

Agilent 8890 GC による 脂肪酸メチルエステル (FAME) の分析と 実際のサンプルへの適用

著者

Jie Zhang
Agilent Technologies, Inc.
Shanghai, China

概要

このアプリケーションノートでは、メソッド GB5009.168-2016¹ および 5009.257-2016² に準じて、Agilent 8890 GC を用いて長い極性カラムによる FAME 分析を行いました。GC メソッドは、代表的な 37 成分の FAME および 21 成分のトランス FAME の 80 分間の分離用に最適化しました。システムのリテンションタイム (RT)、面積の再現性、および直線性を評価し、実際の油サンプルから前処理した FAME 混合物を分析しました。

はじめに

脂質は主に脂肪酸とグリセロールのトリエステルであり、一般的にトリグリセリドと呼ばれます。栄養分のラベリングでは、脂肪はその由来にかかわらず食品に含まれる脂肪酸の合計と定義されており、トリグリセリドの同等物と表示されます。脂肪酸にはさまざまな種類があり、その不飽和性の程度（飽和、一価不飽和、多価不飽和）によって分類されます。トランス脂肪酸は、少なくとも 1 つのトランス型非共役二重結合が含まれる不飽和脂肪酸です。

食品の脂肪含有量は、栄養学において常に幅広く議論され、綿密に調査されてきた要素です。多くの消費者は、健康、栄養価、ダイエットなどの理由から、食品の脂肪含有量に関心を持っています。

食品中の脂肪を分析するため、GB 5009.168-2016¹ や GB 5009.257-2016² など多くのメソッドが開発されています。これら 2 つのメソッドでは、さまざまな食品マトリックスからの脂肪の抽出方法、脂肪酸から脂肪酸メチルエステル (FAME) へのエステル交換反応、分離およびデータ分析用に推奨される GC メソッドについて定めています。メソッド 168 は主に 37 種類の代表的な脂肪酸の分析について、メソッド 257 はトランス脂肪酸の分析について定めています。

材料

装置

- Agilent 8890 GC
とスプリット/スプリットレス注入口および水素炎イオン化検出器
- Agilent 7693A シリーズオートサンブラ (ALS) (p/n G4567A)

試薬

- 37 成分の FAME 混合物 (CDAA-252795-MIX-1 mL)、ANPEL Laboratory Technologies Inc. (上海) から購入、200 ~ 400 ng/μL の濃度範囲の C4–C24 FAME を含む。

- 13 成分のトランス FAME 混合物 (CDAA-2527、15 ~ 100 mg) および 8 成分のシス/トランスオクタデカトリエン酸メチルエステル (CDAB-CRM47792)、ANPEL Laboratory Technologies Inc. (上海) から購入。2 種類の混合物中の各成分の重量割合は 3 ~ 30 %。

サンプル

GB 5009.168-2016 に基づき、Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research が提供および前処理した大豆油、ピーナツ油、ごま油のサンプル。

機器

表 1. 分析条件

GC システム	8890A GC
S/SL 注入口	250 ° C、スプリット比 100:1、
ライナ	スプリット、ウルトラライナート、ガラスウール、低圧力損失 (p/n 5190–2295)
オープン昇温プログラム	100 ° C (13 分間)、10 ° C/min で 180 ° C まで昇温 (6 分間)、1 ° C/min で 200 ° C まで昇温 (20 分間)、4 ° C/min で 230 ° C まで昇温 (7 分間)
キャリアガス	窒素、40 psi、定圧モード
カラム	Agilent HP-88、100 m × 0.25 mm、0.20 μm (p/n 112-88A7)
検出器	280 ° C、 H ₂ : 40 mL/min 空気:400 mL/min メークアップガス:25 mL/min

結果と考察

GB 5009.168-2016 で推奨されているオープン温度プログラムを使用しました。定圧モードを使用し、カラムヘッド圧を 40 psi で最適化して、重要なペア (C20:0/C20:3n6) を最低でも分離度 1.3 で分離できるようにしました。これは、メソッドの所定の分離能要件である 1.25 を超える数値です。

37 成分の FAME の混合標準液を各成分が 50 ~ 100 ng/μL になるまで希釈し、システム再現性のテストに使用しました。この標準溶液は GB メソッドに従って選択しました。多くの食品サンプルの脂肪酸組成に似ているためです。オープン昇温プログラムは以下に示すように非常に長く、37 成分の FAME の分離に 81 分かかりました (図 1)。すべての成分を十分に分離できました。6 回の注入からのクロマトグラムの重ね表示は、面積と RT の再現性が非常に優れていました (図 1)。表 2 に各ピークの RT、面積、精度を示します。面積の再現性の範囲は 1 つの成分を除いて 1.1 ~

3.4 % (図 2) で、1 つの成分の面積 RSD% は 4.0 % に達しています。サンプル溶媒がヘキサンであり、1 回の注入あたりの分析時間が 80 分を超えているため、分析中にサンプル (特に溶媒) の蒸発によりサンプル濃度が少し変化しました。

各成分のカラムにロードされたサンプル量の範囲は、0.5 ~ 1 ng でした。溶媒の蒸発によるサンプル量の低下により、面積 RSD% が 2 % を少し上回りましたが、定量要件は満たしています。

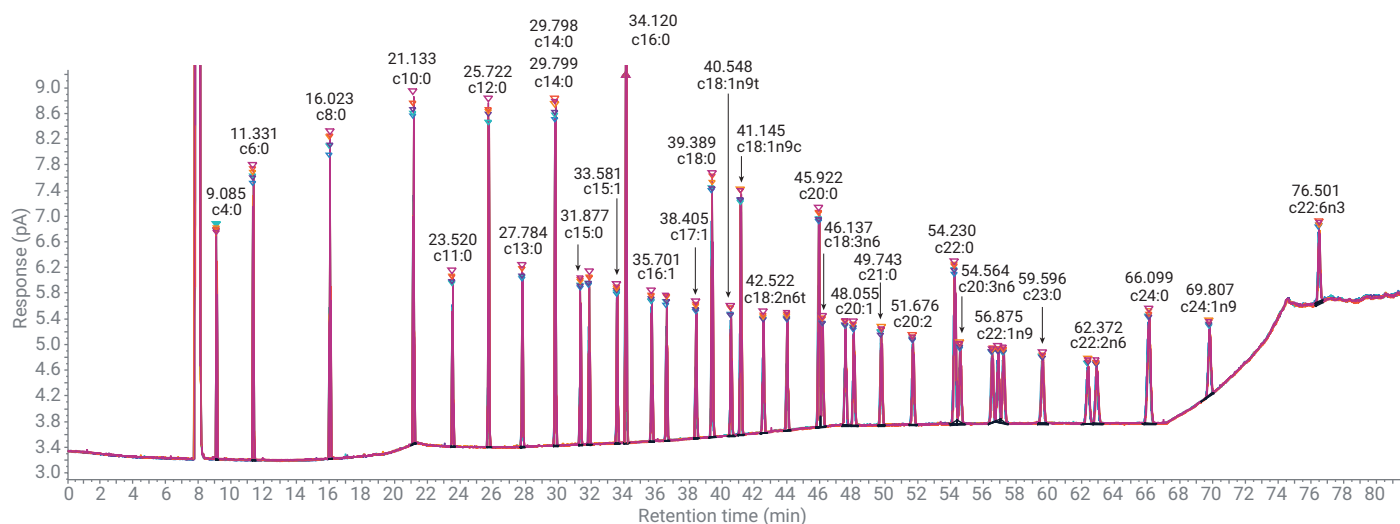


図 1. 8890 GC で 37 成分の FAME を 6 回注入した場合のクロマトグラムの重ね表示

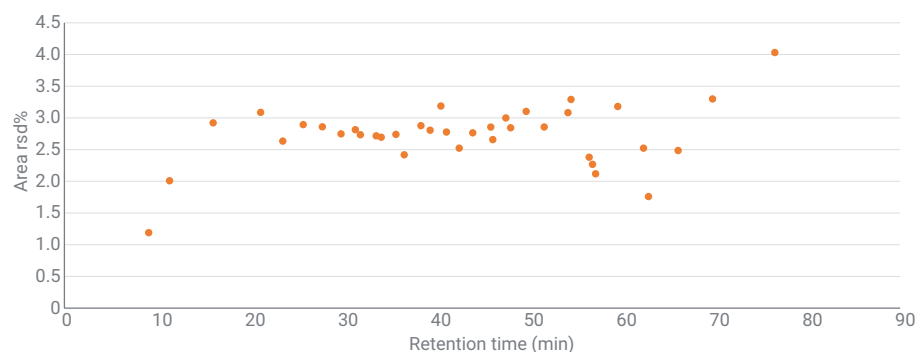


図 2. 37 成分の FAME を 6 回注入した場合の面積精度

リテンションタイムの再現性の範囲は 0.01 ～ 0.03 % でした (図 3)。分析時間が長い場合、優れたシステム再現性の達成は困難でしたが、8890A GC によるオープン温度、注入口圧力、検出器の流量の制御は正確、精密で安定していました。このため、再現性の高いクロマトグラムを生成し、信頼性の高い同定結果を得ることができました。

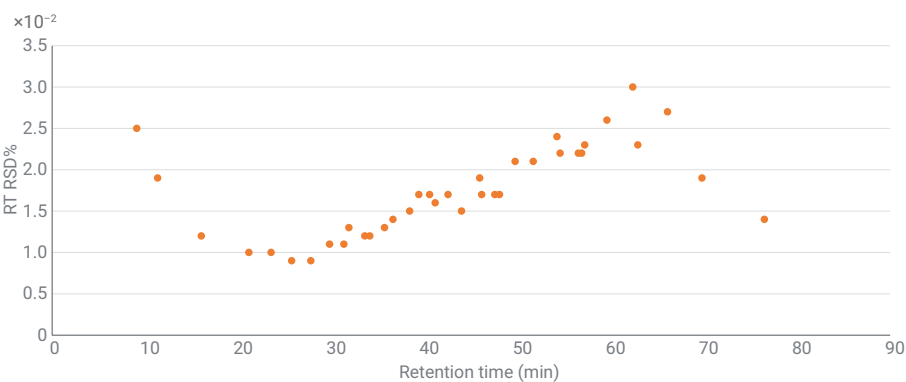


図 3. 37 成分の FAME を 6 回注入した場合の RT 精度

表 2. 37 成分の FAME を 6 回注入した場合の RT、面積、およびその精度

化合物	平均 RT (分)	RT RSD (%)	面積の平均	面積の RSD (%)
C4:0	9.086	0.025	6.903	1.189
C6:0	11.331	0.019	12.795	2.008
C8:0	16.022	0.012	16.599	2.921
C10:0	21.131	0.01	17.995	3.086
C11:0	23.518	0.01	9.365	2.633
C12:0	25.721	0.009	18.702	2.893
C13:0	27.783	0.009	9.655	2.859
C14:0	29.796	0.011	19.362	2.747
C14:1	31.333	0.011	9.57	2.813
C15:0	31.874	0.013	9.9	2.733
C15:1	33.58	0.012	9.818	2.716
C16:0	34.119	0.012	29.97	2.694
C16:1	35.699	0.013	9.999	2.739
C17:0	36.602	0.014	10.125	2.417
C17:1	38.4	0.015	10.053	2.876
C18:0	39.385	0.017	20.432	2.805
C18:1n9t	40.544	0.017	10.294	3.186
C18:1n9c	41.142	0.016	20.389	2.776
C18:2n6t	42.519	0.017	10.188	2.522

化合物	平均 RT (分)	RT RSD (%)	面積の平均	面積の RSD (%)
C18:2n6c	43.972	0.015	10.363	2.763
C20:0	45.919	0.019	20.719	2.854
C18:3n6	46.135	0.017	10.003	2.657
C18:3n3	47.54	0.017	10.167	2.998
C20:1	48.052	0.017	10.354	2.843
C21:0	49.731	0.021	10.554	3.102
C20:2	51.671	0.021	10.302	2.855
C22:0	54.225	0.024	21.046	3.082
C20:3n6	54.554	0.022	10.28	3.29
C20:3n3	56.514	0.022	10.244	2.379
C22:1n9	56.871	0.022	10.273	2.266
C20:4n6	57.204	0.023	10.633	2.117
C23:0	59.588	0.026	10.693	3.179
C22:2n6	62.36	0.03	10.415	2.521
C20:5n3	62.903	0.023	10.177	1.758
C24:0	66.093	0.027	21.326	2.484
C24:1n9	69.797	0.019	10.863	3.298
C22:6n3	76.499	0.014	9.456	4.03

5 つの濃度で C18:1c FAME および C18:2c FAME のレスポンス係数 (RF) の相対標準偏差 (RSD%) を計算し、システムの直線性を評価しました。表 3 から、2 つのプローブ成分の RF RSD% が 4 % 程度と低いことがわかります。つまり、ピークレスポンスに関して直線性が優れているということです。定量に ESTD メソッドを使用するラボもあります。広い濃度範囲で検出器の直線性が優れていると、シングルポイントの ESTD メソッドを使用しても正確な定量が可能です。

図 4 に、13 成分のトランス FAME と 8 成分のオクタデカトリエン酸メチルエステルの異性体の混合物の分離を示します。これらの結果は GB 5009.257-2016 に従って達成したものです。オープン温度プログラムは、37 成分の FAME 混合物の分析時と同じものを使用しました。C18:3 トランス FAME の 8 つの異性体は、特に分離が困難です。C18:3 FAME と共存する他の FAME を同じ分析で分離する必要があります。ところが 100 m の HP-88 カラムを使用すると、オクタデカトリエン酸メチルエステルの拡大した溶出セクションに、8 つの異性体の 8 つのピークが出現しました

(図 5)。分離能は、ベースライン分離には遠く及ばないものの、GB 5009.257-2016 のリファレンスクロマトグラムとの比較では許容範囲内でした。またシス-9、シス-12、シス-15-オクタデカトリエン酸メチルエステルを、他のトランス異性体から十分に分離できました。これは、栄養表示ラベル業界でトランス脂肪酸がラベル表示されることを考えると重要なポイントです。

表 3. C18:1-シスと C18:2-シスの面積レスポンスの直線性

成分	濃度	面積 (PA*S)	RF (量単位のレスポンス)	RF の RSD%
C18:1-シス	1.7 ppm	0.330	0.194	4.7 %
	17 ppm	3.002	0.177	
	170 ppm	29.152	0.171	
	1,700 ppm	301.107	0.177	
	17,000 ppm	3,065.390	0.180	
C18:2-シス	0.86 ppm	0.155	0.180	3.0 %
	8.6 ppm	1.628	0.189	
	86 ppm	14.833	0.172	
	860 ppm	152.562	0.177	
	8,600 ppm	1,550.921	0.180	

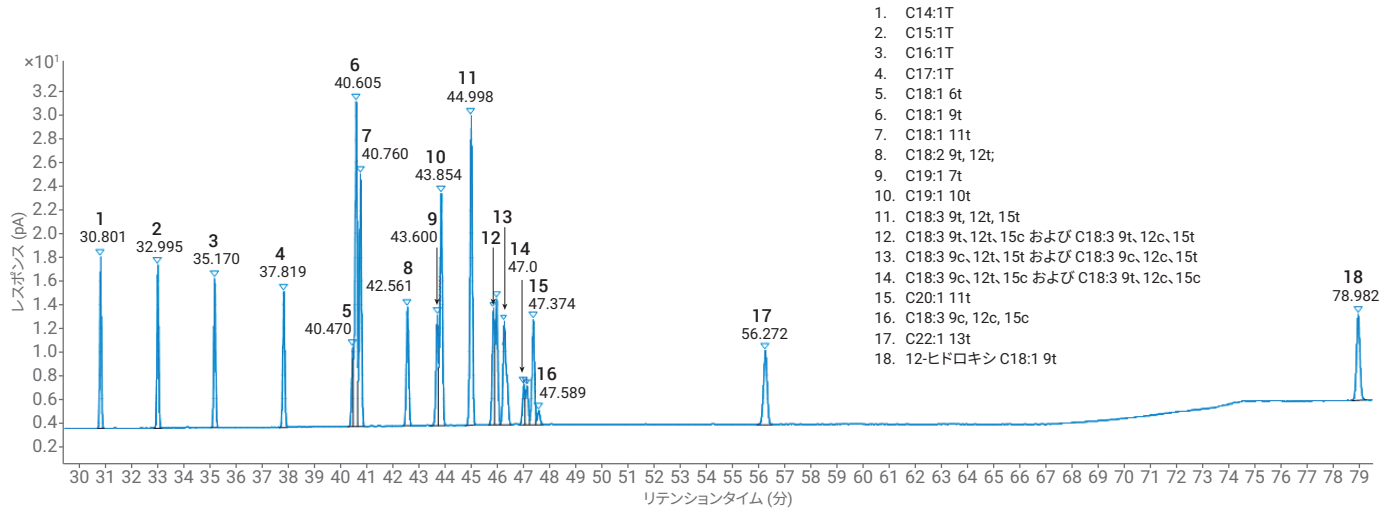


図 4. HP-88 カラムでの 21 成分のトランス FAME のクロマトグラム

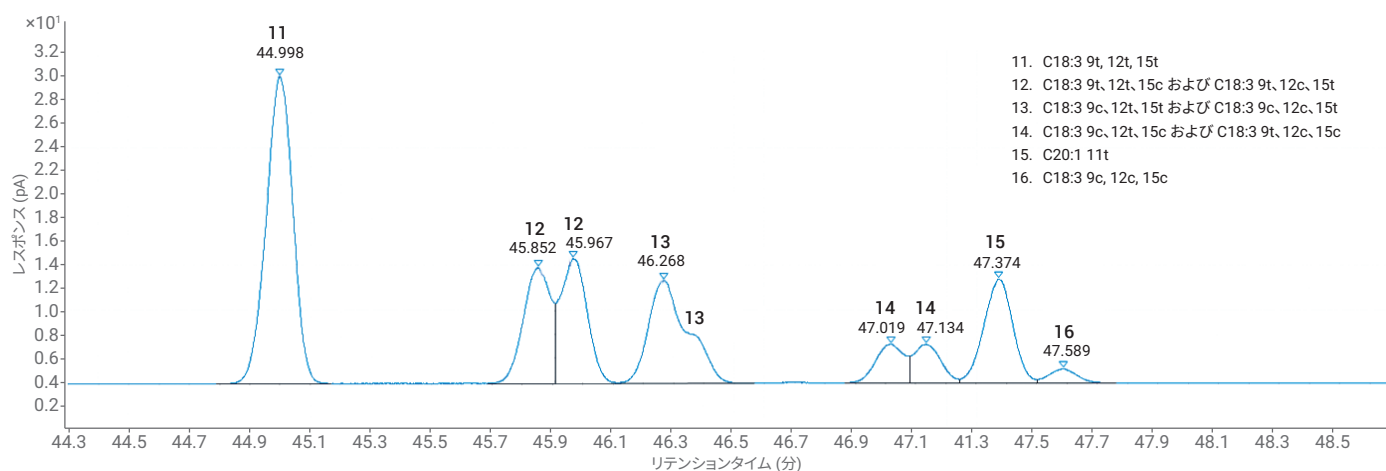


図 5. オクタデカトリエン酸メチルエステル異性体のクロマトグラムの拡大図

8890 GC プラットフォームでは、GB 5009.168-2016 に従って実際の油サンプル(大豆油、ピーナツ油、ごま油)を抽出、誘導体化、分析することができました。図 6A、6B、6C に結果のクロマトグラムを示します。C16:0、C18:0、C18:1n9c、C18:2n6c、C18:3n3、C20:1 は、3 種類の油サンプルで同定された主要脂肪酸です(図 6A、6B、6C 中の赤色のフォントラベルは、メソッドキャリブ

レーションテーブルに含まれるが実際のサンプルでは同定されなかった化合物です)。

FAME 分析では、短いポリシアノプロピルシロキサンカラムを使った高速分析によって、代表的な 37 成分の FAME を 10 分以内で分離することもできます³。ただし高速分析では、シス/トランス FAME の分離がある程度制限されます。長い極性カラムを用いた 60 ~ 80 分間の FAME 分析は、複雑なシス/トランス脂肪酸など、分析困難な

異性体の分離が必要なサンプルを処理するために開発されました。エキストラバージンオリーブ油の品質テストといった特定のアプリケーションにおいて、シス/トランス FAME の効率的な分離は分析時間より重要です。

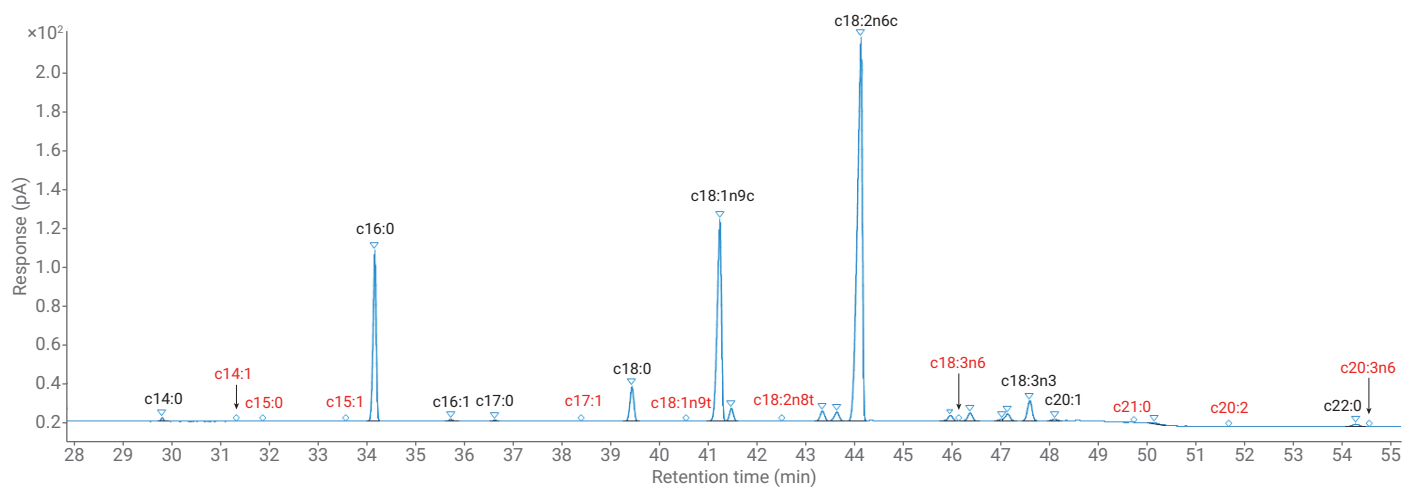


図 6A. ごま油の分析のクロマトグラム

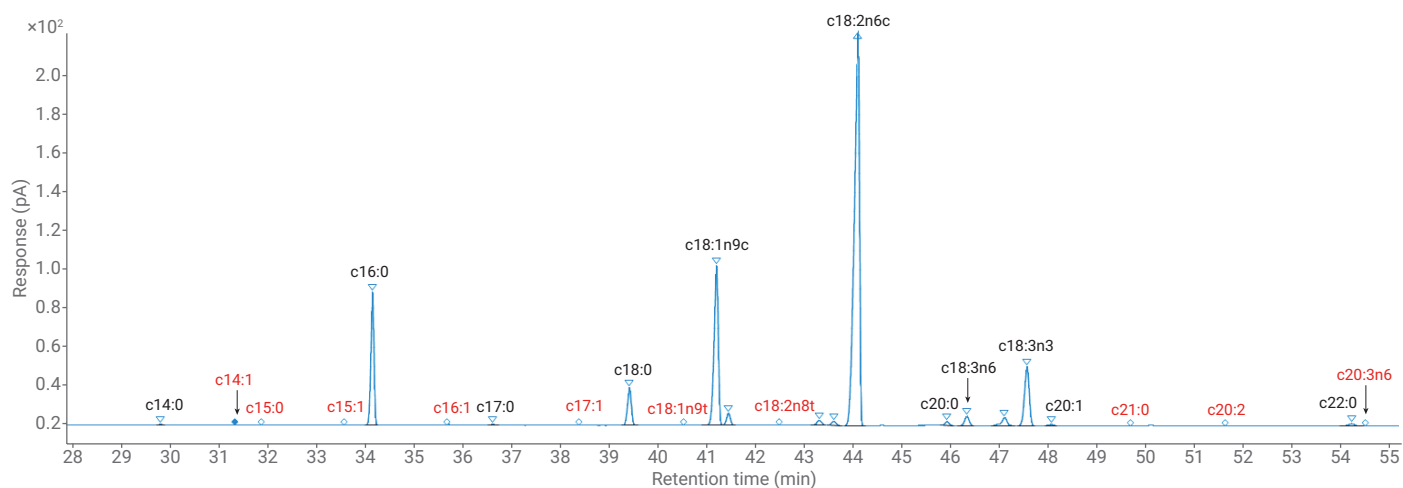


図 6B. 大豆油の分析のクロマトグラム

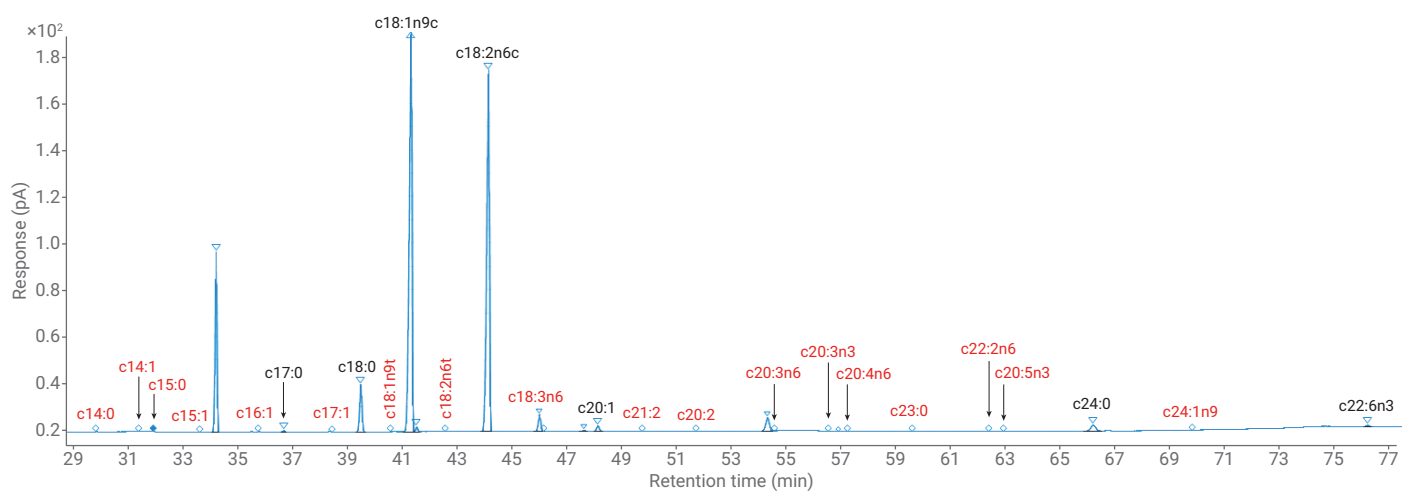


図 6C. ピーナツ油の分析のクロマトグラム

結論

8890A GC と HP-88 カラムを組み合わせ、代表的な 37 成分の FAME と 21 成分のトランス FAME を分析すると、いずれのサンプルでも優れた分離能を得ることができました。重要な化合物ペアについては、メソッド GB 5009.168-2016 および GB 5009.257-2016 の要件以上の分離能を達成しました。リテンションタイム、面積再現性、FID の広い直線検出範囲などから、8890A GC は信頼性の高い FAME に最適なプラットフォームであると結論付けることができます。

参考文献

1. Determination of fatty acids in food, GB5009.168-2016 method.
2. Determination of *trans* fatty acids in food, GB5009.257-2016 method
3. A fast analysis of FAME by Intuvo 9000 GC, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-9482.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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, January 2, 2019
5994-0549JAJP