました。油脂サンプルの調製は、さまざまなメソッドにより行うことができます [1-5]。

試料調製メソッド [5]

20 mL 試験管 (ネジ蓋付き) または反応バイアルで、100 mg のサンプルを量ります。このサンプルを 10 mL ヘキサンに溶かします。2 N 水酸化カリウムのメタノール溶液 (100 mL 中に 11.2 g) 100 μ L を加えます。試験管またはバイアルに蓋をして、遠心分離器で 30 秒間遠心分離します。上澄液を 2 mL のオートサンプリングバイアルに移します。

分析条件

この分析は、水素炎イオン化検出器 (FID) 付きの Agilent 6890 GC で行いました。自動スプリット注入には、Agilent 7683 オートサンプラを用いました。表 2 には DB-Wax カラム、表 3 には DB-23 カラム、表 4 には HP-88 カラムでの装置構成と分析条件をまとめました。

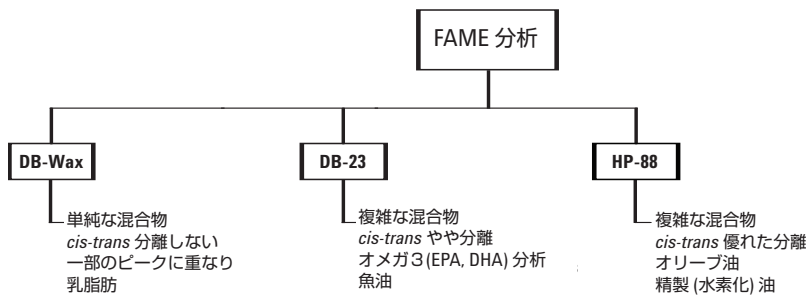


図 1 脂肪酸メチルエステル (FAME) を分析するカラム選択の概要

表2 メソッド1 (DB-Wax)

装置	
クロマトグラフシステム	Agilent 6890 GC
注入口	スプリット/スプリットレス
検出器	FID または Agilent 5973 MSD
オートサンブラ	Agilent 7683
ライナ	スプリットライナ (p/n 5183-4647)
カラム	30 m×0.25 mm 内径、0.25 µm DB-Wax (J&W 122-7032)
GC-FID の実験条件	
注入口温度	250 °C
注入量	1 µL
スプリット比	1/50
キャリアガス	水素
ヘッド圧	定圧力 53 kPa (50 °C で 36 cm/s)
オープン温度	50 °C、1分、200 °C まで 25 °C/min、230 °C まで 3 °C/min、18分
検出器温度	280 °C
検出器ガス	水素：40 mL/min、空気：450 mL/min、ヘリウムメークアップガス：30 mL/min

表3 メソッド2 (DB-23)

装置	
クロマトグラフシステム	Agilent 6890 GC
注入口	スプリット/スプリットレス
検出器	FID または Agilent 5973 MSD
オートサンブラ	Agilent 7683
ライナ	スプリットライナ (p/n 5183-4647)
カラム	60 m×0.25 mm 内径、0.15 µm DB-23 (J&W 122-2361)
GC-FID の実験条件	
注入口温度	250 °C
注入量	1 µL
スプリット比	1/50
キャリアガス	ヘリウム
ヘッド圧	定圧力 230 kPa (50 °C で 33 cm/s)
オープン温度	50 °C、1分、175 °C まで 25 °C/min、230 °C まで 4 °C/min、5分
検出器温度	280 °C
検出器ガス	水素：40 mL/min、空気：450 mL/min、ヘリウムメークアップガス：30 mL/min

表4 メソッド3A および 3B (HP-88)

装置	
クロマトグラフシステム	Agilent 6890 GC
注入口	スプリット/スプリットレス
検出器	FID または Agilent 5973 MSD
オートサンブラ	Agilent 7683
ライナ	スプリットライナ (p/n 5183-4647)
カラム A	100 m×0.25 mm 内径、0.2 µm HP-88 (J&W 112-88A7)
カラム B	60 m×0.25 mm 内径、0.2 µm HP-88 (J&W 122-8867)
GC-FID の実験条件	
注入口温度	250 °C
注入量	1 µL
スプリット比	1/50
キャリアガス A	水素
キャリアガス B	ヘリウム
ヘッド圧	定流量 2 mL/min
オープン温度 A	120 °C、1分、175 °C まで 10 °C/min、10分、210 °C まで 5 °C/min、5分
オープン温度 B	175 °C、10分、3 °C/min、220 °C、5分
検出器温度	280 °C
検出器ガス	水素：40 mL/min、空気：450 mL/min、ヘリウムメークアップガス：30 mL/min

結果

37 成分の FAME リファレンス標準試料を DB-Wax カラムによって分析して得られる代表的なクロマトグラム結果を、図 2 に示します。

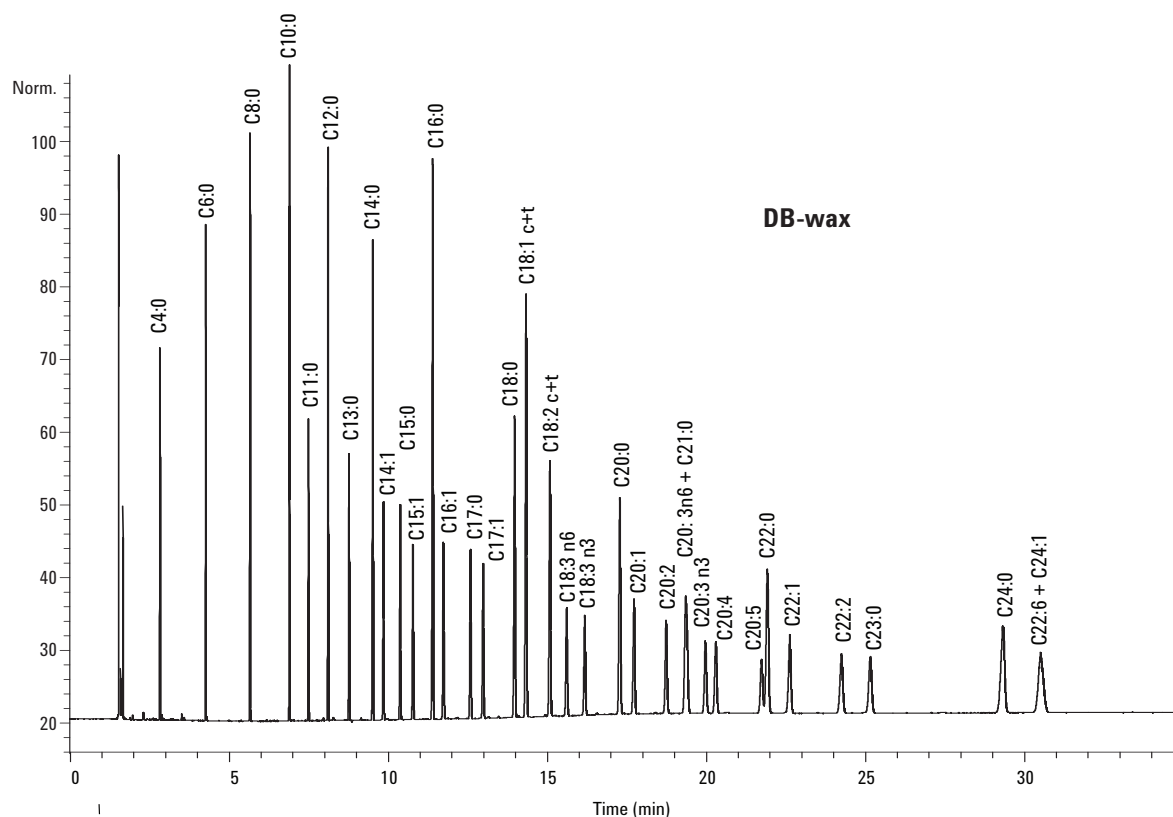


図 2 37 成分 FAME 標準品混合試料の GC-FID 分析。30 m×0.25 mm 内径、0.25 μm の DB-Wax カラムを使用し、条件はメソッド 1 (表 2 参照) による。

分離はおおむね良好ですが、以下の脂肪酸はうまく分離されていません。14.38 min では *cis*- および *trans*- の C18:1 が共溶出し、15.13 min では *cis*- および *trans*- の C18:2 が共溶出し、19.44 min では C20:3 n6 と C21:0 が共溶出し、30.73 min では C22:6 と C24:1 が共溶出しています。それでもこの分離結果は、油脂を特性評価する古典的なメソッドとして十分な結果です。酪酸は 4.28 min で溶出し、このメソッドで乳脂肪を測定することが可能です。その結果を図 3 に示します。これは、検定済み乳脂肪リファレンスサンプル (CRM 164、[6]) の分析結果です。

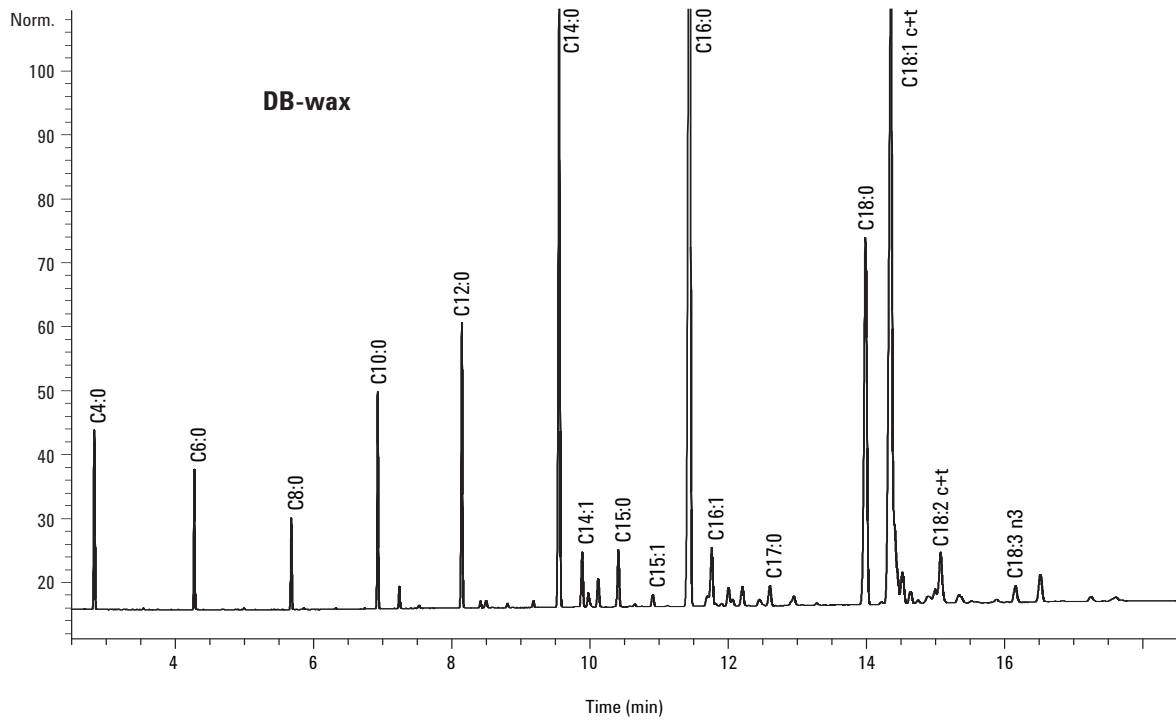


図3 乳脂肪 (CRM 164) 脂肪酸の GC-FID 分析。30 m×0.25 mm 内径、0.25 μm の DB-Wax カラムを使用し、条件はメソッド 1 (表 2) による。

60 m×0.25 mm 内径、0.15 μm の DB-23 カラムで 37 成分を含む FAME 標準品混合試料を分離した結果を、図 4 に示します。

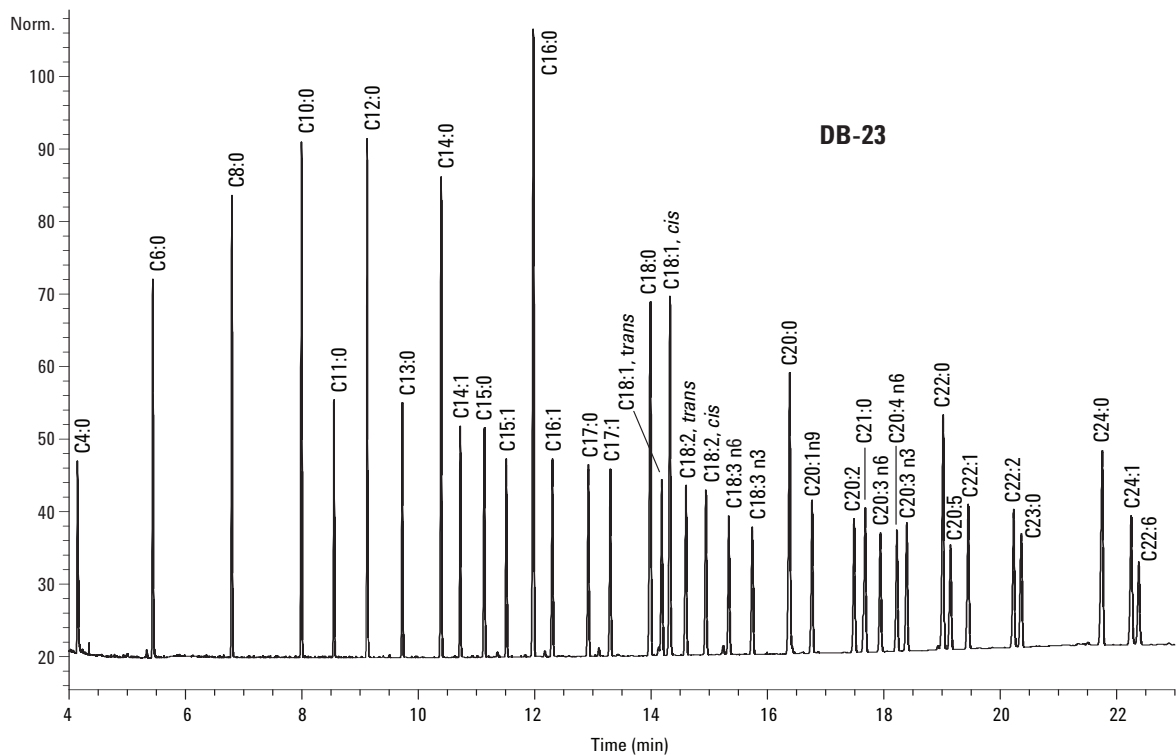


図4 FAME 標準的混合試料の GC-FID 分析。60 m×0.25 mm 内径、0.15 μm の DB-23 カラムを使用し、条件はメソッド 2 (表 3) による。

これらの条件では、標準品混合試料に含まれるすべての成分が十分に分離されています。重要な点は、*cis/trans* 異性体の分離、および EPA (19.15 min) 成分と DHA (22.38 min) 成分の分離です。このメソッドは、複雑な混合物に含まれる脂肪酸を分析する際に非常に有用で、特に EPA や DHA などのオメガ-3 脂肪酸の測定に有用です。海洋生物から得た多価不飽和脂肪酸混合物を分離した例を図 5 に示します。EPA および DHA が容易に検出・定量できています。

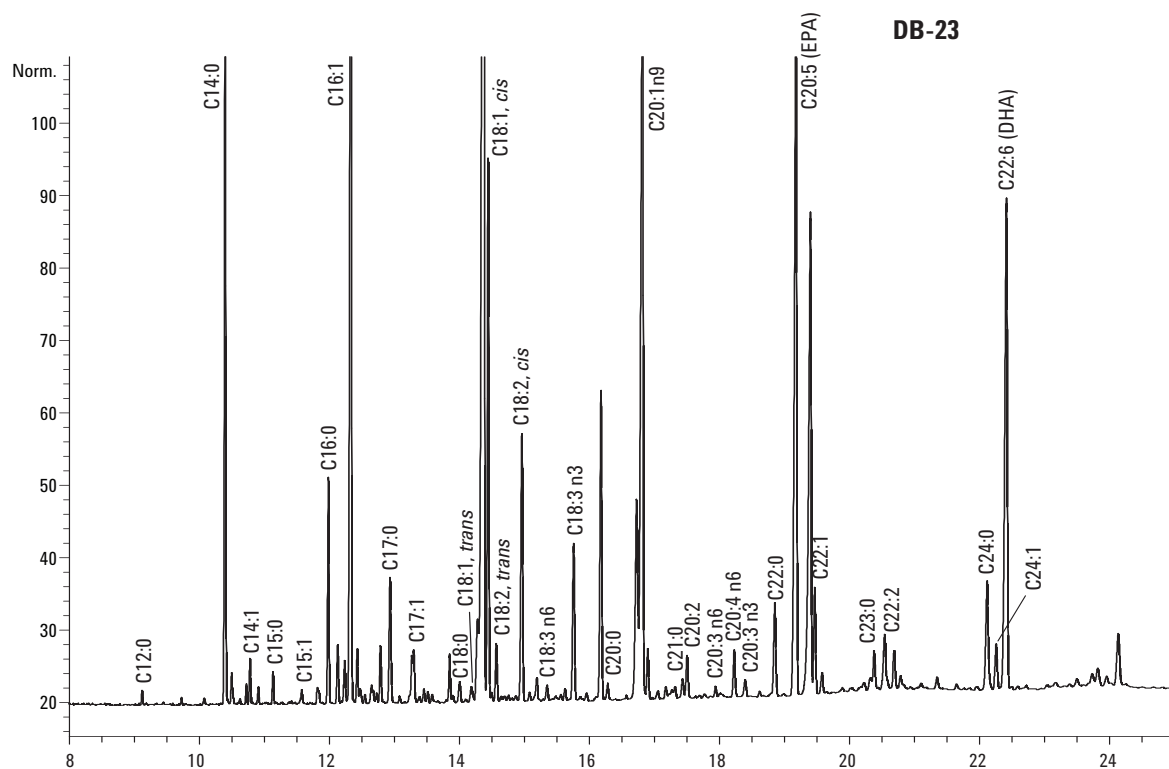


図 5 海洋生物中の不飽和脂肪酸混合物の GC-FID 分析。60 m×0.25 mm 内径、0.15 μm の DB-23 カラムを使用し、条件はメソッド 2 (表 3) による。

37 成分標準品混合試料を高極性カラム HP-88 で分離した結果を、図 6 に示します。

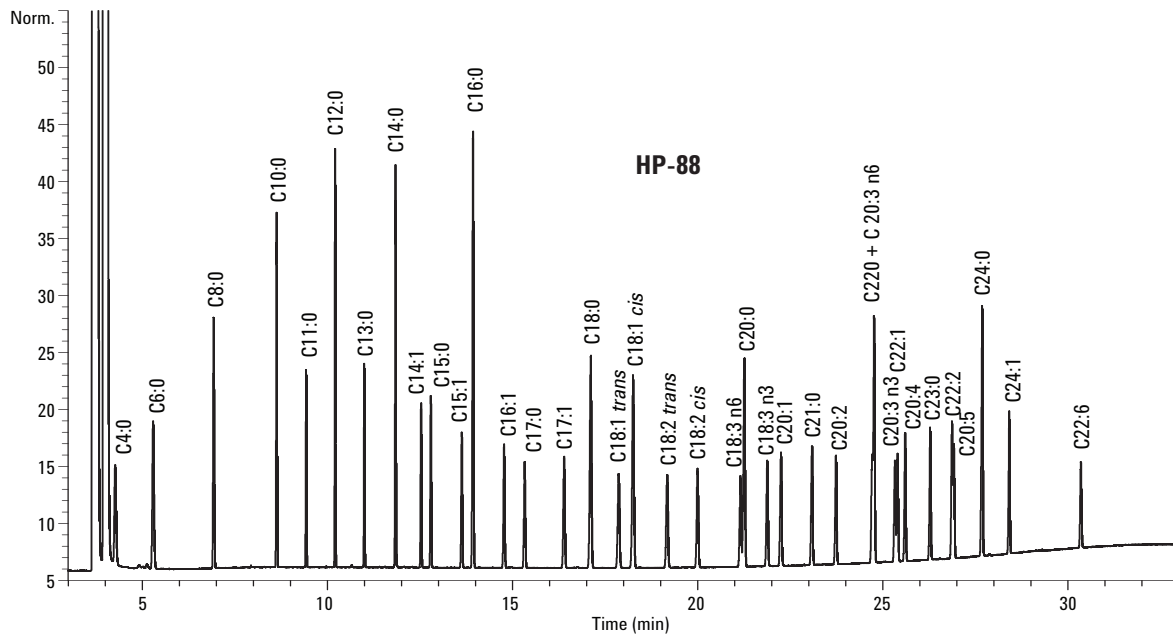


図 6 37 成分 FAME 標準品混合試料の GC-FID 分析。100 m×0.25 mm 内径、0.2 μm の HP-88 カラムを使用し、条件はメソッド 3A (表 4A) による。

この場合も極めて良好な分離が得られていますが、C22:0 と C20:3 (n-6) が 24.7 min で共溶出しています。しかし、このカラムを使用すると *cis*- と *trans*- 異性体の分離は非常に優れています。これは、5 つの C18:1 異性体を含む標準品混合試料の分離で説明できます。*cis*- と *trans*- 位置異性体の分離が図 7 で示すとおり十分に分離されています。

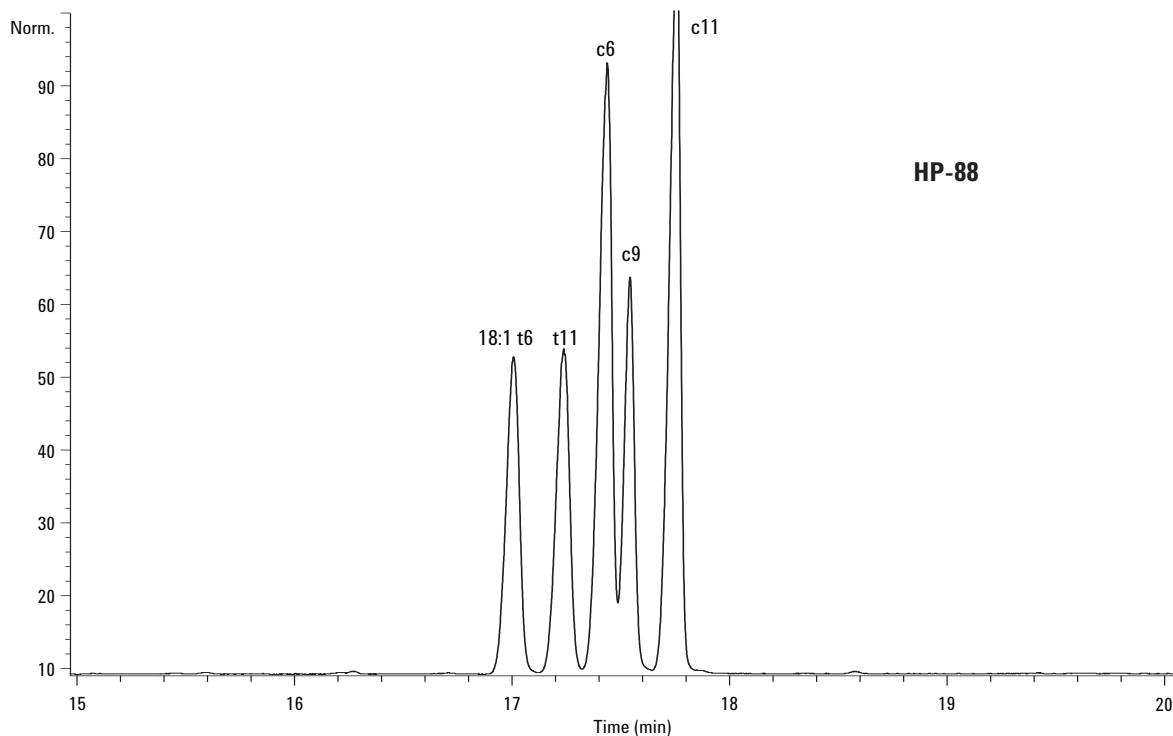


図 7 C18:1 異性体の GC-FID 分析。100 m×0.25 mm 内径、0.2 μm の HP-88 カラムを使用し、条件はメソッド 3A (表 4A) による。

同様に、4つの C18:2 異性体 (*trans-trans*、*cis-trans*、*trans-cis*、*cis-cis*) の分離についても、図 8 に示すように良好な分離を得ました。

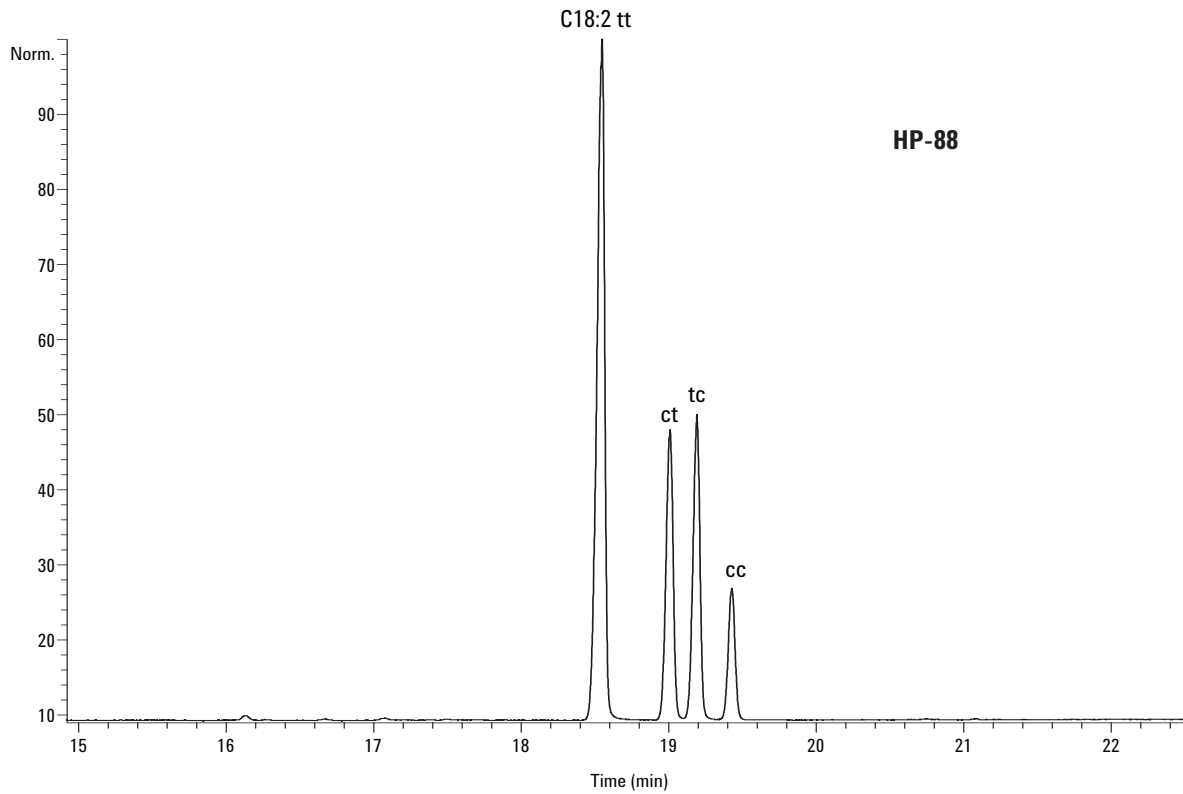


図 8 C18:2 異性体の GC-FID 分析。100 m×0.25 mm 内径、0.2 μm の HP-88 カラムを使用し、条件はメソッド 3A (表 4)による。

DB-23 カラムと HP-88 カラムとの比較を、高度に水素化した油脂の分離によって行いました。この水素化プロセスにより、可能性のあるすべての位置異性体および幾何異性体 (*cis-trans*) が生成します。このサンプルを DB-23 カラムと HP-88 カラムにより、どちらも 180 °C の等温でそれぞれ分析しました。クロマトグラムの比較を図 9 に示し、C18:1 についてはその詳細を溶出ウィンドウで示しています。図 4 では 37 化合物含有の標準試料にて *trans*-C18:1(n9) と *cis*-C18:1 (n9) がベースライン上で分離されていますが、この図 9 では、複数の C18:1 異性体が含まれる実サンプルでは HP-88 による *cis-trans* 分離がカラム選択として適していることを示しています。

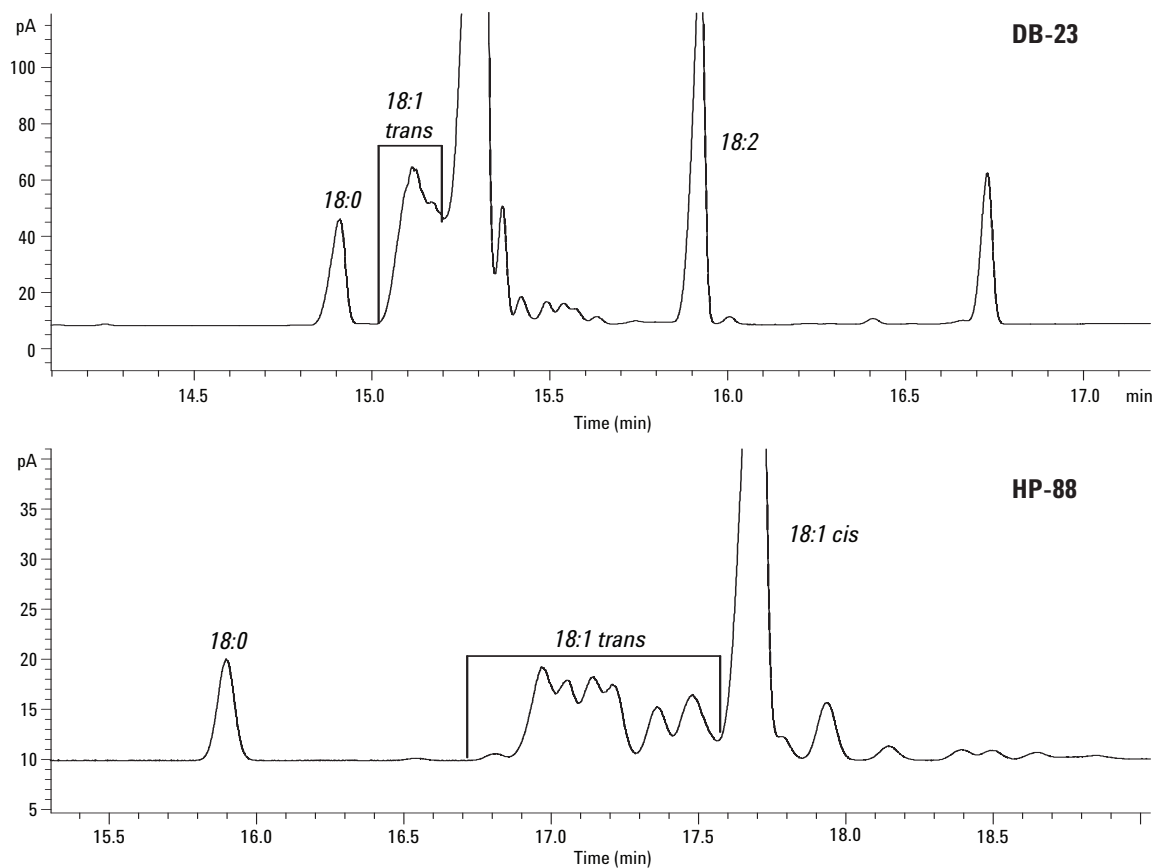


図9 水素化油に含まれるC18:1異性体分離の比較。60 m×0.25 mm 内径、0.15 μm のDB-23 カラム (上のウィンドウ)、および 100 m×0.25 mm 内径、0.2 μm のHP-88 カラムを使用し、どちらのカラムも 180 °C で等温分析した。

HP-88 のアプリケーションを、部分水素化菜種油の分析で説明します。図 10 では、*trans*-脂肪酸がきれいに分離されています。*trans*-異性体と *cis*-異性体との谷は容易に定量できます。また、他の *trans*-異性体 (C18:2 と C18:3) も検出されています。

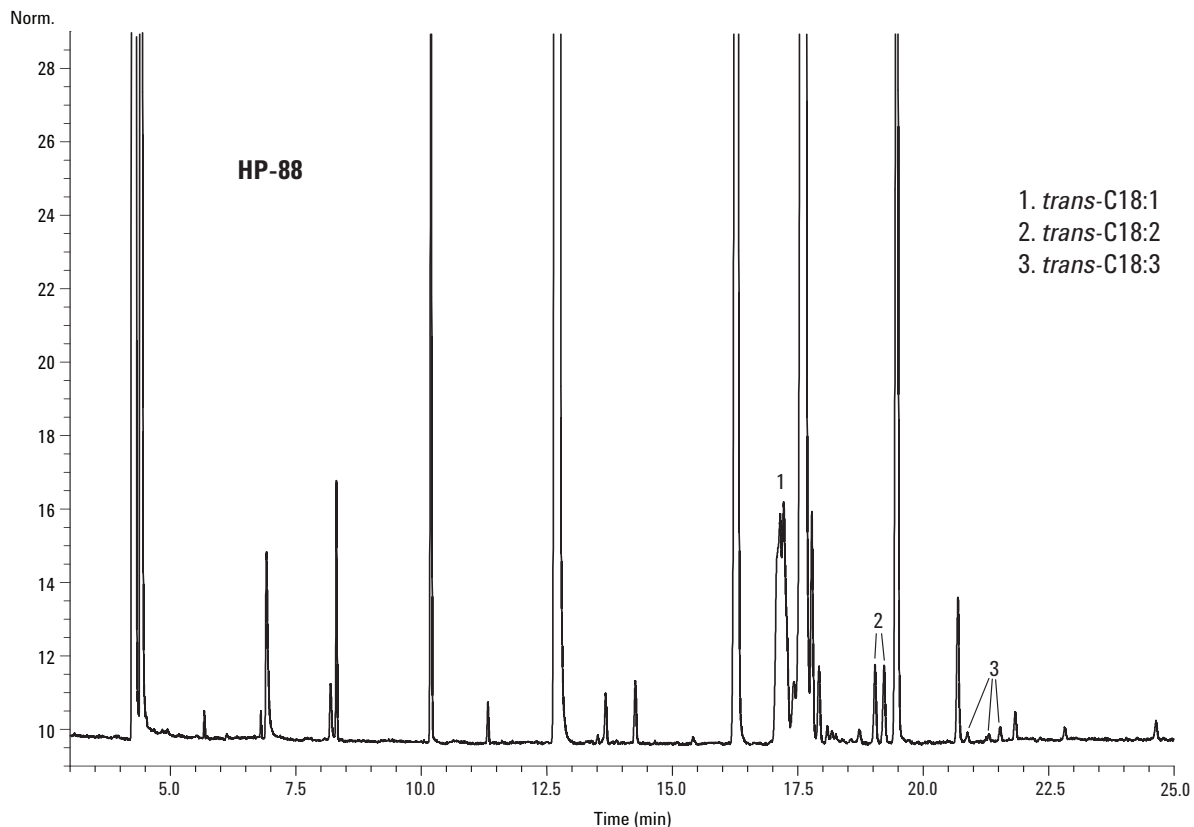


図 10 部分水素化菜種油に含まれる FAME の GC-FID 分析。100 m×0.25 mm 内径、0.2 μm の HP-88 カラムを使用し、条件はメソッド 3A (表 4) による。した結果

このカラムは、EC Regulation 2568/91 に準拠したオリーブ油の品質管理に使用できます [5]。表 4 に記載されているメソッド (カラム A - メソッド A) では、キャリアガスとして水素を使用した 100 m カラムでの分析時間は約 35 分です。オリーブ油の品質管理 (QC) では、60 m カラムも使用できます (表 4 - カラム B)。キャリアガスとしてヘリウムを使用して別の温度プログラム (つまり表 4 のオープン温度 B) を用いた場合、図 11 に示すように 20 分以内で非常に良好な分離が得られます。この分離結果は EC regulation に完全に適合しています [5]。

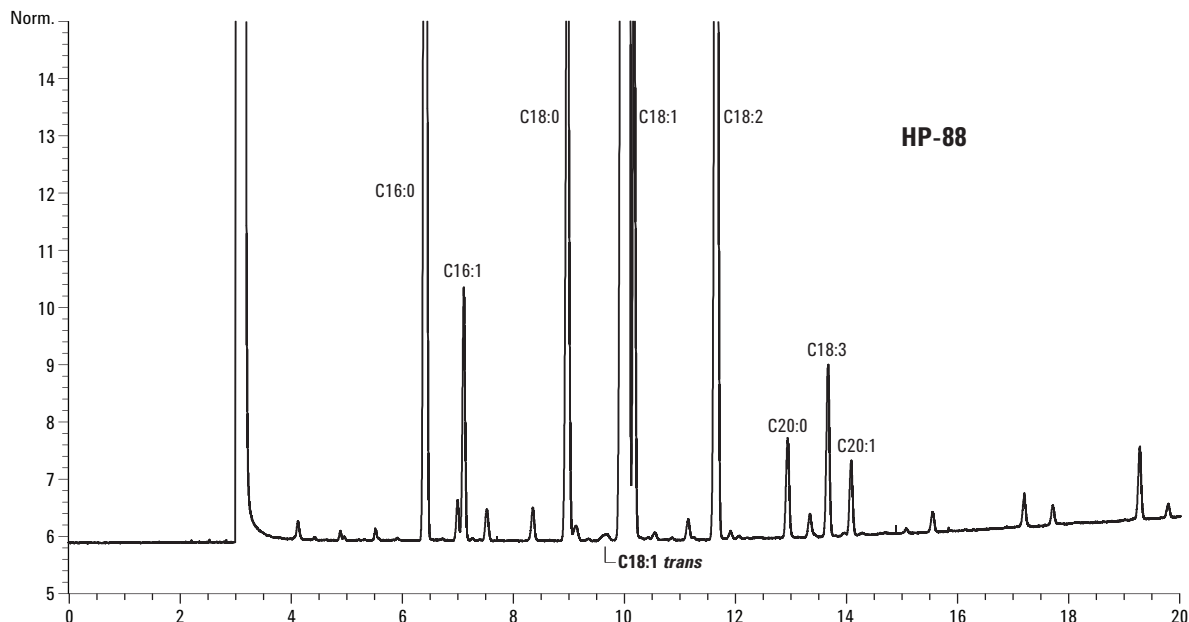


図 11 オリーブ油に含まれる FAME の GC-FID 分析。60 m×0.25 mm 内径、0.2 μm の HP-88 カラムを使用し、条件はメソッド 3B (表 4) による。

結論

FAME の分析には、3 種類の固定相を使用できます。

1. DB-Wax カラムは、乳脂肪に含まれる酪酸の測定など食用油脂の古典的分析に有用です。ただし、このカラムでは、*cis-trans* 異性体は分離されません。
2. 中極性のシアノプロピルカラム DB-23 は魚油を含む複雑な FAME 混合物の分析に優れ、EPA や DHA などのオメガ 3 脂肪酸を測定できます。*cis-trans* は部分的に分離されます。
3. より詳細な *cis-trans* 分離が必要である場合には、HP-88 カラムが推奨されます。このカラムは、オリーブ油の品質管理 (QC) 分析に最適です。

参考文献

1. W. W. Christie, "Gas Chromatography and Lipids, A Practical Guide", (1989), The Oily Press, Ayr, Scotland (ISBN 0-9514171-0-X).
2. AOAC Official Methods of Analysis (2000), method Ce 2-66.
3. IUPAC, Standard methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives, Blackwell Scientific Publications, IUPAC Method 2.301.

4. International Standard ISO 15304, version 2003-05-15 (ISO 15304/2002) (can be ordered from www.iso.org)
5. EU regulation 2568/91, *Official Journal EU*, document L248, 5/9/1991.
6. EC, Bureau of Reference (BCR), Brussels, Belgium (see catalog at www.irmm.jrc.be)

詳細情報

弊社製品とサービスについて更に詳しい情報をご希望のお客様は弊社 Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

お問い合わせは： 0120-477-111

横河アナリティカルシステムズ株式会社
〒192-0033 東京都八王子市高倉町9-1

Agilent は、万一この資料に誤りが発見されたとしても、また、本資料の使用により付随的または間接的に損害が発生する事態が発生したとしても一切免責とさせていただきます。
本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2005

Printed in Japan
August 30, 2005
5989-3760JAJP