

揮発性有機酸と脂肪酸の分析の比較研究

DB-FATWAX ウルトライナートカラムと他の WAX GC カラム

著者

Yun Zou
Agilent Technologies
(Shanghai) Co., Ltd,

概要

このアプリケーションノートでは、水性 C2 ～ C7 遊離脂肪酸、C2 ～ C18 有機酸、および Agilent WAX UI テスト混合物の分析における Agilent J&W DB-FATWAX ウルトライナート GC カラムの性能を評価します。DB-FATWAX ウルトライナート GC カラムは、水性マトリックスの繰り返し注入において優れた安定性を示します。また、DB-FATWAX UI カラムは、Agilent J&W DB-FFAP GC カラムのような酸修飾 WAX カラムと比較して、短鎖揮発性有機酸で同等またはそれを上回るピーク形状を示します。実験の結果から、DB-FATWAX UI は非誘導体化揮発性有機酸と遊離脂肪酸の分析に関して、複数の他社製 WAX カラムよりも不活性度、熱安定性、リテンションタイムの再現性が優れていることがわかりました。

はじめに

さまざまな種類の揮発性有機酸および脂肪酸のモニタリングは、食品、香料、アルコール、飲料などの業界で必要とされる一般的な分析手法です。ライフサイエンス分野の研究ラボでは日常的に、バクテリア培地から抽出した脂肪酸のプロファイル进行分析することにより、バクテリアを同定しています¹。また、発酵時の嫌気性または好気性の消化作用について調べるために、短鎖有機酸 (C2 ~ C7) も定期的にモニタリングしています。この場合、ヘッドスペース/GC または液液抽出の後に GC 分析を組み合わせて使用できます。最も一般的なメソッドは、水中に酸をダイレクト注入することです²。非誘導体化揮発性有機酸は、GC による定量は困難です。その理由は、このような高極性化合物はカラムで活性サイトと強力に相互作用し、テーリングまたは分離が不十分なピークを生成することがあり、低濃度での定量が困難になるためです。いくつかの酸では、吸着が不可逆になることもあります。ダイレクト注入メソッドでは GC カラム固定相を使用する必要がありますが、これは強力な酸と水の中でも分解しないためです。

通常、脂肪酸は分析においてメチルエステルに誘導体化されます。食品業界の一般消費財を同定して定量するには通常、脂質および油中のさまざまな飽和および不飽和脂肪酸の比率を測定することにより、脂肪酸エステルを分析します³。これらの前処理手順は煩雑で時間がかかります。抽出プロセスにおいて、酸からエステルへの変換が不完全で、短鎖脂肪酸エステルが失われる可能性があります。そのため、誘導体化、抽出、およびクリーンアップ手順に関連する問題を取り除くために、非誘導体化有機酸と遊離脂肪酸を分析する必要があります。通常、これらの脂肪酸は 2 種類の GC カラムを用いて遊離型で分析します。1 つは FFAP カラムのような酸修飾 WAX カラムで、もう 1 つはウルトライナート WAX カラムです。

以前の記事では、DB-FATWAX UI カラムを使用した FAME の GC 分析について詳細に説明しました^{4,5}。このアプリケーションノートでは、DB-FATWAX UI、DB-FFAP、およびその他の WAX カラムを使用した遊離脂肪酸の分析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

テスト混合物中のすべての標準化合物と試薬は、ANPEL Scientific Instrument Co. Ltd (上海、中国) から購入しました。各標準化合物と溶媒の純度は 98 % を超えています。標準溶液混合物は、個別の純粋化合物から調製しました。WAX ウルトライナートテスト混合物⁶は、表 1 に示されている 12 種類の化合物から構成されており、表 4 のクロマトグラフィー条件に従って分析しました。

表 1. WAX UI テスト混合物、ジクロロメタン中

ピーク 番号	化合物	カラム量 (ng)
1	2-ノナン	3.3
2	デカナール	3.3
3	プロピオン酸	3.3
4	エチレングリコール	3.3
5	ヘプタデカン	1.65
6	アニリン	3.3
7	ドデカン酸メチル	3.3
8	2-クロロフェノール	3.3
9	1-ウンデカノール	3.3
10	ノナデカン	1.65
11	2-エチルヘキサン酸	6.6
12	エチルマルトール	6.6

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 を使用して実行しました。サンプルの導入には、5 μ 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使用しました。表 2 ～ 4 に、装置構成と分析条件をまとめて示します。表 5 に、この実験で使用したその他の消耗品のリストを示します。

表 2. メソッド 1 実験条件 (C2～C7 遊離脂肪酸水溶液)

パラメータ	設定値
GC システム	7890B/FID
カラム	J&W DB-FATWAX ウルトライナート、30 m、0.25 mm、0.25 μ m (部品番号 G3903-63008) J&W DB-FFAP、30 m、0.25 mm、0.25 μ m (部品番号 122-3232) 他社 1 および他社 2 製 WAX カラム、30 m、0.25 mm、0.25 μ m
キャリアガス流量	ヘリウム、42 cm/s、定流量モード
注入口	スプリット/スプリットレス、250 °C、スプリット比 30:1
オープン	162 °C 定温
FID	250 °C、水素: 40 mL/min、空気: 400 mL/min、メークアップガス: 25 mL/min
サンプル	0.06 ～ 0.13 % 各酸水溶液
注入量	0.1 μ L

表 3.メソッド 2 実験条件 (C2～C18 有機酸)

パラメータ	設定値
GC システム	7890B/FID
カラム	J&W DB-FATWAX ウルトライナート、30 m、0.25 mm、0.25 μ m (部品番号 G3903-63008) J&W DB-FFAP、30 m、0.25 mm、0.25 μ m (部品番号 122-3232) 他社 1 および他社 2 製 WAX カラム、30 m、0.25 mm、0.25 μ m
キャリアガス流量	ヘリウム、42 cm/s、定流量モード
注入口	スプリット/スプリットレス、280 °C、スプリット比 50:1
オープン	120 °C (2 分間)、5 °C/min で 140 °C まで昇温 (3 分間)、20 °C/min で 250 °C まで昇温 (10 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
サンプル	0.05 ～ 0.1 % ジクロロメタン中の各成分
注入量	1 μ L

表 4.メソッド 3 実験条件 (WAX UI テスト混合物)

パラメータ	設定値
GC システム	7890B/FID
カラム	J&W DB-FATWAX ウルトライナート、30 m、0.25 mm、0.25 μ m (部品番号 G3903-63008) J&W DB-FFAP、30 m、0.25 mm、0.25 μ m (部品番号 122-3232) 他社 1 および他社 2 製 WAX カラム、30 m、0.25 mm、0.25 μ m
キャリアガス流量	ヘリウム、40 cm/s、定流量モード
注入口	スプリット/スプリットレス、250 °C、スプリット比 75:1
オープン	130 °C 定温
FID	250 °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	0.5 μ L

表 5.消耗品

供給	説明
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バック (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)
フェーラル	15 % グラファイト/85 % ベスベル、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)
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)

結果と考察

水性 C2 ～ C7 遊離脂肪酸テスト混合物

GC 分析では、水中に溶解した遊離脂肪酸の直接注入は非常に困難です。強力な酸と水が存在するため、従来の WAX タイプの相は不安定で活性化してしまい、ピーク形状と再現性は不十分で寿命も短くなります。ライナの気化容量のオーバーロードを防止するために、水性サンプルの注入量は 1 μ L 未満にする必要があります。

図 1 に、J&W DB-FATWAX ウルトライナート (UI) カラムでの C2 ～ C7 遊離脂肪酸水溶液混合物の GC/FID クロマトグラムを示します。表 2 に、分析条件を示します。DB-FATWAX UI GC カラムのウルトライナート性能により、すべての酸が良好に分離され、シャープで左右対称なピーク形状が得られました。

分析の再現性とカラム性能の安定性を、水性 C2 ～ C7 遊離脂肪酸サンプルを 15 回注入することにより試験しました。図 2 は、水溶性サンプルの繰り返し注入によってリテンションタイムの安定性がドリフトしていないことを示しています。ピーク形状も、本分析の最後

まで維持されています。すべての遊離脂肪酸において、リテンションタイムの相対標準偏差 (RSD) は 0.03 % 未満で、絶対ピーク面積は 2 % 以内に収まっています。

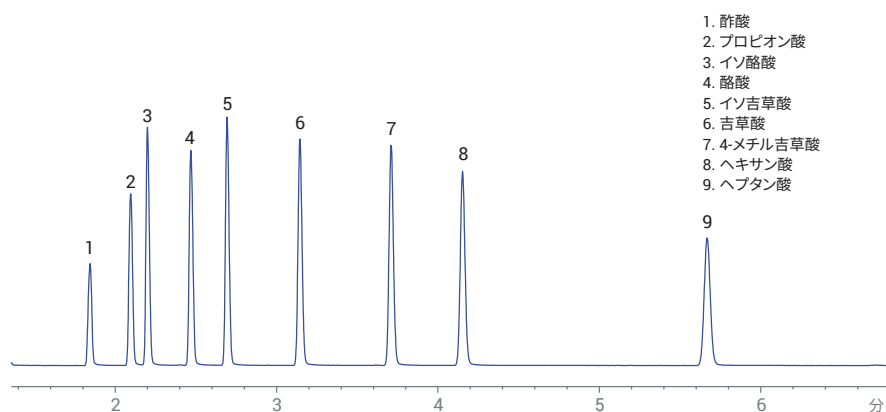


図 1. 30 m $\times$ 0.25 mm 内径、0.25 μ m J&W DB-FATWAX ウルトライナートカラムでの C2 ～ C7 遊離脂肪酸水溶液混合物の GC/FID クロマトグラム (表 2 に示した条件)

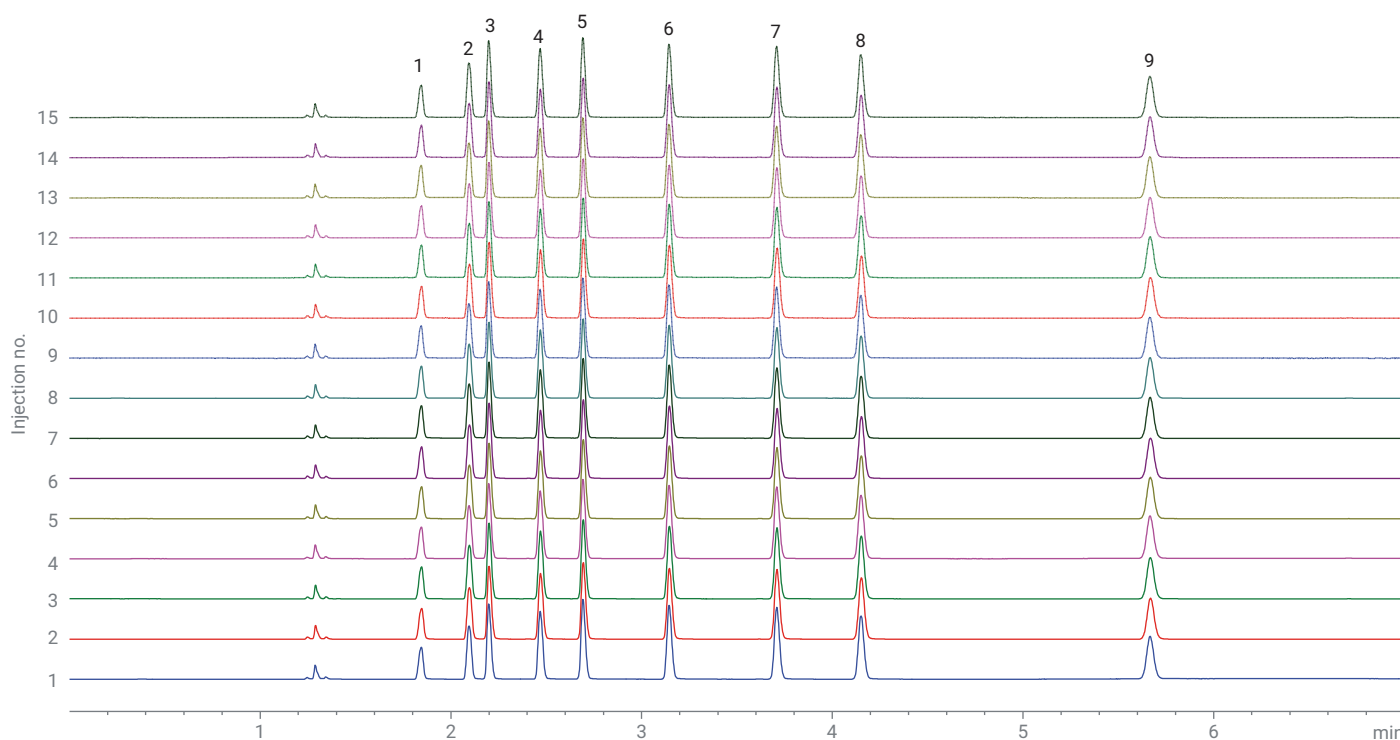


図 2. 図 1 と同じ水性 C2～C7 遊離脂肪酸サンプルの繰り返し注入により得られた GC/FID クロマトグラムの重ね表示

酸修飾 WAX カラムの DB-FFAP は主に、有機酸、遊離脂肪酸、または酸性不純物の定量が必要なサンプルの分析向けに設計されています。図 3 は、DB-FFAP カラムと DB-FATWAX UI カラム両方での水性 C2 ～ C7 遊離脂肪酸テスト混合物のクロマトグラムを示しています。分析完了までに要した時間は、DB-FFAP カラムで約 5 分、DB-FATWAX UI カラムで 6 分でした。両方のカラムで、すべての酸について優れたピーク形状と高い分離能が得られています。表 6 は、このクロマトグラムの各ピークのピーク高さの 10 % 位置でのピーク非対称性 (As.10 %) を示しています。DB-FATWAX UI での As.10 % は 0.98 ～ 1.16 の間で、DB-FFAP では 0.91 ～ 1.20 の間です。DB-FATWAX UI では、酢酸 (ピーク 1) およびイソ酪酸 (ピーク 3) という対称性のあるピークも得られています。

その他 2 つの他社製 WAX タイプカラムについても、同じ条件下で同じ試験を実施しました。水性 C2 ～ C7 遊離脂肪酸混合物を使用した場合、他社製 WAX カラムではピークテーリングが観察されました (図 4 および表 6)。特に、他社 1 製 WAX カラムではカラム活性と不安定相により、酢酸 (ピーク 1)、プロピオン酸 (ピーク 2)、イソ酪酸 (ピーク 3) などの重要な分析対象物において、リテンションタイムのドリフト、分離が不十分なピーク、応答の欠落も引き起こしています。同じ結果が図 6 に示されています。

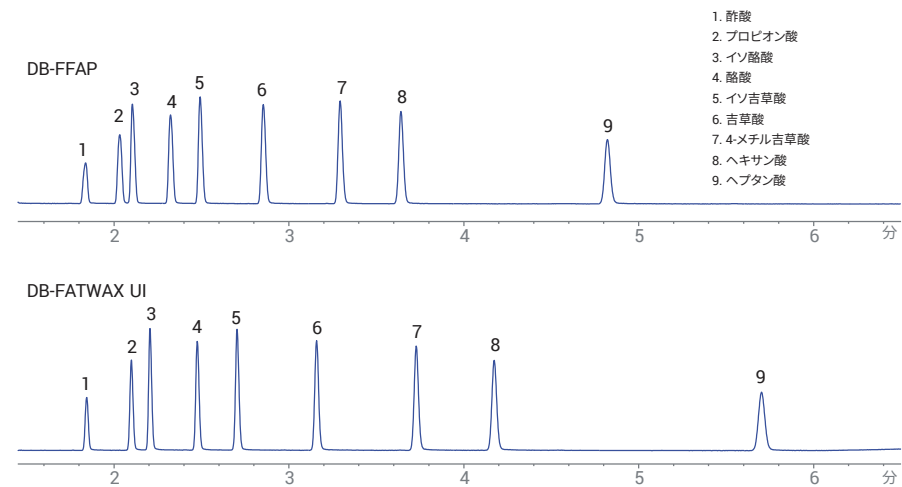


図 3. 30 m × 0.25 mm 内径、0.25 μm J&W DB-FFAP カラムと DB-FATWAX ウルトライナートカラムでメソッド 1 を使用した水性 C2 ～ C7 遊離脂肪酸サンプルの GC/FID クロマトグラム (表 2 を参照)

表 6. ピーク高さの 10 % 位置におけるピークの非対称性 (As.10 %)

ピーク番号	As.10 %								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DB-FATWAX UI	0.98	1.04	1.15	1.16	1.14	1.08	1.06	1.07	1.04
DB-FFAP	0.91	1.05	1.20	1.16	1.16	1.15	1.09	1.05	1.06
他社 1 製 WAX	1.56	共溶出	共溶出	1.97	1.65	2.04	1.96	1.96	1.87
他社 1 製 WAX	0.97	1.08	1.32	1.22	1.28	1.23	1.27	1.26	1.23

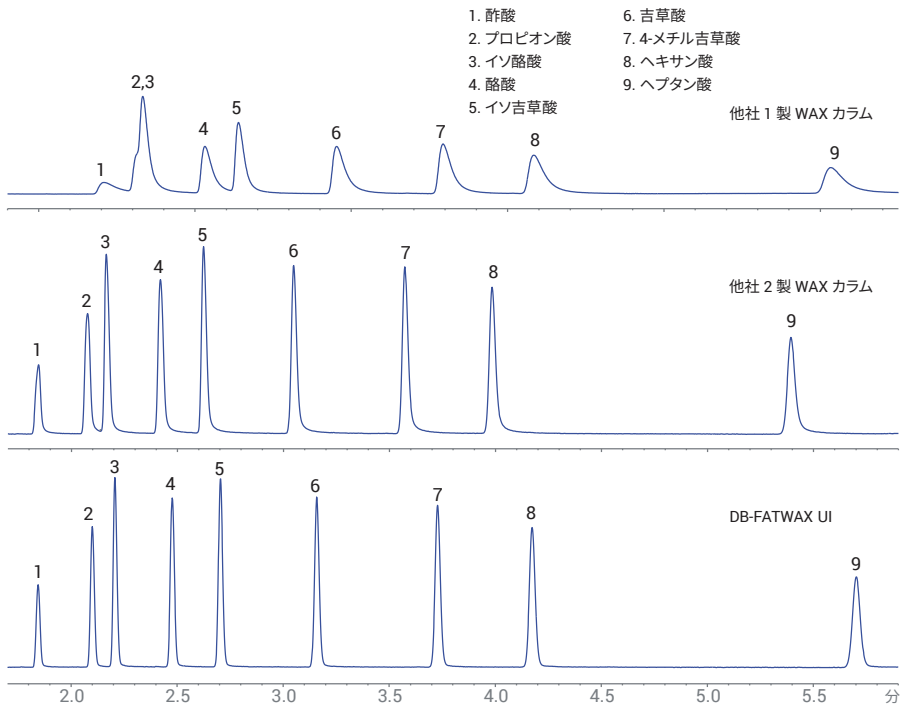


図 4. J&W DB-FATWAX UI カラムと他社 1 および他社 2 製 WAX カラムでメソッド 1 を使用した水性 C2 ～ C7 遊離脂肪酸サンプルの GC/FID クロマトグラム (表 2 を参照)

C2 ～ C18 有機酸テスト混合物

図 5 ～ 7 に、J&W DB-FFAP と DB-FATWAX UI カラム、さらに他社製 WAX カラムにおける、C2 ～ C18 有機酸テスト混合物の GC/FID クロマトグラムの例を示します。カラムを 250 °C で 50 時間コンディショニングした後、試験を実施しました。図 5 に示すように、DB-FFAP は DB-FATWAX UI と比較して、高温 (250 °C) で比較的低いカラムブリードを示しており、C18 脂肪酸のような高分子量有機酸を溶出するための分析時間も短くなっています。

ただし、図 5 を拡大した図 6 によると、DB-FATWAX UI カラムは DB-FFAP と比較して、C2 ～ C12 揮発性有機酸で同等またはそれを上回る良好なピーク形状を示しています。これらの揮発性酸は食品の香りや品質に大きな影響を与えるため⁷、一部の食品ではこれらの活性揮発性酸の含有量が品質保証の指標になります。図 7 は、他社製 WAX カラムの不活性度性能が、50 時間のカラムコンディショニング後に大幅に低下したことを示しています。他社 2 製 WAX カラムは、不活性 WAX 相カラムとして報告されています。このカラムでは、異性体を含むすべての化合物が分離できましたが、クロマトグラムでは C2 ～ C7 遊

離有機酸で顕著なテーリングが発生していました。他社 1 製 WAX カラムは、代表的な従来型 WAX 相 GC カラムです。他社 1 製 WAX カラムは、カラム不活性度と熱安定性が欠如していたため重大なピークテーリングを引き起こし、特に活性 C2 ～ C7 遊離脂肪酸とレブリン酸の感度、分離能、および選択性に悪影響を与えました。

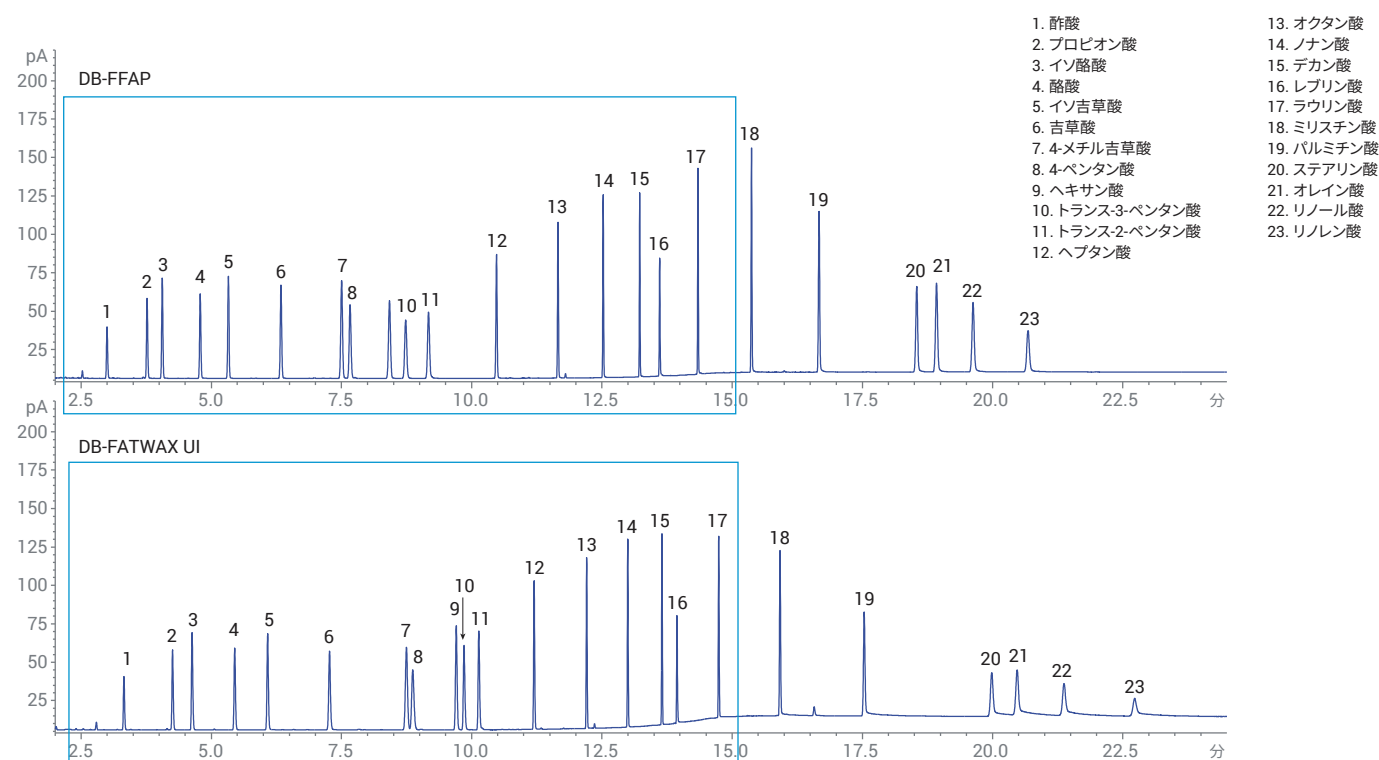


図 5. J&W DB-FFAP および DB-FATWAX UI GC カラムでメソッド 2 を使用した有機酸 (C2～C18) テスト混合物の FID クロマトグラムの例 (表 3 を参照)

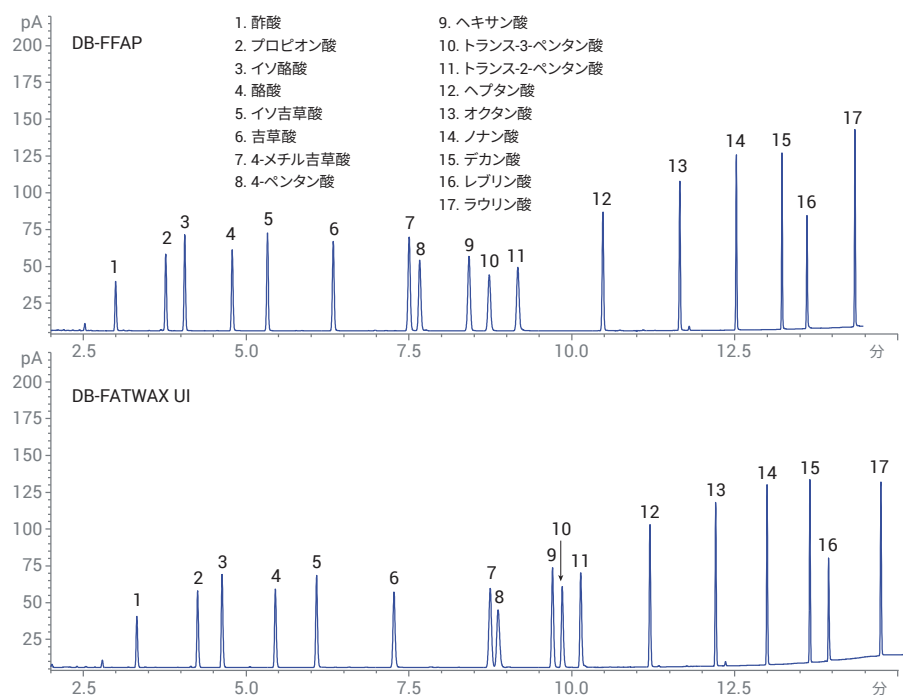


図 6. J&W DB-FFAP および DB-FATWAX UI GC カラムで分離された有機酸 (C2 ~ C18) テスト混合物の GC/FID クロマトグラムの拡大図 (溶出順序は図 5 と同じ)

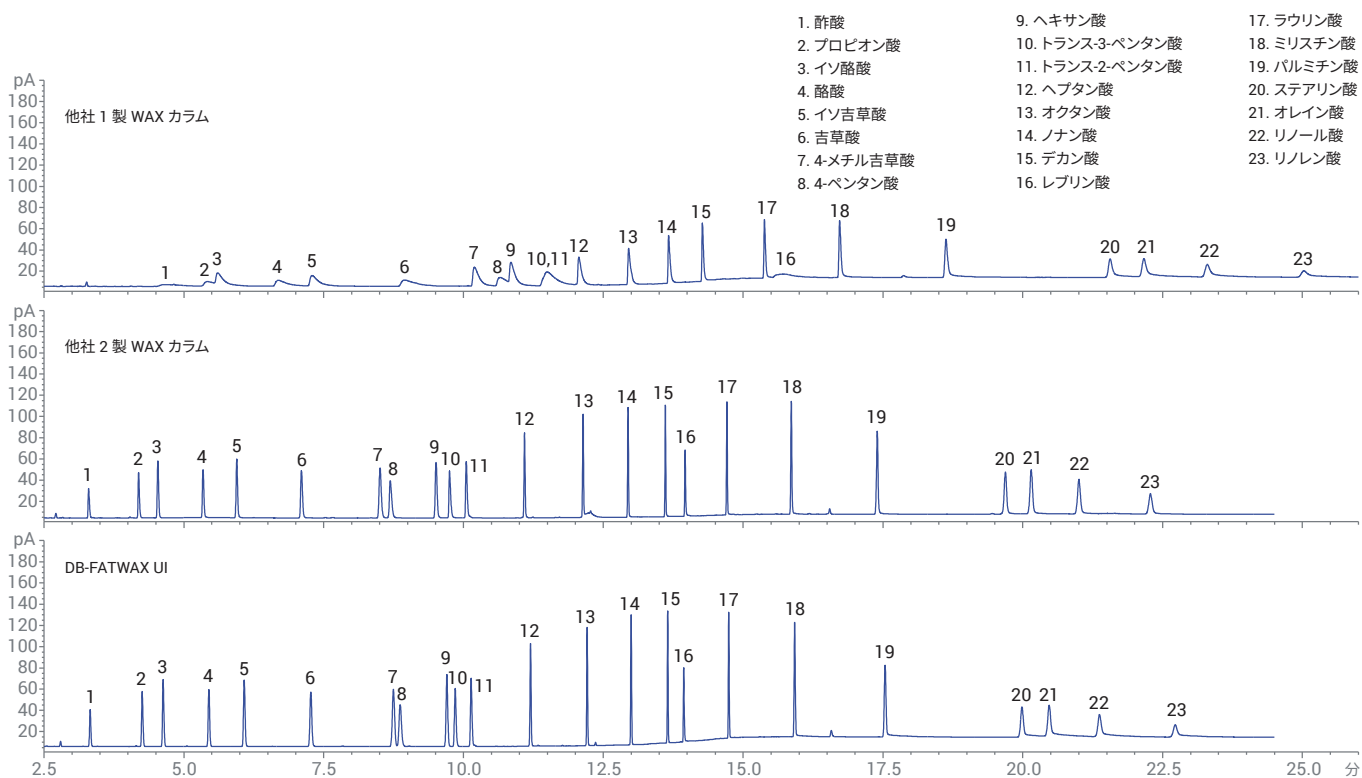


図 7. J&W DB-FATWAX UI カラムと他社製 WAX カラムでの有機酸 (C2~C18) テスト混合物の GC/FID クロマトグラムの例 (溶出順序は図 5 と同じ)

Agilent WAX UI テスト混合物

DB-FATWAX UI GC カラムは、J&W ウルトラ イナート GC カラムファミリの製品です。これら の活性極性化合物に対して不活性度の性能を保証するために、すべてのカラムを業界で最も要求の厳しいテスト混合物を用いて試験しています⁶。WAX UI テスト混合物には、プロピオン酸、エチルヘキサン酸、およびその他の活性化合物が含まれています。図 8 および 9 に、DB-FATWAX UI、DB-FFAP、および他社 1 および他社 2 製 WAX カラムで分離された WAX UI テスト混合物のクロマトグラムを示します。DB-FATWAX UI カラムでは、分析対象化合物の優れたピーク形状が得られました。DB-FFAP と DB-FATWAX UI は、プロピオン酸および 2-エチルヘキサン酸に対して同程度の不活性度性能を示していますが、図 8 の DB-FFAP カラムのクロマトグラムによると、エチレングリコールのピークに関して顕著なテーリングが観察されています。エチレングリコールの As.10 % は、DB-FFAP で 0.37、DB-FATWAX UI で 0.91 でした。また、DB-FFAP でのエチレングリコールのクロマトグラ

ムでは、明らかに応答が低下しています。他社 2 製 WAX カラムは、デカナール、プロピオン酸、およびエチレングリコールでピークがテーリングしており、ピークの非対称性値はそれぞれ 1.28、1.32、および 1.26 です。他社 1 製 WAX カラムのカラム活性度を、デカナール、

プロピオン酸、エチレングリコール、2-エチルヘキサン酸、エチルマルトールなど、重要な分析対象物に関するピークテーリングおよび応答の欠落により特性解析しました (図 9)。

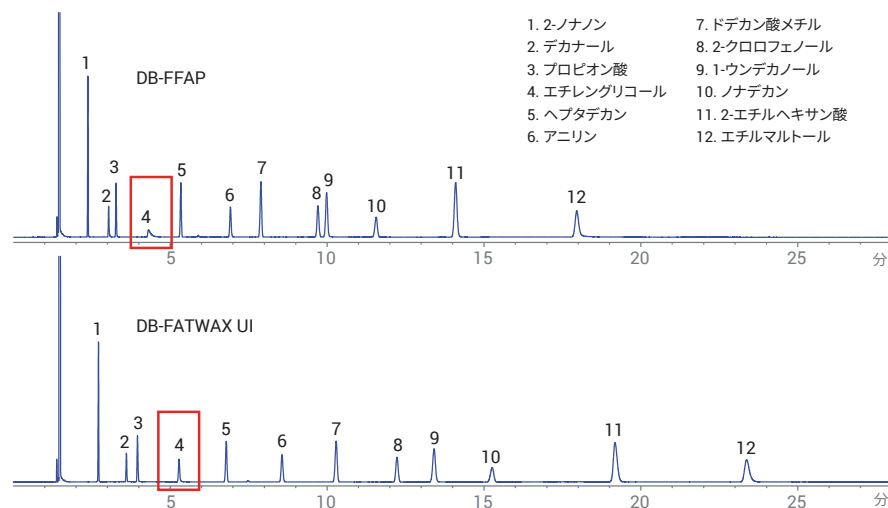


図 8. J&W DB-FFAP および DB-FATWAX UI GC カラムでメソッド 3 を使用した WAX UI テスト混合物の GC/FID クロマトグラムの例 (表 4 を参照)

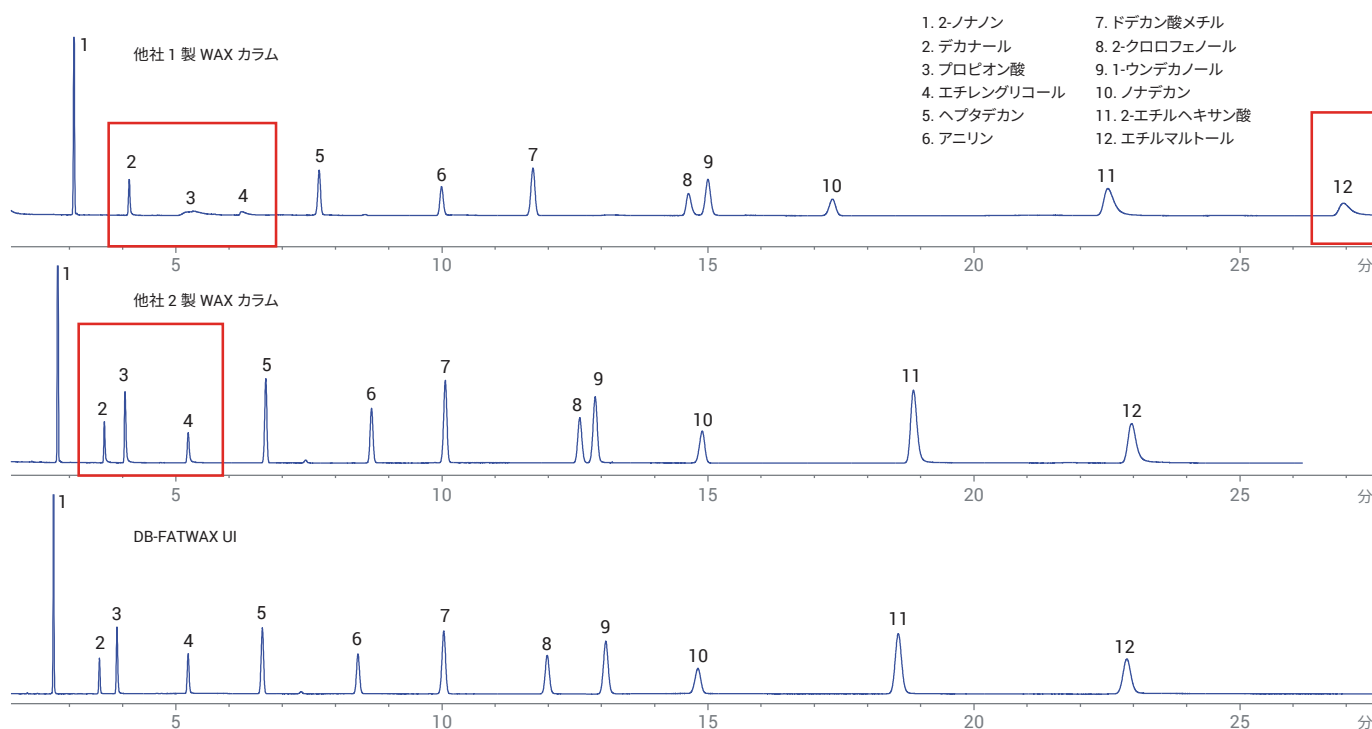


図 9. J&W DB-FATWAX UI カラムおよび他社製 WAX GC カラムでメソッド 3 を使用した WAX UI テスト混合物の GC/FID クロマトグラムの例 (表 4 を参照)

結論

有機酸および WAX UI テスト混合物を GC/FID 分析することにより、J&W DB-FATWAX ウルトライナート GC カラムを評価しました。不活性度と熱安定性に優れた DB-FATWAX UI では、この研究で評価した他の他社製 WAX カラムよりも良好なピーク形状が得られ、長期にわたって安定した分析結果がもたらされました。この傾向は、強力な短鎖揮発性有機酸と水性サンプルが存在する場合に特に顕著でした。揮発性有機酸と遊離脂肪酸は、DB-FATWAX UI と DB-FFAP GC の両方のカラムで適切に分離され、シャープで対称性のあるピークが得られました。C18 脂肪酸分析には DB-FFAP カラムが適しています。その理由は、高温 (250 °C) で低いカラムブリードを示し、分析時間も短いためです。アルコール、ジオール、グリコール、有機酸を含む複雑なサンプルに最適なカラムは DB-FATWAX ウルトライナートです。これは、特に大部分の活性化合物でシャープなピークと高い応答性を示し、分析困難な対象物で高い感度と再現性が得られるためです。C2 ～ C7 遊離脂肪酸水溶液に関する再現性の高い分析により、水性注入における DB-FATWAX UI の優れた相安定性が示されました。

参考文献

1. Merrick-Gass, M.T. Gas Chromatography in G-Bacteria Identification. American Clinical Products Review. Dec. **1986**.
2. Henderson, M.H.; Steedman, T.A. Analysis of C2–C6 monocarboxylic acids in aqueous solution using gas chromatography. Journal of chromatography A, 244(1982), 337–346.
3. Vickers, A.K. High efficiency FAMES analyses using capillary GC. Agilent Technologies Article Reprint, publication number 5989-6588EN, **2007**.
4. Van Der Meer, I.; Zou, Y.; Serrano, G. Analysis of Omega 3 and Omega 6 FAMES in Fish Oil and Animal Fat Using an Agilent J&W DB-FATWAX Ultra Inert GC Column. Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-8744EN, **2017**.
5. Zou, Y.; Wu, H. Improving the Analysis of 37 Fatty Acid Methyl Esters. Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-8706EN, **2017**.
6. Dang, N.-A.; Vickers, A.K. A New PEG GC Column with Improved Inertness Reliability and Column Lifetime. Agilent Technologies Competitive Comparison, publication number 5991-6683EN, 2016.
7. Alur, M.D.; et al. Biochemical methods for determination of spoilage of foods of animal origin: a critical evaluation. Journal of Food Science and Technology (India) **1995**, 32, 181–188.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2018
Printed in Japan, April 5, 2018
5991-9223JAJP