

## 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

#### 著者

Yun Zou  
Agilent Technologies  
(Shanghai) Co.Ltd,  
Shanghai 200131 P.R.China

Hua Wu  
Agilent Technologies  
(China) Co.Ltd,  
Beijing 100102 P.R.China

#### 概要

脂肪酸メチルエステル (FAME) の分析は、食品中の脂質フラクションの特性解析に使用されます。この分析は、食品分析における最も重要なアプリケーションの 1 つです。このアプリケーションノートでは、Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME、Agilent J&W DB-FastFAME、および Agilent J&W DB-FATWAX ウルトライナート GC カラムを用いた 37 成分の FAME 標準混合物の分離について説明します。CP-Sil 88 for FAME GC カラムを用いることにより、高い分離能が得られました。高速高分離 DB-FastFAME カラムにより、37 成分の FAME がわずか 8 分で非常に適切に分離されました。一方、DB-FATWAX ウルトライナートカラムは、大部分の飽和および多価不飽和 FAME に対して独自の選択性を示しています。

## はじめに

脂質は、食品栄養および食品化学の研究分野で重要な役割を果たしています。脂質の脂肪酸組成物は、飽和、一価不飽和、および多価不飽和化合物の複雑な混合物であり、さまざまな炭素鎖長から構成されています。体内の脂肪酸の役割はその構造に応じて異なるため、食品に含まれる脂肪酸について詳細な組成的分析を実施する必要があります。脂肪酸メチルエステル (FAME) 誘導体の GC 分析は、食品内の脂質とトランス脂肪含有量の合計を測定する際の脂質の特性解析における重要な手段です<sup>1,2</sup>。異なる固定相、およびカラム長、内径、膜厚などその他のカラム寸法の選択は主に、分離全体における脂肪酸の組成と要件の複雑さに応じて異なります。

ポリエチレングリコール (PEG) タイプのキャピラリカラムは、乳脂中の酪酸の測定など、海産魚の油や牛肉サンプルの FAME 分析に日常的に使用されています。これは、PEG キャピラリカラムが炭素鎖長と不飽和の程度に応じて、FAME 異性体を溶出するためです。ただし、PEG カラムの重大な制約事項の 1 つとして、シストランス識別機能が備えられていないという点が報告されています。シストランス異性体はすべて共溶出します<sup>3</sup>。

食品検査用の多くの規制メソッドでは、GC/FID による脂肪酸組成の測定時に、特定のシストランス脂肪酸異性体を分離する必要があります。食用油などのさらに複雑なサンプルを分析する場合、シアノプロピル固定相で被覆されたキャピラリカラムを用いることにより、FAME で優れた分離能が得られます。中含量シアノプロピル相の Agilent J&W DB-FastFAME GC カラムを使用することにより、複雑な FAME 混合物が迅速かつ非常に適切に分離され、シストランス分離が達成されます。詳細なシストランス分離を実施するには、高極性シアノポリシロキサンタイプのカラム (CP-Sil 88 for FAME/HP-88) が適しています。ただし、通常、炭素鎖長のいくつかはシアノポリシロキサン相で重なっており、ピーク同定で問題を引き起こします。その結果、良好な FAME 分離を達成するために、長い GC カラム (例えば、100 m) と長い分析時間が必要になりますが、これは生産性の低下につながります。

37 成分の FAME 標準混合物は、多数の食品サンプル中の脂肪酸組成を模倣するように設計されており、多くの食品中の主要な脂肪酸メチルエステル (FAME) を同定するのに使用できます。この混合物には C4:0 ~ C24:1 の範囲の FAME が含まれていますが、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 (表 1)。

このアプリケーションノートでは、FAME 分析専用の 3 種類のキャピラリカラム、Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME、DB-FastFAME、および Agilent J&W DB-FATWAX ウルトライナート GC カラムを使用して、37 成分の FAME 混合物を分析する方法について説明します。

## 実験方法

### 化学物質および標準試料

37 成分の FAME 標準混合物 (部品番号 CDAA-252795-MIX-1 mL) は、ANPEL Scientific Instrument Co. Ltd (上海、中国) から購入しました。表 1 に、混合物中の各成分の濃度を示します。

PUFA No.1 (海産由来)、PUFA No.2 (動物由来)、および PUFA No.3 (メンヘーデン油由来) は、Minn Bolin Bio-Tech Co. LTD (深圳、中国) から購入しました。この混合物は 100 mg 非希釈混合物として使用可能ですが、それぞれアセトンを加えて 100 倍に希釈しました。

### 装置構成

分析は、水素炎イオン化検出器 (FID) を備えた Agilent 7890B GC を用いて実施しました。サンプルの導入には、5  $\mu$ L シリンジ (部品番号 G4513-80213) とスプリット/スプリットレス注入ポートを備えた Agilent 7683B 自動液体サンプラを用いました。装置構成と分析条件を、表 2 (CP-Sil 88 for FAME カラム)、表 3 (DB-FastFAME カラム)、表 4 (高速高分離 DB-FastFAME カラム)、および表 5 (DB-FATWAX UI カラム) にまとめて示します。表 6 に、この実験で使用したその他の消耗品を示します。

表 1. 37 成分の FAME 混合物

番号	成分 (メチルエステル)	省略記号・略語	濃度 (mg/mL)
1	酪酸	C4:0	403
2	カプロン酸	C6:0	404
3	カプリル酸	C8:0	406
4	カプリン酸	C10:0	403
5	ウンデカン酸	C11:0	200
6	ラウリン酸	C12:0	399
7	トリデカン酸	C13:0	200
8	ミリスチン酸	C14:0	397
9	ミリストレイン酸	C14:1	202
10	ペンタデカン酸	C15:0	202
11	シス-10-ペンタデセン酸	C15:1	200
12	パルミチン酸	C16:0	599
13	パルミトレイン酸	C16:1	200
14	ヘプタデカン酸	C17:0	201
15	シス-10-ヘプタデセン酸	C17:1	200
16	ステアリン酸	C18:0	399
17	オレイン酸	C18:1 シス (n9)	400
18	エライジン酸	C18:1 トランス (n9)	200
19	リノール酸	C18:2 シス (n6)	203
20	リノレライド酸	C18:2 トランス (n6)	200
21	γ-リノレン酸	C18:3n6	203
22	α-リノレン酸	C18:3n3	199
23	アラキジン酸	C20:0	406
24	シス-11-エイコセン酸	C20:1(n9)	199
25	シス-11,14-エイコサジエン酸	C20:2	200
26	シス-8,11,14-エイコサトリエン酸	C20:3n6	202
27	シス-11,14,17-エイコサトリエン酸	C20:3n3	200
28	アラキドン酸	C20:4n6 (ARA)	198
29	cis-5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸	C20:5n3 (EPA)	201
30	ヘニコサン酸	C21:0	201
31	ベヘン酸	C22:0	400
32	エルカ酸	C22:1n9	202
33	シス-13,16-ドコサジエン酸	C22:2	199
34	cis-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸	C22:6(n3) (DHA)	197
35	トリコサノン酸	C23:0	200
36	リグノセリン酸	C24:0	405
37	ネルボン酸	C24:1	201

表 2. Agilent J&amp;W CP-Sil 88 for FAME メソッド条件

パラメータ	設定値
GC システム	Agilent 7890B/FID
カラム	Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME, 100 m × 0.25 mm, 0.20 μm (部品番号 CP7489)
キャリアガス流量	ヘリウム, 32 psi, 定圧モード
注入口	スプリット/スプリットレス, 260 °C, スプリット比 50:1
オープン	100 °C (5 分間)、 8 °C/min で 180 °C まで昇温 (9 分間)、 1 °C/min で 230 °C まで昇温 (15 分間)
FID	260 °C, 水素:40 mL/min 空気:400 mL/min メークアップガス:25 mL/min
注入量	1 μL

表 3. Agilent J&amp;W DB-FastFAME メソッド条件

パラメータ	設定値
GC システム	Agilent 7890B/FID
カラム	Agilent J&W DB-FastFAME, 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm (部品番号 G3903-63011)
キャリアガス流量	ヘリウム, 14 psi, 定圧モード
注入口	スプリット/スプリットレス, 250 °C, スプリット比 50:1
オープン	50 °C (0.5 分間)、 25 °C/min で 194 °C まで昇温 (1 分間)、 5 °C/min で 245 °C まで昇温 (3 分間)
FID	280 °C, 水素:40 mL/min 空気:400 mL/min メークアップガス:25 mL/min
注入量	1 μL

表 4. 高速高分離 Agilent J&amp;W DB-FastFAME メソッド条件

パラメータ	設定値
GC システム	Agilent 7890B/FID
カラム	Agilent J&W DB-FastFAME, 20 m × 0.18 mm, 0.20 μm (部品番号 G3903-63010)
キャリアガス流量	水素, 28 psi, 定圧モード
注入口	スプリット/スプリットレス, 250 °C, スプリット比 50:1
オープン	80 °C (0.5 分間)、 65 °C/min で 175 °C まで昇温、 10 °C/min で 185 °C まで昇温 (0.5 分間)、 7 °C/min で 230 °C まで昇温
FID	280 °C, 水素:40 mL/min 空気:400 mL/min メークアップガス:25 mL/min
注入量	1 μL

表 5. Agilent J&amp;W DB-FATWAX ウルトライナートメソッド条件

パラメータ	設定値
GC システム	Agilent 7890B/FID
カラム	Agilent J&W DB-FATWAX ウルトライナート, 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm (部品番号 G3903-63008)
キャリアガス流量	ヘリウム, 定流量モード:30 cm/s
注入口	スプリット/スプリットレス, 250 °C, スプリット比 50:1
オープン	40 °C (2 分間)、 55 °C/min で 171 °C まで昇温 (25 分間)、 10 °C/min で 215 °C まで昇温 (25 分間)
FID	280 °C, 水素:40 mL/min 空気:400 mL/min メークアップガス:25 mL/min
注入量	1 μL

## 結果と考察

CP-SIL 88 for FAME または HP-88 のような高極性シアノプロピルシロキサン相は、シストランス FAME の分離を改善するという明確な目的のもとに設計されました。トランス脂肪酸測定用の高極性シアノプロピルシロキサンカラムの効能については、以前詳細に説明しました。ただし、例えば、C18:3n6 または C18:3n3、C20:0; C20:3n3、C22:1n9、C20:4n6 など多数のアプリケーションにおける 37 成分の FAME 分析では、溶出パターンに炭素鎖の大幅な重なりが存在します<sup>3</sup>。これは、ピーク同定の問題を引き起こす可能性があります。図 1 に、CP-Sil 88 for FAME カラムと GC-FID を用いた 37 成分の FAME 参照標準の最適化されたメソッド分離の結果を示します。優れた選択性により、37 成分すべてが 1 回の分析でベースライン分離されました。

37 成分の FAME 標準混合物中のすべての化合物で高い分離能を達成するために、100 m CP-Sil 88 for FAME GC カラムを選択した結果、分析時間は 70 分を超えました。

表 6. 消耗品

パラメータ	設定値
バイアル	茶色、ラベル付き、認定済み、2 mL、スクリュートップバイアルパック (部品番号 5182-0554)
セプタム	ノンスティック BTO セプタム (部品番号 5183-4757)
カラムナット	セルフタイト、注入口/検出器 (部品番号 5190-6194)
フェエラル	15 % グラファイト-85 % ポリイミド、ショート、内径 0.4 mm、0.1~0.25 mm カラム用 (10 個、部品番号 5181-3323)
注入口ライナ	Agilent ウルトライナートスプリットライナ、ガラスウール入り (部品番号 5190-2295)
注入口シール	ウルトライナート、金メッキ、ワッシャ付き (部品番号 5190-6144)

複雑な混合物中でのこれらの種類の FAME 分析に用いられている一般的な代替手段としては、中含量シアノプロピル相の GC カラムもあります。J&W DB-FastFAME GC カラムは FAME 混合物の高速分離用に特別に設計されました。シス異性体とシアノ双極子の強い相互作用により、シス異性体より前にトランス異性体が溶出します。このため、シスおよびトランス FAME の一部が分離します。

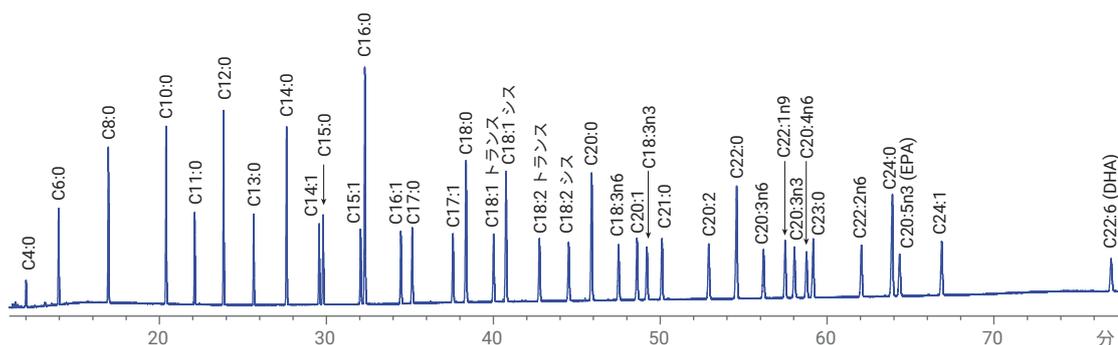


図 1. 100 m × 内径 0.25 mm、0.25 μm Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME カラムでメソッド 1 を使用した 37 成分の FAME 標準混合物の GC/FID クロマトグラム (表 2 を参照)

### J&W DB-FastFAME GC カラム

37 成分の FAME 標準混合物を分析するために、30 m × 0.25 mm 内径、0.25 μm DB-FastFAME カラムを選択しました。図 2 は一般的な GC-FID クロマトグラムを示しています。標準混合物中のすべての化合物が良好に分離されており、分析時間も 18 分未満でした。

高速高分離 0.18 mm 内径 GC カラムは、測定性能を低下させずに生産性を向上させるための 1 つの選択可能な手段です。これは、内径を小さくすることにより、1 m あたりのカラム効率が向上し、分離能を一定に維持したままカラム長を短くすることができるためです。キャリアガスとして水素を使用すると、ほぼ同等の分離能で分析がさらに高速化されます。これは、水素の

拡散性が高いため、最適なキャリアガスの直線速度が高くなることによります。図 3 に、20 m × 内径 0.18 mm、0.20 μm DB-FastFAME カラムにおいて、37 成分の FAME 標準混合物を分離した結果を示します。このメソッドにより、重要な AOAC ペアを含む、標準混合物中の化合物がすべて完全に分離され (分離能 > 1.5)、分析時間も 8 分未満に短縮されました。これは、高速高分離カラムを使用すると、分離能を低下させずに高速サンプルスループットを達成できる可能性があることを示しています。

図 2 と 3 では、2 組の化合物ペア (EPA/c22:0 および DHA/C24:1) の溶出順序の違いを観察できます。温度プログラム実行中に注入口圧力を変更すると、効果的なカラム温度が変わることがあります。DB-FastFAME GC カラムにおいて、混合

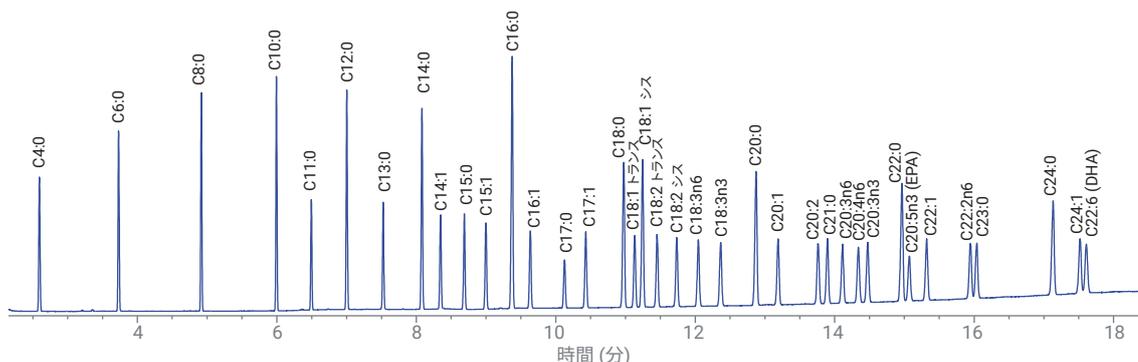


図 2. 30 m × 内径 0.25 mm、0.25 μm Agilent J&W DB-FastFAME カラムでメソッド 2 を使用した 37 成分の FAME 標準混合物の GC/FID クロマトグラム (表 3 を参照)

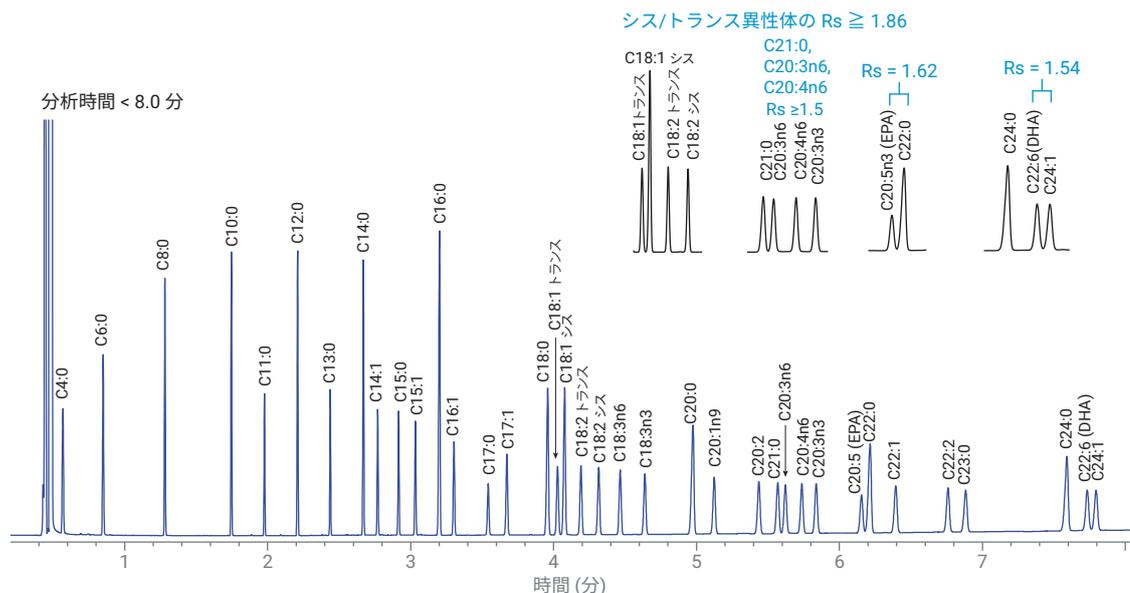


図 3. 20 m × 内径 0.18 mm、0.20 μm Agilent J&W DB-FastFAME カラムでメソッド 3 を使用した 37 成分の FAME 標準混合物の GC/FID クロマトグラム (表 4 を参照)

物中の EPA および DHA の分析メソッドの最適化は、キャリアガスを変更し異なる注入圧力と膜厚を用いる場合、これら 2 組の化合物ペアの溶出順序を変更することで可能になります。

PEG カラム (WAX カラム) は、乳脂中の酪酸の測定など、代表的な食用油と脂質、海産魚の油、牛肉サンプルの FAME 分析に日常的に使用されています。これは、PEG カラムが炭素鎖長と不飽和の程度に応じて、FAME 異性体を溶出するためです。ただし、例えば、C20:3 n6 と C21:1 の分離の失敗、C22:6 と C24:1 の共溶出など、一部には重なりが存在するため、従来の WAX カラムではシストランス異性体を分離できませんでした。

そこで性能が向上した J&W DB-FATWAX ウルトライナート (UI) GC カラムを使用しました。図 4 に、30 m × 内径 0.25 mm、0.25 μm DB-FATWAX ウルトライナート GC カラムにおいて、37 成分の FAME 標準混合物を分離した結果を示します。高い分離能が得られていますが、例外として C18:1 シスと C18:1 ト

ランス異性体という 1 つのペアでは、分離能は 0.56 です。通常、この化合物のペアは共溶出し、他の WAX カラムでは 1 つのピークのように見えます。シストランス異性体の別のペアである C18:2 シスと C18:2 トランスは、DB-FATWAX UI GC カラムでベースライン分離できます。これは、DB-FATWAX UI カラムが最初にシス異性体を溶出させることにより、シストランス異性体の一部が分離されたことを示しています。

人間栄養にとって重要な複数の二重結合を備えた多価不飽和脂肪酸 (PUFA) のグループは、C20:5n3 (EPA)、C22:6n3 (DHA)、C20:4n6 (ARA) のようなオメガ3 およびオメガ6 脂肪酸です。図 4 に、これらのオメガ3 およびオメガ6 FAME に対して得られた高い分離能を示します。図 5 ~ 7 では、PUFA 混合物に対して得られた分離結果の例を示します。EPA、DHA を含む主要な FAME は簡単に検出され、定量されています。

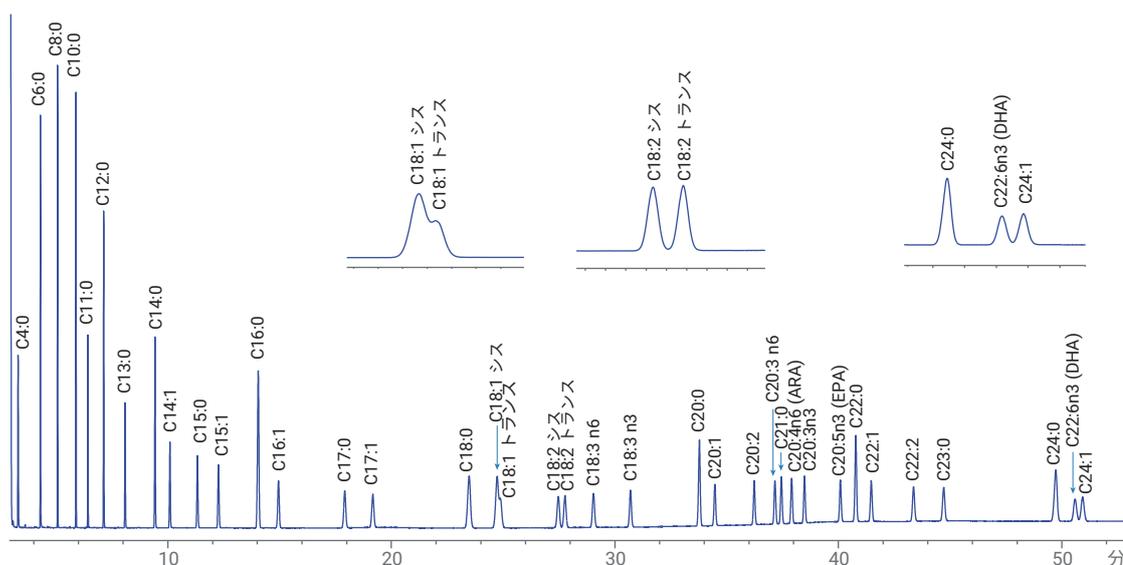


図 4. 30 m × 内径 0.25 mm、0.25 μm Agilent J&W DB-FATWAX ウルトライナート GC カラムでメソッド 4 を使用した 37 成分の FAME 標準混合物の GC/FID クロマトグラム (表 5 を参照)

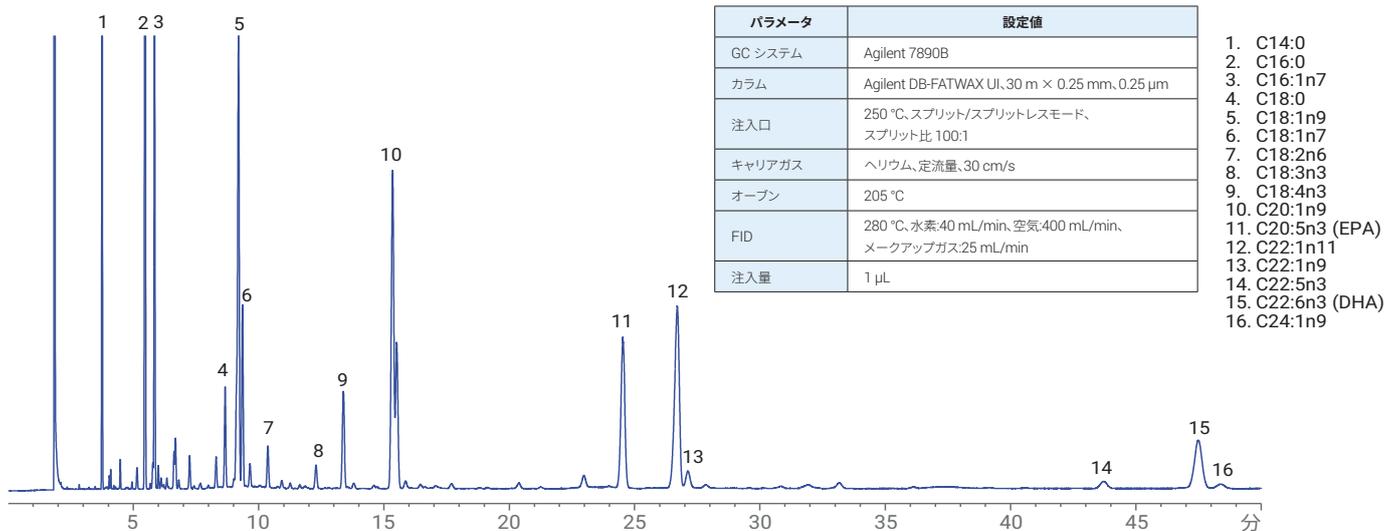


図 5. 30 m × 内径 0.25 mm, 0.25 μm Agilent J&W DB-FATWAX ウルトラライナート GC カラムでの PUFA No.1 混合物 (海産由来) の GC/FID クロマトグラム

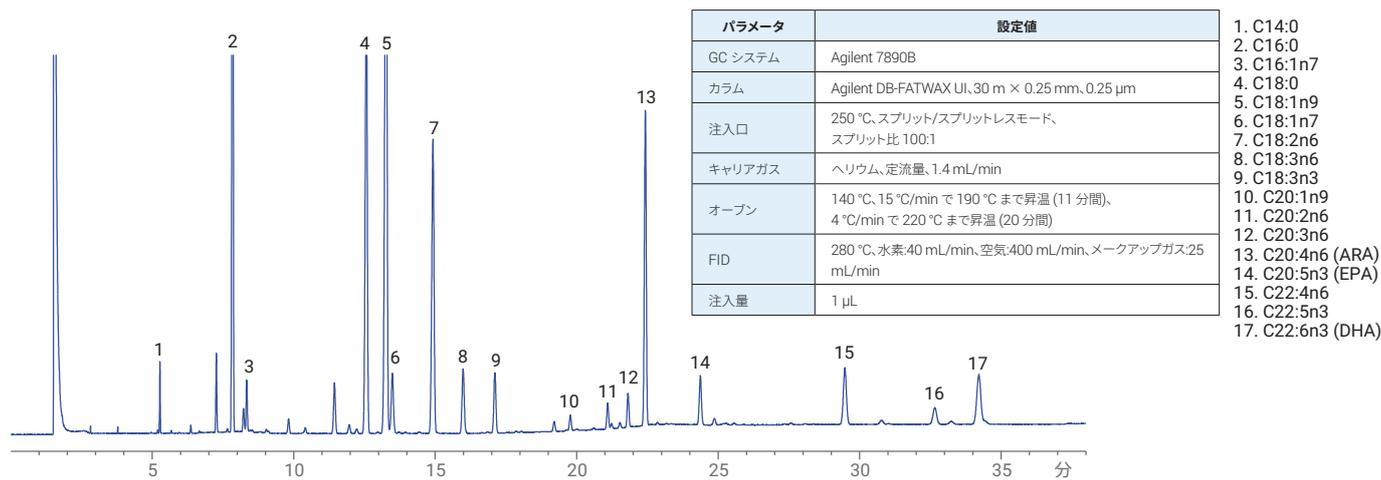


図 6. 30 m × 内径 0.25 mm, 0.25 μm Agilent J&W DB-FATWAX ウルトラライナート GC カラムでの PUFA No.2 混合物 (動物由来) の GC/FID クロマトグラム

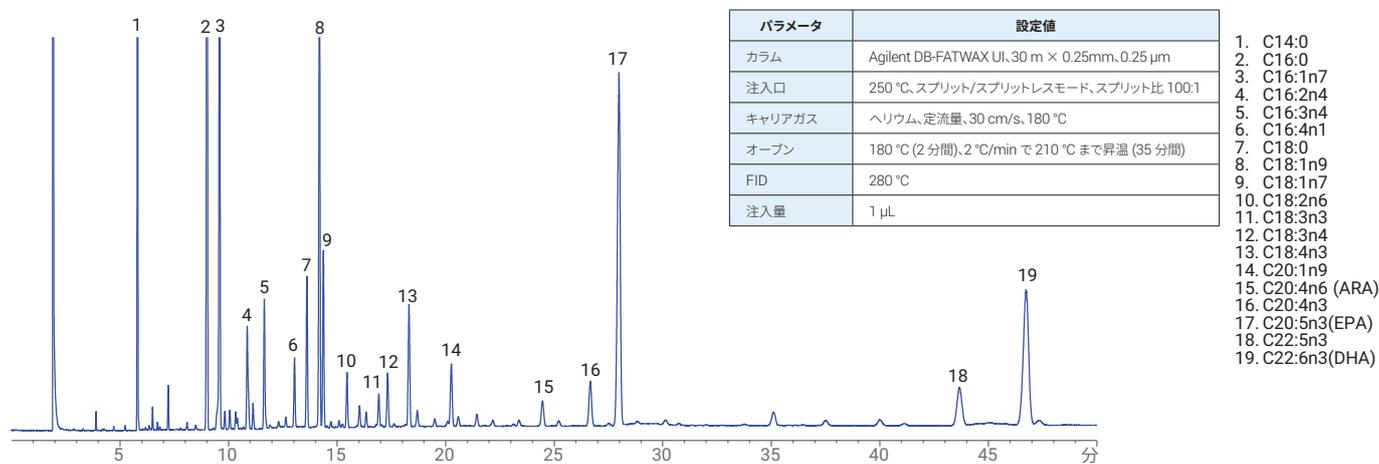


図 7. 30 m × 内径 0.25 mm, 0.25 μm Agilent J&W DB-FATWAX ウルトラライナート GC カラムでの PUFA No.3 混合物 (メンハーデン油由来) の GC/FID クロマトグラム

## 結論

このアプリケーションノートでは、FAME 分析専用の 3 種類のキャピラリーカラムを使用した、37 成分の FAME 標準混合物に対する分析結果の向上について説明しています。シストランス異性体を分離するには、高極性シアノプロピルシロキサン相 Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME カラムが適切な選択肢でした。この研究では、37 成分の FAME 標準混合物中のすべての化合物が CP-Sil 88 for FAME において、ベースライン分離されたことを示しました。また、Agilent J&W DB-FastFAME GC カラムでも、37 成分の FAME 標準混合物の分析で優れた分離能を達成できています。高速高分離内径 0.18 mm DB-FastFAME GC カラムでは、標準混合物中の化合物がすべて完全に分離されており、分析時間も 8 分未満に短縮できます。また、高速高分離カラムでは、分離能を低下させずに高速サンプルスループットを達成できる可能性があります。Agilent J&W DB-FATWAX UI カラムは、大部分の飽和および多価不飽和 FAME に対して独自の選択性を示しています。C18:1 シストランス異性体を除き、ARA、EPA、DHA などその他の FAME は、C18:2 シストランス異性体を含め、良好に分離されています。このカラムは、海産魚の油、牛肉脂質、主要なオメガ3 およびオメガ6 FAME の分析に最適です。

## 参考文献

1. AOAC Official Methods of Analysis (**2000**), method Ce 2-66.
2. IUPAC, Standard methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives, Blackwell Scientific Publications, IUPAC Method 2.301.
3. F. David, P. Sandra, A. K. Vickers. Column selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters. Agilent Technologies Application Note, publication number 5989-3760EN, **2005**.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタマコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2017, 2018

Printed in Japan, May 29, 2018

5991-8706JAJP