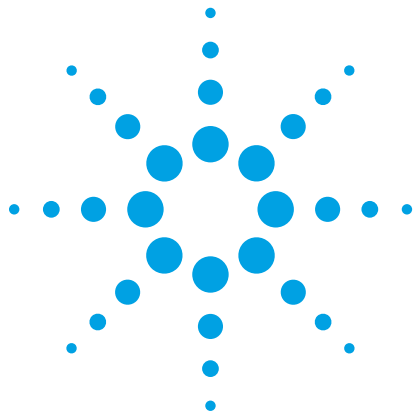




自動サンプル前処理を使用した サケ油中の脂肪酸メチルエステル (FAME) の測定

アプリケーションノート

食品

著者

Norbert Helle、Monika Bzduch
TeLA GmbH Bremerhaven
Rebecca Veeneman,
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して、脂肪酸 (FA) の誘導体化を自動で行いました。遊離脂肪酸はガスクロマトグラフでテーリングが起こるため、脂肪酸を脂肪酸メチルエステル (FAME) に変換する方法が広く使用されています。手動によるサンプルの誘導体化には時間が掛かり、繰り返し再現性が低下することがあります。自動的な誘導体化では、再現性が大きく向上し、時間が短縮されます。特に高度不飽和脂肪酸では、手動手順を使用した場合、反応温度と反応時間のわずかな変動が、繰り返し再現性にマイナスの影響を与えることがあります。

サケ油は、多価不飽和オメガ-3 脂肪酸の優れた供給源です。2 つの主要な脂肪酸、つまりエイコサペンタエン酸 (EPA) とドコサヘキサエン酸 (DHA) は健康上の重要な要素として特定されており、心臓の正常な働きに関連しています。EPA および DHA の濃度は、サケ油カプセルの重要な品質指標です。このアプリケーションノートでは、サケ油カプセルにおける EPA および DHA の Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチによる誘導体化とその後の測定について説明しています。



Agilent Technologies

材料と実験方法

サンプル前処理では、10 mg のサケ油を 2 mL のオートサンプルバイアルに測り取りました。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチの液体分注モジュールを使用して、サンプルを 500 μ L の tert-ブチルメチルエーテル (TBME) で希釈し、搭載されたボルテックスミキサを使用して 90 秒間混合しました。前処理を行ったサンプルの 250 μ L を空バイアルに移し、125 μ L のトリメチルスルホニウムヒドロキシド (TMSH) 誘導体化試薬 (MachereyNagel, Düren) を加え、ワークベンチのボルテックスミキサを使用して混合しました。バイアルヒータを使用し、この混合物を 80 °C で 5 分間加熱しました。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチでの自動前処理のフローを図 1 に示します。

測定条件を表 1 に示します。

表 1. GC/FID の条件

ピークの特徴

C14:0	ミリスチン酸
C16:0	パルミチン酸
C16:1	パルミトレイン酸
C18:0	ステアリン酸
C18:1	オレイン酸
C18:2	リノール酸
C20:0	アラキン酸
C18:3	γ -リノレイン酸
C20:1	ガドレイン酸
C18:3	リノレイン酸
C22:1	エルカ酸
C20:4	アラキドン酸
C20:5	エイコサペンタエン酸
C24:1	ネルボン酸
C22:6	ドコサヘキサエン酸

GC の条件

機器	Agilent 6890 シリーズ GC
カラム	HP 88、100 m $\times$ 250 μ m、0.20 μ m
注入量	2 μ L
インジェクタ	スプリット/スプリットレス、 スプリット 50:1
キャリアガス	H ₂
温度プログラム	70 ~ 260 °C
流量	1.4 mL/min
検出器	250 °C、FID
	H ₂ 流量 : 40 mL/min
	空気流量 : 450 mL/min
	メークアップ流量、N ₂ : 45 mL/min

Agilent ワークベンチのプログラム

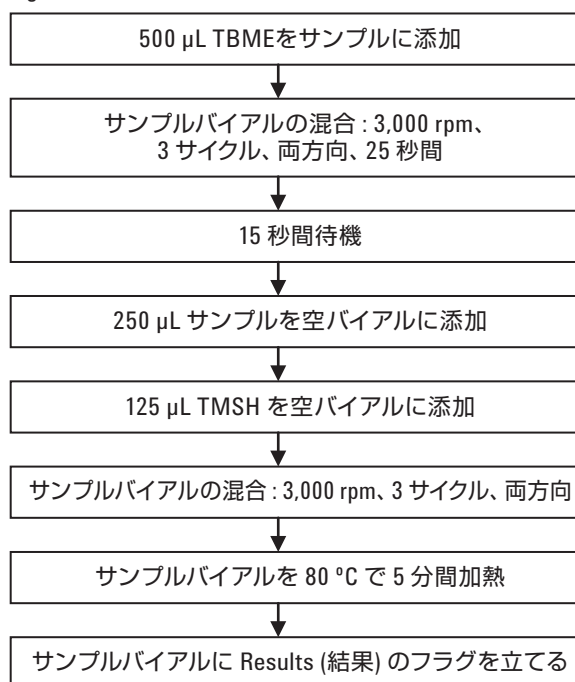


図 1. Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用した FAME サンプル前処理のフロー

結果と考察

図 2 に Agilent 7696A ワークベンチでサケ油から得られた FAME の分離を示します。この分離によって、すべての FAME を明確に同定することができます。主要な 2 つの化合物のリテンションタイムは、35.07 分 (EPA) と 40.55 分 (DHA) です。EPA (23.7 %) と DHA (20.0 %) を除き、サケ油は不飽和脂肪酸であるオレイン酸 (12 %)、リノール酸 (11 %)、パルミトレイン酸 (8 %) で構成されています。飽和脂肪酸であるパルミチン酸とステアリン酸の含有量は低く、それぞれ 4 % および 5 % です。

繰り返し再現性のテストでは、10 個の個別のサケ油サンプルを誘導体化および分析を行い、自動サンプル前処理とクロマトグラムの再現性を確認しました。図 3 に示すように、優れた繰り返し再現性が得られました。

EPA と DHA のピークの絶対面積値の標準偏差は 1 % 未満でした (EPA が 0.51 %, DHA が 0.78 %)。さらに、EPA と DHA の相対濃度の変動は安定していました。相対標準偏差は、EPA では 0.85 %, DHA では 1.22 % を達成しました。10 個のサンプルで異常値は観察されませんでした。

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチでのサンプル前処理の合計時間は、サンプルあたりわずか 20 分間でした。これに対し、手動による誘導体化の時間はラボ技術者の技術によって異なり、最大で 2 時間となりました。

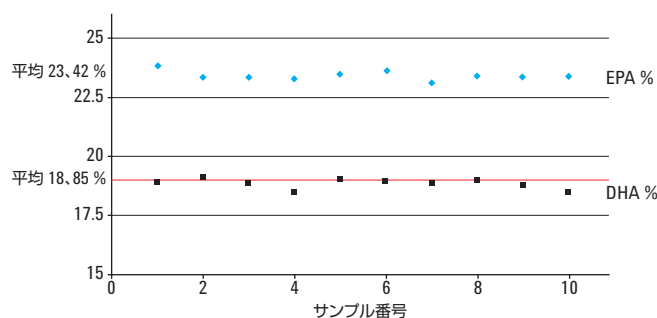


図 3. サケ油に含まれる FAME の自動測定のリターン再現性データ

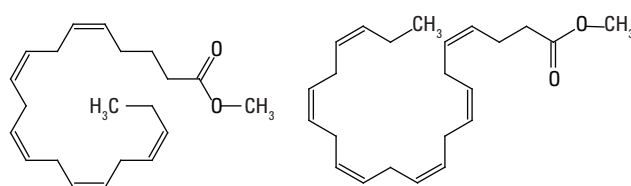


図 4. EPA メチルエステル (左) および DHA メチルエステル (右) の構造

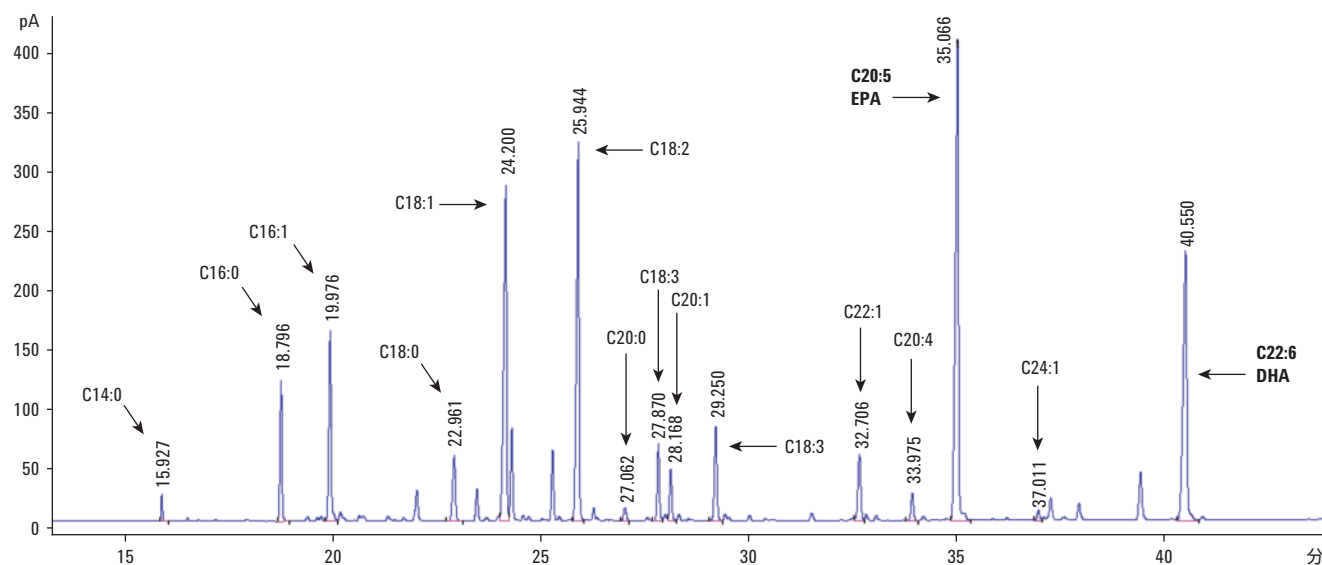


図 2. Agilent ワークベンチ 7696A を使用して前処理したサケ油サンプルの GC/FID クロマトグラム

表 2. サケ油サンプル中の脂肪酸の構成比

C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C18:3	C20:1	C18:3	C22:1	C20:4	C20:5	C24:1	C22:6
0.71	4.68	7.95	3.54	12.95	13.86	0.36	2.61	1.71	3.33	3.35	0.87	23.79	0.36	19.93

結論

サンプルの自動誘導体化は、信頼性が高く、容易で迅速です。特に多価不飽和脂肪酸の相対濃度が比較的高いサンプルでは、自動化によって手動よりも信頼性が大幅に向上します。

参考文献

1. Animal and vegetable fats and oils – Gas chromatography of fatty acid methyl esters – Part 3: Preparation of methyl esters using trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) (ISO 12966-3:2009)

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

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., 2012

Printed in Japan

January 30, 2012

5990-9799JAJP



Agilent Technologies