Agilent J&W DB-5ms UI カラムを使用した、食物脂肪酸、ステロール、リグナンの分析

アプリケーションノート

食品試験および農業

著者

Pat Sasso and Ken Lynam

Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent J&W ウルトライナート (UI) キャピラリ GC カラムによるピーク形状の向上により、脂肪酸メチルエステル (FAME) を生成することなく脂肪酸のプロファイルを確認することができました。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用し、キャノーラとエキストラバージンオリーブオイルを加水分解生成物として脂肪酸の分析用に前処理しました。ステロールとリグナンは共抽出し、元の形式でアッセイを行いました。反応の終了は Agilent J&W DB-5ms UI GC カラムで確認し、ドコサン酸 (C22) までの不飽和脂肪酸について許容可能なピーク形状を示しました。一般的なサンプルでステアリン酸 (C18:0) からオレイン酸 (C18:1) を分離できました。

はじめに

メチルエステルは良好なピーク形状を持ち、遊離脂肪酸よりも揮発性が高いという利点がありますが、ネガティブモードエレクトロスプレーなどのツールを使用することにより HPLC で有機酸を検出することができます。これらの化合物では、分離能の調整に一般的な HPLC 移動相または緩衝液を使用する場合に、分析が難しい低波長の UV 発色団が生じます。GC と HPLC のいずれにも対応するサンプル前処理を実行できれば、分析タスクを実行するための優れた柔軟性が提供され、時間が短縮されて、リソースの使用が軽減されます。食品栄養表示に関わる最近の多くのラボはガスおよび液体クロマトグラフを備えており、LC/MS の使用が劇的に増加しています。すべての消費者向け動物性および植物性油脂の脂肪酸プロファイルは十分に確認されていますが [1]、水に溶解しないこのような高粘度の物質を加水分解する機能が自動液体処理システムの課題となっています。サンプルを正確に計量し、1:1 の比でヘキサンと混合すると、7696A サンプル前処理

Agilent Technologies

ワークベンチがサンプル前処理のすべてのステップを実行します。最適な加水分解技術は 3:1 のモル比での NaOH との鹸化ですが、これを行うには少なくとも 24 時間もの長い時間が必要です。サンプル前処理のこのボトルネックは、20～30 のサンプルをバッチ処理し、無人で一晩自動処理することで緩和できます。ガスクロマトグラフでの分析時間は約 40 分間で、未反応の植物性油トリグリセリドを監視することができます [2]。

実験方法

Agilent 7890A シリーズ GC と、イナート EI 350 ナノコーティングイオン源を使用した Agilent 5975C シリーズ GC/MSD システムを使用しました。FID 検出器を使用した同様の設定を粗リアクションモニタリングに使用しました。

条件

GC の条件

カラム : Agilent J&W DB-5ms UI、10 m × 0.25 mm、0.25 µm (p/n 122-5532UI)

サンプル前処理

サンプル : キャノーラオイル、エキストラバージンオリーブオイル鹸化物、ヘキサン抽出物

キャリア : MSD ヘリウム、リアクションモニタリング用 FID 水素、いずれも 1.0 mL/min の定流量

オーブン : 120 °C (1 分間保持、20 °C/min で 120～325 °C、20 分間保持)

注入量 : スプリット/スプリットレス、5 分でガスセーバをオンにした 100 mL/min スプリットフロー、3 mL/min パージフロー

注入口温度 : 280 °C

検出器 : リアクションモニタリング用の FID、325 °C

MSD トランスファーライン温度 : 325 °C

GC : Agilent 7890A シリーズ GC

サンプラ : Agilent 7693 オートサンプラ、5 µL シリンジ 0.1 µL 注入、スプリット 20:1

MS の条件

MS : EI イナート 350 イオン源、タンデムアクシスディテクタを備えた Agilent 5975C シリーズ GC/MSD システム

溶媒待ち時間 : 1 分

MS 温度 : 300 °C (イオン源)、150 °C (四重極)

スキャン範囲 : 30～550

流路の消耗品

バイアル : 茶色スクリューキャップ (p/n 5182-0716)

キャップ : 青色スクリューキャップ (p/n 5282-0723)

バイアルインサート : 樹脂脚付き 250 µL ガラス (p/n 5181-1270)

シリンジ : 5 µL (p/n 5181-1273)

セプタム : 赤色ブリード温度最適化 BTO (p/n 5183-4757)

注入口ライナ : デュアルテーパ直接接続 (p/n G1544-80700)

拡大鏡 : 20x (p/n 430-1020)

標準物質の前処理

C12～C22 で構成される 6 成分チェックアウト混合物 (ヘキサン中に 10 ng/µL) を使用し、カラムの最高使用温度までピーク形状のカラム評価を行いました。これらの化合物は、キット形式に含まれる純粋な標準として Grace から (偶数の炭素番号 p/n 186021) 化合物 1 つあたり 100 mg 単位で購入できます。ピノレジノールは Sigma-Aldrich Corp. (カタログ番号 SML-0073-1MG) から購入しました。図 1 に、標準混合物のすべての成分についてピーク形状が視覚的に許容できるものであることを示します。

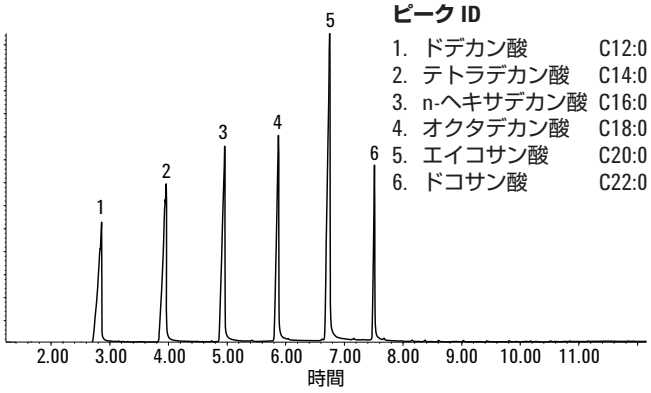


図 1. 6 成分遊離脂肪酸評価ミックスの TIC

サンプル前処理

分析用の植物性油脂サンプルを、7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して反応/鹸化させて抽出し、一晩無人で処理しました。ω-3 FAME の含有量が多い魚油カプセルをカミソリで切り開きました。内容物を水で洗い、ヘキサンを抽出して、グリセロールを製剤から取り除きました。鹸化は不要でした。エキストラバージンオリーブオイルのリグナンマーカの分離は、複数の液液抽出により[3]、ヘキサン:メタノールおよびヘキサン:アセトニトリルを使用して 2 段階で実行しました。図 2 に、7696A サンプル前処理ワークベンチのパラメータの画面を示します。このシステムではさまざまな反応条件を使用することができます。解決すべき主な問題は、反応する油が水溶性の NaOH 溶液から分離することです。酸への変換は約 90 % の完成率で実行できるため、報告されている値と比較して正確なプロファイリングができる十分な量の酸が得られます [4]。

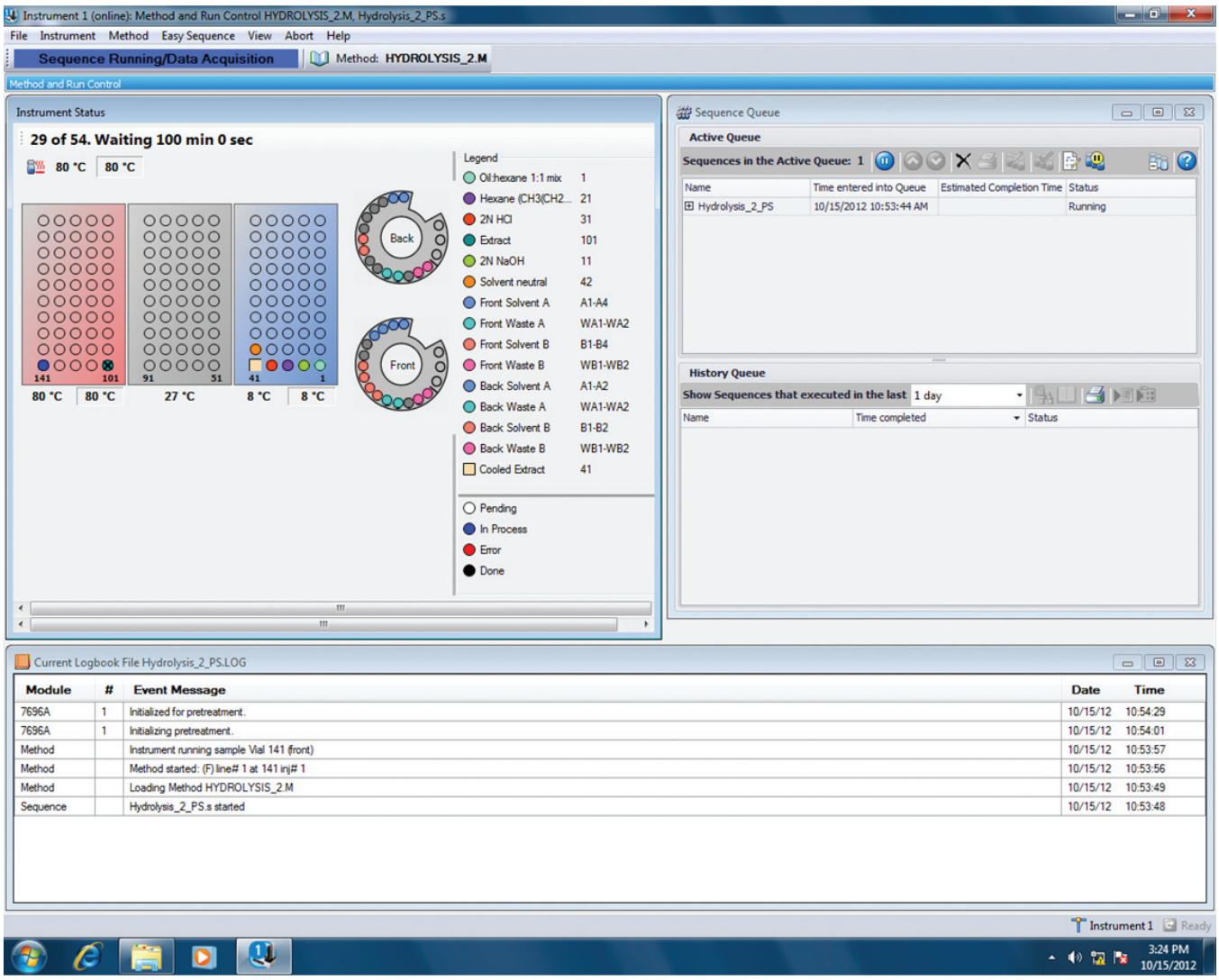


図 2. Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチの加水分解の試薬と温度

図 3 に、クロマトグラフィー分析の最後に未反応のモノ-、ジ-、およびトリグリセリドが溶出する初期の粗反応 (50 %) を示します。

結果と考察

表 1 には、図 1 で示したピークを Agilent ChemStation ソフトウェアで計算したピーク幅とテーリング係数が示されています。ピーク幅は、メチルエステルで予測されるものよりも遊離脂肪酸の方が大幅に広くなりますが、キャノーラとオリーブオイルの場合、主成分であるオレイン酸 (C18:1) の微量ステアリン酸 (C18:0) からの分離は図 4 ではっきりと見られます。cis および trans 異性体の分離にはシアノ官能基の固定相が必要ですが、これは GC カラムおよび LC カラムで利用可能です。 C18 異性体では、メチルエステルの分離は Agilent J&W Select FAME 固定相 (p/n CP7421) の使用により GC で実行することができます。天然に存在するオイルでは、cis 構造の場合にのみ二重結合が含まれますが [5]、処理と精製の際に異性化されることがあります。ビタミン E (トコフェロール) を含む植物ステロールの回収と分離を図 5 の TIC トレースに示します。

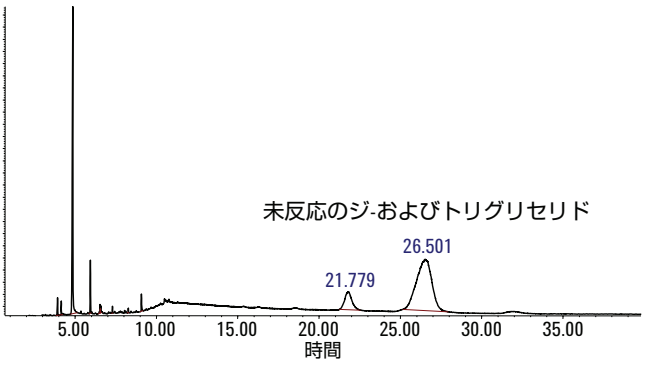


図 3. すべての反応物質を溶離する GC 条件を使用したときの Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチでの反応 (約 50 % 完了)

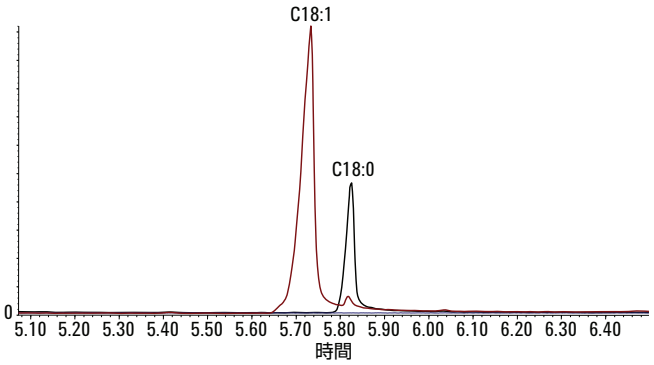


図 4. 隣接ピーク、オレイン酸 (C18:1) のステアリン酸 (C18:0) からの分離

ピーク ID

1. n-ヘキサデカン酸 C16:0
2. 9-オクタデセン酸、(Z)-C18:1
3. オクタデカン酸 C18:0
4. 9,12-オクタデカジエン酸、(Z,Z)-C18:2
5. オレイン酸、3-ヒドロキシプロピルエステル
6. 9,12,15-オクタデカトリエン酸、(Z,Z,Z) C18:3
7. トコフェロール
8. スチグマステロール
9. カンペステロール
10. シトステロール

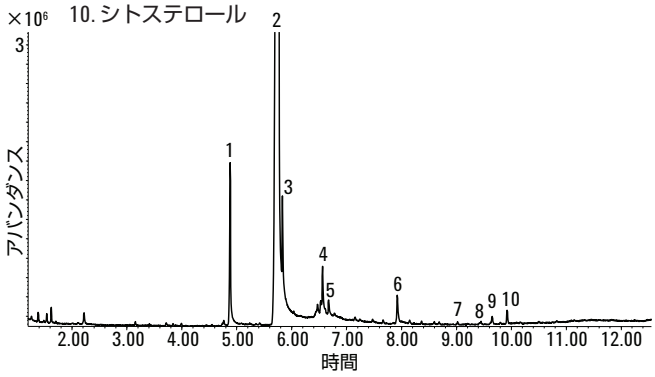


図 5. すべての脂肪酸と植物ステロールを示す加水分解したキャノーラオイルの TIC トレース

表 1. ピーク幅とテーリング係数の計算

成分	ピーク幅	テーリング
C_{12} ドデカン酸	0.324	0.53
C_{14} テトラデカン酸	0.390	0.55
C_{16} n-ヘキサデカン酸	0.372	0.57
C_{18} オクタデカン酸	0.238	0.61
C_{20} エイコサン酸	0.258	0.58
C_{22} ドコサン酸	0.193	0.71

エキストラバージンオリーブオイルのリグナンマーカ、ピノレジノール、および 1-アセトキシレジノールを、スペクトルとともに微量成分として図 6 に示します。これらの 2 つの化合物は最近の NIST11 MS スペクトルライブラリには含まれていません。DHA (ドコサヘキサエン酸) および EPA (エイコサペンタエン酸) の魚油 ω-3 エステルのピーク形状を図 7 に示します。

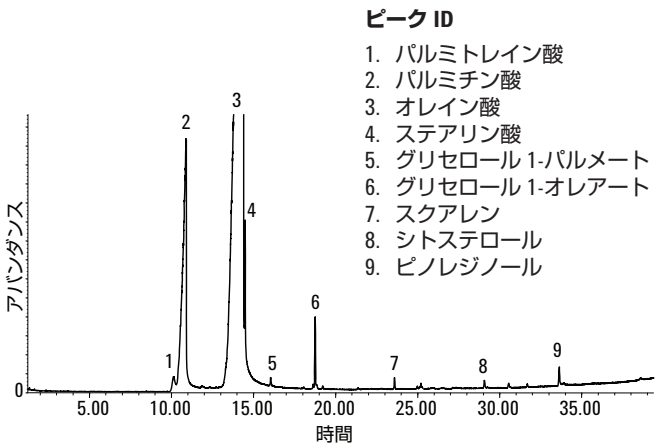


図 6. EI スペクトルともに脂肪酸とリグナンマーカを示した加水分解エキストラバージンオリーブオイルの TIC トレース

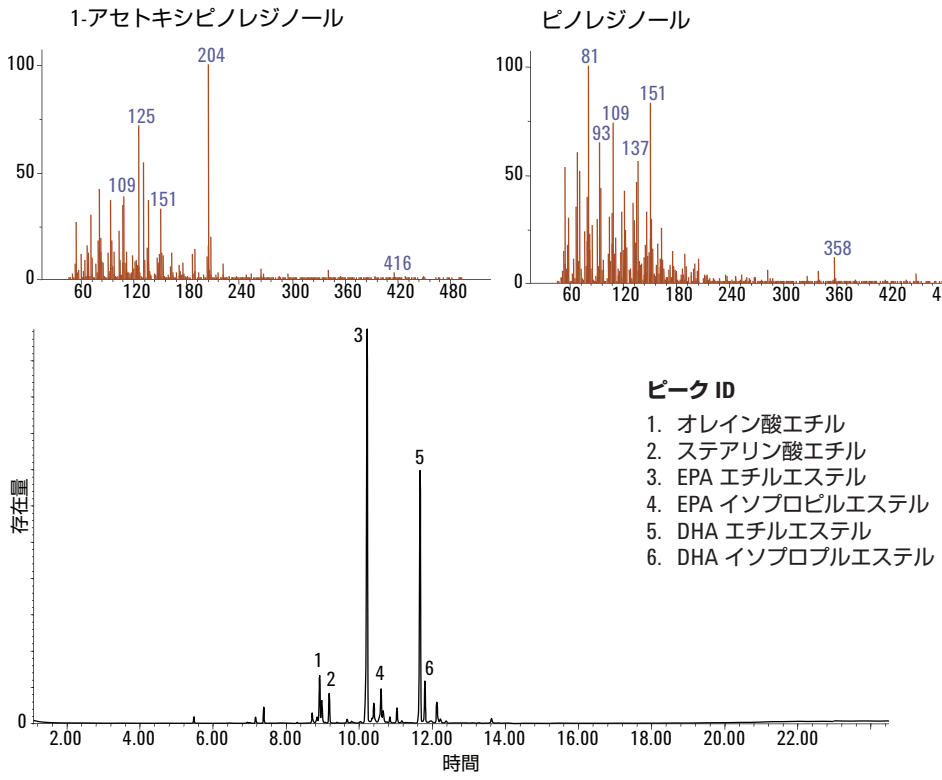


図 7. 大気圧化学イオン化 (APCI) により LC/MS で分析可能な市販魚油 ω-3 エステルの TIC トレース

結論

Agilent J&W DB-5ms ウルトライナート GC カラムは、遊離脂肪酸について許容可能なピーク形状を提供します。カラムケミストリと自動的なサンプル前処理の両方を活用することで、GC/MS から LC/MS へアッセイを柔軟に移動することができ、一般的なアプリケーションの範囲を超えて機器リソースを拡張することにより、総合的な生産性とラボのスループットを向上することができます。分析アッセイの発展に伴ってサンプル前処理がカスタマイズされ、数多くの課題が発生してきました。手間のかかるサンプル前処理などの障害を取り除くことによって、ラボの生産性向上を実現できます。

謝辞

評価用の脂肪酸を提供していただきました Rebecca Veeneman 氏に感謝申し上げます。

参考文献

[1] S. Rossi. Does Canola Oil Have Omega-6 Fatty Acids? Livestong Foundation. http://www.livestrong.com/article/430013-does-canola-oil-have-omega-6-fatty-acids/

[2] N. Helle, M. Bzduch, R. Veeneman.「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、アジレント・テクノロジー、資料番号 5990-9799JAJP (2012).

[3] M. Brenes, F. J. Hidalgo, A. García, J. J. Rios, P. García, R. Zamora, A. Garrido. Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc*. 77, 715 (2000).

[4] Fatty acids content in dietary fats. Wikipedia. http://en.wikipedia.org/wiki/fatty_acid

[5] AOAC. AOAC Official Method 2000.10. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA. http://www.aoac.org/vmeth/E_methodEX2000.10.PDF

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、アジレントのウェブサイト 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., 2013
Printed in Japan
January 10, 2013
5991-1715JAJP

Agilent Technologies