

Agilent 8860 ガスクロマトグラフによる 37 成分の FAME の高速分析

著者

Youjuan Zhang
Agilent Technologies
(Shanghai) Co. Ltd.,
Shanghai 200131 P. R. China

概要

スプリット/スプリットレス注入口および水素炎イオン化検出器 (FID) 付きの Agilent 8860 GC を用いて、37 成分の脂肪酸メチルエステル (FAME) の標準混合物と、タンパク質分解乳の実際のサンプルを分析しました。このアプリケーションノートでは、GB 5009.168-2016 より高速で優れた分離が可能な 37 成分の FAME 混合物の分析について説明します。

はじめに

脂肪酸は中性脂肪、リン脂質、糖脂質の主成分です。脂肪酸は飽和、一価不飽和、多価不飽和の3種に分類することができます。リノール酸などの一部の脂肪酸は必須脂肪酸であり、これらは体内で合成することができず、食物から摂取しなければなりません。アラキドン酸 (ARA)、エイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などのオメガ3およびオメガ6脂肪酸は、人間の栄養に関して重要な役割を果たす多価不飽和脂肪酸です。オメガ3脂肪酸は心疾患や高血圧などの疾患を予防する働きがあると考えられています。脂肪酸は栄養学や食品化学の観点できわめて重要な役割を果たします。

加水分解とメチル化は脂肪酸測定に最も一般的に用いられるメソッドです。脂肪酸のエステル化は極性を低下させ、不飽和異性体の分離を促進します。脂肪酸メチルエステル (FAME) の分析は、食品分析で最も重要なアプリケーションの1つです。

GB 5009.168-2016 では、食品中の37種の脂肪酸の測定についての規制があります。このメソッドには、サンプル前処理とガスクロマトグラフィー (GC) のパラメータが詳細に記載されており、高極性シアノポリシロキサンタイプのカラム (100 m × 0.25 mm、0.2 μm) が推奨されています。このメソッドでは、37成分の FAME を 82 分で分離することができます。アジレントの以前のアプリケーションノートで、Agilent Intuvo 9000 GC システムと Agilent J&W DB-FastFAME Intuvo GC カラムでキャリアガスとしてヘリウムを用いて、37種の FAME を 8 分間で分離できることが示されています²。この高速分析は、250 °C/min でのカラムの加熱が可能な Intuvo ダイレクトヒータリング技術によって実現しました。

このアプリケーションノートでは、8860 GC システムでキャリアガスとして窒素を使用し、長さの異なる2種の DB-FastFAME カラムを用いる比較的高速なメソッドについて説明します。面積 RSD を測定し、ARA、EPA、DHA などの重要な中性脂肪を定量分析しました。メソッドの適用性を示すために、乳児用調合乳サンプルもこのアプリケーションの分析対象としました。

実験方法

化学物質および標準試料

37 成分の FAME の標準混合物 (p/n CDAA-252795-MIX-1 mL) と、C20:4n6 (p/n CDAA-253207M-10 mg)、C20:5n3 (p/n CDAA-253209M-10 mg)、C22:6n3 (p/n CDAA-253228M-10 mg) の単一標準物質は、ANPEL Scientific Instrument Co. Ltd (中国、上海) から購入しました。混合物内の各成分の濃度は 200 ~ 400 mg/mL でした。

乳児用調合乳サンプルは地域で市販のものを入手しました。サンプル前処理は GB 5009.168-2016 に従って実施しました。

装置構成

FAME 分析には、水素炎イオン化検出器 (FID) 付きの 8860 GC を用いました。サンプルの導入には、5 μL シリンジとスプリット/スプリットレス注入ポートを備えた Agilent 7693A オートサンプラを用いました。表 1 および 2 に機器と分析条件を示します。

表 1. Agilent DB-FastFAME 30 m × 0.25 mm、0.25 μm のメソッド条件

パラメータ	設定値
GC システム	8860 GC/FID
注入口	スプリット/スプリットレス、250 °C、スプリット比 100:1、ライナ (p/n 5190-2295)
カラム	DB-FastFAME、30 m × 0.25 mm、0.25 μm (p/n G3903-63011)
キャリア	水素、12 psi、定圧モード
オープン	80 °C (0.5 分間)、40 °C/min で 165 °C まで昇温 (1 分間)、4 °C/min で 230 °C まで昇温 (4 分間)
FID	260 °C、水素: 40 mL/min、空気: 400 mL/min、メークアップガス (N ₂): 25 mL/min
注入	1 μL

表 2. Agilent DB-FastFAME 20 m × 0.18 mm、0.2 μm のメソッド条件

パラメータ	設定値
GC システム	8860/FID
注入口	スプリット/スプリットレス、250 °C、スプリット比 100:1、ライナ (p/n 5190-2295)
カラム	DB-FastFAME、20 m × 0.18 mm、0.2 μm (p/n G3903-63010)
キャリア	水素、20 psi、定圧モード
オープン	80 °C、35 °C/min で 194 °C まで昇温 (1 分間)、5 °C/min で 245 °C まで昇温
FID	260 °C、水素: 40 mL/min、空気: 400 mL/min、メークアップガス (N ₂): 25 mL/min
注入	1 μL

結果と考察

図 1 は、30 m の DB-FastFAME カラムで得られる、37 成分の FAME 標準混合物分析の典型的なクロマトグラムを示しています。一部のアプリケーションでは、シスおよびトランス C18:1、シスおよびトランス C18:2、C22:0、および C20:3、C22:6 および C24:1 が共溶出し、ピーク同定で問題が発生する場合があります。図 1 に示すとおり、これらの条件を用いることで、37 成分すべてが 8860 GC システムによって適切に分離され、シャープで対称性のあるピークが得られ、分析時間が 24 分未満に抑えられました。特筆すべきは、シス/トランス異性体と、EPA および DHA の成分を分離する能力です。このメソッドは複雑な混合物中の脂肪酸の定量分析にきわめて有用で、特に魚油などのマトリックス中の EPA および DHA の測定に役に立ちます。この 30 m × 0.25 mm、0.25 μm カラムは、内径 0.18 mm のカラムと比較して内径が大きくフィルムが厚いため、カラムキャパシティが大きく、カラムの寿命が長くなります。

タンパク質分解乳はミルクアレルギーの乳児に最適であり、加水分解の程度によって、部分加水分解乳、高度加水分解乳、アミノ酸乳の 3 種に分類することができます。図 2 ～ 4 に 3 種の異なるタンパク質分解乳の分析を示します。C18:2n6、C18:3n3、ARA、DHA などの主要な FAME を容易に検出し、定量できました。

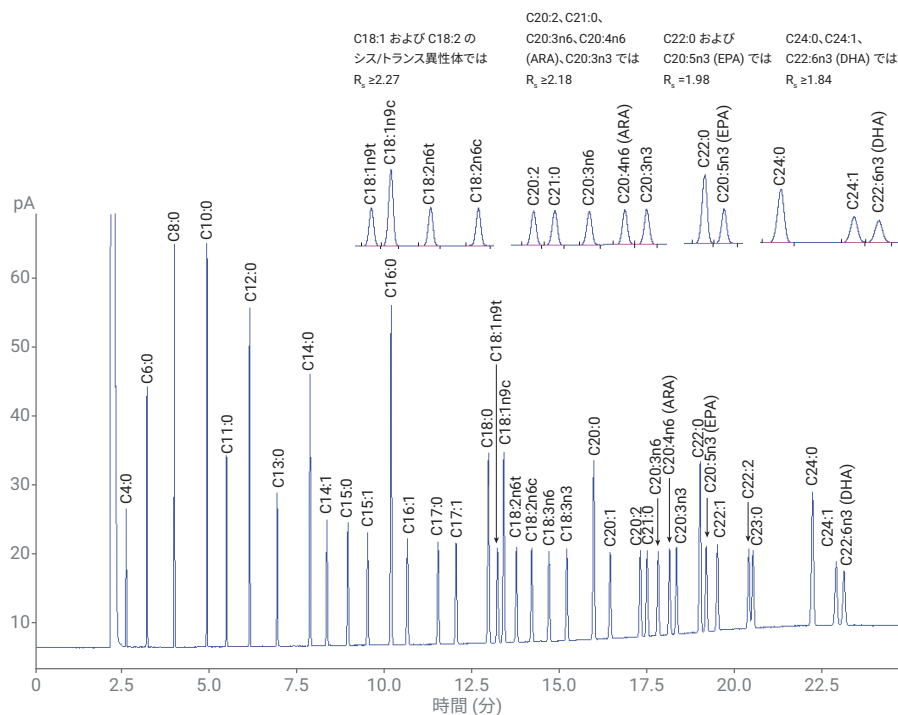


図 1. 30 m × 0.25 mm、0.25 μm DB-FastFAME ウルトライナートカラム (p/n G3903-63011) での 37 成分の FAME 標準混合物の GC/FID クロマトグラム

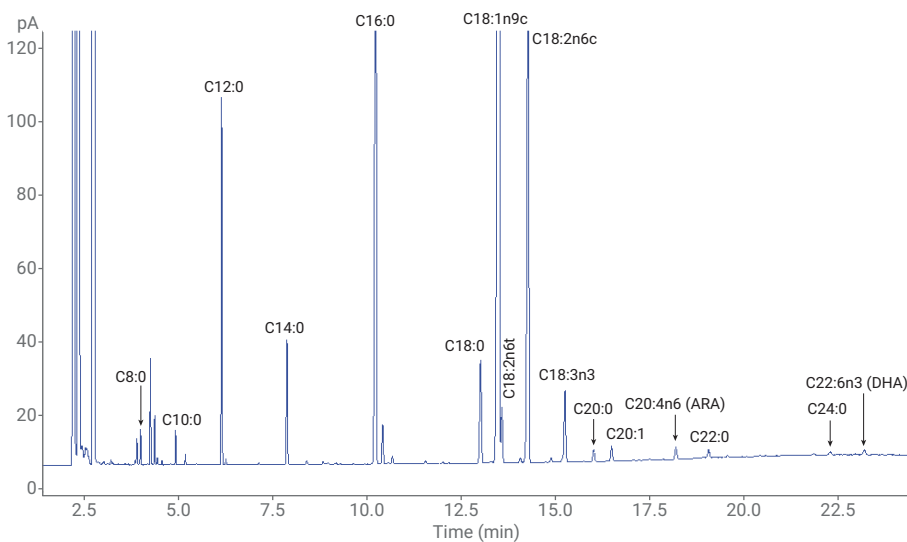


図 2. 30 m × 0.25 mm、0.25 μm DB-FastFAME ウルトライナートカラムでのアミノ酸乳中の FAME の GC/FID クロマトグラム

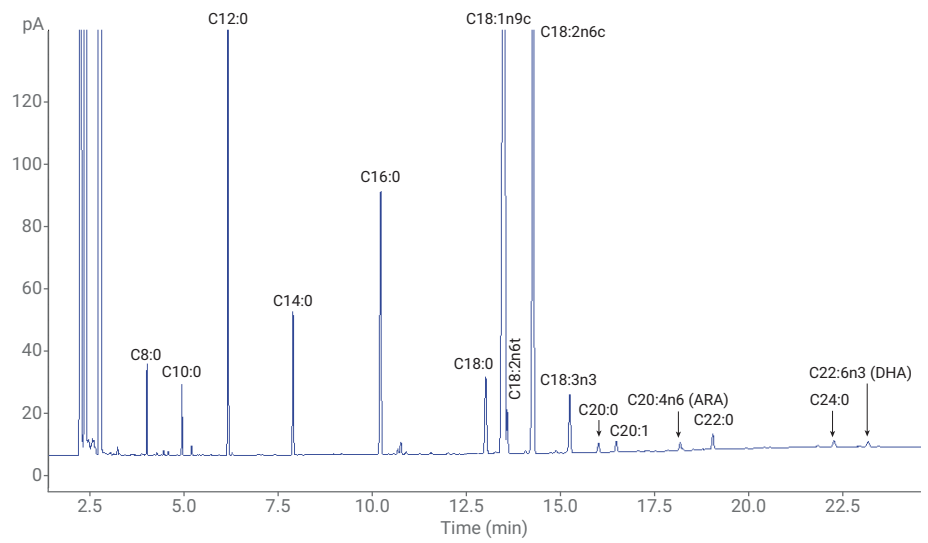


図 3. 30 m × 0.25 mm、0.25 μm DB-FastFAME ウルトライナートカラムでの高度加水分解乳中の FAME の GC/FID クロマトグラム

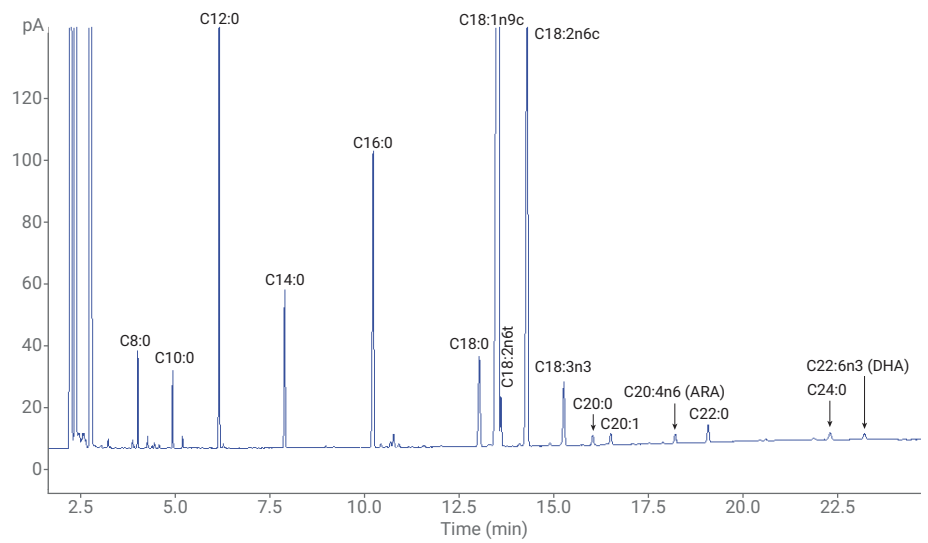


図 4. 30 m × 0.25 mm、0.25 μm DB-FastFAME ウルトライナートカラムでの部分加水分解乳中の FAME の GC/FID クロマトグラム

ARA、EPA、DHA の標準溶液を 5、10、50、100、250、1,000 mg/L の濃度で前処理しました。これら 3 種の化合物の決定係数 (R^2) は 0.9997 以上でした。図 5、6、7 に検量線を示します。

標準混合物を 6 回注入し、メソッドの再現性をテストしました。図 8 に示す結果から、C4:0 を除くすべての化合物で面積 %RSD が 1 % を大幅に下回っていることがわかります。これは、8860 GC システムが脂肪酸分析において信頼できるシステムであることを示しています。

高効率の内径 0.18 mm カラムには、生産性を高め、分析性能を損なうことなく分析時間を短縮できる可能性があります。図 9 に示すとおり、この短いカラムを用いることで、14 分未満という高速分析が可能になり、ほぼ同等の分離能が得られます。主要な成分の分離能の値を図 1 および 9 に示します。

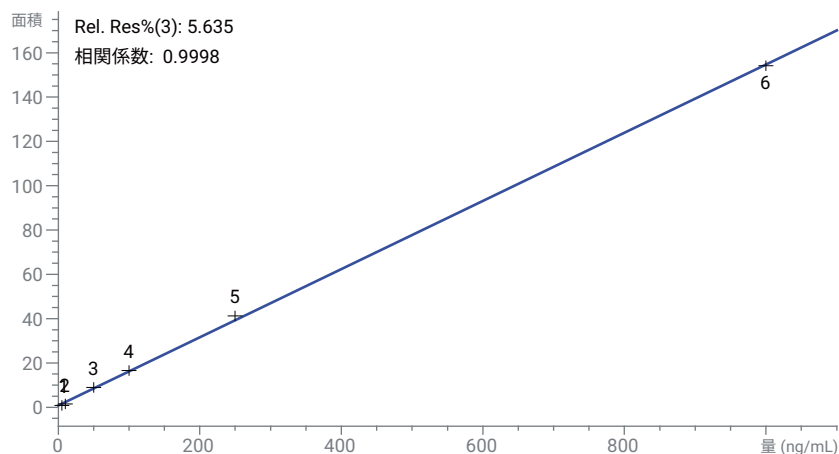


図 5. 30 m × 0.25 mm、0.25 μm DB-FastFAME ウルトライナートカラムでの C20:4n6 (ARA) の 5 ~ 1,000 μg/mL までの検量線

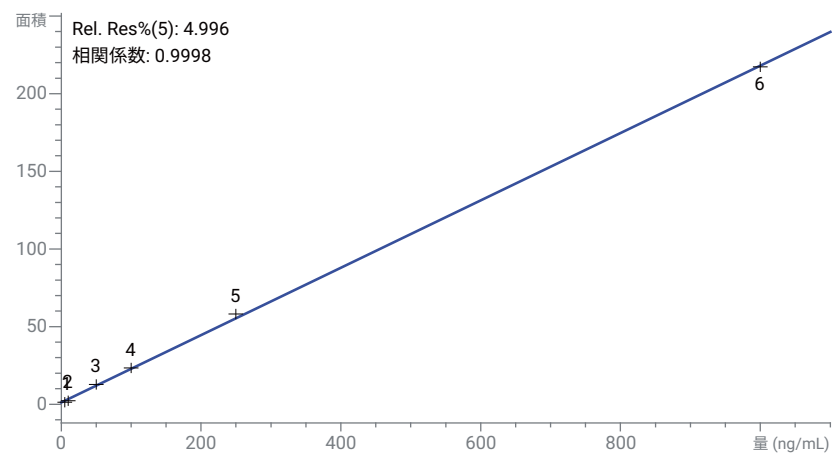


図 6. 30 m × 0.25 mm、0.25 μm DB-FastFAME ウルトライナートカラムでの C20:5n3 (EPA) の 5 ~ 1,000 μg/mL までの検量線

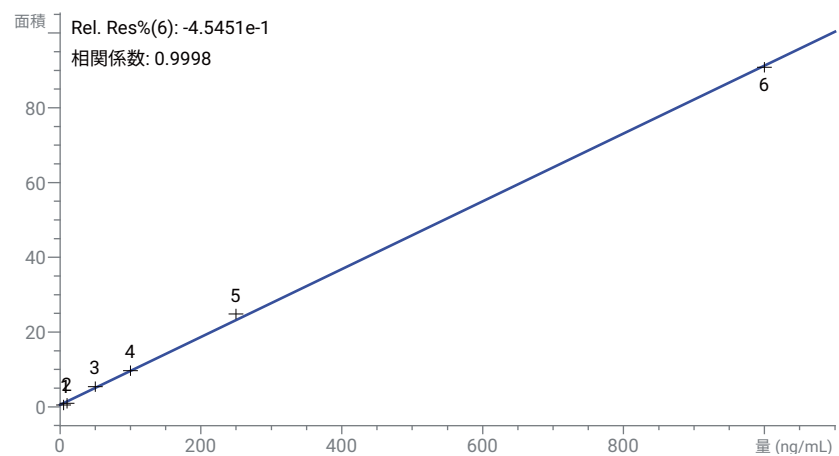


図 7. 30 m × 0.25 mm、0.25 μm DB-FastFAME ウルトライナートカラムでの C22:6n3 (DHA) の 5 ~ 1,000 μg/mL までの検量線

結論

このアプリケーションノートでは、自動注入と FID で構成した 8860 GC により、37 成分の FAME を高速で分析し、信頼性の高い結果を得られることを実証しました。使用した FAME 分析専用のキャピラリーカラム 2 種は、いずれも分離能を損なうことなく優れた効率を示しています。30 m の DB-FastFAME カラムはカラム容量がより大きく、耐久性に優れています。一方、20 m の DB-FastFAME カラムは分析時間を短縮できます。最大サンプル数 16 の 7693A オートサンプラと、8860 GC の EPC コントロールにより、ファストフード産業やルーチン分析に最適な優れた再現性と容易な操作性が実現します。

参考文献

1. Zhou, Y.; Wu, H. 37 成分の脂肪酸メチルエステル分析の改善、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. Zhou, Y. 脂肪酸メチルエステルの高速分離、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 5994-0116JAJP, **2018**.

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. 2019

Printed in Japan, February 19, 2019

5994-0687JAJP

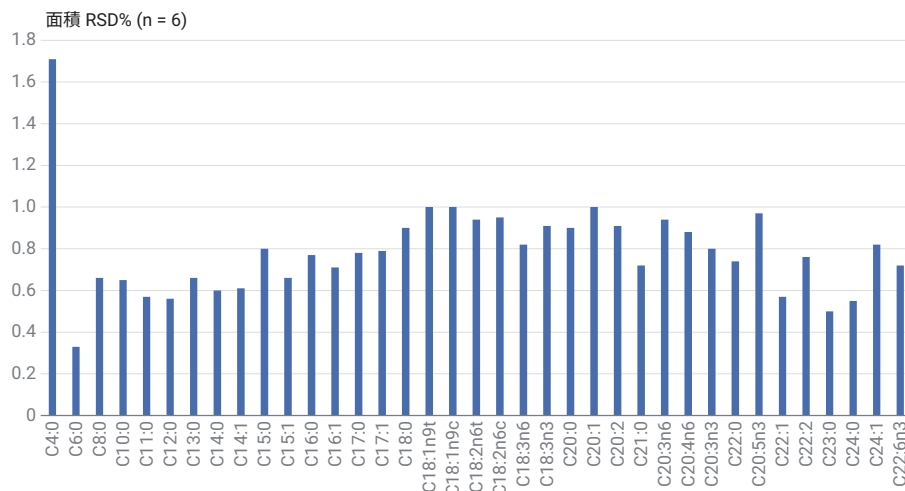


図 8. 30 m × 0.25 mm、0.25 μm DB-FastFAME ウルトライナートカラム上で 37 成分の FAME 標準混合物を 6 回繰り返し注入した場合の面積 RSD%

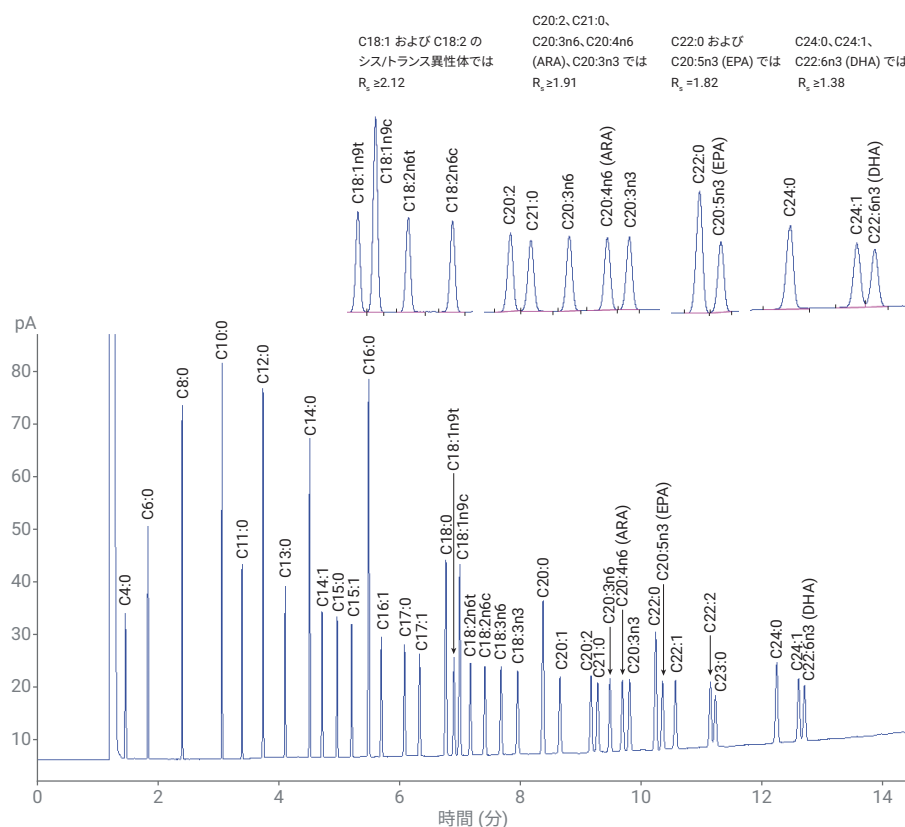


図 9. 20 m × 0.18 mm、0.2 μm DB-FastFAME ウルトライナートカラム (p/n G3903-63010) での 37 成分の FAME 標準混合物の GC/FID クロマトグラム