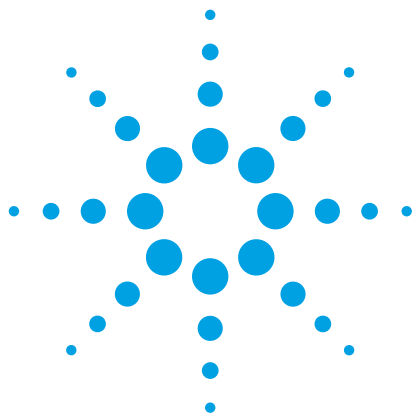




Agilent 7696A サンプル前処理 ワークベンチを使用した 食用油の FAME 分析用 自動サンプル前処理法

アプリケーションノート

著者

Rima Juskelis、Jack Cappozzo
Institute for Food Safety and Health
Illinois Institute of Technology
Bedford Park, IL
USA

Joseph Jablonski
U.S. Food and Drug Administration
Bedford Park, IL USA

Philip L. Wylie and Peter Mrozinski
Agilent Technologies, Inc.
Wilmington, DE
USA

概要

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチで、脂肪酸メチルエステル (FAME) 分析における脂肪酸の誘導体化とキャリブレーション標準作成を自動で行いました。その結果、手作業で行った場合と比べて精度は同等で回収率は高くなり、より正確なキャリブレーションが得られました。また、操作時間、試薬の使用量、危険な化学物質への曝露はすべて大幅に削減されます。この自動化アプローチはオリーブオイルに安物の植物油脂が混入しているのを検出するために使用されています。



Agilent Technologies

はじめに

食事として摂取する脂質および特定の脂肪酸が人間の健康へ与える影響に関する栄養学は急速に発展しており、食品の脂肪含有量を理解しようという一般市民の関心を刺激し、それが法規制を後押ししています。これは食用油全般、特にその中でもオリーブオイルについて言えることです。

米国食品医薬品局 (FDA) は、オリーブオイルの一価不飽和脂肪酸を摂取することで、冠動脈性心疾患のリスクが軽減される可能性があるという限定的健康強調表示を承認しました。最近の研究では、オリーブオイルの抗炎症効果は主に、オリーブを最初に冷却圧縮したときに得られるエクストラバージンオリーブオイル (EV00) によるものであるとされています。EV00 には、抗酸化物質と抗炎症化合物が豊富に含まれています。

EV00 に関心を持った消費者は、自分が購入したオリーブオイル製品が本当の EV00 で、品質や栄養価の低いその他の油脂が混入していないかどうかを知りたいがっています。このニーズを満足させるには、正確な組成分析が必要です。通常、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリドの脂肪酸は、鹸化および誘導体化の後、脂肪酸メチルエステル (FAME) として分析されます。分析は、ガスクロマトグラフと質量分析計または水素炎イオン化検出器 (GC/MS/FID) を使って行われます。

誘導体化反応は通常、手作業で行われますが、この場合、時間がかかりすぎ、また分析者を危険な化学物質に曝す可能性があります。このアプリケーションノートでは、誘導体化処理およびキャリブレーション標準の前処理を自動化する Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチの能力を実証します。サンプル前処理ワークベンチが前処理した標準から生成された検量線は、手作業で前処理した標準の検量線よりも高い直線性を示します。自動化されたメソッドでは、使用される溶媒の量や消耗品の数が大幅に削減され、分析者による操作時間も大きく短縮されます。また、生成される化学廃棄物の量も減ります。安物の植物油脂が混入している EV00 の検出には、サンプル前処理ワークベンチで前処理されたサンプルの FAME 分析結果を使用しました。

実験手法

標準および試薬

GLC 参照標準 GLC-603 (FAME) とウンデカン酸メチル (ISTD) は、Nu-Chek Prep, Inc. (ミネソタ州エリジアン) から入手しました。三フッ化ホウ素-メタノール (50 % w/v) と水酸化ナトリウム (試薬グレード) は Sigma-Aldrich (ミズーリ州セントルイス) から購入しました。ヘキササン (試薬グレード) とメタノール (HPLC グレード) は、Burdick and Jackson (ミシガン州マスキーゴン) から入手しました。

機器

誘導体化反応およびキャリブレーション標準の前処理は Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチで行いました。サンプル分析は Agilent 7683A オートサンブラを搭載した Agilent 6890A GC に Agilent 5973 シリーズ MSD または Agilent 水素炎イオン化検出器 (FID) を組み合わせて行いました。GC/MS/FID 条件を表 1 に、自動サンプル前処理ワークベンチ誘導体化の手順を表 3 に示します。

表 1. GC/MS/FID 実行条件

GC	
カラム	Agilent HP-88、60 m x 0.25 mm、0.20 µm (p/n 112-8867)
注入量	1 µL
注入口	スプリット比 100:1
注入口温度	250 °C
ライナ	スプリットライナ、シングルテーパー、不活性処理済 (p/n 5183-4711)
キャリアガス	ヘリウム (He)、定流量モード、1 mL/min オープン温度
プログラム	140 °C で 5 分間保持 4 °C/min で 240 °C 0 分間保持 総分析時間 30 分間
MS	
トランスファーライン温度	280 °C
溶媒待ち時間	4 分
取り込みモード	スキャン、40~500 amu
FID	
温度	300 °C

統計解析

主成分分析には、Agilent MassProfiler Professional ソフトウェアを使用しました。

結果と考察

キャリブレーションの直線性

図 1 に一般的な FAME クロマトグラフィー分離を示します。6 種類の FAME キャリブレーション標準は、手作業、およびサンプル前処理ワークベンチの両方により、GLC-603 標準の FAME 濃度に応じて、0.001 ~ 0.1 mg/mL および 0.040 ~ 40 mg/mL の範囲で前処理しました。すべての検量線は、作成した濃度範囲で良好な直線性を示しました (図 2)。

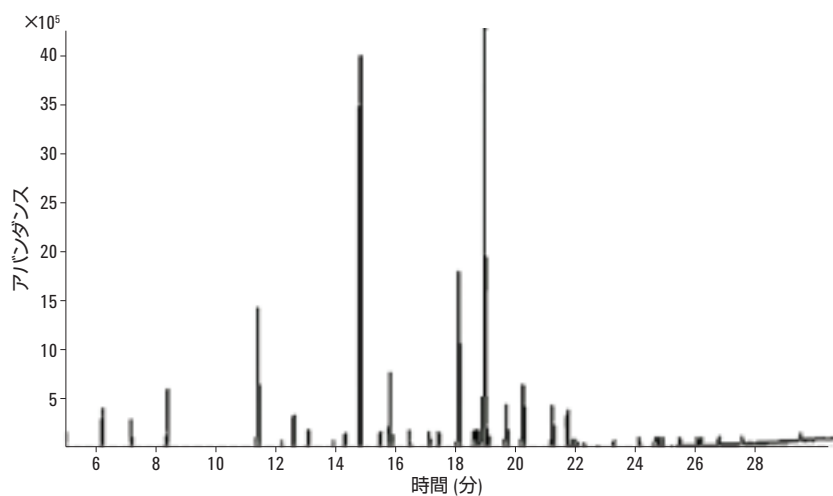


図 1. Agilent 5973 シリーズ GC/MSD を使用したリファレンス標準 GLC-603 の分析クロマトグラム。

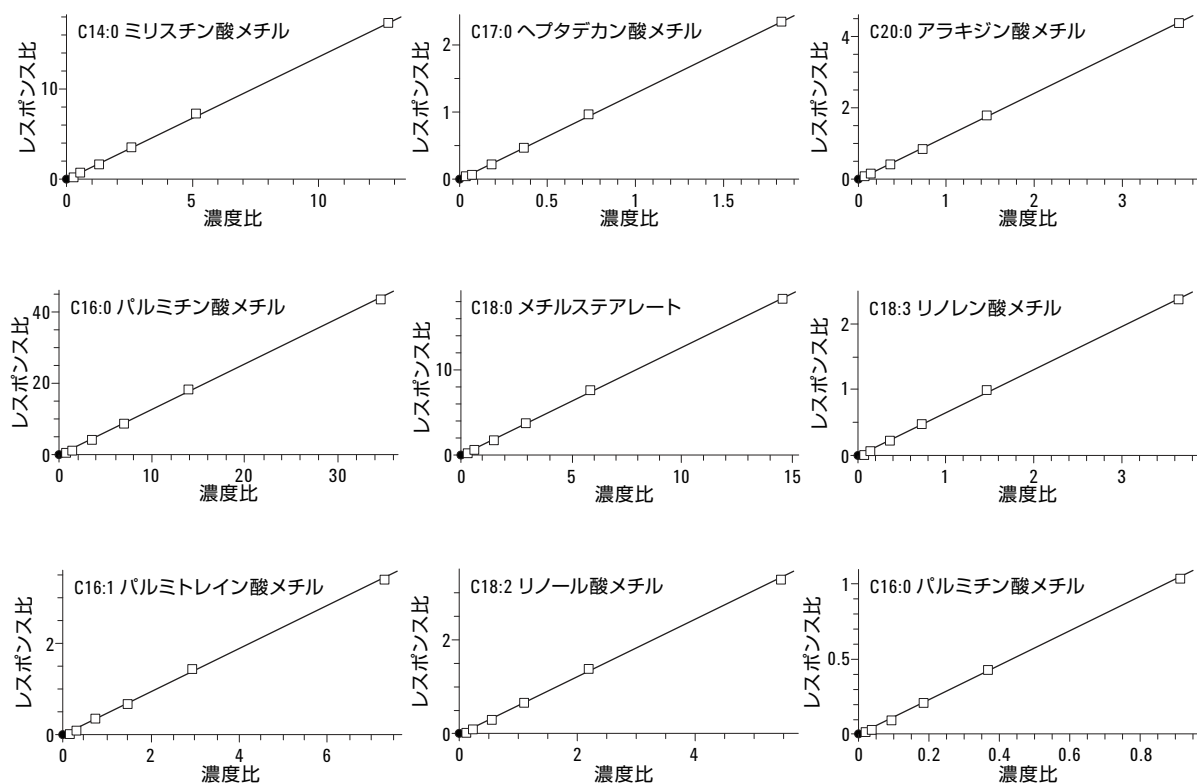


図 2. FAME 標準の代表的な検量線。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用。

サンプル前処理ワークベンチを使用して前処理した検量線の相関係数は一様に高く、すべての脂肪酸に対する平均相関係数 (R2) は、手作業で前処理した場合の検量線では 0.995 だったのに対し 0.999 でした (表 2)。6 回の繰り返しに対して行った分析の相対標準偏差 (RSD) は、キャリブレーション標準を手作業、自動のどちらで前処理した場合でも 5 % 未満でした。

表 2. 検量線の直線性

FAME	鎖	相関係数 (R ²)	
		手作業	Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ
ミリスチン酸メチル	C14:0	0.9919	0.9994
パルミチン酸メチル	C16:0	0.9901	0.9992
パルミトレイン酸メチル	C16:1	0.9943	0.9991
ヘプタデカン酸メチル	C17:0	0.9989	0.9997
メチルステアレート	C18:0	0.9906	0.9996
オレイン酸メチル	C18:1	0.9912	1.0000
バクセン酸メチル	C18:1	0.9961	0.9987
リノール酸メチル	C18:2	0.9957	0.9994
アラキジン酸メチル	C20:0	0.9969	0.9997
リノレン酸メチル	C18:3	0.9970	0.9994
11-エイコセン酸メチル	C20:1	0.9976	0.9989
ベヘン酸メチル	C22:0	0.9997	0.9997
リグノセリン酸メチル	C24:0	0.9989	0.9999

表 3. 自動および手作業による誘導体化のステップ

ステップ 番号	自動	手作業
1	ヘキサンで希釈したオイルサンプル 10 µL を追加 (オイル:ヘキサン/50:50)。	サンプル 50 mg を 15 mL の遠心分離チューブに入れる。
2	内部標準 3.3 µL を追加。	2 N NaOH メタノール溶液を 2 mL 追加。
3	2 N NaOH メタノール溶液を 120 µL 追加。	80 °C で 1 時間加熱。その後、冷ます。
4	1,500 rpm で 20 秒間混合。	25 % BF ₃ メタノール溶液を 2 mL 追加。
5	70 °C で 5 分間加熱。その後、5 分間冷ます。	80 °C で 1 時間加熱。その後、冷ます。
6	12.5 % の三フッ化ホウ素 (BF ₃) メタノール溶液を 240 µL 追加。	水 を 5 mL、ヘキサンを 5 mL 追加。
7	1,500 rpm で 20 秒間混合。	よく振る。
8	70 °C で 5 分間加熱。その後、5 分間冷ます。	固定相が分離または遠心分離するまでそのままにしておく。
9	水 300 µL を追加。	上澄みを GC オートサンブラバイアルに移す。
10	ヘキサン 300 µL を追加。	
11	1,500 rpm で 20 秒間混合。	
12	最上層 (300 µL) を新しい GC バイアルに移す。	

自動誘導体化

表 3 は、手作業による誘導体化の手順とサンプル前処理ワークベンチで自動化された手順を比較したものです。自動化された手順の方が細かいステップに分かれています。オペレータの操作時間、試薬や溶媒の使用量、廃棄コストが大幅に削減されます。誘導体化を手作業、自動のどちらで行っても、スペイン産 EV00 の脂肪酸の組成は基本的に同一で (図 3)、回収率は自動メソッドを使用した場合の方が全般的により良好でした。相対標準偏差 (RSD) も 0.00~8 % とどちらのメソッドでもほぼ同じでした (表 4)。

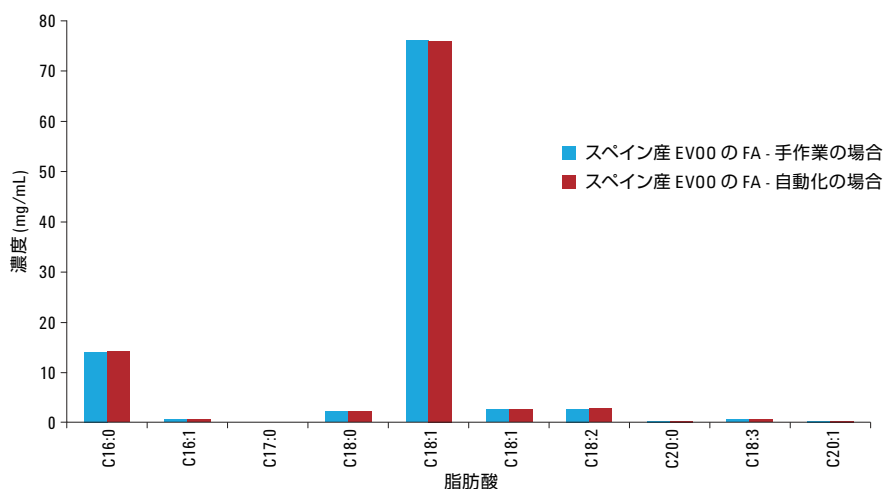


図3. 手作業による方法およびAgilent 7696A サンプル前処理ワークベンチで自動誘導体化する方法を使って測定した脂肪酸の組成の比較

表4. 手作業および自動 FAME 誘導体化を使ったオリーブオイルに含まれる脂肪酸の組成の測定結果 (n = 6)

FAME	鎖	RT (分)		スペイン産 EV00		カリフォルニア産 EV00	
				手作業	Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ	手作業	Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ
パルミチン酸メチル	C16:0	14.985	mg/mL	109.36	109.52	103.35	104.78
			SD*	3.53	3.54	2.94	4.40
			%RSD	3.23	3.23	2.84	4.20
パルミトレイン酸メチル	C16:1	15.994	mg/mL	5.53	5.53	3.95	4.74
			SD*	0.39	0.39	0.39	0.00
			%RSD	7.00	7.00	9.80	0.00
メチルステアレート	C18:0	18.333	mg/mL	18.11	17.31	17.31	17.63
			SD*	0.60	0.72	0.72	0.80
			%RSD	3.33	4.14	4.14	4.52
オレイン酸メチル	C18:1	19.182	mg/mL	592.64	584.45	568.82	563.26
			SD*	15.60	19.22	14.09	26.65
			%RSD	2.63	3.29	2.48	4.73
バクセン酸メチル	C18:1	19.192	mg/mL	20.17	20.17	17.94	18.26
			SD*	0.72	0.72	0.39	0.39
			%RSD	3.56	3.56	2.17	2.13
リノール酸メチル	C18:2	19.826	mg/mL	21.91	22.07	45.56	45.56
			SD*	0.60	0.72	1.11	1.53
			%RSD	2.75	3.25	2.44	3.35
アラキジン酸メチル	C20:0	21.467	mg/mL	1.91	1.91	1.91	2.87
			SD*	0.00	0.00	0.00	0.00
			%RSD	0.00	0.00	0.00	0.00
リノレン酸メチル	C18:3	21.964	mg/mL	4.92	4.92	4.13	4.44
			SD*	0.39	0.39	0.49	0.49
			%RSD	7.90	7.90	11.92	11.07
11-エイコセン酸メチル	C20:1	22.273	mg/mL	1.91	1.91	1.91	2.87
			SD*	0.00	0.00	0.00	0.00
			%RSD	0.00	0.00	0.00	0.00

*SD = 標準偏差

オリーブオイルへの偽和物混入

オリーブオイルへの偽和物混入の検出にこのメソッドを使用できるかどうかを判断するために、数種類の植物油脂を分量を変えてオリーブオイルに加えました。純粋な植物油脂とオリーブオイルのサンプル、およびその混合物をサンプル前処理ワークベンチを使って誘導体化し、GC で分析しました。図 4 はその分析結果の一例で、コーン油をイタリア産 EV00 に追加したものです。コーン油を加えると、それが 10 % v/v 程度であっても、脂肪酸の分布に明らかな変化が見られます。コーン油の割合が増えると同時に、オレイン酸メチル (C18:1) のピークが徐々に低くなり、一方で、リノール酸メチル (C18:2) のピークは反対に高くなっています。

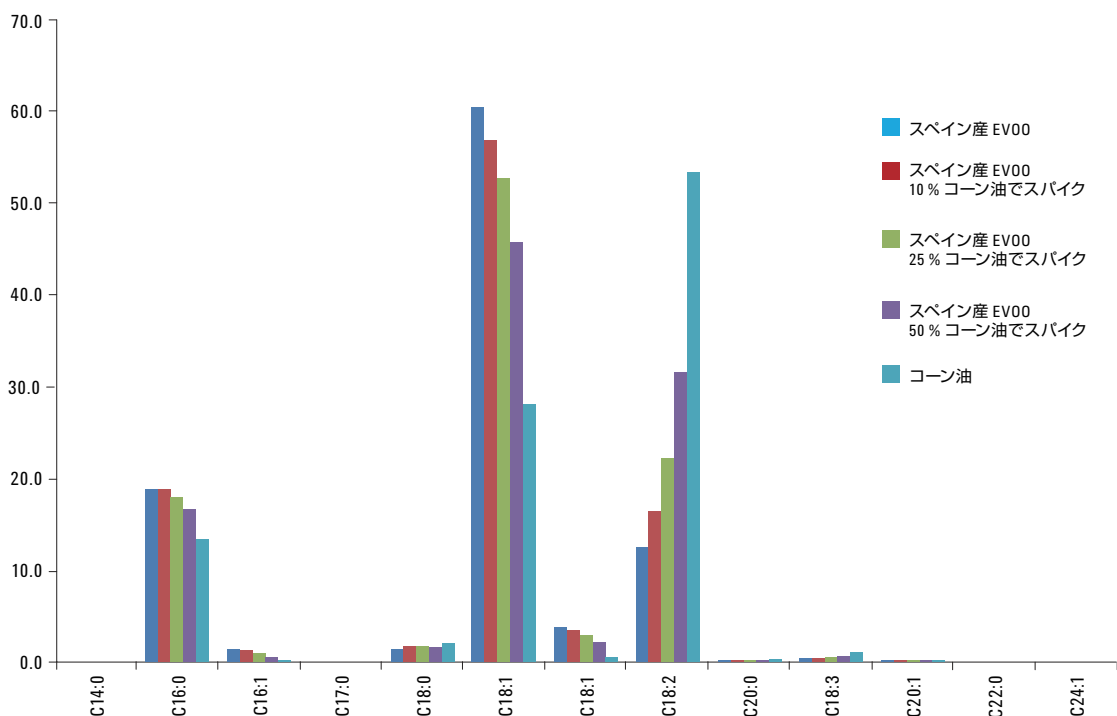


図 4. コーン油をスパイクしたイタリア産オリーブオイルの FAME 分析。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ自動誘導体化メソッドを使用。

さまざまなレベルの偽和物混入を区別できることを確認するために、Agilent MassProfiler Professional ソフトウェアを使用して主成分分析 (PCA) を行いました。PCA はよく使用される教師なし多変量解析手法の 1 つで、データの識別力を維持しながら、データ次元を縮小することができます。PCA では、測定した変数を相関関係のない主成分に変換します。各主成分はオリジナルの変数の線形結合です。この手法を品質管理の手段として使用し、データがどのようにクラスター化されているかという概念を示し、サンプルの外れ値を特定することができます。さまざまな量のコーン油が混入しているイタリア産オリーブオイルのサンプル間で、量を変えてエンティティの PCA を行った結果、データが明確にグループ化されることを確認できました (図 5)。わずか 10 % のコーン油混入でも簡単に識別できました。グレープシードオイルなどその他の植物油脂の混入したオリーブオイルでも同様の結果が得られました (データは掲載されていません)。

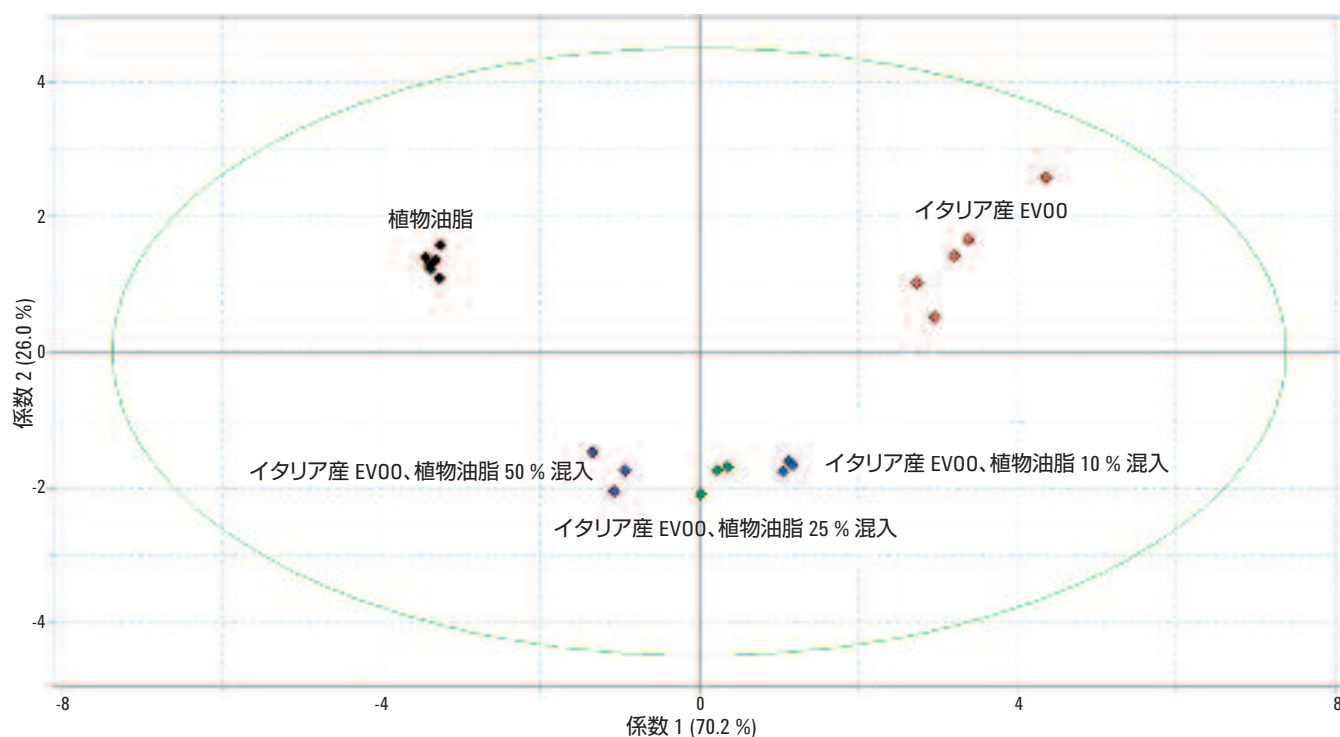


図 5. コーン油が混入しているオリーブオイルの PCA 分析。わずか 10 % の偽和物混入でも識別できることがわかります。

結論

FAME 分析において、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチでキャリブレーション標準の自動前処理を行った結果、検量線は手作業で前処理したものよりも直線性が高くなります。6 回の繰り返し分析の精度は、これら 2 つのメソッドで同等でした。オペレータの操作時間と危険な化学物質への曝露はいずれも大幅に削減されました。また、溶媒の使用量は 17 分の 1 になり、同時に消耗品の使用量と廃液の量も減ります。したがって、このメソッドはオリーブオイルへの偽和物混入を確認するには理想的で、Agilent MassProfiler Professional ソフトウェアで実行される統計解析を使用すれば簡単に判断できます。

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、
アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2014
Published in Japan January 13, 2015
5991-5172JAJP



Agilent Technologies