

# Agilent J&W HP-88 キャピラリ GC カラムを用いた乳児用調製粉乳中の 脂肪酸分析

## アプリケーションノート

食品安全性

### 著者

Shun Na  
Agilent Technologies (China)  
Co.Ltd , No.3 Wang Jing Bei Road  
Chao Yang District Beijing 100102  
P.R.China  
Yun zou  
Agilent Technologies (Shanghai)  
Co.Ltd, 412 YingLun Road  
Waigaoqiao Free Trade Zone  
Shanghai 200131 P.R.China

### 概要

このアプリケーションノートでは、乳児用調製粉乳中の脂肪酸測定に対応する、効率的かつ経済的な RTL-GC/FID メソッドを紹介します。塩化アセチルメタノールメチルエステル化を行い、脂肪酸を FAMES に変換しました。Agilent J&W HP-88 キャピラリ GC カラムを使用すれば、シス-トランス異性体を含む複雑な FAMES を良好に分離できます。



**Agilent Technologies**

## はじめに

乳児用調製粉乳は、母乳の代替品として広く利用されています。したがって、調乳に含まれる栄養のバランスは、きわめて長期的な影響を及ぼすことがあります。乳児用調乳の主成分である脂肪については、脂肪酸成分の影響を考慮することが特に重要です。なぜならば、脂肪酸は生物系に、大きな役割を果たしているからです。脂肪酸は生体膜の脂質を構成する成分で、流動性や完全性、浸透性、膜結合酵素の活性といった膜特性に影響を与えます [1]。特に、ドコサエキサエン酸 (DHA)、アラキドン酸 (ARA)、エイコサペンタエン酸 (EPA) といった一部の長鎖ポリ不飽和脂肪酸は、正常な視覚や脳の発達にとって重要です。一方で、標準的な乳児用調乳では、トランス脂肪酸を使用するべきではありません。例外的に、部分硬化脂肪を調乳で使用する場合は、トランス脂肪酸が全脂肪酸の 3 % を超えないようにしなければなりません。

これまでのところ、脂肪酸の分析メソッドとしては、GC がもっとも広く用いられています [2]。また、脂肪酸は通常、脂肪酸メチルエステル (FAME) として分析されます。アジレントは、さまざまな用途に応じた幅広い FAME 分析ソリューションを提供しています [3]。

2010 年、乳幼児用食品に含まれる脂肪酸をモニターする中国の基準 GB/T 5413.27-2010 が公布されました [4]。このアプリケーションノートでは、この基準に従い、HP-88 カラムを FAME 分析カラムとして用いて、ガスクロマトグラフィ-水素炎イオン化検出 (GC-FID) および GC/MSD により 37 成分混合物を分離する方法を紹介します。

## 実験

### 標準試料

FAMEs の標準物質を、Seperlco Co.,Ltd.(上海、中国) から購入しました。37 成分混合物 (Supelco #18919) は、C4 ~C24 FAMEs (相対濃度 2 %~4 %) を含む 100-mg の混合物として提供されています。使用前に、標準溶液をヘキササン 10 mL で希釈しました。各 FAME の最終濃度を 0.2~0.4 mg/mL としました。

### サンプル前処理

サンプル約 500 mg を 0.1 mg の誤差で計り、20-mL スクリューキャップチューブに入れました。サンプルをトルエン 5 mL に溶解し、10 % 塩化アセチル-メチルメタノール溶液 6 mL をチューブに加えました。チューブの蓋を閉め、水槽で 2 時間、80 °C でインキュベーションしたのち、室温まで冷却しました。溶液を 50-mL 遠心分離チューブに移し、チューブを 6 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液で洗浄しました。すべての Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液を集めて 50-mL 遠心分離チューブに入れ、5,000 rpm で 5 分間、遠心分離しました。上澄み液をサンプルバイアルに移し、GC で分析しました。

## 使用機器

分析には、Agilent 7890A GC-FID システムと Agilent 7890 GC-5975C MSD システムを使用しました。機器条件を表 1 および 2 にまとめています。

表 1. GC/FID システムの分析条件

|           |                                               |
|-----------|-----------------------------------------------|
| GC        | Agilent 7890A シリーズ                            |
| オートサンブラ   | Agilent 7683 インジェクタおよび サンプルトレイ                |
| カラム       | HP-88、100 m x 0.25 mm x 0.2 μm (p/n 112-88A7) |
| 注入口       | 260 °C、スプリット比 30:1                            |
| キャリアガス    | ヘリウム、コンスタントフローモード、1 mL/min                    |
| リテンションタイム | C16:0 を 18.600 分でロック                          |
| ロッキング     |                                               |
| オープン温度    | 140 °C (5 分)、4 °C/min で 240 °C へ (15 分)       |
| 検出器       | FID @ 280 °C                                  |
| 注入口ライナ    | スプリットライナ、テーパー不活性化 (p/n 5183-4647)             |
| 注入量       | 1 μL                                          |

表 2. GC/MS システムの分析条件

|            |                                                           |
|------------|-----------------------------------------------------------|
| GC         | Agilent 7890A シリーズ                                        |
| オートサンブラ    | Agilent 7683 インジェクタおよび サンプルトレイ                            |
| カラム        | Agilent J&W HP-88、100 m x 0.25 mm x 0.2 μm (p/n 112-88A7) |
| 注入口        | 260 °C、スプリット比 30:1                                        |
| キャリアガス     | ヘリウム、コンスタントフローモード、20 cm/s                                 |
| オープン温度     | 140 °C (5 分)、4 °C/min で 240 °C へ (15 分)                   |
| 注入量        | 1 μL                                                      |
| 質量選択検出器    | 5975C MSD                                                 |
| トランスファーライン | 280 °C                                                    |
| 溶媒ディレイタイム  | 8.2 分                                                     |
| 取り込みモード    | スキャン (40~400 amu)                                         |

## 結果と考察

ここで述べる GC/FID メソッドは、FAMEs の品質管理に使用できます。図 1 に、HP-88 カラムで得られた 37 成分 FAMEs 標準物質の代表的なクロマトグラムを示しています。クロマトグラムからもわかるように、Agilent J&W HP-88 GC カラムによりほとんどのターゲット化合物が分離でき、良好なピーク形状が得られています。ただし、C20:3n3、C22:1n9、C20:4n6 (ARA) は例外です。これらの化合物は、GB/T 5413.27-2010 でも分離できません。ARA はオメガ-6 ポリ不飽和脂肪酸 [C20:4 (n-6)] で、ヒト母乳に天然で存在しています。ARA は一般に、重要な栄養素として乳児用調乳製品に添加されます。図 1 では、ARA と C22:1n9 の分離能は 1 程度で、この分離能はスプリット比を高くすると向上します。これらの化合物の分離は、乳幼児用食品の安全性を分析するうえでは十分なものです。

中国基準 GB 5413.27-2010 のクロマトグラムと比べると、図 1 では C18:3n3、C22:1n9、C20:5n3 (EPA) の溶出順序が異なります。これは、シアノプロピル-ポリシロキサンカラムの種類によって、FAMEs のリテンションタイムが異なるためです。

FAMEs の同定ミスリスクを低減するために、GC/MS で標準溶液を分析しました。37 成分 FAMEs の標準物質について得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC) を図 2 に示します。GC-FID と同様の分離が得られています。この GC-MS メソッドも、複雑な混合物中の FAMEs の分析に有効です。

表 3. 各FAMEs のリテンションタイム、CAS 番号、分子式、分子量

| ピーク<br>番号 | RT<br>(分) | 化合物                                                              | CAS 番号     | 分子式      | 分子量 |
|-----------|-----------|------------------------------------------------------------------|------------|----------|-----|
| 1         | 8.82      | Butyric acid methyl ester (C4:0)                                 | 623-42-7   | C5H10O2  | 102 |
| 2         | 9.23      | Caproic acid methyl ester (C6:0)                                 | 106-70-7   | C7H14O2  | 130 |
| 3         | 9.96      | Caprylic acid methyl ester (C8:0)                                | 111-11-5   | C9H18O2  | 158 |
| 4         | 11.20     | Capric acid methyl ester (C10:0)                                 | 110-42-9   | C11H22O2 | 186 |
| 5         | 12.06     | Undecanoic acid methyl ester (C11:0)                             | 1731-86-8  | C12H24O2 | 200 |
| 6         | 13.09     | Lauric acid methyl ester (C12:0)                                 | 111-82-0   | C13H26O2 | 214 |
| 7         | 14.29     | Tridecanoic acid methyl ester (C13:0)                            | 1731-88-0  | C14H28O2 | 228 |
| 8         | 15.63     | Myristic acid methyl ester (C14:0)                               | 124-10-7   | C15H30O2 | 242 |
| 9         | 16.75     | Methyl myristoleate (C14:1)                                      | 56219-06-8 | C15H28O2 | 240 |
| 10        | 17.07     | Pentadecanoic acid methyl ester (C15:0)                          | 7132-64-1  | C16H32O2 | 256 |
| 11        | 18.27     | cis-10-Pentadecenoic acid methyl ester (C15:1)                   | 90176-52-6 | C16H30O2 | 254 |
| 12        | 18.60     | Palmitic acid methyl ester (C16:0)                               | 112-39-0   | C17H34O2 | 270 |
| 13        | 19.64     | Palmitoleic acid methyl ester (C16:1)                            | 1120-25-8  | C17H32O2 | 268 |
| 14        | 20.16     | Heptadecanoic acid methyl ester (17:0)                           | 1731-92-6  | C18H36O2 | 284 |
| 15        | 21.23     | cis-10-Heptadecenoic acid methyl ester (C17:1)                   | 75190-82-8 | C18H34O2 | 282 |
| 16        | 21.74     | Stearic acid methyl ester (C18:0)                                | 112-61-8   | C19H38O2 | 298 |
| 17        | 22.37     | trans-9-octadecenoic methyl ester (C18:1n9t)                     | 2462-84-2  | C19H36O2 | 296 |
| 18        | 22.69     | Oleic acid methyl ester (C18:1n9c)                               | 112-62-9   | C19H36O2 | 296 |
| 19        | 23.35     | Linolelaidic acid methyl ester (C18:2n6t)                        | 2566-97-4  | C19H34O2 | 294 |
| 20        | 24.08     | Linoleic acid methyl ester (C18:2n6c)                            | 112-63-0   | C19H34O2 | 294 |
| 21        | 24.87     | Arachidic acid methyl ester (C20:0)                              | 1120-28-1  | C21H42O2 | 326 |
| 22        | 25.07     | $\gamma\gamma$ -Linolenic acid methyl ester (C18:3n6)            | 16326-32-2 | C19H32O2 | 292 |
| 23        | 25.68     | Linolenic acid methyl ester (C18:3n3)                            | 301-00-8   | C19H32O2 | 292 |
| 24        | 25.83     | cis- 11-Eicosenoic acid, methyl ester (20:1)                     | 2390-09-2  | C21H40O2 | 324 |
| 25        | 26.43     | Heneicosanoic acid methyl ester (C21:0)                          | 6064-90-0  | C22H44O2 | 340 |
| 26        | 27.29     | cis- 11,14-Eicosadienoic acid methyl ester (C20:2)               | 2463-02-7  | C21H38O2 | 322 |
| 27        | 28.05     | Behenic acid methyl ester (C22:0)                                | 929-77-1   | C23H46O2 | 354 |
| 28        | 28.38     | cis- 8,11,14-Eicosatrienoic acid, methyl ester (C20:3n6)         | 21061-10-9 | C21H36O2 | 320 |
| 29        | 29.04     | cis- 11,14,17-Eicosatrienoic acid methyl ester (C20:3n3)         | 55682-88-7 | C21H36O2 | 320 |
| 30        | 29.11     | Erucic acid methyl ester (C22:1n9)                               | 1120-34-9  | C23H44O2 | 352 |
| 31        | 29.22     | Arachidonic acid methyl ester (C20:4n6)                          | 2566-89-4  | C21H34O2 | 318 |
| 32        | 29.71     | Tricosanoic acid methyl ester (C23:0)                            | 2433-97-8  | C24H48O2 | 368 |
| 33        | 30.74     | cis-13,16-Docosadienoic acid, methyl ester (C22:2n6)             | 61012-47-3 | C23H42O2 | 350 |
| 34        | 31.16     | cis- 5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid methyl ester (C20:5n3)   | 2734-47-6  | C21H32O2 | 316 |
| 35        | 31.48     | Lignoceric acid methyl ester (C24:0)                             | 2442-49-1  | C25H50O2 | 382 |
| 36        | 32.74     | Nervonic acid methyl ester (C24:1n9)                             | 2733-88-2  | C25H48O2 | 380 |
| 37        | 36.54     | cis- 4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid methyl ester (C22:6n3) | 301-01-9   | C23H34O2 | 342 |

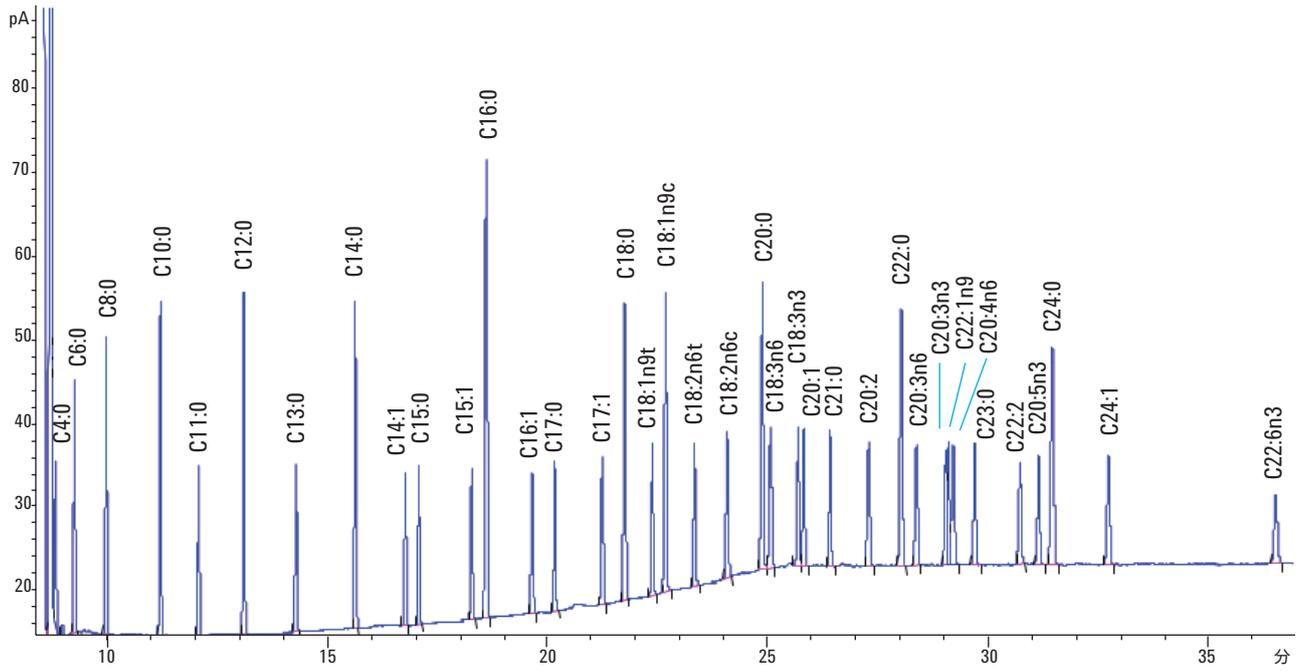


図 1. Agilent J&W HP-88、100m x 0.25 mm x 0.20  $\mu$ m カラムを用いた 37 成分 FAMES 標準混合物質の GC-FID 分析 (GC-FID メソッドは表 1 を参照)

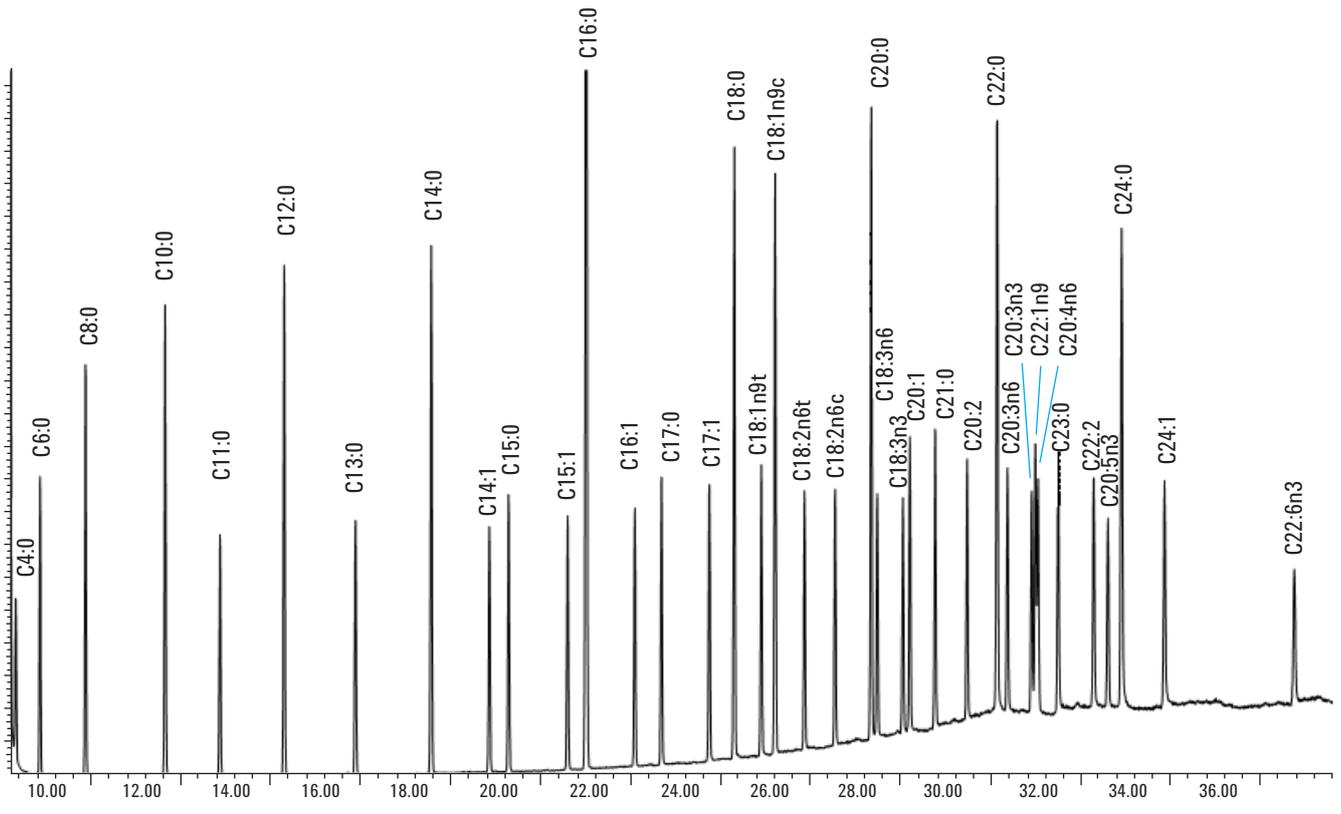


図 2. Agilent J&W HP-88、100 m x 0.25 mm x 0.20  $\mu$ m カラムを用いた 37 成分 FAMES 標準混合物質の GC-MS 分析 (GC-MS メソッドは表 2 を参照)

## 実サンプルの分析

分析したすべてのサンプルを、サンプル前処理の項目で述べた手順に従って調整しました。乳児用調乳分析の一例を図 3 に示しています。実サンプルを分析する場合、ミルクのサンプルに含まれる脂肪酸の実際の組成には大きな違いがあります。濃度は 0.01~5 % の範囲で変動します。そのため、各化合物のリテンションタイムも変動することがあります。実サンプルの濃度に応じて、標準溶液の前処理をおこなう必要があります。

リテンションタイムロッキング (RTL) は、アジレント製 GC にてリテンションタイムを再現できる便利なツールです [5]。GC/FID システムを C16:0 に対して 18.60 分でリテンションタイムロック (RTL) しました。各化合物のリテンションタイムは、表 3 に記載しています。

図 4 は、RTL-GC-FID メソッドを用いて得られた、別の実サンプルである抽出物 (粉ミルク) と標準混合物質のクロマトグラムを示しています。この図では、優れた再現性が示されています。このメソッドを乳児用調乳の脂肪酸の品質管理に用いたところ、優れた分離能が得られ、基準で定められた条件を満たすことができました。

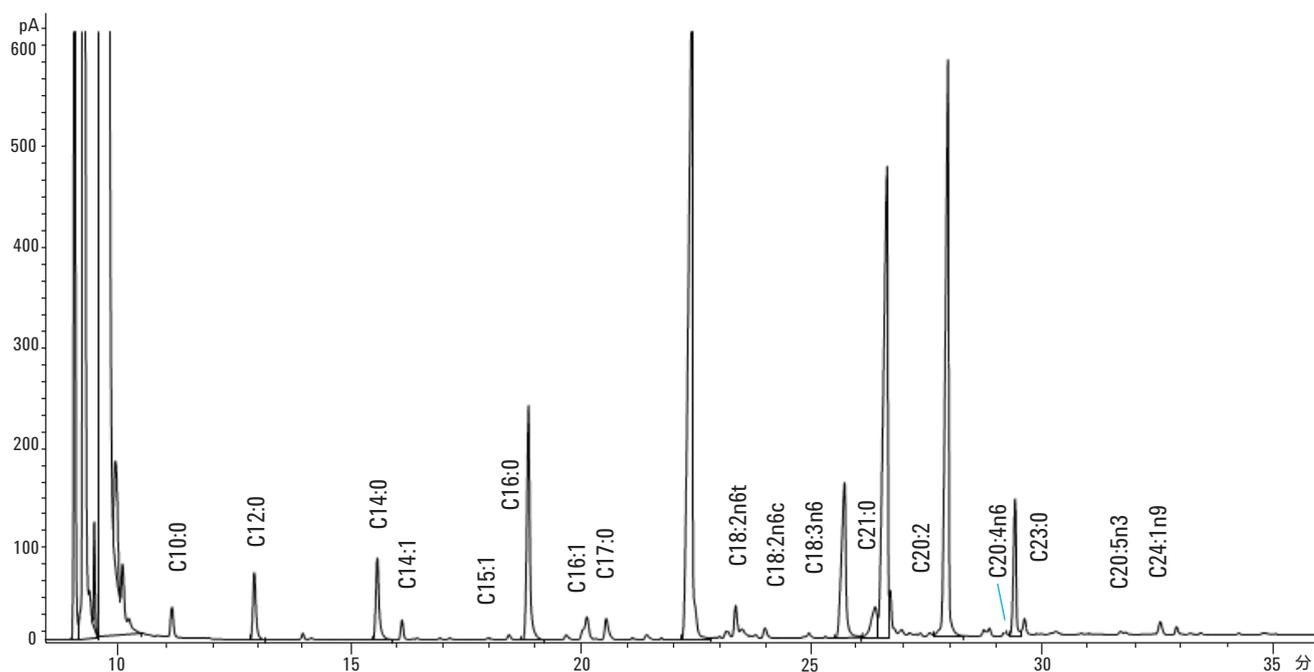


図 3. Agilent J&W HP-88 GC 100 m x 0.25 mm x 0.20  $\mu$ m カラムを用いた乳児用調乳中 FAMES の GC-FID 分析

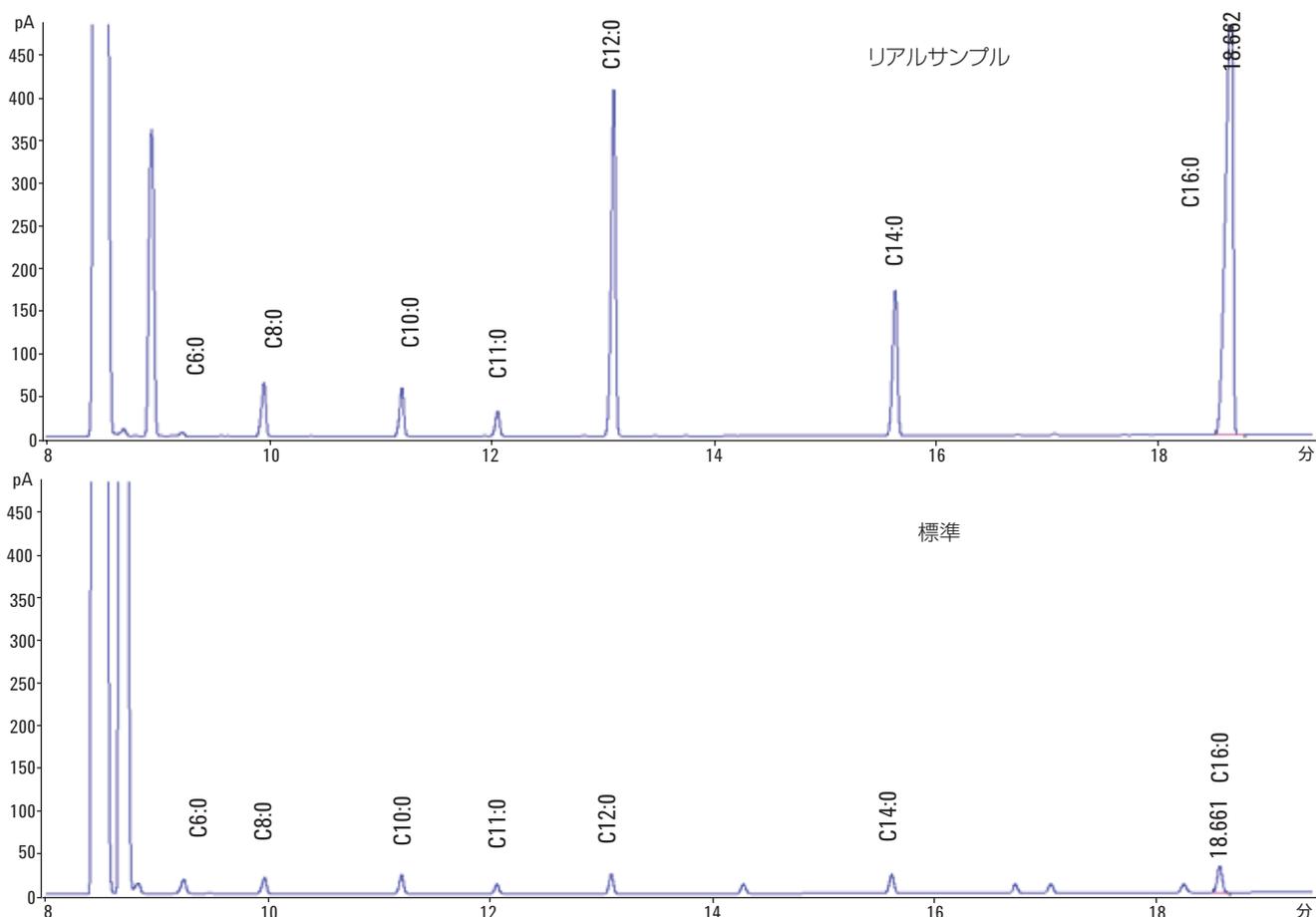


図 3. Agilent J&W HP-88 GC 100 m x 0.25 mm x 0.20 μm カラムを用いた乳児用調乳中 FAMES の GC-FID 分析

## 結論

このアプリケーションノートでは、乳児用調製粉乳中の脂肪酸分析に対応する、効率的かつ経済的な RTL-GC/FID メソッドを紹介しています。GC/FID と GC/MS を用いて、37 成分 FAME 標準物質を分析しました。Agilent J&W HP-88 GC カラムは FAMES を効率的に分離でき、良好なピーク形状が得られました。基準で定められたメソッド条件を満たしながら、信頼性の高い結果を得ることができます。

## 参考文献

1. Stubbs CD, Smith AD. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim Biophys Acta*. 1984 Jan 27; 779(1):89-137.”
2. Eder K. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1995 Sep 15; 671(1-2):113-131.

3. Frank David, Pat Sandra and Allen K. Vickers 「脂肪酸メチルエステル分析に使用するカラムの選択」、アジレント・テクノロジー、資料番号 5989-3760JAJ.P.
4. National food safety standard (China), GB 5413.27-2010: Determination of fatty acids in foods for infants and young children, milk and milk products.
5. V.Giarocco, B. Quimby, and M. Klee, “Retention Time Locking: Concepts and Applications,” Agilent Technologies, publication 5966-2469EN, [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

## 詳細情報

ここに記載されたデータは、代表的な結果を示したものです。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト [www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。



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

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc., 2011  
Printed in Japan  
June 17, 2011  
5990-8429JAJP



**Agilent Technologies**