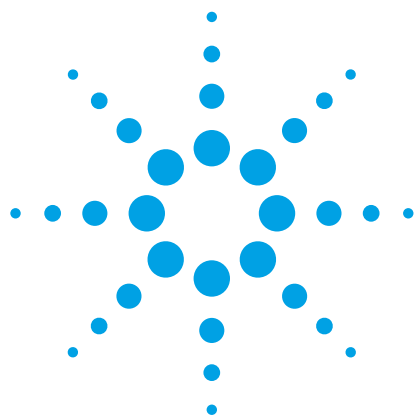




自動サンプル前処理による オリーブオイル中の 脂肪酸メチルエステル (FAME) の測定

アプリケーションノート

食品テスト

著者

Ramon Hernandez and Pablo Castillo
Lab de Microbiologia de Andaluza
Instrumentatcion in Spain

Enrique Longueira and Jose Pineda
Laboratorio Químico Microbiológico,
S.A. Murcia
Spain

Rebecca Veeneman
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

概要

オイル中の脂肪酸 (FA) を分析するにはさまざまな方法があります。このアプリケーションノートでは、塩基触媒反応を用いた FA の分析方法および Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用したサンプル前処理の利点について説明します。

はじめに

FA の分析はオリーブオイル業界では非常に一般的であり、通常はガスクロマトグラフを使用して行います。FA は極性が高く、沸点が高いため、通常は良好なピーク形状が得られず、再現性も低くなります。このような問題を避けるために、ほとんどのメソッドでは誘導体化反応を使用して FA を脂肪酸メチルエステル (FAME) にします。FAME は FA よりも分離が容易で、ピーク形状も良好です。

誘導体化反応には数多くの方法があります。最も一般的な方法の 1 つは塩基触媒反応です。この反応では、メタノールに溶解したヘキサンと水酸化カリウム (KOH) メタノール溶液を使用します。このメソッドは迅速でシンプルであり、優れた結果が得られますが、遊離脂肪酸では使用できません。



Agilent Technologies

実験方法

試薬

使用した試薬は、Baker の n-ヘプタン (ヘキサンでも可)、メタノール (GC グレード)、および水酸化カリウムです。11.2 g の KOH を 100 mL のメタノールに加えて、KOH 2N の溶液を調製しました。

7696A サンプル前処理ワークベンチの洗浄溶媒としてヘプタンと水を使用しました。KOH 溶液を分取するシリンジの洗浄には両方の溶媒を使用する必要がありました。最初に水、次にヘプタンを使用してシリンジ洗浄を行いました。ヘプタンの分取用シリンジは、ヘプタンだけを使用して洗浄しました。

機器

塩基誘導体化によりオリーブオイル中の脂肪酸を分析する通常のメソッドでは、20 mL の試験管で 100 mg のサンプル、10 mL のヘプタン、100 μ L の水酸化カリウムを使用します。この実験ではワークベンチの有効性を調べました。ワークベンチでは 2 mL バイアルを使用するため、すべての量を 10 分の 1 にスケールダウンしました。

この塩基触媒反応は、数分間の 1 回のステップで行われます。

ワークベンチを使用して、GC/MS システムに注入するすべてのサンプルを自動的に前処理しました。

使用したメソッド

このソフトウェアでは、すべてのバイアルと試薬のトレイの割り当てを設定するリソースマネージャの機能があります (図 1 を参照)。

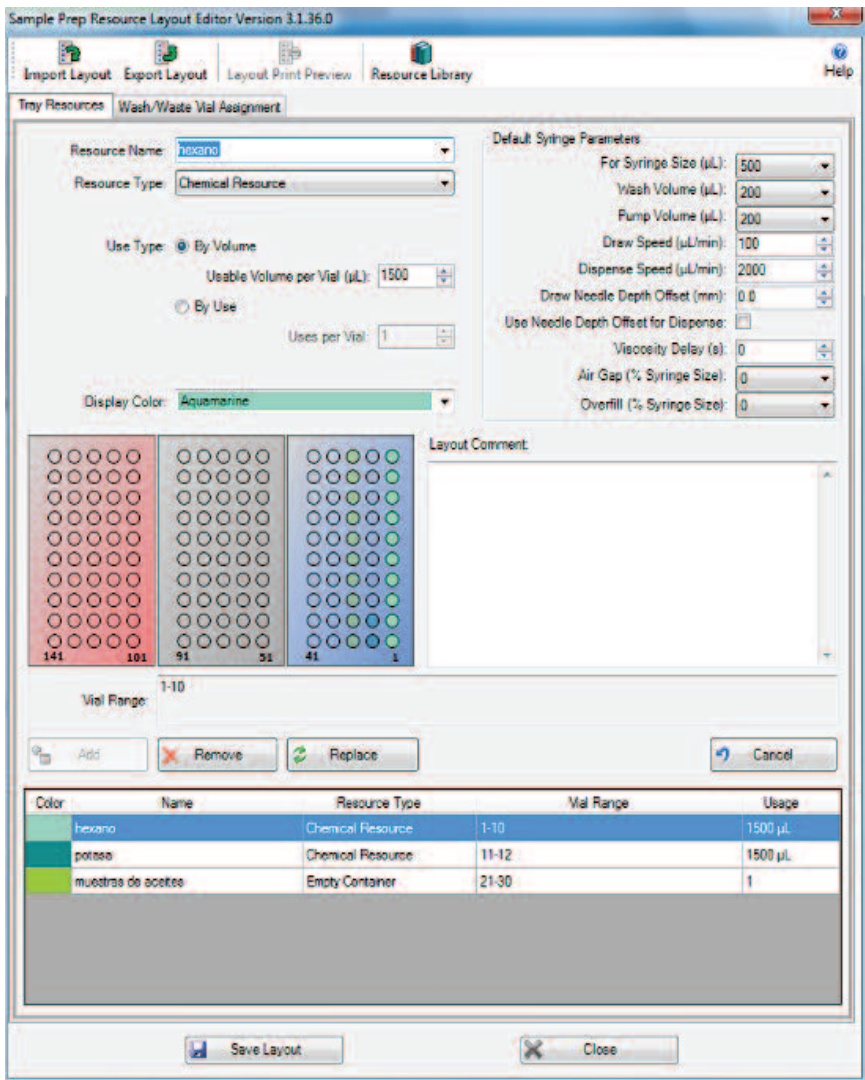


図 1. リソースのレイアウト

サンプル前処理に使用したメソッドを図 2 に示します。

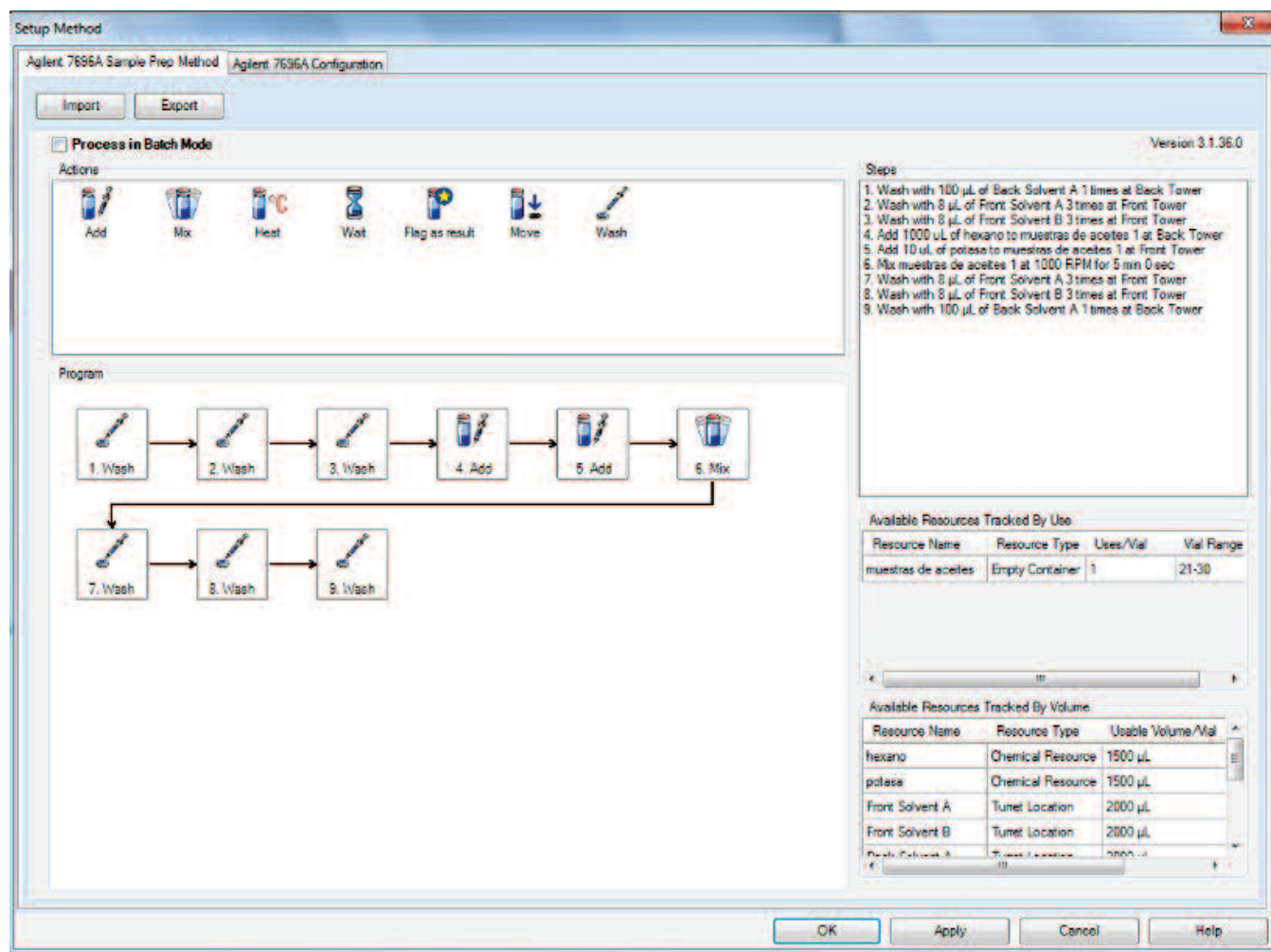


図 2. Agilent 7696A サンプル前処理メソッド

トレイの 1 つに 2 mL バイアルを 3 列セットしました。それぞれの列にはヘプタン、KOH、約 10 µL のオリーブオイルが 1 滴 (重量を記録しておく必要がある) 入ったバイアルが含まれます。サンプル前処理ワークベンチでは、2 つのシリンジを使用して、各試薬を必要量 (ヘプタンを 1 mL、KOH を 10 µL) 加えます。両方を加えた後、バイアルを 10 分間振とうしました。

バイアルを混合後、スプリット/スプリットレス注入口 (250 °C) を備えた GC/MS に最終サンプル溶液の上層を注入しました。使用したカラムは、カラム流量 1 mL/min の HP88 (60 m x 250 µm、0.2 µm) です。オープン温度プログラムは、175 °C で 5 分間、5 °C/min で 250 °C まで昇温するように設定し、脂肪酸を分離しました。注入口は、スプリット比 100:1 のスプリットモードに設定し、すべての分析は SIM と SCAN の両方のモードで実施しました。

結果と考察

ワークベンチを使用して得られたクロマトグラムの再現性と精度を評価するために、ワークベンチを使用して前処理した 10 本のバイアルを GC/MS に注入しました。表 1 にその結果を示します。

このアプリケーションノートでは、オリーブオイルの 4 つの主要な化合物の結果を比較します。クロマトグラムのピーク形状を図 3 に、ピーク面積値を表 2 に示します。

最初に、オイルを1滴添加後に10本のバイアルを計量しました。表1に得られた値を示します。

表1. 測定したオリーブオイルの重量

バイアル	オリーブオイル重量 (mg)
1	12.9
2	13.4
3	14.8
4	14.5
5	14.2
6	14.7
7	13.2
8	14.9
9	13.8
10	13.6

これらのバイアルをワークベンチのトレイに置きました。ここで、プログラミングされた量の各試薬が自動的に注入されます。

前処理を行ったサンプルは、GC/MSで測定します。図3に結果を示します。

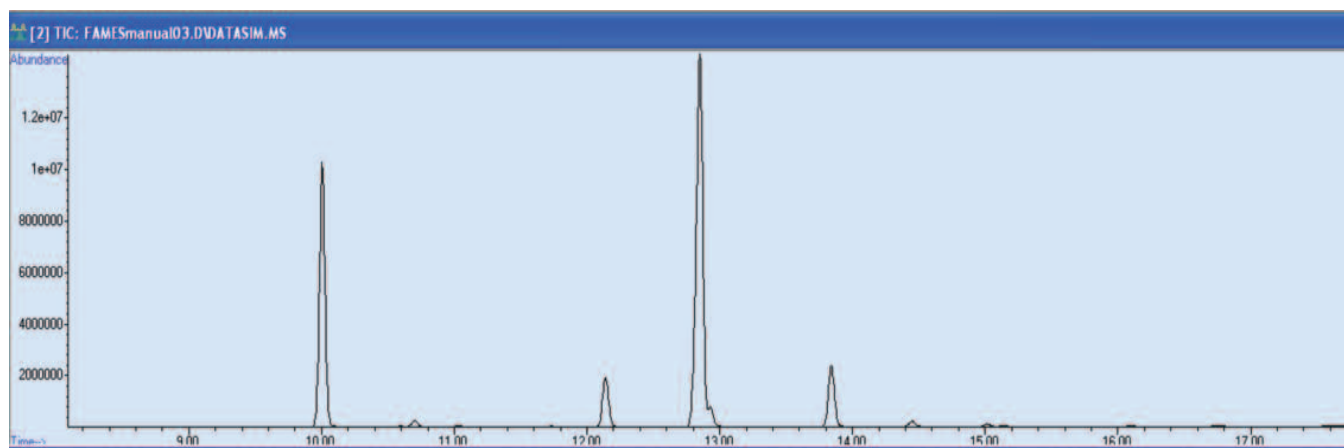


図3. SIMモードでのクロマトグラム

表2. オリーブオイルの4つの主要な化合物の面積

サンプル	パルミチン酸メチル 9.99 分	ステアリン酸メチル 12.128 分	オレイン酸メチル 12.844 分	リノール酸メチル 13.83 分
1	317343837.0	63331226.0	569320584.0	80584679.0
2	373510457.0	74825501.0	660064790.0	94609910.0
3	389137859.0	74174710.0	683431450.0	98106712.0
4	350160186.0	69553324.0	621849766.0	88281829.0
5	350311578.0	69513586.0	622622625.0	88233984.0
6	363692227.0	71973045.0	643859326.0	91639831.0
7	298792007.0	58778562.0	534781631.0	74997383.0
8	376569059.0	74878674.0	666439996.0	95109185.0
9	352698458.0	68424565.0	654254324.0	82569566.0
10	351745852.0	70145747.0	602155656.0	86951448.0
平均	350409359.2	69188856.3	622601967.1	87561952.4
相対標準偏差	27119463.9	5161865.2	46358289.5	7182432.9
%RSD	7.7	7.5	7.4	8.2

表 3 にオリーブオイル 1 mg あたりの各化合物の面積を示します。

表 3. オイル 1 mg あたりの面積

サンプル	パルミチン酸メチル 9.99 分	ステアリン酸メチル 12.128 分	オレイン酸メチル 12.844 分	リノール酸メチル 13.83 分
1	24600297.4	4909397.4	44133378.6	6246874.3
2	27873914.7	5583992.6	49258566.4	7060441.0
3	26293098.6	5011804.7	46177800.7	6628831.9
4	24155874.9	4796781.0	42886190.8	6088402.0
5	24669829.4	4895323.0	43846663.7	6213660.8
6	24740967.8	4896125.5	43799954.1	6234002.1
7	22635758.1	4452921.4	40513759.9	5681619.9
8	25273091.2	5025414.4	44727516.5	6383166.8
9	25557859.3	4958301.8	47409733.6	5983301.9
10	25863665.6	5157775.5	44276151.2	6393488.8
平均	25097420.2	4954369.4	44585290.7	6272059.8
相対標準偏差	1391411.9	284657.5	2430391.6	371694.7
%RSD	5.5	5.7	5.5	5.9

表 4 に各 FAME の面積パーセンテージを示します。

表 4. クロマトグラムの各ピークのア面積パーセンテージ

サンプル	パルミチン酸メチル 9.99 分	ステアリン酸メチル 12.128 分	オレイン酸メチル 12.844 分	リノール酸メチル 13.83 分
1	30.8	6.1	55.2	7.8
2	31.0	6.2	54.9	7.9
3	31.3	6.0	54.9	7.9
4	31.0	6.2	55.0	7.8
5	31.0	6.1	55.1	7.8
6	31.1	6.1	55.0	7.8
7	30.9	6.1	55.3	7.8
8	31.0	6.2	54.9	7.8
9	30.5	5.9	56.5	7.1
10	31.7	6.3	54.2	7.8
平均	31.0	6.1	55.1	7.7
相対標準偏差	0.3	0.1	0.6	0.2
%RSD	1.0	1.9	1.0	2.9

オリジナルの手動によるメソッド (オイル 100 mg) と比較を行います。オリジナルメソッドの分析結果を表 5 に示します。

表 5. オリジナルの手動によるメソッドを使用したときのオイル 1 mg あたりの面積

サンプル	パルミチン酸メチル 9.99 分	ステアリン酸メチル 12.128 分	オレイン酸メチル 12.844 分	リノール酸メチル 13.83 分
1	2674181.8	529275.8	4610749.8	674892.3
2	2562129.3	505970.3	4442449.3	648040.5
3	2596966.1	511187.6	4504510.0	655770.4
4	2388663.8	466760.2	4168008.4	601931.7
5	2721157.8	535230.9	4722598.6	688465.5
6	2789232.0	549999.6	4813189.6	704034.8
7	2330855.0	453164.1	4057061.6	589335.4
8	2645696.1	528725.3	4579552.0	669544.2
9	2650632.8	520264.3	4600138.2	668931.5
10	2660736.3	520639.8	4632201.2	671882.6
平均	2594658.8	510416.9	4501404.4	655410.2
相対標準偏差	142531.1	30276.4	236121.4	36110.5
%RSD	5.5	5.9	5.2	5.5

ここからわかるように、%RSD はワークベンチを使用したときの結果と類似しています。

ワークベンチと同一のサンプル前処理を手動で行いました。
2 mL バイアルに計量済みのオイルを 1 滴加え、アジレントのマニユアルシリンジを用いて 1 mL のヘプタンと 10 μ L の KOH をメタノールに添加して、静かに混合しました。分析結果を表 6 に示します。

表 6. ワークベンチの量を使用して手動でサンプル前処理を行った後のオイル 1 mg あたりの面積

サンプル	パルミチン酸メチル 9.99 分	ステアリン酸メチル 12.128 分	オレイン酸メチル 12.844 分	リノール酸メチル 13.83 分
1	24414278.4	4280301.6	34483064.7	5405051.1
2	21953969.5	4385041.9	34340981.7	5496525.8
3	25176754.2	4987565.4	39311102.4	6258162.4
4	23806050.0	4723341.1	36249791.4	5917479.9
5	23413864.7	4659269.7	36103230.9	5862013.3
6	22388861.8	4441774.0	34988087.2	5625015.1
7	23345774.4	4655270.9	36540218.6	5654628.9
8	21758664.6	4326697.7	31010500.3	5465899.5
9	22268704.8	4448969.7	34833834.8	5598507.6
10	21726270.7	4324528.6	34099881.5	5188441.0
平均	22970768.0	4513461.5	35078976.3	5633014.3
相対標準偏差	1194355.0	226067.9	2129375.1	301856.8
%RSD	5.2	5.0	6.1	5.4

ここからわかるように、%RSD はワークベンチを使用したときの結果と類似しています。

結論

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチは、サンプル前処理など、ラボの一般的な操作の一部を自動化する、非常に使いやすく、迅速、容易、そして信頼性の高いツールです。このアプリケーションノートの結果は、ワークベンチを使用して実行した場合の分析の再現性を詳細に示しています。ワークベンチを使用した前処理で得られた結果は、元のメソッドのリソース量でも、ワークベンチスケールの量でも、手動による前処理と非常に類似しています。

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

July 19, 2012

5991-0761JAJP



Agilent Technologies