

Agilent 8850 GC システムによる 脂肪酸メチルエステルの分析

著者

Jie Zhang
Agilent Technologies
(Shanghai) Co. Ltd.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent 8850 ガスクロマトグラフ (GC) システムを用いた脂肪酸メチルエステル (FAME) の分析を紹介します。20 m および 30 m の Agilent J&W DB-FastFAME GC カラムを使用して、37 種類の一般的な FAME をそれぞれ 10 分および 15 分で高速分離できました。リノール酸およびリノレン酸メチルエステルのシス/トランス異性体や位置異性体といったさらに複雑な FAME サンプルを分析するため、8850 GC プラットフォームで従来の昇温範囲を用い、90 m Agilent DB-FastFAME GC カラムと 100 m Agilent J&W HP-88 カラムを使用しました。また、ヘリウムキャリアガスと窒素キャリアガスを 3 つの DB-FastFAME 分析カラムで評価し、ターゲット分析への影響を評価しました。主要な化合物ペアの分解能、精度、分析速度などのメソッド性能を評価しました。

はじめに

脂肪酸は脂質の構成要素であり、健康的な食生活に不可欠な要素です。脂肪分の多い魚、ナッツ、種子、植物油など、さまざまな食品に含まれています。脂肪酸は、飽和脂肪、一価不飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪（オメガ3脂肪酸やオメガ6脂肪酸など）、およびトランス脂肪に分類されます。不飽和脂肪酸は心臓や血管の機能の維持に関して有益な役割を果たします。ただし、加工食品に含まれる人工のトランス脂肪は厳格に制限する必要があります。食品中の脂肪酸の測定は以下において重要な役割を果たします。

- **栄養評価**：食品の栄養バランスにかかるオメガ3/オメガ6比の分析
- **安全規制**：トランス脂肪酸などの健康リスクの特定
- **品質管理**：オイルへの偽物混入とプロセスの欠陥の検出
- **研究開発支援**：機能性食品開発をサポートするデータの提供

食品中の脂肪酸を測定するには、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、分光分析法などの手法を使用できます。これらの手法にはそれぞれのメリット、デメリット、適用可能なシナリオがあります。例えば、液体クロマトグラフィーは熱に弱い脂肪酸の分析に適していますが、分解能が低いという問題があります。蛍光分光分析は操作が容易ですが、マトリックス効果の影響を受けやすく、特異性が不十分です。ガスクロマトグラフィーは脂肪酸の測定で最もよく使用される手法です。食品中の脂肪酸は主にトリグリセリドとして存在します。分析を行う前にトリグリセリドを抽出し、鹸化し、メチル化して、対応する FAME を得る必要があります。FAME は脂肪酸より極性が低く揮発性が高いため、ガスクロマトグラフィープラットフォームでの分析に適しています。FAME 分析では、ポリエチレングリコールやシアノプロピルシロキサンなどの固定相を用いた極性カラムを主に使用します。ポリエチレングリコール固定相は単純な脂肪酸混合物の分析に適しており、シス/トランス異性体の分析には適しません。FAME 分析の他の分析メソッドでは、高含量シアノプロピル相で被覆されたカラムが推奨されます。ただし、このタイプの相を用いた分析は完了まで通常 70 分以上かかり、リテンションタイム (RT) の安定性もあまり良くありません。Agilent J&W DB-FastFAME カラムは改良型のシアノプロピル相を備えており、分析が高速化し、再現性が向上しています。

アジレントでは、寸法が異なる DB-FastFAME カラムを提供しており、20 m と 30 m のサイズを使用して代表的な 37 種類の食品中の FAME の分析速度を向上できます。以前の実験では、この 2 本のカラムで従来のオープン昇温速度を用いることで分析速度が向上することが実証されています。¹ Agilent 8850 GC の発売により、エアバスオープンでの高速昇温プログラミングが可能になります。このアプリケーションノートでは、8850 GC で窒素 (N₂) キャリアガスとヘリウム (He) キャリアガスを使用して、37 種類の FAME を高速分析する方法を示します。また、37 種類の FAME と 15 種類のトランス FAME を含むより複雑な FAME 混合物を、90 m DB-FastFAME カラムと 100 m Agilent J&W HP-88 カラムで分析し、シス/トランス FAME と位置異性体の分析における 8850 GC の性能を実証しました。

実験方法

試薬

- **FAME 混合標準液 1**：イソオクタン中の濃度範囲 200 ~ 600 µg/mL の C4 ~ C24 FAME、37 成分 (CDAA-M-252795-DZ-1.2mL)
- **FAME 混合標準液 2**：トランス FAME 混合物、イソオクタン中に各 100 µg/mL、8 成分 (CDAA-M-259004-DA-1mL)
- **FAME 混合標準液 3**：CH₂Cl₂ 中の 10 mg/mL リノレン酸メチルエステル混合物、8 成分 (CRM47792)
- **FAME 混合標準液 4**：CH₂Cl₂ 中の 10 mg/mL リノール酸メチルエステル混合物、4 成分 (CRM47791)

すべての試薬は、ANPEL Laboratory Technologies (Shanghai) Inc. から購入しました。

混合標準液 1 をイソオクタンで 5 倍に希釈し、20 m および 30 m の Agilent J&W DB-FastFAME カラムで高速分離を行いました。

混合標準液 1 ~ 4 を混合し、90 m DB-FastFAME カラムと 100 m HP-88 カラムでトランス/シス FAME 分析を行いました。

装置構成

分析には、スプリット/スプリットレス注入口と水素炎イオン化検出器 (FID) を備えた 8850 GC システムを使用しました。サンプル注入には、Agilent 7650A オートサンブラ (ALS) (部品番号 G4567A) を用いました。

4 種類の分析カラムで He キャリアガスと N₂ キャリアガスを用いて実施したメソッドを表 1 に示します。注入口と検出器の温度設定は同じです。カラムヘッド圧とオープン温度プログラムは、カラムのタイプとキャリアガスに基づいて最適化しました。データの取り込みおよび解析には、Agilent OpenLab CDS 2.8 ソフトウェアを使用しました。使用した消耗品のリストを表 2 に示します。

表 1. 8850 GC 機器パラメータ

パラメータ	設定値			
スプリット/スプリットレス注入口	220 °C、スプリット比：20:1 ~ 100:1			
FID	240 °C H ₂ ：30 mL/分 空気：400 mL/分 メークアップ (N ₂)：20 mL/分			
カラムタイプ	20 m Agilent J&W DB-FastFAME	30 m Agilent J&W DB-FastFAME	90 m Agilent J&W DB-FastFAME	100 m Agilent J&W HP-88
オープンプログラムとカラムヘッド圧設定 (He ベースのメソッド)				
キャリアガス	ヘリウム			
カラムヘッド圧	28 psi, CP*	27 psi, CP	34 psi (1.5 分)、6 psi/分で 40 psi まで、RP*	40 psi, CP
オープンプログラム	60 °C (0.5 分)、 300 °C /分で 175 °C まで (0.32 分)、 23 °C /分で 210 °C まで (1 分)、 23.5 °C /分で 220 °C まで (1 分)、 60 °C /分 250 °C (3 分)	60 °C (0.49 分)、 300 °C /分で 175 °C まで (0.49 分)、 15 °C /分で 210 °C まで (2.5 分)、 14.5 °C /分で 240 °C まで (3 分)	75 °C (1.5 分)、 150 °C /分で 200 °C まで (20 分)、 2 °C /分で 208 °C まで (0.8 分)、 9 °C /分で 235 °C まで (21 分)	100 °C (13 分)、 10 °C /分で 180 °C まで (6 分)、 1 °C /分で 200 °C まで (20 分)、 4 °C /分で 250 °C まで (2 分)
オープンプログラムとカラムヘッド圧設定 (N₂ ベースのメソッド)				
キャリアガス	窒素			
カラムヘッド圧	20 psi	14 psi	30 psi (1.5 分)、6 psi/分で 36 psi まで、RP	
オープンプログラム	60 °C (0.58 分)、 250 °C /分で 175 °C まで (0.37 分)、 19.6 °C /分で 210 °C まで (1.6 分)、 20.1 °C /分で 225 °C まで (2 分)、 180 °C /分 250 °C (2 分)	60 °C (0.64 分)、 130 °C /分で 175 °C まで (1.3 分)、 8 °C /分で 210 °C まで (5.4 分)、 50 °C /分で 250 °C まで (4 分)	75 °C (1.5 分)、 150 °C /分で 200 °C まで (20 分)、 3 °C /分で 208 °C まで (8 分)、 9 °C /分で 235 °C まで (18 分)	

* CP は定圧を表し、RP は昇圧を表します。窒素キャリアガスを使用する場合に同様の分解能を得るには、カラムバッチの違いを考慮し、20 m および 30 m のカラムのヘッド圧を調整しなければならない場合があります。

表 2. FAME 分析で使用した消耗品

カテゴリ	アジレント部品	部品番号
注入口セプタム	高温/低ブリード/ノンステックセプタム	5183-4757
注入口ライナ	ウルトラライナート、ガラスウール入り低圧力損失スプリットライナ	5190-2295
ALS シリンジ	Agilent ゴールドスタンダード、23 ~ 26s テーパーニードル	5181-1273
カラム 1	Agilent J&W DB-FastFAME、20 m × 0.18 mm、0.20 μm、カスタム 5 インチフォーマット	100-2000
カラム 2	Agilent J&W DB-FastFAME、30 m × 0.25 mm、0.25 μm	G3903-63011
カラム 3	Agilent J&W DB-FastFAME、90 m × 0.25 mm、0.25 μm、カスタム 5 インチフォーマット	100-2000
カラム 4	Agilent J&W HP-88 GC カラム、100 m、0.25 mm、0.2 μm	112-88A7E

結果と考察

ショートカラムでの 37 種類の脂肪酸メチルエステルの高速分析

37 種類の FAME は多数の食品サンプル中の脂肪酸組成を再現したものであり、この中には重要な飽和、一価不飽和、および多価不飽和 FAME の大部分が含まれています。これらは、確立され広く受け入れられた標準物質です。

8850 GC での 37 種類の FAME の高速分析を実証するため、20 m × 内径 0.18 mm、0.2 μm DB-FastFAME カラムと 30 m × 内径 0.25 mm、0.25 μm DB-FastFAME カラムを使用しました。オープン昇

温プログラムとカラム流量は以前の実験に基づき、8850 GC 向けにさらに最適化しました。代替キャリアガスの必要性の高まりやさまざまな地域のラボの作業習慣を考慮し、He キャリアガスベースと N₂ キャリアガスベースの両方のメソッドを開発しました。

異なるキャリアガスを用いた 2 本のカラムで得られた GC-FID クロマトグラムを図 1A、1B、2A、2B に示します。He メソッドではすべての化合物を良好に分離できました。ベースライン分離できなかった 3 つの化合物ペアを黒い四角で示しています。このうち、He メソッドを用いた場合の c22:2n6 および c23:0 のピークの分解能が 20 m カラムで 1.27、30 m カラムで 1.31 と最も低くなりました。AOAC International のメソッド

996.06² では、FAME の C18:3 および C20:1 の 2 つの隣接ピークと、C22:1、C20:3、C20:4 の 3 つの隣接ピークを、分解能 1.0 以上で分離する必要があります。この要件は主に高含量シアノプロピル固定相が推奨されます。DB-FastFAME カラムで 6 本のプローブの FAME を異なる順序で溶出し、これをクロマトグラムに黄色い四角でマークしました。DB-FastFAME カラムの独自の選択性によって、これらの分離は分解能の要件を容易に上回りました。2 本のカラムにおける He メソッドの分析時間は 7 分および 10 分未満でした。分析速度は従来のメソッドに比べて 5 ~ 8 倍高速でした。

N₂ メソッドで後で溶出された化合物はピーク形状が幅広く、隣接ピークの分解能に影響がありました。20 m カラムで N₂ キャリアガスに切り替えた場合、C22:2n6/C23:0 の分解能は 1.27 から 1.1 に低下し、C24:1/C22:3n6 の分解能は 1.36 から 1.01 に低下しました。分析時間は約 30 % 増加しました。N₂ メソッドの分解能を向上させるには、分析速度を下げる必要があります。図 2B は、30 m カラムで N₂ キャリアガスを使用し、カラム流量とオープンプログラムを低速にして生成したクロマトグラムを示しています。30 m カラムでの N₂ メソッドの c22:2n6 および c23:0 の分解能は 1.30 で、He メソッドの 1.31 と同等でした。30 m

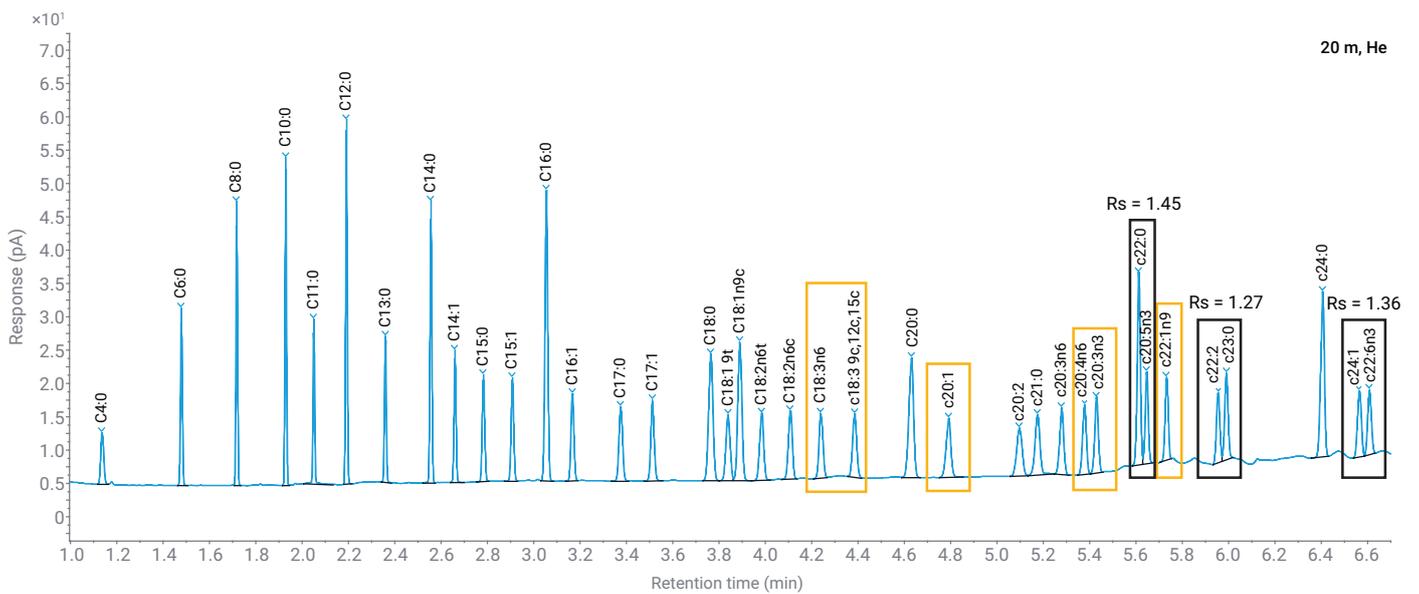


図 1A. 20 m Agilent J&W DB-FastFAME カラムで He キャリアガスを使用した 37 種類の FAME のクロマトグラム

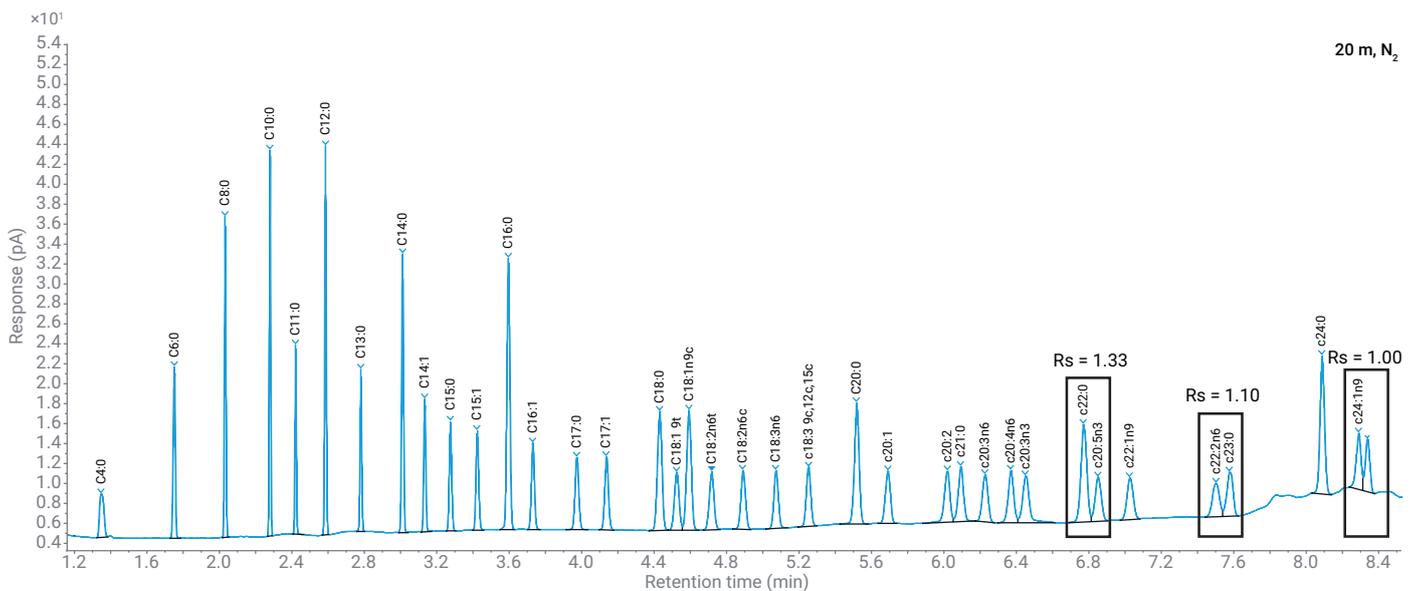


図 1B. 20 m Agilent J&W DB-FastFAME カラムで N₂ キャリアガスを使用した 37 種類の FAME のクロマトグラム

カラムでの N₂ メソッドの分析速度は He メソッドよりも 50 % 低速でした (14.5 分対 9.5 分)。短い DB-FastFAME カラムでは、He キャリアガスと N₂ キャリアガスのどちらを使用しても高速 FAME 分析を実現できますが、

より高い分解能と生産性を得るには、He ベースのメソッドがより優れた選択肢となります。

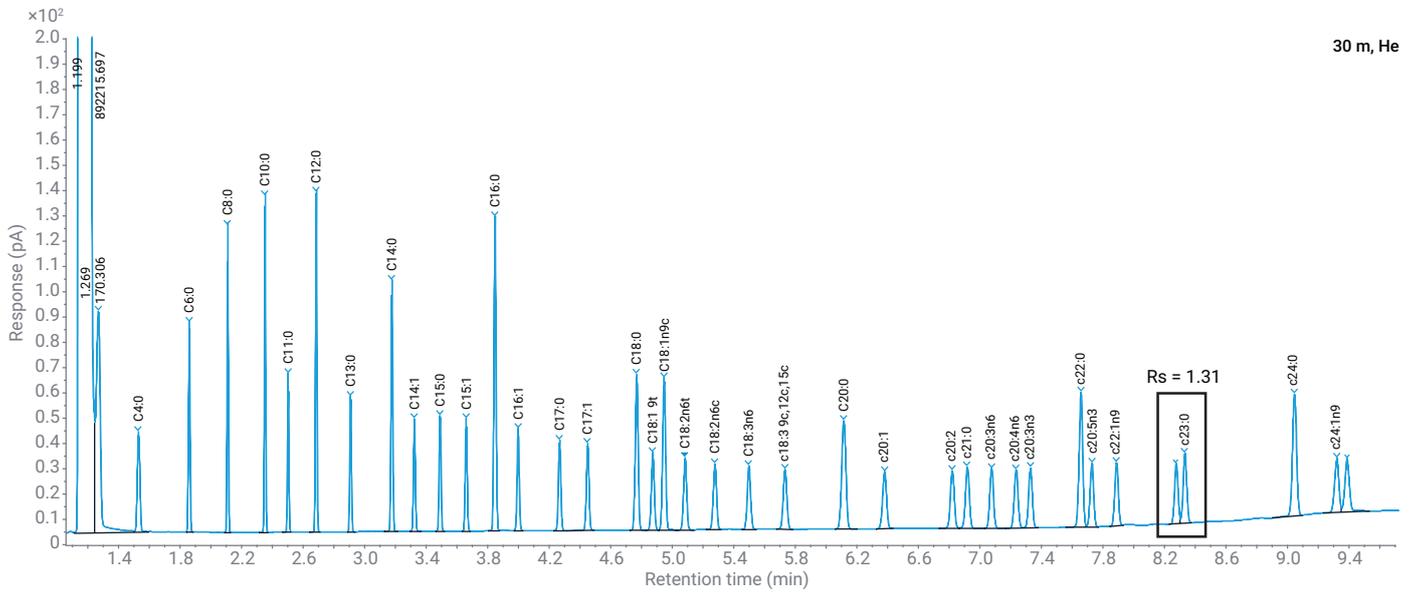


図 2A. 30 m Agilent J&W DB-FastFAME カラムで He キャリアガスを使用した 37 種類の FAME のクロマトグラム

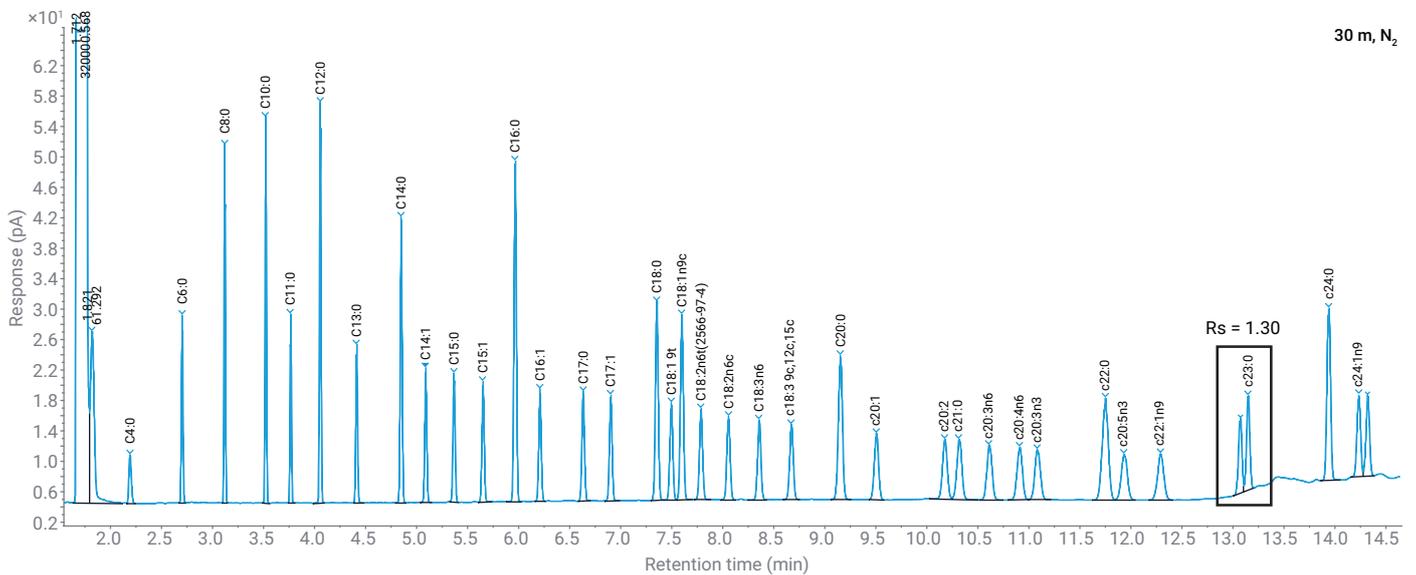


図 2B. 30 m Agilent J&W DB-FastFAME カラムで N₂ キャリアガスを使用した 37 種類の FAME のクロマトグラム

37 種類の FAME を 7 回連続注入した場合の 4 つの高速メソッドの RT とピーク面積の精度を評価しました。カラムに導入した分析対象物の量は 0.4 ~ 1.2 ng です。図 3 で示すように、面積再現性は 0.2 ~ 3.8 % です。ベースラインによるピーク積分への影響により、後半に溶出された化合物は面積値の %RSD が高くなります (2 ~ 3.8 %)。オープン温度が高いと、DB-FastFAME カラムのベースラインは温度が低いときほど平坦になりません。ベースラインの変動が後半の溶出物の積分の開始点と終了点に影響し、積分の再現性が低下しました。ピーク面積のばらつきが反映され、応答 %RSD は少し高くなりました。一般的に、実際のサンプルの分析では脂肪酸の量が試験標準よりもかなり高くなります。応答がかなり大きくなり、ベースラインの変動の影響を受けにくくなるため、定量精度は向上します。

4 つのメソッドの RT 精度は 0.01 ~ 0.07 % でした (図 4)。分析速度を考慮するとこれは優れた精度であり、正確な適格性評価を保証します。

高速分析はコーン、大豆、とうもろこしといった植物油など、従来のサンプルの特定解析に適していることを強調しておきます。乳製品や魚油中のオメガ 3 脂肪酸など動物由来のサンプルでは、品質管理プロセスには高速分析メソッドを適用できます。一方で、シス/トランス脂肪酸や位置異性体 (二重結合位置異性体) の分析が必要な複雑なサンプルの場合は、十分な分解能を得るために、長い極性カラムの利用や低速な温度プログラムを検討することをお勧めします。

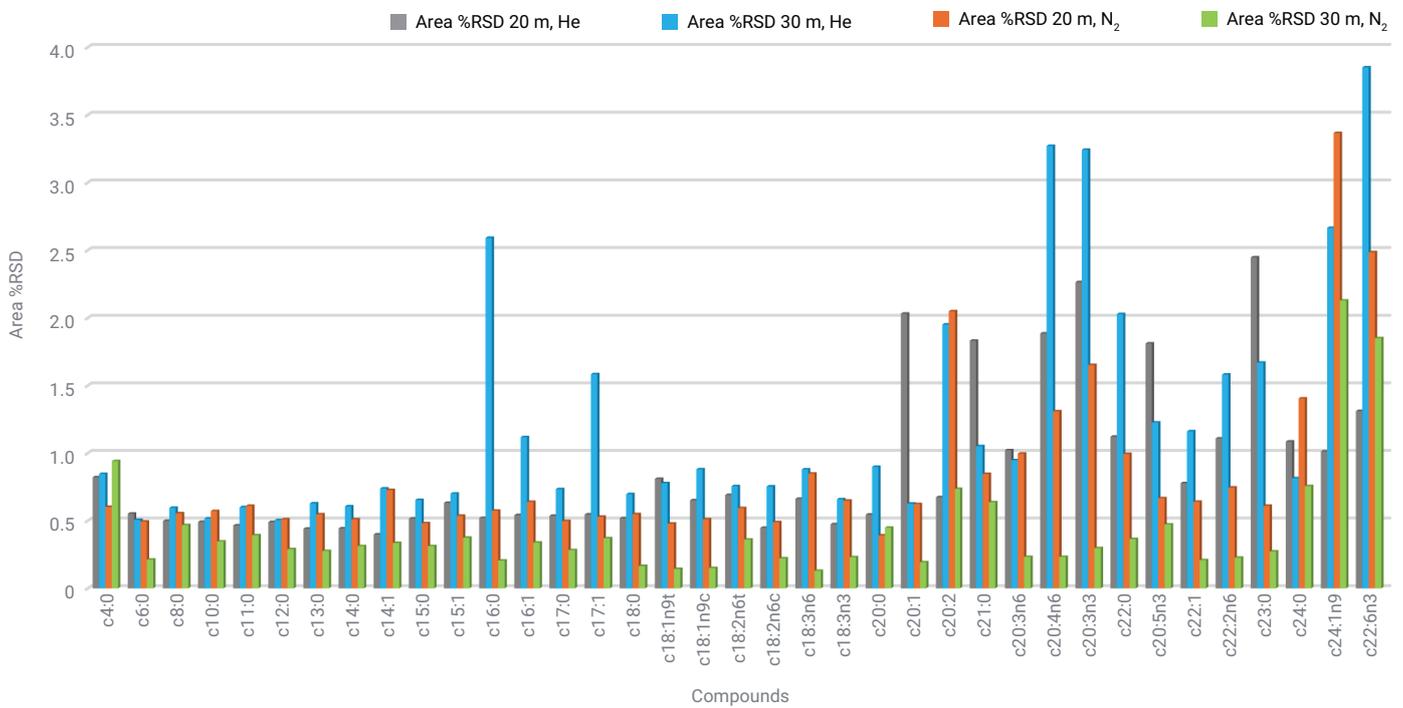


図 3. 20 m および 30 m の Agilent J&W DB-FastFAME カラムでヘリウムキャリアガスおよび窒素キャリアガスを使用した場合のピーク面積精度

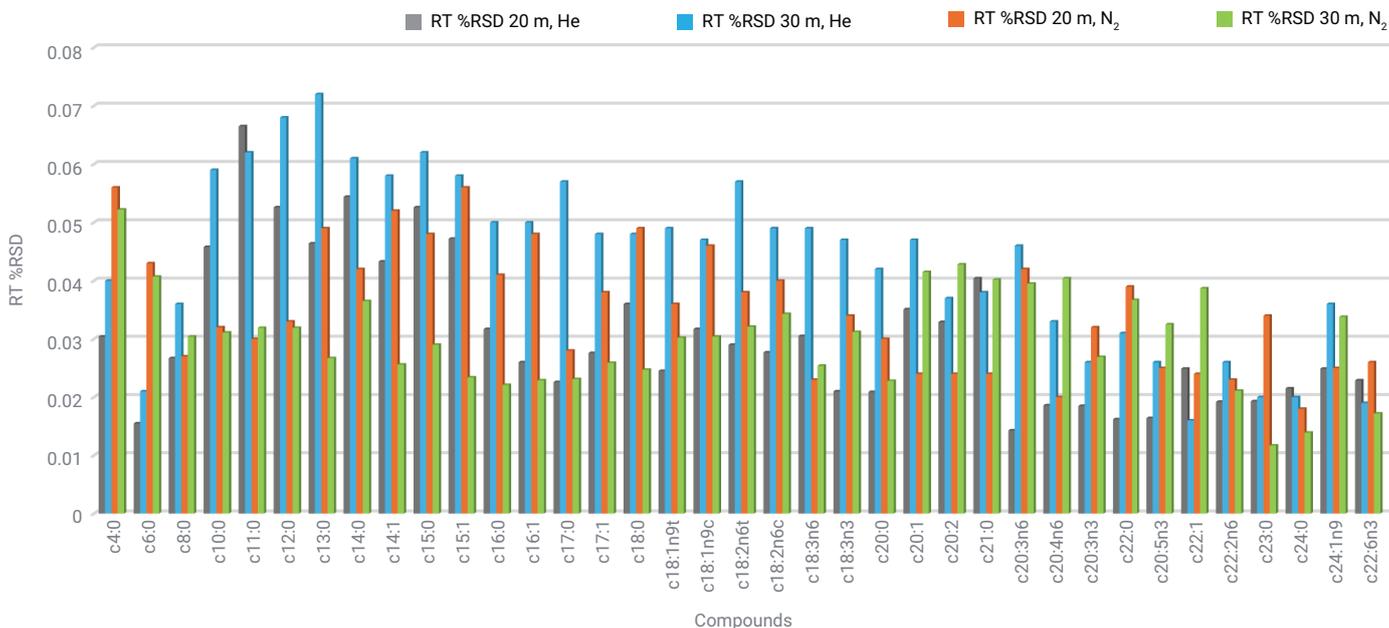


図 4. 20 m および 30 m の Agilent J&W DB-FastFAME カラムでヘリウムキャリアガスおよび窒素キャリアガスを使用した場合のリテンションタイム精度

90 m DB-FastFAME カラムおよび 100 m HP-88 カラムでの複雑なトランス/シス脂肪酸の分析

包括的な脂肪酸分析を行うには、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の分離だけでなく、リノレン酸 (C18:3) 異性体やリノール酸 (C18:2) 異性体など複数のトランス/シス脂肪酸異性体の分離も必要です。中国の国内食品安全性標準カタログの GB 5009.168-2016³ メソッドおよび GB 5009.257-2016⁴ メソッドでは、食物マトリックス中の 52 種類の脂肪酸を分析する必要があります。C18:2 異性体、C18:3 異性体、37 種類の FAME がターゲットリストに含まれます。短い DB-FastFAME カラムはこのアプリケーション向けの設計ではありません。従来、このような分離は HP-88 カラムや Agilent J&W CP-Sil 88 カラムといった長い高含量シアノプロピル相カラムで行われています。ここでは、Agilent 8850 GC で 90 m DB-FastFAME カラムを用いてターゲット分離を行いました。分解能、分析速度、メソッド精度を評価しました。

37 種類の FAME と 15 種類のトランス FAME の混合物を、最適化されたオープン温度プログラムを使用し、He キャリアガスと N₂ キャリアガスで分離しました。オープンプログラムの高速昇温部分に合わせて、カラムヘッド圧を上昇させました。He メソッドによる分析時間は 50 分未満で、N₂ メソッドではそれより少し長くなりました (55 分未満)。図 5A と図 5B は、90 m DB-FastFAME カラムでの C18:2 異性体と C18:3 異性体のクロマトグラムと詳細な分解能を示しています。ベースラインレベルの分解能で隣接ピークをすべて分離することは困難です。目標は、シス FAME とトランス FAME を、1.0 を超える分解能で分離することです。He メソッドでは、C18:3 (6c,9c,12c) (シス) と C18:3 (9t,12t,15c) (トランス) の化合物ペアのみがこの分解能を満たすことができませんでした。N₂ メソッドでは、C18:3 (9t,12t,15c)、C18:3 (6c,9c,12c)、C18:3 (9t,12c,15c) の 3 つの FAME でこの目標を達成できませんでした。

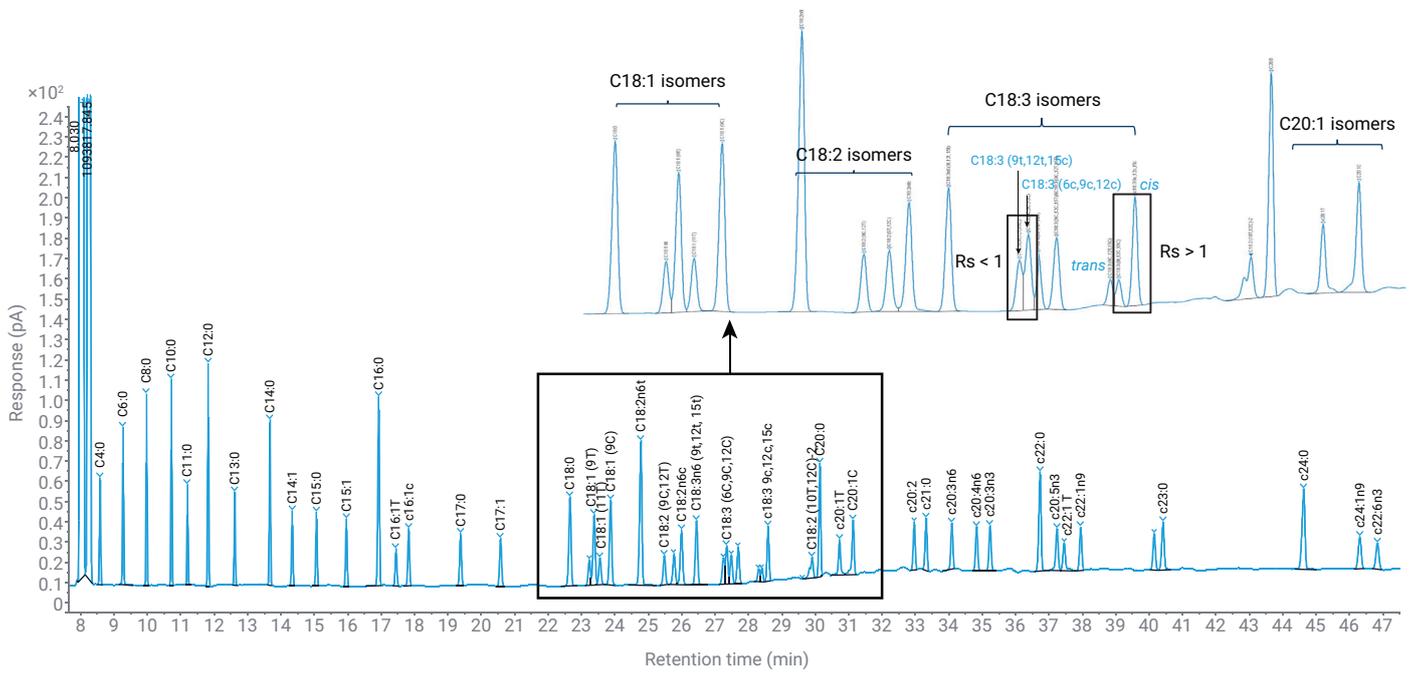


図 5A. 90 m Agilent J&W DB-FastFAME カラムでの 52 種類の FAME の分析 (He)

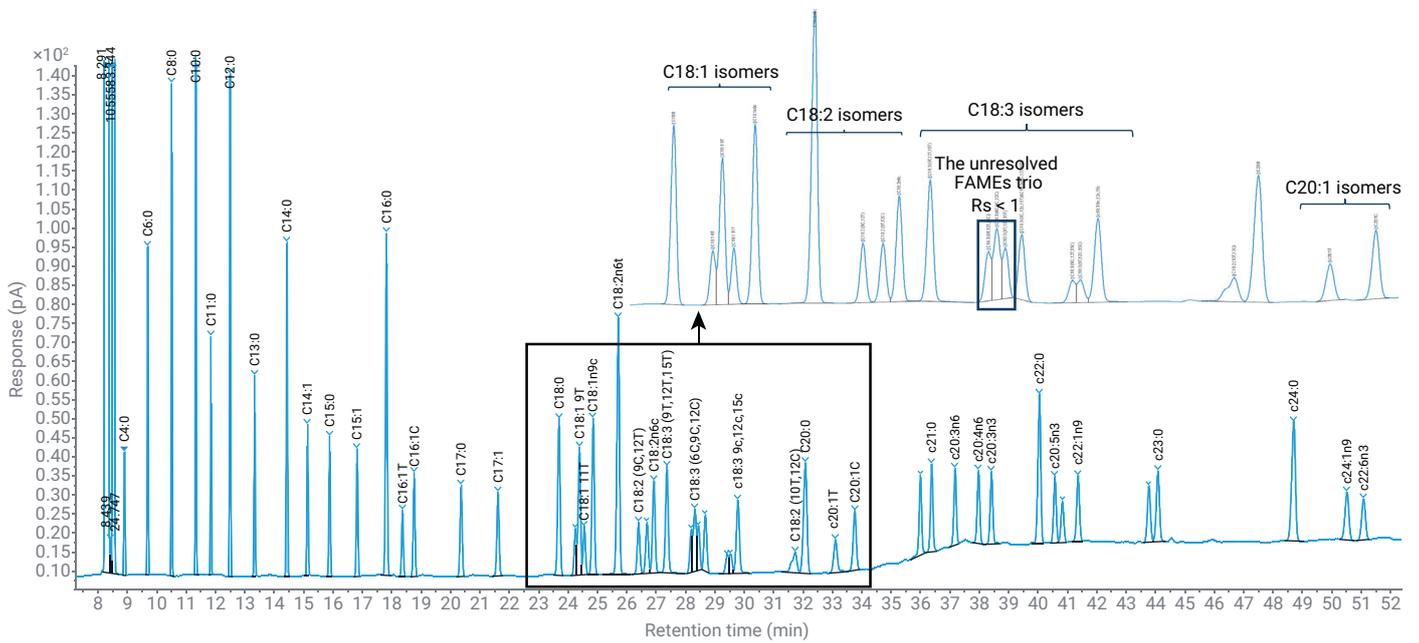


図 5B. 90 m Agilent J&W DB-FastFAME カラムでの 52 種類の FAME の分析 (N₂)

比較のため、同じ 8850 GC システムで 100 m HP-88 カラムを用いて同じ標準を分析しました。図 6 は、100 m HP-88 カラムで He キャリアガスを用いたクロマトグラムを示しています。分析は約 75 分かかりました。DB-FastFAME カラムと同様、HP-88 タイプカラムでも C18:3 異性体の分解能について問題がありました。HP-88 カラムでは、シストランス FAME の共溶出が 1 組発生し、C18:3 (9c,12c,15t)、C18:3 (6c,9c,12c)、C18:3 (9c,12t,15t) の 3 つの FAME で十分な分解能が得られませんでした。2 つの試験カラムの選択性の差が化合物の溶出順序と分解能の違いに表れました。図 7 で示すように、HP-88 カラムでは C20:0 と、C18:3 異性体の 1 つである C18:3 (9t,12c,15t) を分離

できませんでした。上段のクロマトグラムで、共溶出したピークを赤枠で示しました。比較すると、DB-FastFAME カラムではこれら 2 つの化合物を良好に分離でき、C20:0 は C18:3 (9t,12c,15t) よりかなり遅れて溶出しました。その他の化合物はどちらのカラムでもすべて良好に分離できました。クロマトグラムの比較により、90 m DB-FastFAME カラムを用いて、GB 5009.168-2016 メソッドと GB 5009.257-2016 メソッドでターゲットとなる 52 種類の FAME について、従来の高含量シアノプロピル相カラムより短時間で同等の分離を実現できることが実証されました。

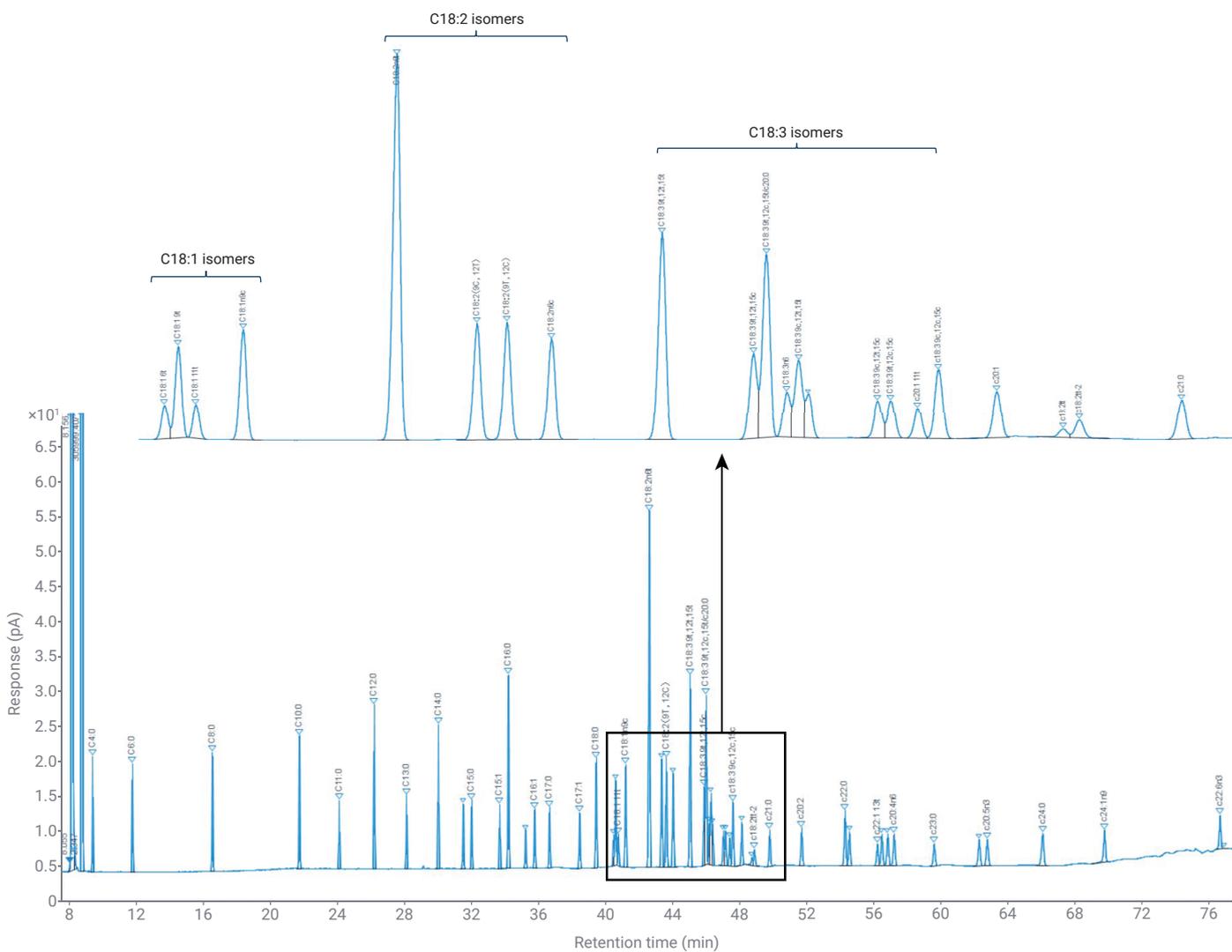


図 6. 100m HP-88 カラムでの 52 種類の FAME の分析 (He)

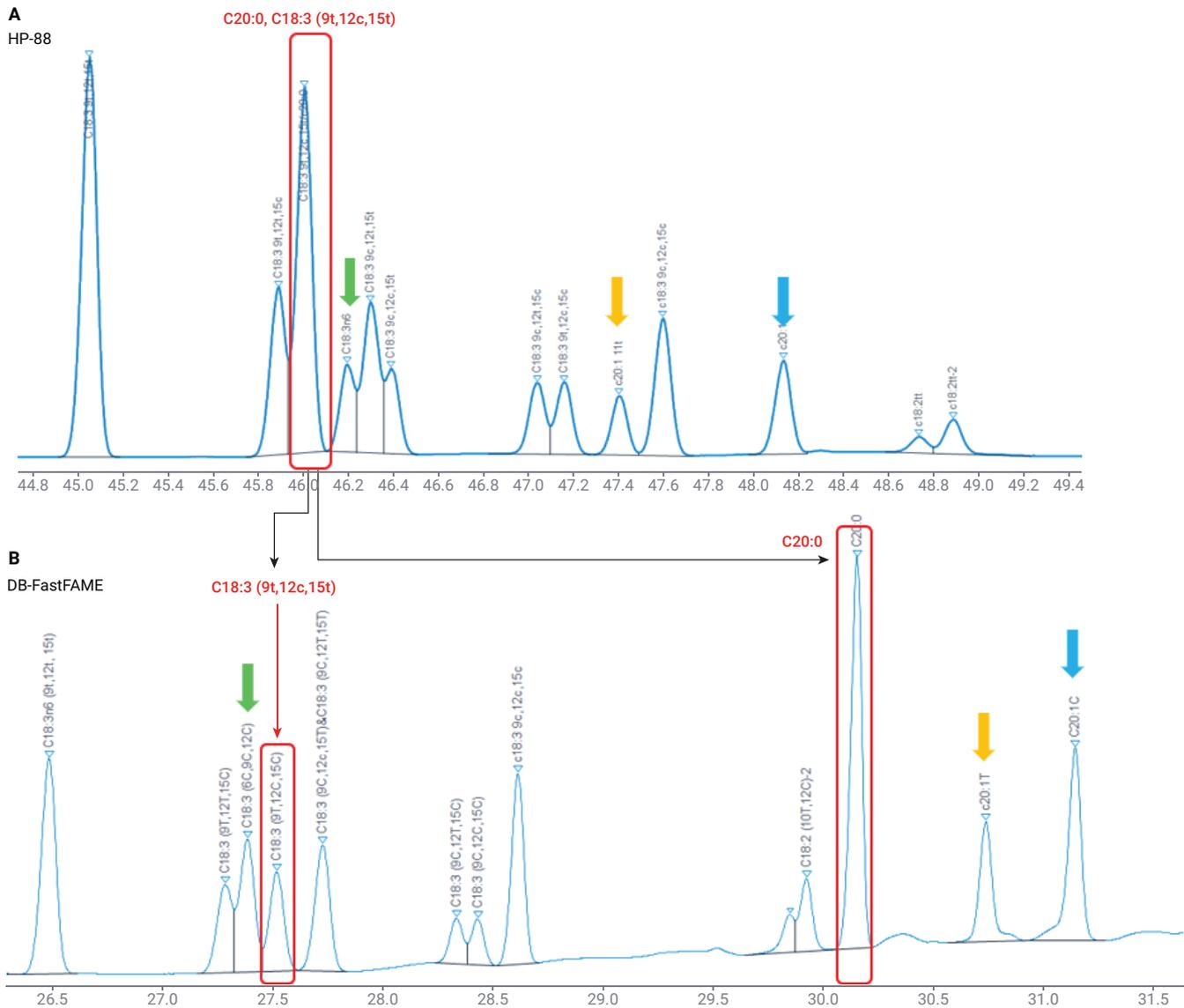


図 7. 100 m Agilent J&W HP-88 (A) カラムと 90 m Agilent J&W DB-FastFAME (B) カラムでの C18:3 異性体の分離。同じ色の矢印でラベル付けしたピークは、DB-FastFAME カラムと HP-88 カラムで異なる順序で溶出した同じ化合物に属します。

52 種類の FAME 混合物で 6 回の繰り返し分析を行い、90 m DB-FastFAME カラムの分析精度を評価しました。面積再現性の範囲は 0.22 ~ 2.7 % でした (図 8)。RT の再現性の範囲は 0.005 ~ 0.041 % でした (図 9)。応答と RT の精度は非常に良好で、前の 8890 GC での

結果と同等でした。これは、8850 GC での長時間の分析において、オープン温度、注入口圧力、検出器流量を正確かつ安定的に制御することができ、複雑な FAME サンプルで信頼性の高い同定結果を得ることができることを示しています。

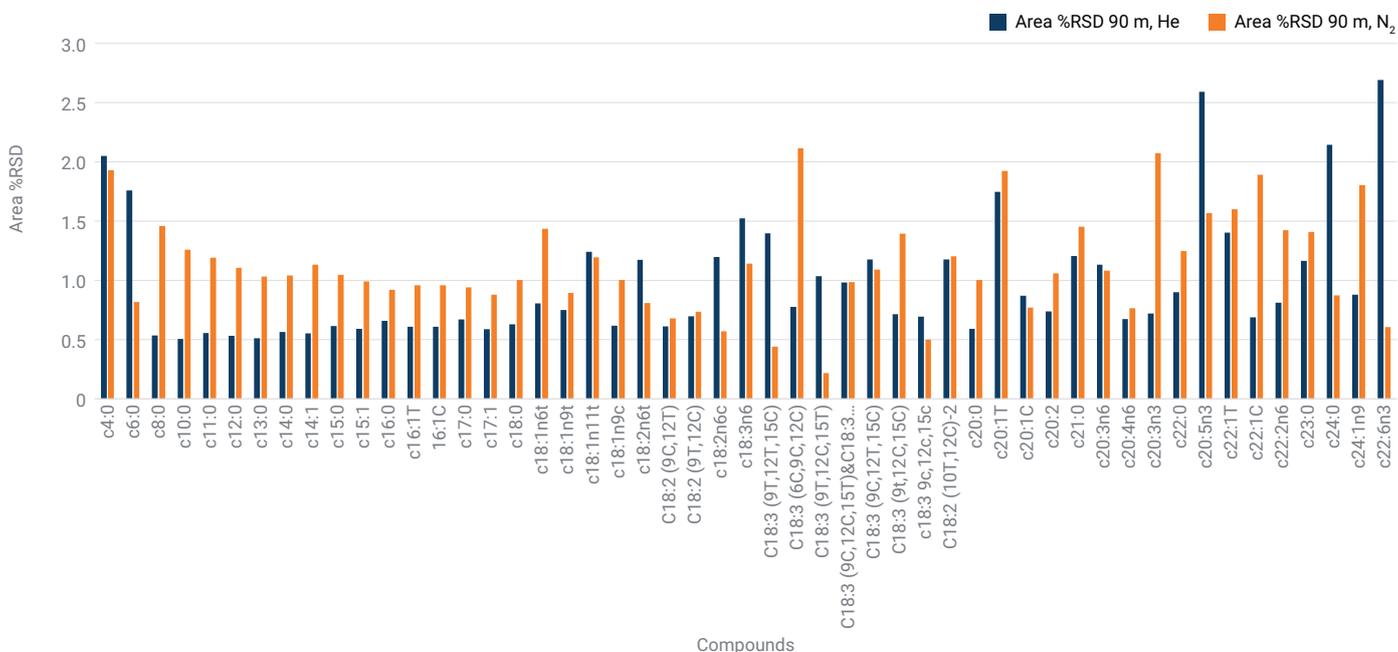


図 8. 90 m Agilent J&W DB-FastFAME カラムのピーク面積精度

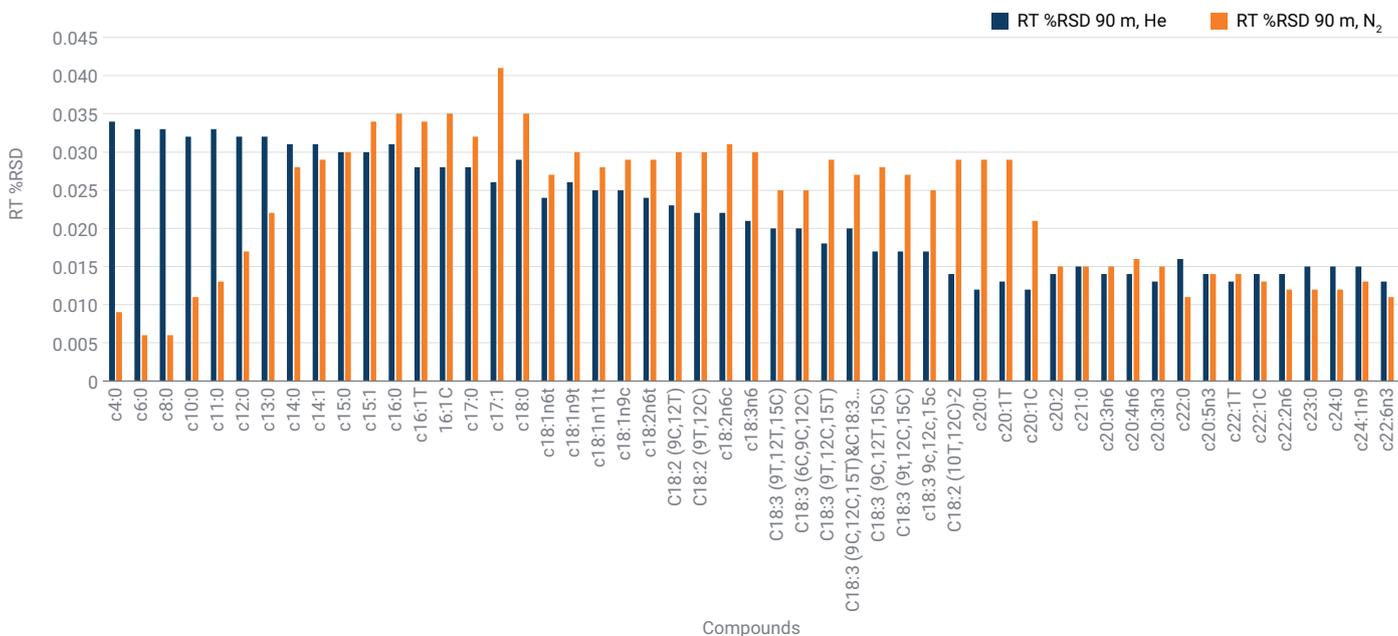


図 9. 90 m Agilent J&W DB-FastFAME カラムのリテンションタイム精度

結論

Agilent 8850 GC システムで高速 FAME 分析を行いました。最適化されたオープンプログラムを使用して、特別に設計された 20 m および 30 m の Agilent J&W DB-FastFAME カラムで FAME 標準の分析を行い、優れた再現性が得られました。分析時間は、He キャリアガス使用時は 10 分未満、N₂ キャリアガス使用時は 15 分未満でした。これは従来のメソッドに比べて 5～8 倍高速です。高速メソッドで得られたピーク分解能は AOAC 996.06 標準の要件を満たしました。このメソッドにより、37 種類の FAME のルーチン分析におけるラボの生産性を大幅に向上させることができます。

90 m DB-FastFAME カラムと 100 m Agilent J&W HP-88 カラムでの 52 種類の FAME の分析によって、シス/トランス脂肪酸や位置異性体を含む複雑な脂肪酸を分析する際の分解能、面積再現性 (2.5 % 未満)、RT 精度 (0.04 % 未満) に関して、8850 GC が Agilent 8890 GC システムと同等の性能を提供できることが示されました。

参考文献

1. Zou, Y.; Wu, H. 37 成分の脂肪酸メチルエステル分析の改善:3 種類のキャピラリー GC カラムによる分析. アジレント・テクノロジーアプリケーションノート, 資料番号 5991-8706JAJP, **2018**.
2. AOAC International. AOAC Official Methods of Analysis (2000), Method 996.06, Ce 2-66.
3. People's Republic of China National Health Commission. Determination of Fatty Acids in Food, Method GB5009.168-2016.
4. People's Republic of China National Health Commission. Determination of Fatty Acids in Food, Method GB5009.257-2016.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、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。

DE-009757

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, November 5, 2025

5994-8743JAJP