自動サンプル前処理テクニックを用いた脂肪酸メチルエステル分析法の開発

アプリケーションノート

食品試験および農作物

著者

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

概要

菜種油サンプル中の脂肪酸をエステル化するための自動メソッドを紹介します。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いて、マイクロピペットを使った手動メソッドと、この自動システム向けに開発したメソッドの対照比較をおこないました。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いた場合、10 サンプルの前処理の RSD は、酸触媒反応と塩基触媒反応のいずれでも 3 % でした。自動化した酸触媒メソッドでは、手動前処理メソッドに比べて、RSD が 2 倍向上しました。さらに、脂肪酸前処理の自動化により、試薬使用量が最大 1/50 に減少しました。全体的に、自動メソッドでは、より少ない試薬でより優れた精度が得られ、作業完了までの所要時間も短縮されました。

Agilent Technologies

はじめに

脂肪酸 (FA) 分析は、多くの業界で一般的におこなわれています。食品業界では、脂質が油、肉、種子などの製品の主成分であることから、ルーチン分析として FA 分析がおこなわれています [1-5]。また、健康的な食事における脂肪の重要性や、健康な体内動態における脂肪の役割の重要性が高まっていることから、FA 成分の測定はますます広くおこなわれるようになっています [1-2]。生物医学アプリケーションでは、FA 組成が生体膜に影響を与えることから、診断ツールとして FA 組成が用いられています [3-4、6-7]。脂肪酸は、多くの一般向け製品にも含まれ、化粧品や界面活性剤などの業界でも使用されています [2、8]。

こうした業界では、1950 年以降、FA のおもな分析手法としてガスクロマトグラフィが用いられてきました [3-4、9]。FA は適切な分離条件で分離および分析できますが、極性と高い沸点に起因する多くの問題も存在します。こうした問題は一般に、リテンションタイムの延長やピーク形状の悪化につながります。そのため、ほとんどのメソッドでは、誘導体化反応を用いて、FA を脂肪酸メチルエステル (FAME) に誘導体化します。FAME は FA よりも分離が容易で、ピーク形状も改善されます。

FA の FAME への変換には、マトリックスやアプリケーションに関係なく、多くの手法を用いることができます。たいていは、鹸化とそれに続くメチル化という 2 つのプロセスでなりたっています。アルコール分解と呼ばれるプロセスを使えば、脂質を 1 ステップでエステル化することもできますが [4]、多くのアプリケーション、特に食品アプリケーションでは、現在も 2 ステップでの手法が用いられています [1、2、5]。複数ステップでも 1 ステップでも、FA を FAME に誘導体化するプロセスには多くの方法があり、各アプリケーションで異なる誘導体化試薬が必要となります [10]。反応の大部分は、酸性試薬を使用するもの、塩基性試薬を使用するもの、シリル化試薬を使用するもの、ジアゾメタンを使用するものに分類できます。それぞれの方法に長所と短所があります。

酸触媒反応の試薬としては、三フッ化ホウ素 (BF_3) メタノール溶液、塩酸 (HCl)、硫酸 (H_2SO_4) がもっとも一般的に用いられます。HCl や H_2SO_4 を用いた手順では、メチル化を完了するためには、1 時間以上の酸反応が求められます。時間は酸の濃度やサンプル (遊離脂肪酸、ホスホグリセリド、トリグリセリドなど) によって異なります [3-4、10]。この手法はきわめて効果的ですが、コストがかかるうえに、特別なガラス器具やトレーニングが必要となります。メチル化試薬として BF_3 を用いる手法の場合、加熱により 2 分で反応が完了するため、より早く結果を得られます。しかし、不安定な脂肪酸の分解が生じることがあるほか、室温での保存可能期間も限られたものになります [3]。

塩基触媒反応では、水酸化ナトリウム (NaOH) メタノール溶液か水酸化カリウム (KOH) メタノール溶液が用いられます。この手法には多くの利点があります。時間のかからないシンプルな 1 ステッププロセスで、室温でおこなうことができます。また、不安定な FA の分解も避けることができます。しかし、塩基触媒反応は遊離脂肪酸は反応しないため、適用できる分野に制限があります。[3-4、10]。

そのほかに 2 つの試薬を使用できますが、使われることはめったにありません。ジアゾメタンは高速誘導体化テクニックとして用いられますが、分析対象化合物に干渉する副生成物が生じる可能性があります [3、10]。また、毒性が高く、爆発が生じるおそれもあるため、近年ではほとんど使用されていません。シリル化試薬は、きわめて反応が速く、中程度の温度で反応しますが、水の影響を受けやすいため、やはりほとんど使われていません [10]。

これらの手法を自動化すれば、多くの利点が得られます。最近では、FA の FAME への誘導体化に関して、自動化されたマイクロスケールのメソッドが数多く開発されています [11-15]。一般に、自動メソッドは試薬の消費量が少なく、実施者が有害物質に曝露される可能性も低くなります。また、作業完了までの所要時間を短縮し、数時間にわたって無人操作を続けることも可能です。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使えば、FAME の前処理を自動化できます (図 1)。このシステムは、150 バイアルトレイ、液体シリンジを装着した 2 つのモジュール、バイアルヒーター、ミキサー、バーコードリーダーを搭載しています。また、バイアルラックを個別に加熱冷却することが可能です。2 つのモジュールは、標準シリンジか大容量 (250 µL または 500 µL) シリンジのいずれかに対応する設定にすることができます。ほとんどのアプリケーションでは、1 つのモジュールで微量の液体を計量する標準シリンジ (10 µL、25 µL)、もう 1 つのモジュールで大容量分注用の大容量シリンジが使用されます。2 つの分注モジュール、ミキサー、ヒーターを備えた Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチは、サンプル希釈、内部標準添加、誘導体化、液液抽出のほか、数多くの前処理に対応できます。



図 1. Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いて、菜種油中 FA の抽出およびメチル化に関して、塩基触媒反応と酸触媒反応という 2 つのメソッドを検証しました。どちらのメソッドも、過去に公開されている 20 mL 試験管を用いた手動メソッドをもとにしました [5]。93 %～107 % の回収率、5 % 未満という RSD が得られました。また、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ用に手動メソッドを修正した際には、反応時間が 2 時間から 20 分に短縮され、試薬および溶媒の使用量が最大 50 分の 1 に減少しました。

実験手法

試薬

ヘキサン (試薬グレード)、イソオクテン、メタノール (HPLC グレード) を Burdick and Jackson (ミシガン州マスキーゴン) から購入しました。三フッ化ホウ素 (BF_3) メタノール溶液 (14 % w/v) を Aldrich (ミズーリ州セントルイス) から購入しました。水酸化ナトリウム (NaOH) (試薬グレード、Sigma Aldrich) メタノール溶液を 2N 溶液となるように作成しました。塩化ナトリウム (認定 ACS、Fisher Scientific、ジョージア州アトランタ) を用いて、超純水で 1 M 溶液を作成しました ((H)O/NaCl)。一部の文献では、飽和溶液の使用が提案されていますが [2、16]、そうした濃縮溶液を用いると、システム内で沈殿が生じ、シリンジエラーにつながります。

各 FA は、Alltech (イリノイ州ウォーキーガン) から入手しました。入手した FA は、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸です。これらを用いて、1 mg/mL ヘキサン溶液を作成しました。ChemService (ペンシルベニア州ウェストチェスター) からカスタム混合液を入手し、FAME 標準を作成しました。混合液には、メチルペンタノエート、メチルヘキサノエート、メチルヘプタノエート、メチルオクタノエート、メチルデカノエート、ラウリン酸メチル、ミリスチン酸メチル、パルミチン酸メチル、ステアリン酸メチル、エイコサイン酸メチル、ベヘン酸メチルが 1 mg/mL で含まれています。サロゲート標準溶液には 1 mg/mL のラウリン酸 (ヘキサン溶液) を使用しました。1 mg/mL のデカン溶液 (99+%Sigma、ミズーリ州セントルイス)、ドデカン (99+% Aldrich、ミズーリ州セントルイス)、テトラデカン (99+% Fluka、ミズーリ州セントルイス)、ヘキサデカン (99+% Aldrich、ミズーリ州セントルイス) を含むイソオクタン溶液を内部標準として使用しました。菜種油は地元のスーパーマーケットで購入しました。

2 種類の洗浄溶媒 (ヘキサンとアセトン、ラボグレード、Fisher Scientific、ジョージア州アトランタ) を Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチで使用しました。アセトンは使用したすべての試薬を混和できるため、ほとんどの洗浄ステップでアセトンを使用しました。

使用機器

検量線用標準溶液、遊離 FA サンプル、菜種油サンプルの前処理には、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用しました。このアプリケーションでは、2 つの液体分注モジュールにおいて、バックモジュールを 25 µL シリンジ、フロントモジュールを 500 µL シリンジの構成としました。

すべての分析は、Agilent 7890A ガスクロマトグラフ (GC) システムでおこないました。システムには、スプリット/スプリットレス注入口 (スプリット比 10:1) と FID 検出器が搭載されています。注入口温度は 300 °C で、カラム流量は 3 mL/min (定流量モード) としました。Agilent HP-5MS カラム (30 m x 0.25 mm、0.25 µm) を使用しました。FAME 標準溶液の分離には、100 °C (5 分) – 7 °C/min – 225 °C (5 分) という温度プログラムを用いました。菜種油サンプルでも同じ温度プログラムを使用しましたが、すべての化合物をベースラインで分離できませんでした。検出器を 300 °C に保ち、ChemStation を用いてデータを採取しました。

サンプル前処理メソッドのプログラミングには、Easy SamplePrep を使用しました。Easy SamplePrep は、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ用に開発されたドラッグ & ドロップ式のメソッドエディターです。Easy SamplePrep には、ユーザーがバイアル

を溶媒バイアルか空のバイアルとして割り当てることのできる Resource Manager が搭載されています。前処理に必要なすべての溶媒、試薬、標準溶液、空バイアルをインプットすれば、プログラムやシーケンス中に、Resource Manager がバイアルを追跡します (図 2)。Resource Manager で設定した試薬を用いて、サンプル前処理プログラムを作成します。Easy SamplePrep メソッドエディターを使えば、プロトコルやラボのノートに従うのと同じようにステップを追加し、使用可能なステップや試薬をテキスト形式で表示することができます (図 3)。

各サンプル前処理手順には、カスタマイズしたプログラムを作成するための高度なパラメータセットが備わっています。Add Step では、Advanced Parameter により、洗浄量、吸引および排出スピード、ニードル深さなどのパラメータを設定できます (図 4)。Mix Step は、スピードと時間をもとにカスタマイズできます。Heat Step では、時間と温度の設定を指定できます。Flag as Result Step では、処理が終わったサンプルを含むバイアルを選択できます。

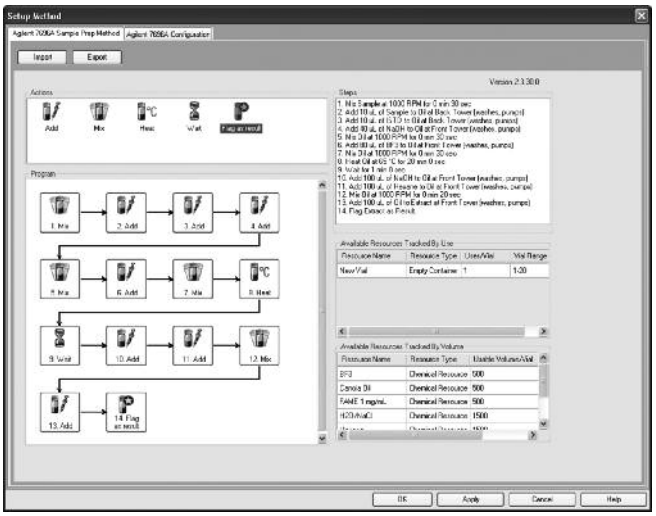


図 3. SamplePrep Method Editor は、1 ステップごとの簡単なプログラミングを可能にするドラッグ & ドロップアイコンを備えています。ここでは、酸触媒反応に用いるステップが表示されています。

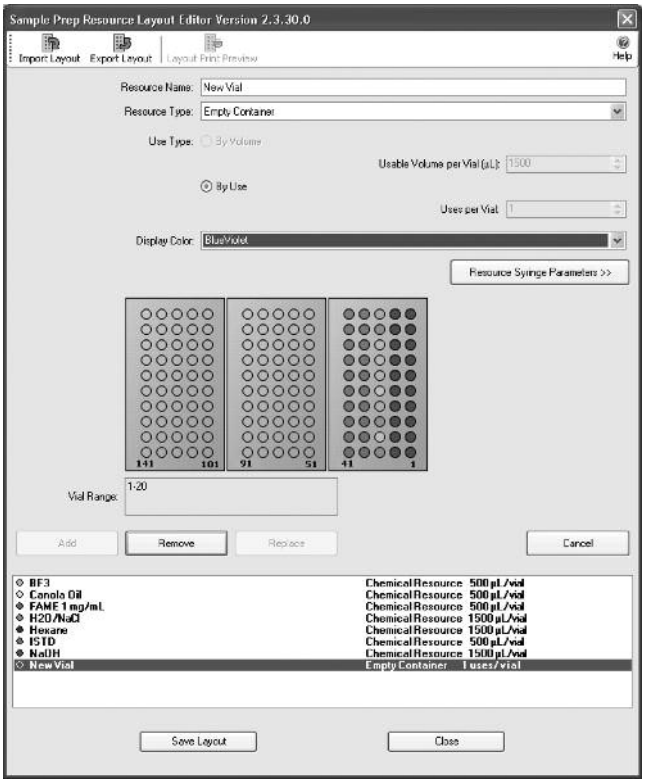


図 2. Resource Editor を使えば、サンプル前処理中に使用する試薬バイアルと空のバイアルを割り当てることができます。

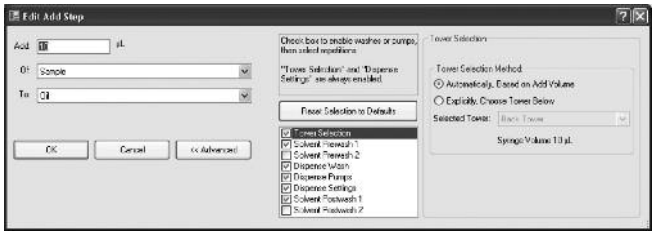


図 4. 各サンプル前処理ステップには、ここで示す Add Step などの高度なパラメータが備わっています。これにより、実験操作を全面的にカスタマイズできます。

検量線の作成

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチによるサンプル前処理に先立ち、同じ機器を用いて FAME 標準溶液で検量線作成用のサンプルを調整しました。1〜500 ppm の範囲において、11 の FAME が含まれる 8 レベルの標準溶液を作成しました。(各、約 100 µL)

サンプル前処理 : 酸触媒反応

オリジナルの手動メソッドは、Association of Official Analytical Chemists (AOAC) の分析メソッドに従っています。20mL 試験管に入れた菜種油サンプル 50mg を使用し、80 °C での 2 回の加熱ステップ (各 60 分) が含まれます [5、17]。

AOAC メソッドを自動メソッドに変換する際には、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチは 2 mL のオートサンプラバイアルを使用するため、反応スケールを小さくする必要があります。手動メソッドを約 1/50 のスケールにして、油サンプルと遊離 FA サンプルの両方に適用しました。

はじめに、油、サロゲート標準溶液 (ラウリン酸)、内部標準溶液 (アルカン) をそれぞれ別のステップで添加しました。ただし、油を吸引する場合は適度な再現性を得ることが難しいため、油サンプル 0.4 mL とサロゲート標準 0.4 mL で構成される溶液を作成しました。これにより、メソッドの再現性が大幅に向上しました。

空の 2-mL オートサンプラバイアルにキャップをして、サンプル 10 µL (ヘキサン中遊離 FA サンプルおよび油/サロゲート標準溶液のいずれか) と内部標準 10 µL を添加しました。サンプルには、NaOH 40 µL を添加し、1000 rpm で 30 秒間、ボルテックスにより混合しました。鹸化後、BF_3 80 µL を添加し、再び 1000 rpm で 30 秒間、ボルテックスにより混合しました。混合液を 65 °C で 20 分加熱し、反応を促進しました。加熱後、混合液を室温で 2 分間放置し、冷却させました。この冷却した混合液に、H_2O/NaCl 100 µL とヘキサン 100 µL を添加し、FAME を有機層に抽出しました。最後にサンプルを 1000 rpm で 20 秒混合し、上層 (100 µL) を新しい空のキャップ付き 2-mL オートサンプラバイアルに移し、GC により分析しました。

サンプル前処理 : 塩基触媒反応

酸触媒反応と同様に、塩基触媒反応の手動前処理は、20-mL 試験管に入れた油サンプル 100 mg から開始されるため、2 mL オートサンプラバイアルでおこなうにはスケールが大きすぎます [5]。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチでこの反応をおこなうために、約 10 分の 1 にスケールダウンしました。

塩基触媒反応では、遊離脂肪酸は誘導体化されないため、サロゲート標準溶液は使用しませんでした。ここでも、メソッドの再現性を高めるために、油 0.4 mL と内部標準 0.4 mL の混合溶液を使用しました。キャップをした空の 2-mL オートサンプラバイアルに、サンプル 10 µL (油/内部標準溶液) を添加しました。FA をメチル化し、FAME を抽出するために、NaOH 100 µL とヘキサン 500 µL を添加し、1000 rpm で 30 秒間、ボルテックスにより混合しました。2 分待ったのち、上層 (100 µL) を新しい空のキャップ付き 2-mL オートサンプラバイアルに移し、GC により分析しました。酸触媒反応とは異なり、塩基触媒反応は 1 ステップでおこなわれ、数分で完了します。

酸触媒反応のバリデーション

酸触媒反応は、遊離脂肪酸だけでなく脂質結合脂肪酸でも機能するため、ヘキサン中の遊離 FA サンプルでメソッドを実行しました。3 日間にわたって 5 つのサンプルを作成し、サンプル間再現性と日間再現性を測定しました。

手動で反応をおこなう場合も、同じ手順に従いました。マイクロピペットを使って計量し、加熱ブロックを使用しました。手動前処理と自動前処理を正確に比較するために、自動手順と並行して手動手順を実行しました。

結果と考察

キャリブレーション

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチで作成した 8 つの標準溶液では、優れた直線性が得られました。キャリブレーションデータを表 1 に示しています。標準溶液はは一部の飽和 FAME を用いて作成したため、油および FA 標準サンプルで同定および定量した化合物は、標準溶液に含まれる飽和 FAME のみです。

表 1. Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを前処理に用いた FAME 標準溶液での機器キャリブレーションデータ

化合物	R2	直線回帰
メチルペンタノエート	0.9997	y = 1.33x + 4.1175
メチルヘキサノエート	0.9998	y = 1.4876x + 8.9684
メチルヘプタノエート	0.9998	y = 1.5671x + 7.7412
メチルオクタノエート	0.9998	y = 1.6669x + 8.2446
メチルデカノエート	0.9998	y = 1.7825x + 9.0499
ラウリン酸メチル	0.9998	y = 1.8786x + 9.7365
ミリスチン酸メチル	0.9998	y = 1.9727x + 10.264
パルミチン酸メチル	0.9998	y = 1.9623x + 10.369
ステアリン酸メチル	0.9998	y = 1.9828x + 10.64
エイコサイン酸メチル	0.9998	y = 2.0155x + 10.826
ベヘン酸メチル	0.9998	y = 2.087x + 11.266

メソッドのバリデーション

油サンプルを分析する前に、前述の自動メソッドおよび手動メソッドにより遊離 FA サンプルの前処理をおこない、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチのバリデーションをおこないました。

自動メソッドでは、同一の日に前処理をおこなった 5 つのサンプルで、平均 2 % 未満の RSD が得られました。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いて 3 日間にわたり、前処理をおこなった 5 つのサンプルを比較した場合も、メチルオクタノエートより後に溶出する成分に関しては非常に良好な再現性が得られました。平均値、標準偏差、相対標準偏差、回収率を表 2 にまとめています。メチルオクタノエートは揮発性が高く、また、溶媒ピークと近いため、他の化合物よりも大幅に低くなっています [3、4]。このデータは、3 回繰り返し注入を用いて、3 日にわたって前処理した 15 サンプルで構成されています。

表 2. 脂肪酸サンプルの酸触媒反応において、外部標準を用いて濃度および回収率を測定した結果

化合物	量 (ppm)	標準偏差 (ppm)	相対標準偏差 (%)	回収率 (%)
デカン	81.8	0.968	1.18	97.3
ドデカン	84.6	0.517	0.611	102.4
テトラデカン	88.0	0.869	0.967	105.7
ヘキサデカン	92.2	1.02	1.11	111.4
メチルオクタノエート	63.5	0.570	0.898	75.1
メチルデカノエート	101.2	0.175	0.173	97.5
ラウリン酸メチル	110.1	0.681	0.619	104.8
ミリスチン酸メチル	97.0	0.713	0.735	102.6
パルミチン酸メチル	115.2	0.688	0.597	106.6
ステアリン酸メチル	98.0	0.266	0.271	106.9
エイコサイン酸メチル	80.6	0.394	0.489	104.0
ベヘン酸メチル	90.0	1.12	1.25	99.9

その後、自動メソッドの結果を、手動メソッドを用いて得られた結果と比較しました。再現性は、分析をおこなった 3 日間すべての日において、手動メソッドのほうが大幅に悪い値になりました。自動データと同じ手法で手動データを処理して得られた平均、標準偏差、相対標準偏差、回収率を表 3 にまとめています。回収率については、自動前処理をおこなったサンプルよりも、手動で前処理をしたサンプルのほうが一貫して高くなっています。これは、添加した標準の量が多いためか、添加したヘキサンがわずかに少ないためと考えられます。どちらかといえば、後者の要因のほうが可能性が高いと考えられます。

表 3. 遊離脂肪酸サンプルの手動による酸触媒反応において、外部標準を用いて濃度および回収率を測定した結果

化合物	量 (ppm)	標準偏差 (ppm)	相対標準偏差 (%)	回収率 (%)
デカン	88.2	13.2	14.9	104.9
ドデカン	98.1	7.92	8.08	118.8
テトラデカン	104.2	6.81	6.53	125.0
ヘキサデカン	109.8	6.66	6.06	132.8
メチルオクタノエート	94.6	14.1	14.9	111.9
メチルデカノエート	126.4	13.8	10.9	121.8
ラウリン酸メチル	130.0	12.1	9.33	123.8
ミリスチン酸メチル	113.1	10.0	8.84	119.6
パルミチン酸メチル	134.4	12.0	8.93	124.3
ステアリン酸メチル	114.0	9.89	8.67	124.3
エイコサイン酸メチル	93.6	8.41	8.98	120.8
ベヘン酸メチル	104.7	9.83	9.39	116.3

表 2 および 3 に示す結果は外部標準を用いて測定したものですが、内部標準を用いたデータの評価もおこないました。ラウリン酸メチルを内部標準物質としました。ラウリン酸メチルを用いたことにより、希釈溶媒の精度に依存しない結果が得られます。この手法により、RSD が大幅に向上しました。標準化したピーク面積を用いて、3 日間にわたって手動および自動メソッドで作成したサンプルの相対標準偏差を、表 4 に示しています。手動の結果と自動の結果を比べると、脂肪酸の誘導体化においては自動メソッドのほうが有効な手段となり、再現性と回収率を高められることが明らかにわかります。

表 4. 手動および自動酸触媒反応により前処理を行い、ラウリン酸メチルを内部標準とした遊離脂肪酸サンプルの分析結果

化合物	相対標準偏差-自動 (%)	相対標準偏差-手動 (%)
メチルオクタノエート	1.31	7.65
メチルデカノエート	0.452	2.63
ラウリン酸メチル	–	–
ミリスチン酸メチル	0.425	1.05
パルミチン酸メチル	0.779	1.80
ステアリン酸メチル	1.10	1.93
エイコサイン酸メチル	1.59	1.72
ベヘン酸メチル	2.62	1.77

菜種油の分析

遊離 FA サンプルを用いた自動メソッドのバリデーション後に、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いて、油サンプルの前処理をおこないました。上で述べたように、菜種油の分注は、粘度が高いために、当初の予想よりも困難でした。しかし、油サンプルとサロゲート標準溶液を混合することで、溶液の粘度をヘキサンの粘度レベルに近づけ、再現性の高い分注をおこなうことが容易になりました。結果を表 5 に、代表的なクロマトグラムを図 5 に示しています。

11 の油サンプルの前処理を 2 日にわたっておこないました。油とラウリン酸の溶液をフレッシュな状態で分析するため溶液は毎日個別に作成しました。このため、11 サンプルすべての平均 RSD を示すことはできません。しかし、それでも良好な再現性が得られました。1 日目に処理した 6 サンプルの平均 RSD は 3.6 % でした。2 日目に処理した 5 サンプルの平均 RSD は、それよりもわずかに低い 2.5 % でした。内部標準としてラウリン酸メチルを用いて FAME を標準化した場合、11 サンプルすべての平均 RSD は、表 5 に示すように低下しました。これらのサンプルの平均化回収率は 101 % でした。

表 5. Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチと酸触媒反応により前処理をおこなった菜種油サンプルにおいて、外部標準 (ES) と内部標準 (IS) を用いた場合の結果

化合物	量 (ppm)	標準偏差 (ppm)	相対標準偏差-ES (%)	相対標準偏差-IS (%)	回収率 (%)
ラウリン酸メチル	51.0	1.91	3.74	–	97.1
パルミチン酸メチル	1499.6	57.8	3.85	0.778	–
ステアリン酸メチル	306.8	12.9	4.20	0.928	–
エイコサイン酸メチル	226.8	9.44	4.16	1.10	–
ベヘン酸メチル	111.6	4.73	4.24	0.861	–

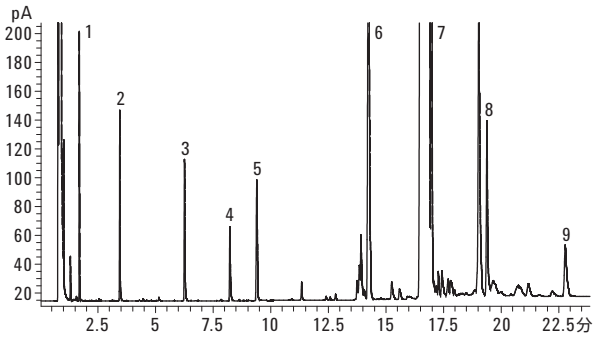


図 5. 自動酸触媒によるサンプル前処理後の GC 分析により得られた菜種油サンプルの典型的なクロマトグラム。同定および定量した化合物は、1) デカン、2) ドデカン、3) テトラデカン、4) ラウリン酸メチル、5) ヘキサデカン、6) パルミチン酸メチル、7) ステアリン酸メチル、8) エイコサイン酸メチル、9) ベヘン酸メチルです。
その他の同定およびキャリブレーションされていないピークは、各種の不飽和 FAME です

塩基触媒反応でも、良好な結果が得られました。全部で 10 サンプルの前処理を 1 日でおこない、酸触媒反応と同様の再現性が得られました (表 6)。10 サンプルの平均 RSD は 3.2 % でした。内部標準にヘキサデカンを用いてピーク面積を標準化しても、酸触媒反応のような大幅な RSD の減少は見られませんでした。平均回収率は 94 % でした。

表 6. Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチと塩基触媒反応により前処理をおこなった菜種油サンプルにおいて、外部標準 (ES) と内部標準 (IS) を用いた場合の結果

化合物	量 (ppm)	標準偏差 (ppm)	相対標準偏差-ES (%)	相対標準偏差-IS (%)	回収率 (%)
ヘキサデカン	9.66	0.215	2.23	–	99.2
パルミチン酸メチル	312.5	13.01	4.16	2.69	–
ステアリン酸メチル	49.95	3.39	6.80	4.89	–
エイコサイン酸メチル	40.98	1.66	4.04	2.15	–
ベヘン酸メチル	18.07	0.945	5.23	2.83	–

自動サンプル前処理の利点

サンプル前処理手順を自動化すれば、多くの面で利点が得られます。オリジナルの手動メソッドを自動メソッドに適用する際に、反応のスケールを小さくしました。これにより、化学物質への曝露のレベルが低下し、溶媒や試薬の消費量も減少します。その結果、メソッドの安全性が向上し、分析のコストが低下します。

さらに重要なのが、メソッドの自動化により、回収率と再現性が向上する点です。この手動メソッドを自動化したところ、再現性が少なくとも 2 倍向上しました。

結論

このアプリケーションノートでは、脂肪酸を脂肪酸メチルエステルに誘導体化する 2 つの自動メソッドを紹介しました。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチの使用により、誘導体化反応を簡単に自動メソッドに変換し、再現性を高めることができました。さらに、溶媒と試薬の使用量が少なくなるため、分析 1 回あたりのコストが大幅に低下しました。脂肪酸標準溶液と菜種油サンプルに含まれるほとんどの化合物において、良好な再現性と回収率が得られました。これらの結果は、この種のメソッドを Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチに簡単に適用させることが可能であり、それにより多くの利点が得られることを示しています。

参考文献

1. M. Petrovic, N. Kezic, and V. Bolanca, *Food Chemistry*, **122**, 285-291(2010).
2. K. M. Giffin and W. H. Wilson, “Preparation and Analysis of FAMEs by Automated Esterification/Capillary GC,” Application Note 288-357, Hewlett-Packard No. (23)5965-1110E (1996).
3. K. Eder, *J. Chromatogr.*, B, **671**, 113-131 (1995).
4. G. Gutnikov, *J. Chromatogr.*, B, **671**, 71-89 (1995).
5. F. David, P. Sandra, P. Wylie, “Improving the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters Using Retention Time Locked Method and Retention Time Databases,” Application Note 5990-4822EN, Agilent Technologies publication 5988-5871EN (2003).
6. W. Welz, W. Sattler, H.-J. Leis, and E. Malle, *J. Chromatogr.*, B, **526**, 319-329 (1990).
7. N. Sanchez-Avila, J. M. Mata-Granados, J. Ruiz-Jimenez, and M. D. Luque de Castro, J. Chromatogr., A, **1216**, 6864-6874 (2009).

8. R. W. Johnson in Fatty Acids, E. Pryde (editor), AOCS Press, Champaign, IL, p. 608 and Part VIII (1979).
9. T. Seppanen-Laakso, I. Laakso, and R. Hiltunen, Anal. *Chim. Acta*, **465**, 39-62 (2002).
10. W. W. Christie in *Advances in Lipid Methodology – Two*, W. W. Christie (editor), Oily Press, Dundee, MI, pp. 69-111 (1993).
11. L. Mondello, P. Quinto Tranchida, P. Dugo, and G. Dugo, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**, 1566-1570 (2006).
12. R. Perkins, K. Summerhill, and J. Angove, *Chromatography Today*, Sept/Oct, 17-19 (2008).
13. M. Athar Masood and N. Salem Jr., *Lipids*, **43**, 171-180 (2008).
14. E. Ballesteros, M. Gallego, and M. Valcarcel, *Anal. Chim. Acta*, **282**, 581-588 (1993).
15. P. W. Park and R. E. Goins, *J. Food Sci.*, **59**, 1262-1266 (1994).
16. L.-E. Dayhuff and M. J. M. Wells, *J Chromatogr.*, A, **1098**, 144-149 (2005).
17. AOAC Official Methods of Analysis (1990), method 969.33.

詳細情報

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 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., 2011
Printed in Japan
April 21, 2011
5990-6873JAJP

Agilent Technologies