

Agilent 8890 GC とリテンションタイム ロッキング機能による AOAC 2012.13 準拠のシス/トランス FAME 分析での システム適合性の確保

著者

Rachael Ciotti
Agilent Technologies, Inc.

概要

AOAC メソッド 2012.13 では、水素炎イオン化検出器を用いたキャピラリーガスガスクロマトグラフィーによって乳製品および乳児用調合乳中の脂肪酸含有量を測定します。このメソッドを、Agilent 8890 GC システムと 100 m CP-Sil 88 カラムを用いて実行し、一般的な 37 種類の脂肪酸メチルエステルに加え、C18 ファミリの 19 種類の一不飽和および多価不飽和のシス/トランス異性体を使用して、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸のより詳細な分離効率を調べました。主なシスおよびトランス FAME の重要なペア間の分離能は、定性用標準液を使用して評価しました。最後に、カラムメンテナンス後の再調整を不要にするために、リテンションタイムロッキング (RTL) を実行しました。

はじめに

乳製品や植物性脂肪はトリグリセリドを含有しています。これは、3つの脂肪酸鎖が結合したグリセリンエステルです。脂肪酸は、短または長、直鎖構造または分枝構造、飽和、一不飽和または多価不飽和の炭化水素鎖に結合されたカルボキシル末端基で構成されています。不飽和脂肪酸の二重結合の構造や位置によって、さまざまな位置異性体およびシス/トランス異性体が生じます。異性体の適切な同定は、正確な栄養表示に不可欠です。

複雑なマトリックスからの脂肪酸同族体および異性体の分離と同定は、非常に困難です。エステル化の後、ガスクロマトグラフィーと水素炎イオン化検出器により、対応する脂肪酸メチルエステル (FAME) を優れた再現性で分析することが可能です。異性体の溶出順序と分離効率は、カラムの固定相のタイプと長さに大きく依存します。多種多様な FAME シス/トランス異性体を完全に分離できるカラムはありません。しかし、CP-Sil 88などの極性の強いシアノプロピル固定相でコーティングされた 100メートルのキャピラリーカラムを用いると、大半のシスおよびトランス FAME 異性体について信頼性が高く詳細な分離を実現できます。従来のワックスカラムとは異なり、非常に極性が強いシアノプロピル固定相でシス異性体が溶出される前にトランス異性体が溶出されます。

実験方法

Agilent 8890 ガスクロマトグラフを、スプリット/スプリットレス注入口 (SSL)、水素炎イオン化検出器 (FID)、Agilent 7693A シリーズオートサンプラ (ALS) と組み合わせて使用しました。

試薬

次の分析標準を購入して FAME の性能を評価しました。

- 37成分の FAME 混合物 (47885-U)、100 ~ 600 µg/mL の濃度範囲の C4 ~ C24 FAME を含む
- 4成分の合計 10 mg/mL のシス/トランスリノール酸メチルエステル混合物 (CRM47791)

- 8成分のリノレン酸メチルエステル異性体混合物 (L6031)、3 ~ 30% の範囲の重量 % で各成分を含む
- シス/トランス FAME カラム性能混合物 (40495-U)、多様な FAME を 2.5 mg/mL で含む

これらすべての混合物は、MilliporeSigma 社 (セントルイス、ミズーリ州) から購入しました。また、8成分のシス/トランス FAME 混合物 (35079) を Restek 社 (ベルフォント、ペンシルベニア) から購入しました。

表 1. 分析条件

Agilent 8890 GC の設定条件 – AOAC Official Method 2012.13	
注入	
シリンジサイズ	10 µL, p/n G4513-80204
注入量	1 µL
注入口	SSL、スプリットモード
温度	250 °C
スプリット比	10:1
セプタムパージ流量	3 mL/min
カラム	Agilent CP-Sil 88, p/n CP7489
寸法	100 m × 0.25 mm, 0.20 µm
キャリアガス	He, 0.8 mL/min, 定流量
オープン	
初期温度	60 °C
最初の保持	5 分
昇温	15 °C/min で 165 °C まで上昇、1 分間保持 2 °C/min で 225 °C まで上昇、20 分間保持
検出器	
タイプ	FID
温度	250 °C
空気流量	400 mL/min
H ₂ 燃料流量	40 mL/min
N ₂ メークアップ流量	25 mL/min

結果と考察

範囲全体での分離を評価するために (図 1)、ジクロロメタン溶媒中の C4:0 ~ C24:0 の 37 種類の FAME の混合物を注入しました。初期オープン温度の設定値 60 °C と保持時間により、牛乳の品質の重要な指標となる C4:0 を溶媒ピークと確実に分離します。また、昇温オープンプログラムにより、シス/トランス異性体や長鎖多価不飽和 FAME の効率的な分離が可能になります。ただし、約 48 分に溶出する C23:0 と C20:4n6 は分離していません。しかし、C23:0 は一般的に乳製品に含まれていないため、これはあまり重要なことではありません。

市販の参照標準混合物を使用して、シス/トランス異性体の詳細な分離を検出しました。Restek 社のジクロロメタン中の 8 成分シス/トランス FAME 混合物をジクロロメタンで 20 倍に希釈して GC に注入しました。このメソッドは、6 種類のシス/トランス C18:1 FAME 異性体の分離に最適です (図 2)。

トランス異性体中でわずかに共溶出がありました。このグループはシス-C18 の一不飽和異性体を適切に分離しています。トランス脂肪酸は AOAC 公式メソッド 2012.13 の 1 グループとして報告されるため、この分離は不可欠です。

C18:2 異性体の分離の特性を調べるために、ジクロロメタン中のリノレン酸メチルエステル FAME 混合物 (MilliporeSigma CRM47791) を最終濃度 500 mg/L に希釈しました。図 3 から、各リノール FAME 異性体が適切に分離されていることがわかります。

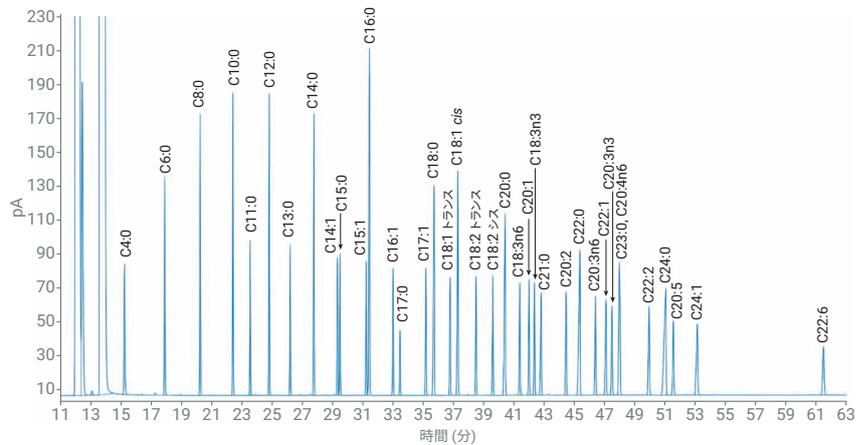


図 1. 37 種類の脂肪酸メチルエステルのクロマトグラム

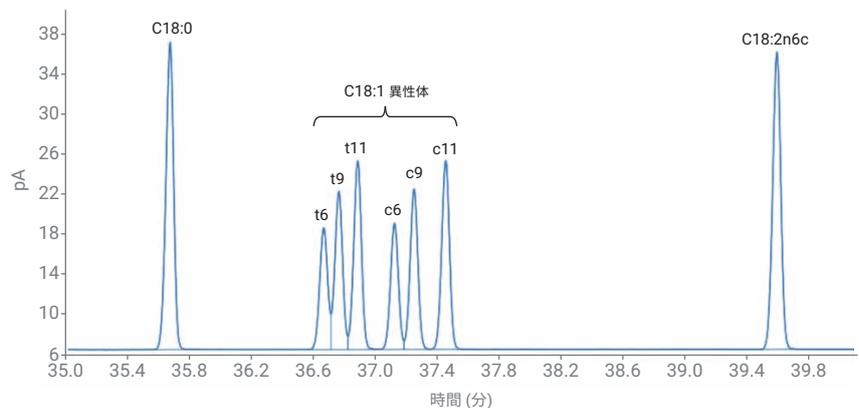


図 2. AOACメソッド 2012.13 による C18:1 異性体のクロマトグラムの拡大図

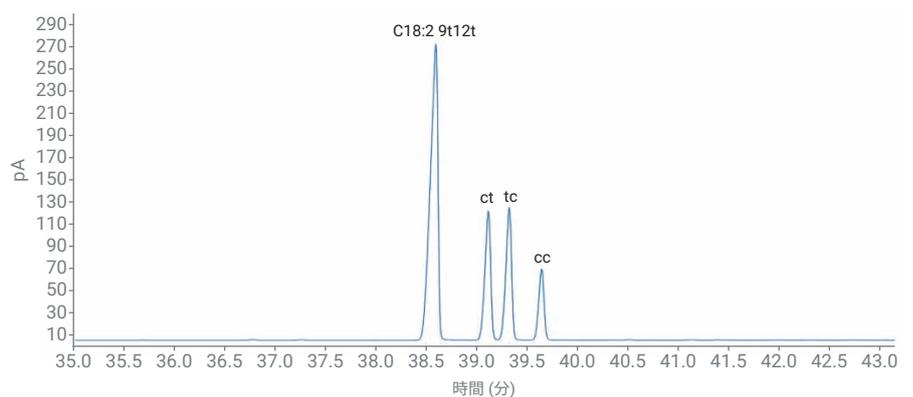


図 3. AOAC メソッド 2012.13 による C18:2 異性体のクロマトグラムの拡大図

最後に、リノレン酸メチルエステル混合物 (MilliporeSigma L6031) をジクロロメタンで 2.5 mg/mL に希釈して注入し、C18:3 異性体に対するメソッド性能を検証しました (図 4)。リノレン酸異性体を完全に分離できるカラムはありませんが、栄養素の報告という目的においては、トランス-含有異性体がアルファ-リノレン酸メチルエステルから適切に分離されています。

メソッド AOAC 2012.13 ではキャリブレーションの前に性能評価の確認が必要です。分離能は、トランス-C18:1n13t/C18:1n14t とシス-C18:1n9c/C18:1n10c ピーク間で決定されます (図 5、挿入図)。式 1 を使用して計算で求めた R 値が 1.00 以上の場合、許容可能な分離能を達成しています。定性的なシス/トランス FAME カラム性能混合物 (MilliporeSigma 40495-U) を 5 回繰り返し分析して注入し、分離能と面積/リテンションタイムの再現性を評価します。

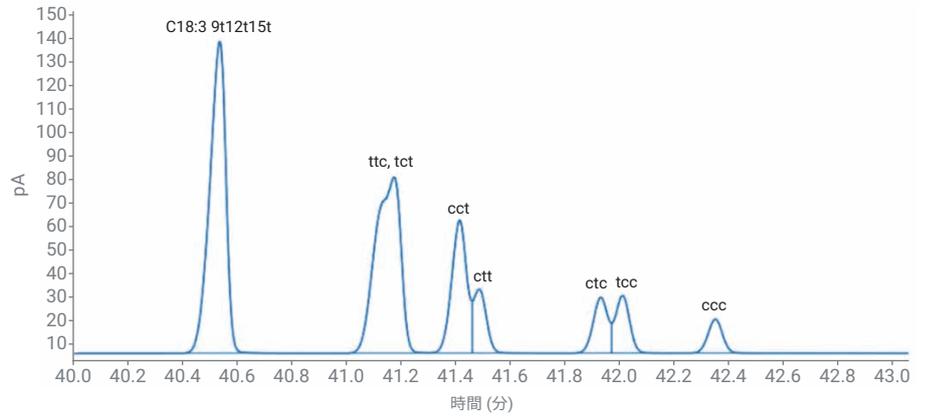


図 4. AOAC メソッド 2012.13 による C18:3 異性体を示すクロマトグラムの拡大図

$$R = 1.18 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0.5h1} + W_{0.5h2}} \right)$$

式 1. 半値幅でのピーク分離

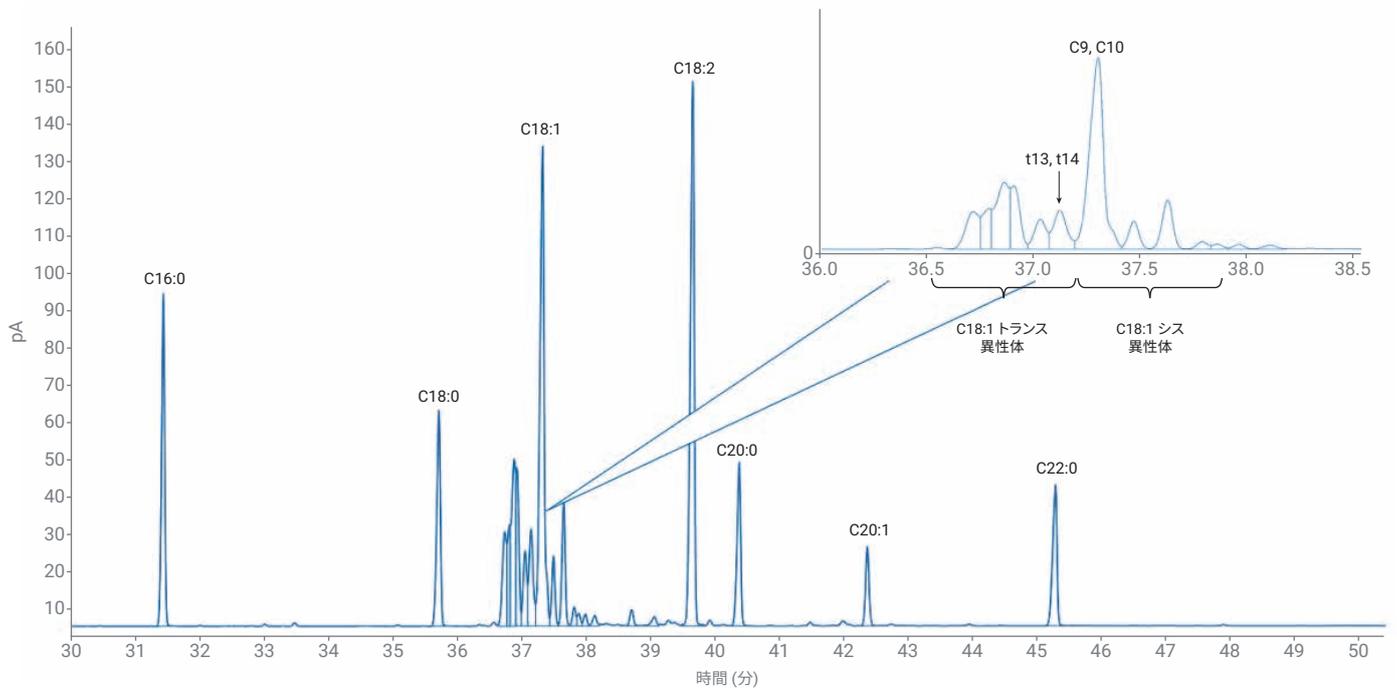


図 5. 定性カラム性能標準のクロマトグラムの拡大図

表 2 に、分離能チェックで使用する重要なペアの結果をまとめて示します。両方の異性体でリテンションタイムの再現性は優れており、相対標準偏差 (RSD) は 0.007 % です。各異性体のピーク面積精度は 2.5 % RSD 未満です。半値幅での平均ピーク分離は 1.494 で、これはメソッドの最小分離能要件を上回っています。

リテンションタイムロッキング

AOAC 2012.13 で測定対象である FAME を適切に同定するためには、温度と流量の両方で高い精度が求められるため、RTL が有効な手法と考えられます。Agilent RTL 機能により、特定の機器において長期間の再現性が得られ、カラムメンテナンス後のリテンションタイムの調整が不要になります。また、メソッドを別の GC に移管した後も同じリテンションタイムの維持が可能となるため、メソッドを簡単に移管し、ラボ間で容易に比較できます。RTL では、特定の化合物のリテンションタイムを適切に合致させることでロックします。あらかじめ、一連のリファレンス分析を行い、注入口パラメータとリテンションタイムとの関係をプロットしておき、その分析結果を使用してシステムをキャリブレーションします。また、この結果はメソッドファイルに保存されます。

Agilent OpenLab CDS 2 Acquisition には RTL ウィザード機能があり、オペレータはそのガイドに沿ってプロセスを進め、ロッキング用の取り込みメソッドと、過去に取得したデータファイルから選んだターゲット化合物を選択します。その後、選択した取り込みメソッドで指定されたパラメータを基に、RTL ウィザードによって一連の圧力キャリブレーション用の分析が設定されます。元の圧力設定値を用いた分析が 1 回実行され、このメソッド設定値からそれぞれ 15 % 増減させた圧力で 2 回の分析が実行されます。この圧力設定値の偏差に

よって、メンテナンス後 (例えばカラムのトリミング後) によく生じるカラムの長さの変化をシミュレーションします。そのため、ロックメソッドでは、カラムのメンテナンス後や交換後のリテンションタイムの再調整は不要で、シンプルな再ロッキング用標準を用いて設定されたリテンションタイムへ合わせることができます。

再ロッキング用標準にカラム性能評価用標準を使用することで、AOAC メソッド 2012.13 が指定する性能評価要件をワンステップで満たすことができます。

表 2. 定性カラム性能 FAME 標準混合物の 5 回繰り返し注入分析から得た結果

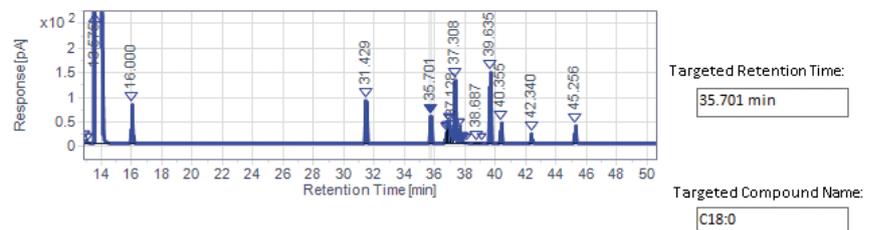
値	説明	1 回目	2 回目	3 回目	4 回目	5 回目	RSD
t _{R1}	リテンションタイム (分)、t13/t14 ピーク	37.124	37.125	37.128	37.128	37.13	0.007%
t _{R2}	リテンションタイム 2 (分)、c9/c10 ピーク	37.304	37.305	37.308	37.308	37.31	0.007%
	面積、t13/t14 ピーク	115.605	113.463	117.747	115.944	120.812	2.356%
	面積、c9/c10 ピーク	599.259	588.91	610.828	602.276	628.644	2.458%
W _{0.5h1}	半値幅、t13/t14 ピーク	0.073	0.072	0.073	0.073	0.074	0.969%
W _{0.5h2}	半値幅、c9/c10 ピーク	0.069	0.069	0.069	0.069	0.07	0.646%
R	半値幅でのピーク分離	1.496	1.506	1.496	1.496	1.475	0.77%

To complete the RTL calibration, the wizard will perform three runs. The first run is completed at a flow/pressure lower than the method setpoint, the second run is completed at the flow/pressure in the method, and the third run is completed at a higher flow/pressure than the method setpoint. Specify the pressure change for runs 1 and 3, and specify the sample vials for each of the runs. For liquid samples, this can be the same vial. For headspace samples, prepare three separate vials.

Run #	% Change in Pressure	Pressure	Vial Number
1	- 15%	21.673 psi	107
2		25.498 psi	107
3	+ 15%	29.323 psi	107

Injection Source: GC Injector - Front

From the chromatogram or table below, please select the retention time of your locking compound. If you wish to set that retention time to a specific value, please enter that in the "Targeted Retention Time" box.



Peak Number	Compound Name	Retention Time	Area
7	C18:0	35.7009	229.6815
8	C18:1n6t	36.7209	113.8100
9	C18:1n9t	36.7966	77.3611
10	C18:1n11t	36.8657	202.8851
11		36.9096	129.4210

図 6. リテンションタイムロッキングウィザードの設定画面

メソッドのリテンションタイムをロックするために、シス/トランス FAME カラム性能混合物標準を使用しました。取り込みメソッド、データ解析メソッド、過去に取得した性能混合物標準の注入から得られた解析結果ファイルを選択しました。C18:0 を RTL 用のターゲット化合物として選択しました。図 6 に示すように、RTL ウィザードは、ターゲットリテンションタイム 35.701 分の C18:0 ピークを使用して、圧力キャリブレーションのプロセスをガイドします。RTL ウィザードで自動的にスケジューリングされた一連の 3 つの分析で得られた圧力検量線は、優れた相関性を示しました (図 7)。次に、表示された圧力 25.498 psi で、分析メソッドがロックされました。その後、CP-Sil 88 100 m カラムのヘッド部から約 0.5 m トリミングすることによってカラムのメンテナンスを実行しました。

カラム長の変更によるリテンション損失の程度を評価するために、シス/トランス FAME カラム性能用混合標準をメンテナンス後に再分析しました。ターゲットの C18:0 のピークのリテンションタイムは、前方向に約 0.232 分にシ

フトしました。システムのリテンションタイムがロックされていなかった場合、オペレータは必要な FAME の一式を含む標準を分析しなければならず、分析対象物のリテンションタイムをデータ解析メソッド内で再度手入力することになります。

しかし、この分析メソッドでは、新しい分析対象成分のリテンションタイムを再度手入力するのではなく、RTL ウィザードを使用して再ロックします。これにより、新しい圧力設定値として 25.253 psi が設定されました。この新しい圧力設定値は、カラム長の変更によるリテンションタイムのずれを補正できるため、より速くかつ容易にシステムを準備できます。新しい圧力設定値によってリテンションタイムの期待値が得られるかを確かめるために、

シス/トランス FAME カラム性能混合物標準を再注入しました。図 8 に、結果のまとめとクロマトグラフィーの重ね合わせ表示を示します。再ロックされたカラムのトリミング後のリテンションタイムは、オリジナルのトリミング前のリテンションタイムとほぼ一致しました。100 m カラムにおける各主要成分のリテンションタイムの変化は 0.000 ~ 0.009 分の間です。C18:0 のリテンションタイム 35.700 分に対し、最初のターゲットリテンションタイムは 35.701 分で、相対差異率は 0.0028 % でした。



図 7. リテンションタイムロックの圧力キャリブレーションの結果

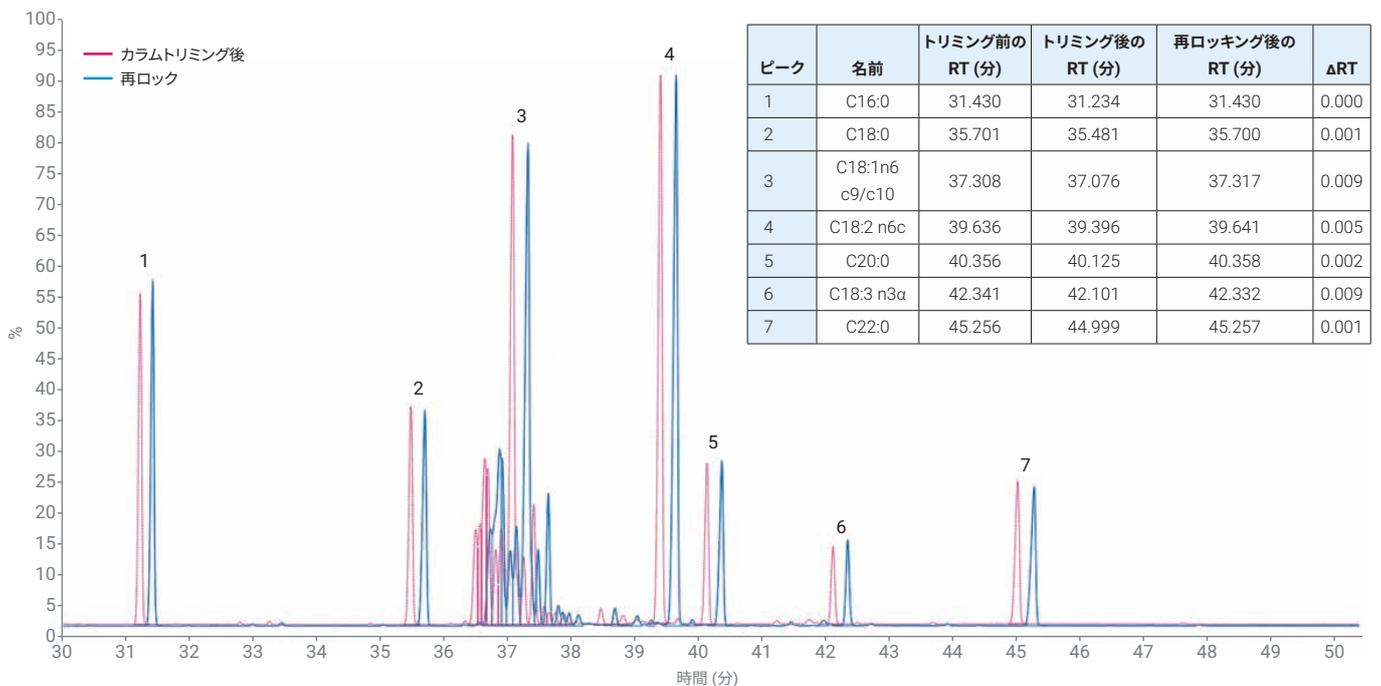


図 8. 再ロックの前後でのカラム性能標準の分析結果と拡大クロマトグラムの重ね合わせ表示

結論

Agilent 8890 GC システムでの Agilent CP-Sil 88 100 m カラムによる FAME 異性体の分離では、AOAC メソッド 2012.13 で指定された最小性能評価要件を上回る信頼性の高い分離能が実現します。専用の FAME カラム性能標準で注入の優れた再現性が得られ、2つの重要な C18 異性体のリテンションタイムの RSD は 0.007 % でした。カラム性能標準とアジレント独自の RTL 機能を組み合わせて使用することにより、FAME 異性体の一貫した正しい同定、機器メンテナンス後の早い稼働、ラボ間でのより容易な比較が実現します。

参考文献

1. Official Methods of Analysis AOAC International, Method 2012.13, **2012**.
2. David, F.; Sandra, P.; Vickers, A. K. Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5989 - 3760EN, **2005**.
3. Zou, Y.; Wu, H. Improving the Analysis of 37 Fatty Acid Methyl Esters. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-8706EN, **2018**.

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2019

Printed in Japan, November 15, 2019

5994-1184JAJP