



PAL-RTCを用いた油脂中の脂肪酸自動分析評価

【はじめに】

脂肪酸は油脂を構成する化合物で、鎖状のモノカルボン酸の総称です。構成する炭素数、二重結合の有無、二重結合を持つ場合はその数と位置によって、それぞれ呼び名が異なります。

油脂の主要成分は、グリセリンが持つ水酸基に脂肪酸がエステル結合したグリセリドと呼ばれる化合物で、グリセリンの三つの水酸基全てに脂肪酸が結合したトリグリセリドが多くを占めています注)。結合した脂肪酸の種類によって油脂の性質が異なるため、油脂を構成する脂肪酸の分析は非常に重要です。

近年、健康への悪影響が懸念されているトランス脂肪酸は、天然の食品では牛や羊などの反芻(はんすう)動物由来により含まれ、また油脂の加工・精製過程でも生成する場合があります。

<農林水産省ホームページより引用>

http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/trans_fat/t_kihon/fat_oil.html

注)グリセリドには、脂肪酸が一つ結合したモノグリセリド、脂肪酸が二つ結合したジグリセリドもあり、これらも油脂中にわずかに含まれています。

油脂中の脂肪酸はアルカリによる加水分解で脂肪酸を遊離させ、遊離脂肪酸をメチルエステル化してGCにより分析します。

GCに注入する試料を得るためには100°C程度の加熱や溶媒による抽出操作を伴います。これらの前処理には時間を要するだけでなく、分析者の熟練度が分析結果に影響を及ぼす可能性があります。

我々はPAL-RTCシステムを用いた油脂中脂肪酸の自動分析を検討し、実試料として植物油の分析を行い、良好な結果を得ることができました。

参考

内閣府食品安全委員会 平成 18 年度食品安全確保総合調査
「食品に含まれるトランス脂肪酸の評価基礎資料調査報告書」

<http://www.fsc.go.jp/sonota/kagaku4-toujitusiryoku.pdf>

AOAC Official Method 996.06 Fat (Saturated, and Unsaturated) in Foods
Hydrolytic Extraction Gas Chromatographic Method

<http://files.instrument.com.cn/bbs/upfile/2008622221856.pdf>

試薬

分析に用いた脂肪酸メチルエステル標準試料と脂肪酸メチル化キットを以下に示しました。

<脂肪酸メチルエステル標準試薬>

- ・Sigma-Aldrich製 SUPELCO 37種 FAME Mix
- ・和光純薬製 9,12-オクタデカジエン酸メチル標準品(*cis-*, *trans-*混合物)
- ・和光純薬製 9,12,15-オクタデカトリエン酸メチル標準品(*cis-*, *trans-*混合物)

<脂肪酸メチル化キット>

nacalai tesque製 脂肪酸メチル化キット

植物油実試料

オリーブ油、ごま油、なたね油、大豆油を分析しました。

GC分析条件をTable 1に示しました。

脂肪酸メチル化キットの処理手順を以下に示しました。

- ①植物油 20mg を容器に封入 ※
- ②メチル化試薬Aを250 μ L添加
- ③メチル化試薬Bを250 μ L添加
- ④37 $^{\circ}$ Cで5分間反応させる
- ⑤メチル化試薬Cを250 μ L添加
- ⑥37 $^{\circ}$ Cで20分間反応させる
- ⑦抽出試薬を500 μ L添加してボルテックスで混合
- ⑧上層をGCに注入

手順②～⑧をPAL-RTCを用いて自動前処理を行ないました。

※ 植物油試料をヘキサンにて1000mg/mLに調整し、20 μ Lを封入しました。

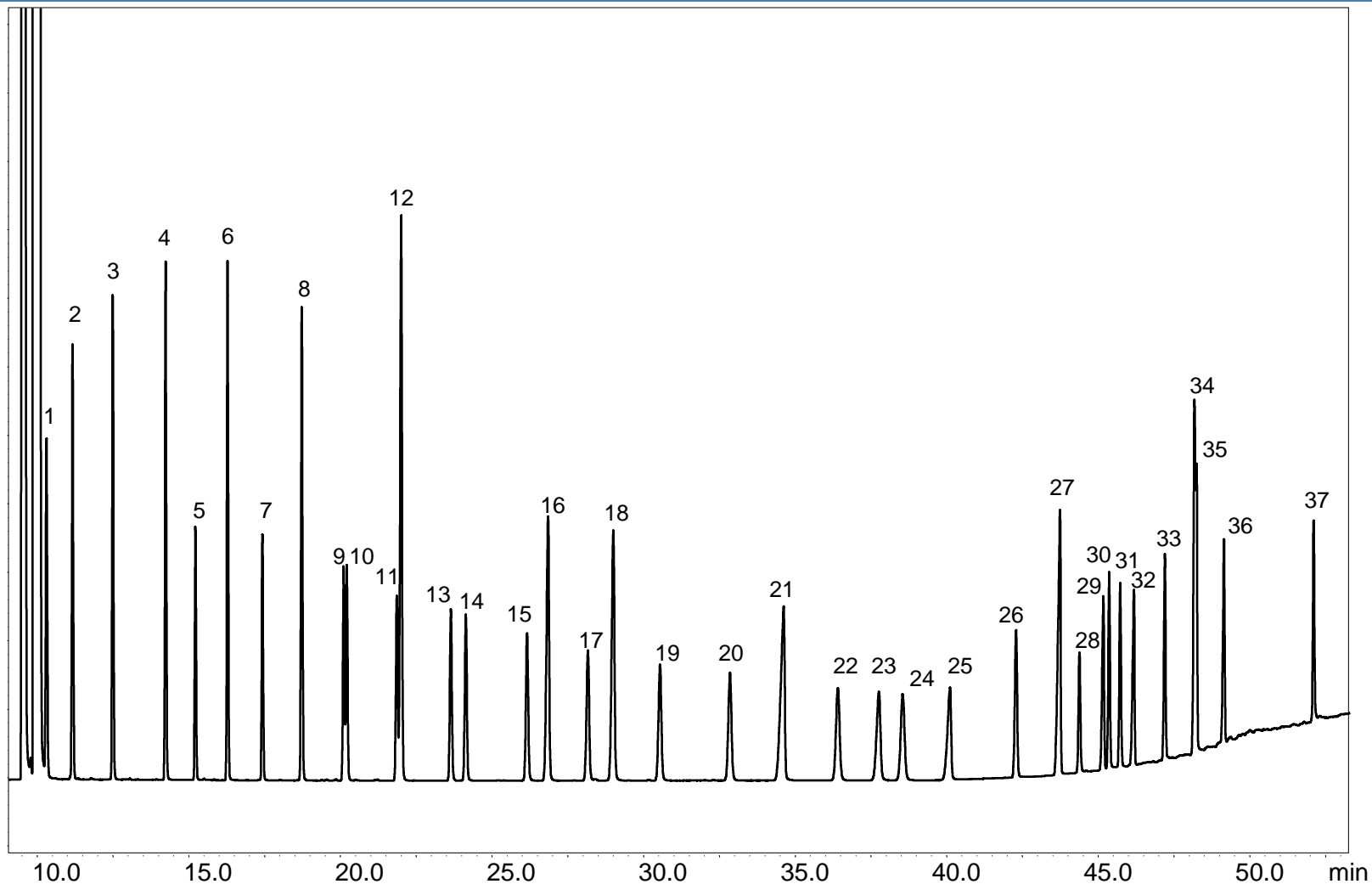
Table1 GC分析条件

使用装置	GC-2010 Plus AF
使用カラム	SGE製 BPX90 (内径 0.25mm 長さ 100m 膜厚0.25 μ m)
カラム温度	100 $^{\circ}$ C(2min) \rightarrow 10 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 175 $^{\circ}$ C(20min) \rightarrow 10 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 280 $^{\circ}$ C(20min)
注入量	1.0 μ L
注入口温度	250 $^{\circ}$ C
キャリアガス	He
キャリアガス制御	線速度一定
注入口圧力	232.7kPa (@100 $^{\circ}$ C)
全流量	24.0mL/min (@100 $^{\circ}$ C)
線速度	18.1cm/sec
カラム流量	1.00mL/min
ページ流量	3.0mL/min
注入方法	スプリット法
スプリット比	1:20
検出器	FID
検出器温度	280 $^{\circ}$ C
H2ガス流量	40.0mL/min
Air流量	400.0mL/min
メイクアップガス流量	He: 30.0mL/min



PAL-RTC		
Main Body	xtended x-axis length	
Tool	1	Tool Station
	2	Tray Holder x 2
	3	Tray (R60, VT54x2, VT15)
	4	Large Wash Module
	5	Vortex
	6	Agitator
	7	Syringe(1ml, 10ul)
	8	Vial(2ml, 10ml, 20ml)

Fig.1 SUPELCO 37種 FAME Mix クロマトグラム



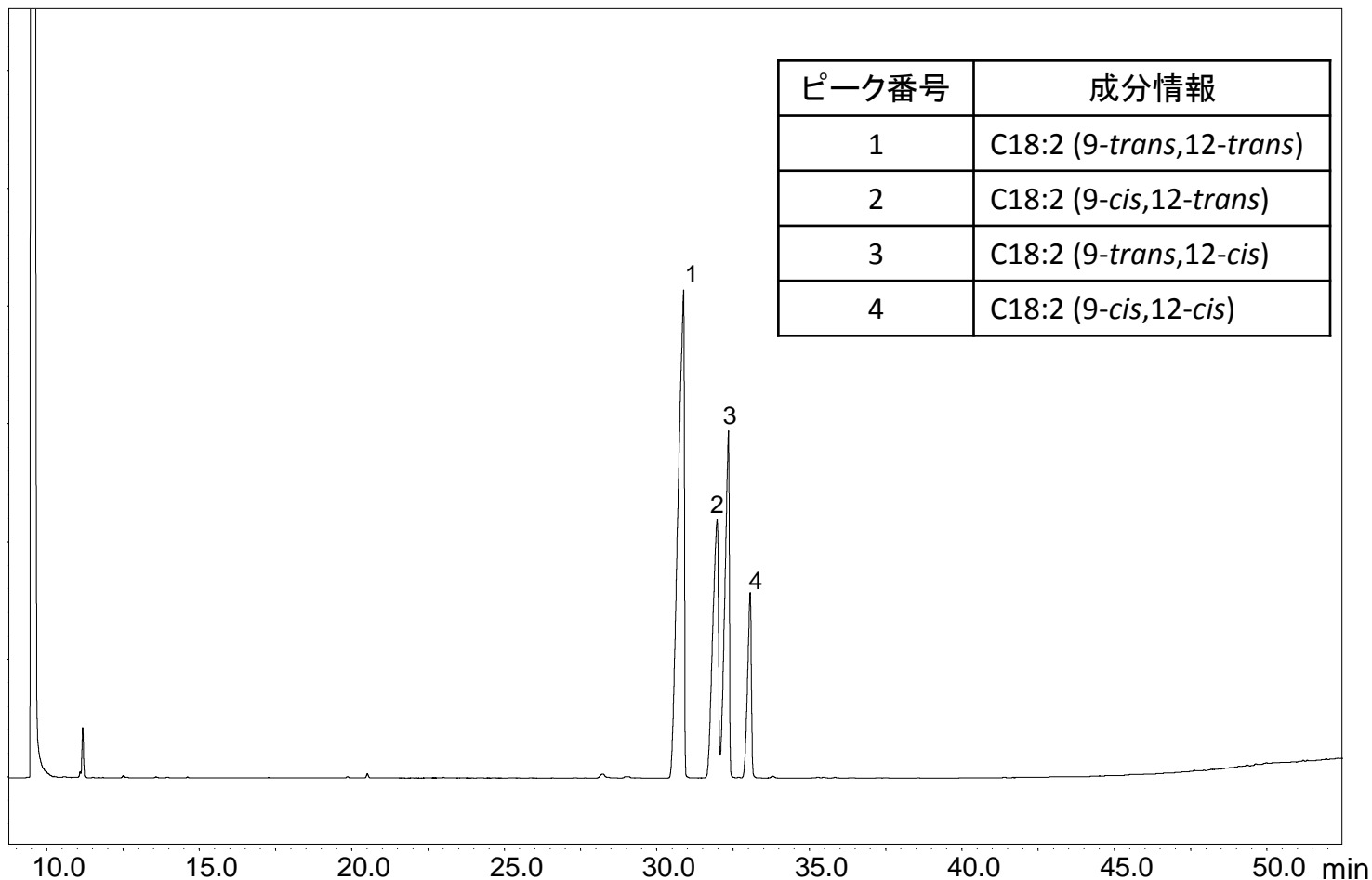
SUPELCO 37種 FAME Mixを分析しました。試薬は希釈せず原液のまま分析しました。結果のクロマトグラムを Fig.1に示しました。各成分ピークのピーク番号と成分名をTable 2-1～2-2に示しました。

Table2-1 SUPELCO 37種 FAME Mixピーク番号と成分

ピーク番号	成分名	略記
1	Butyric acid methyl ester	C4:0
2	Caproic acid methyl ester	C6:0
3	Caprylic acid methyl ester	C8:0
4	Capric acid methyl ester	C10:0
5	Undecanoic acid methyl ester	C11:0
6	Lauric acid methyl ester	C12:0
7	Tridecanoic acid methyl ester	C13:0
8	Myristic acid methyl ester	C14:0
9	Myristoleic acid methyl ester	C14:1
10	Pentadecanoic acid methyl ester	C15:0
11	cis-10-Pentadecenoic acid methyl ester	C15:1
12	Palmitic acid methyl ester	C16:0
13	Palmitoleic acid methyl ester	C16:1
14	Heptadecanoic acid methyl ester	C17:0
15	cis-10-Heptadecenoic acid methyl ester	C17:1
16	Stearic acid methyl ester	C18:0
17	Elaidic acid methyl ester	C18:1n9t
18	Oleic acid methyl ester	C18:1n9c
19	Linolelaidic acid methyl ester	C18:2n6t

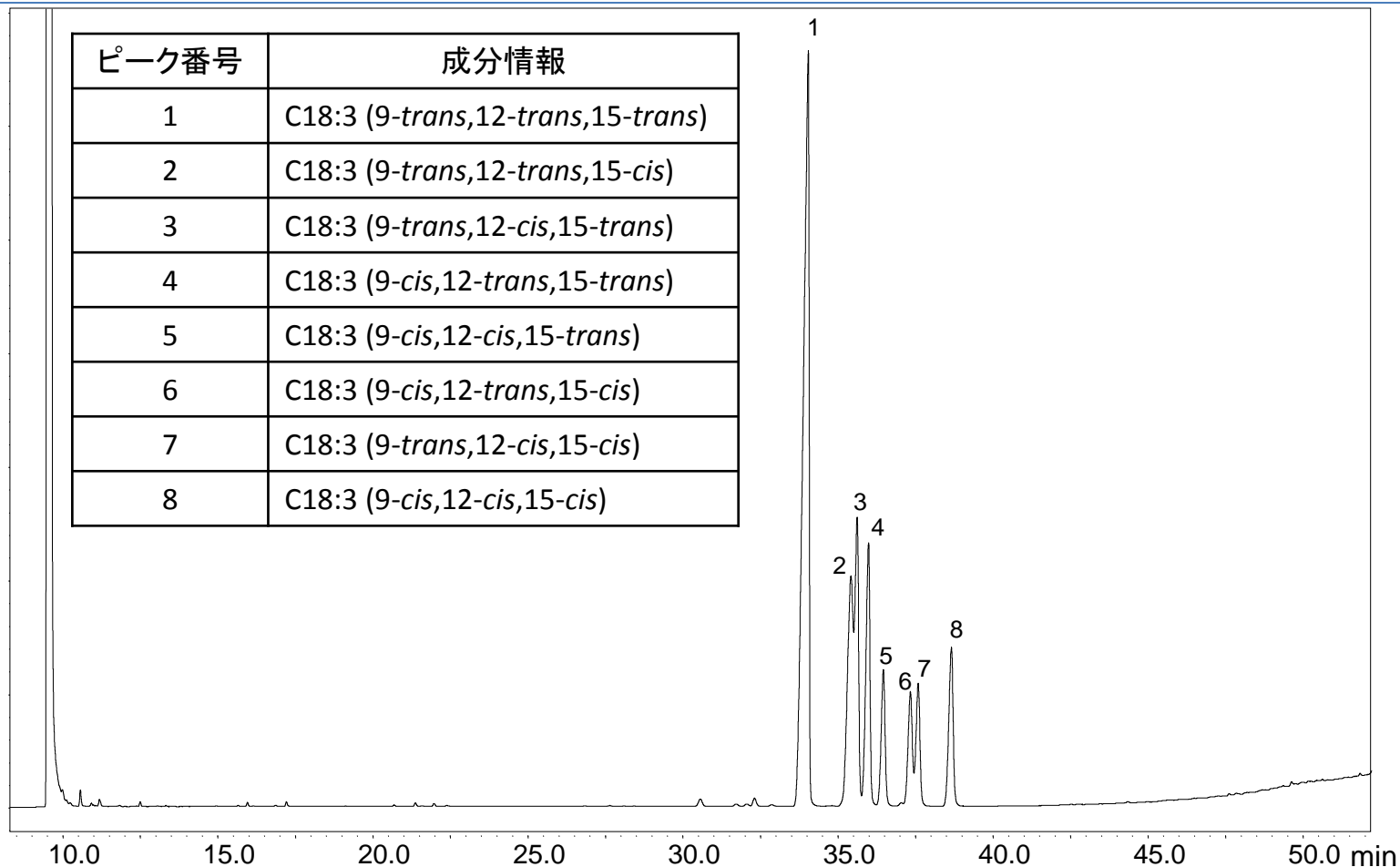
ピーク番号	成分名	略記
20	Linoleic acid methyl ester	C18:2n6c
21	Arachidic acid methyl ester	C20:0
22	γ -Linolenic acid methyl ester	C18:3n6
23	cis-11-Eicosenoic acid methyl ester	C20:1n9
24	Linolenic acid methyl ester	C18:3n3
25	Heneicosanoic acid methyl ester	C21:0
26	cis-11,14-Eicosadienoic acid methyl ester	C20:2n6
27	Behenic acid methyl ester	C22:0
28	cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid methyl ester	C20:3n6
29	Erucic acid methyl ester	C22:1n9
30	cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid methyl ester	C20:3n3
31	Arachidonic acid methyl ester	C20:4n6
32	Tricosanoic acid methyl ester	C23:0
33	cis-13,16-Docosadienoic acid methyl ester	C22:2
34	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid methyl ester	C20:5n3
35	Lignoceric acid methyl ester	C24:0
36	Nervonic acid methyl ester	C24:1
37	cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid methyl ester	C22:6n3

Fig.2 和光純薬製 9,12-オクタデカジエン酸メチル 標準品クロマトグラム



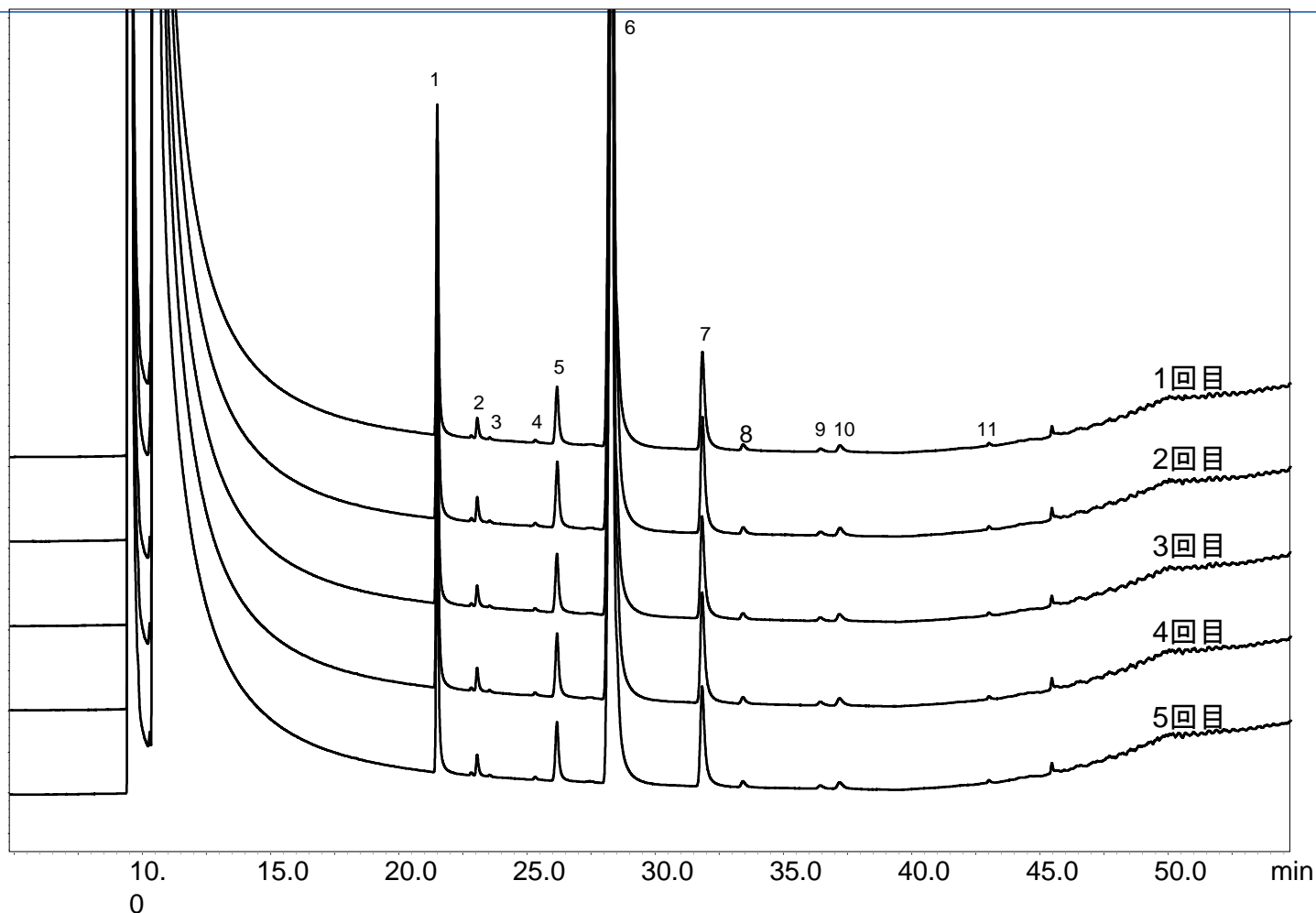
和光純薬製 9,12-オクタデカジエン酸メチル標準品をヘキサンにて10mg/Lに調整し分析しました。結果のクロマトグラムをFig.2に示しました。各成分ピークのピーク番号と成分情報をFig.2中に示しました。

Fig.3 和光純薬製 9,12,15-オクタデカトリエン酸メチル 標準品クロマトグラム



和光純薬製 9,12,15-オクタデカトリエン酸メチル標準品をヘキサンにて10mg/Lに調整し分析しました。結果のクロマトグラムをFig.3に示しました。各成分ピークのピーク番号と成分情報をFig.3中に示しました。

Fig.4 オリーブ油クロマトグラム



オリーブ油クロマトグラムをFig.4に示しました。PAL-RTCによる自動化前処理を含む分析を連続5回行い、再現性を評価しました。

Table 3に面積値再現性を示しました。Table 4に脂肪酸組成比を示しました。

Table 3 オリーブ油面積値再現性結果

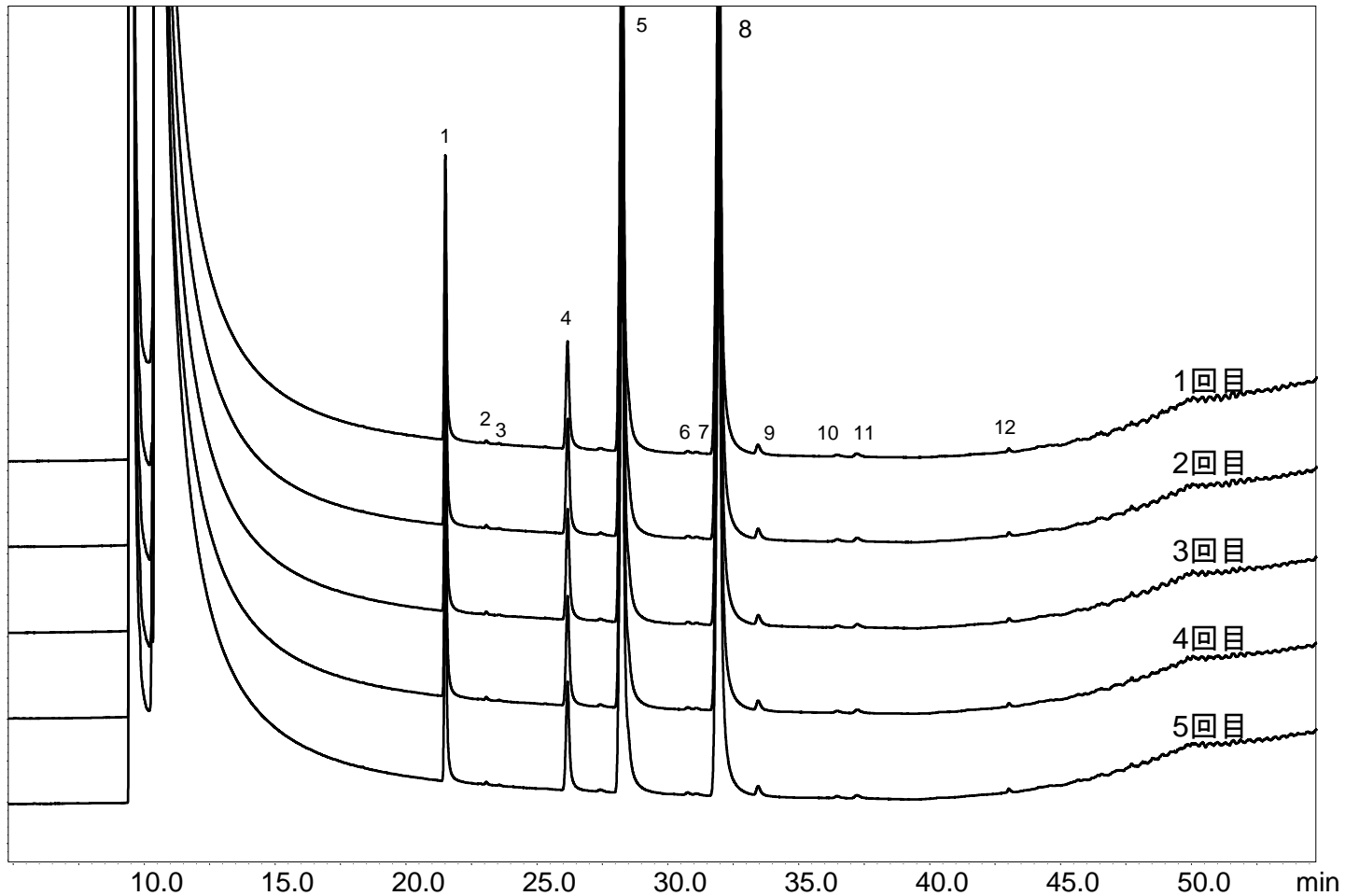
ピーク番号	成分名	面積値						標準偏差	CV%
		1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	平均		
1	C16:0	261197	312551	270754	293010	268435	281189	21181.1	7.53
2	C16:1	16803	20740	18826	19275	17172	18563	1608.5	8.67
3	C17:0	1330	1603	1319	1539	1343	1427	134.1	9.40
4	C17:1	2394	3180	2525	2758	2332	2638	344.3	13.05
5	C18:0	70314	82457	72114	78396	72091	75074	5144.6	6.85
6	C18:1c	1748730	2082489	1820084	1984167	1808994	1888893	139032.9	7.36
7	C18:2(9c,12c)	156890	186402	163860	175810	161205	168833	12071.6	7.15
8	C20:0	7551	9018	8454	8790	7384	8239	735.3	8.92
9	C20:1n9	4324	5484	4565	5351	4666	4878	510.1	10.46
10	C18:3(9c,12c,15c)	10237	12130	11810	12451	9942	11314	1145.5	10.12
11	C22:0	2597	2640	2791	2833	2186	2610	256.5	9.83

Table 4 オリーブ油脂肪酸組成比(%)再現性結果

ピーク番号	成分名	脂肪酸組成比(%)						標準偏差	CV%
		1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	平均		
1	C16:0	11.408	11.459	11.353	11.301	11.358	11.376	0.060	0.53
2	C16:1	0.734	0.760	0.789	0.743	0.727	0.751	0.025	3.30
3	C17:0	0.058	0.059	0.055	0.059	0.057	0.058	0.002	2.91
4	C17:1	0.105	0.117	0.106	0.106	0.099	0.107	0.007	6.10
5	C18:0	3.071	3.023	3.024	3.024	3.050	3.038	0.022	0.71
6	C18:1c	76.377	76.353	76.318	76.526	76.543	76.423	0.104	0.14
7	C18:2(9c,12c)	6.852	6.834	6.871	6.781	6.821	6.832	0.034	0.50
8	C20:0	0.330	0.331	0.355	0.339	0.312	0.333	0.016	4.68
9	C20:1n9	0.189	0.201	0.191	0.206	0.197	0.197	0.007	3.56
10	C18:3(9c,12c,15c)	0.447	0.445	0.495	0.480	0.421	0.458	0.030	6.47
11	C22:0	0.113	0.097	0.117	0.109	0.093	0.106	0.010	9.79

各成分脂肪酸組成比(%) = (各成分ピーク面積値 / 各成分ピーク面積値の合算値) x 100

Fig.5 ごま油クロマトグラム



ごま油クロマトグラムをFig.5に示しました。PAL-RTCによる自動化前処理を含む分析を連続5回行い、再現性を評価しました。

Table 5に面積値再現性を示しました。Table 6に脂肪酸組成比を示しました。

Table 5 ごま油面積値再現性結果

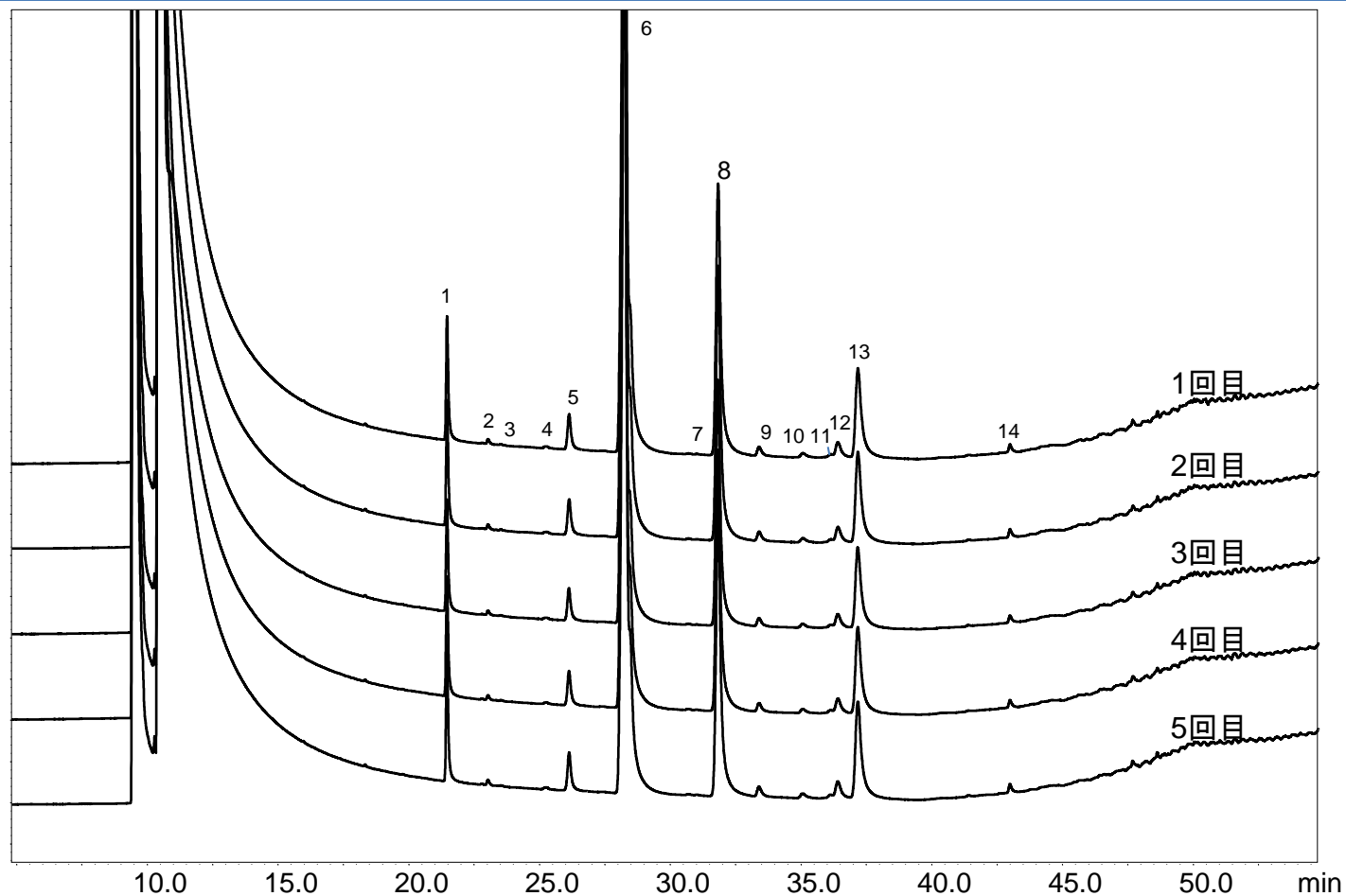
ピーク番号	成分名	面積値						標準偏差	CV%
		1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	平均		
1	C16:0	218134	235607	228092	225809	222319	225992	6559.9	2.90
2	C16:1	2129	2350	2297	2378	2229	2276	100.1	4.40
3	C17:0	758	848	740	832	874	810	58.4	7.20
4	C18:0	127028	136509	134169	133258	128035	131800	4088.2	3.10
5	C18:1c	911644	986269	955464	941907	933257	945708	27704.6	2.93
6	C18:2(9c,12t)	3103	3388	3211	3150	3368	3244	128.4	3.96
7	C18:2(9t,12c)	2611	2970	2460	2672	2886	2720	207.3	7.62
8	C18:2(9c,12c)	1020167	1114361	1071068	1062717	1048105	1063284	34493.6	3.24
9	C20:0	12003	12925	13072	13044	12753	12759	441.0	3.46
10	C20:1n9	3288	3682	3066	3356	3554	3389	239.0	7.05
11	C18:3(9c,12c,15c)	5906	6904	6182	6093	6202	6257	380.2	6.08
12	C22:0	2926	3023	3041	3260	3054	3061	122.1	3.99

Table 6 ごま油脂肪酸組成比(%)再現性結果

ピーク番号	成分名	脂肪酸組成比(%)						標準偏差	CV%
		1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	平均		
1	C16:0	9.434	9.379	9.400	9.403	9.382	9.400	0.022	0.23
2	C16:1	0.092	0.094	0.095	0.099	0.094	0.095	0.003	2.73
3	C17:0	0.033	0.034	0.030	0.035	0.037	0.034	0.003	7.66
4	C18:0	5.494	5.434	5.530	5.549	5.403	5.482	0.062	1.13
5	C18:1c	39.427	39.262	39.378	39.223	39.384	39.335	0.087	0.22
6	C18:2(9c,12t)	0.134	0.135	0.132	0.131	0.142	0.135	0.004	3.21
7	C18:2(9t,12c)	0.113	0.118	0.101	0.111	0.122	0.113	0.008	7.05
8	C18:2(9c,12c)	44.121	44.361	44.142	44.254	44.231	44.222	0.096	0.22
9	C20:0	0.519	0.515	0.539	0.543	0.538	0.531	0.013	2.41
10	C20:1n9	0.142	0.147	0.126	0.140	0.150	0.141	0.009	6.58
11	C18:3(9c,12c,15c)	0.255	0.275	0.255	0.254	0.262	0.260	0.009	3.41
12	C22:0	0.127	0.120	0.125	0.136	0.129	0.127	0.006	4.60

各成分脂肪酸組成比(%) = (各成分ピーク面積値 / 各成分ピーク面積値の合算値) x 100

Fig.6なたね油クロマトグラム



なたね油クロマトグラムをFig.6に示しました。PAL-RTCによる自動化前処理を含む分析を連続5回行い、再現性を評価しました。

Table 7に面積値再現性を示しました。Table 8に脂肪酸組成比を示しました。

Table 7 たたね油面積値再現性結果

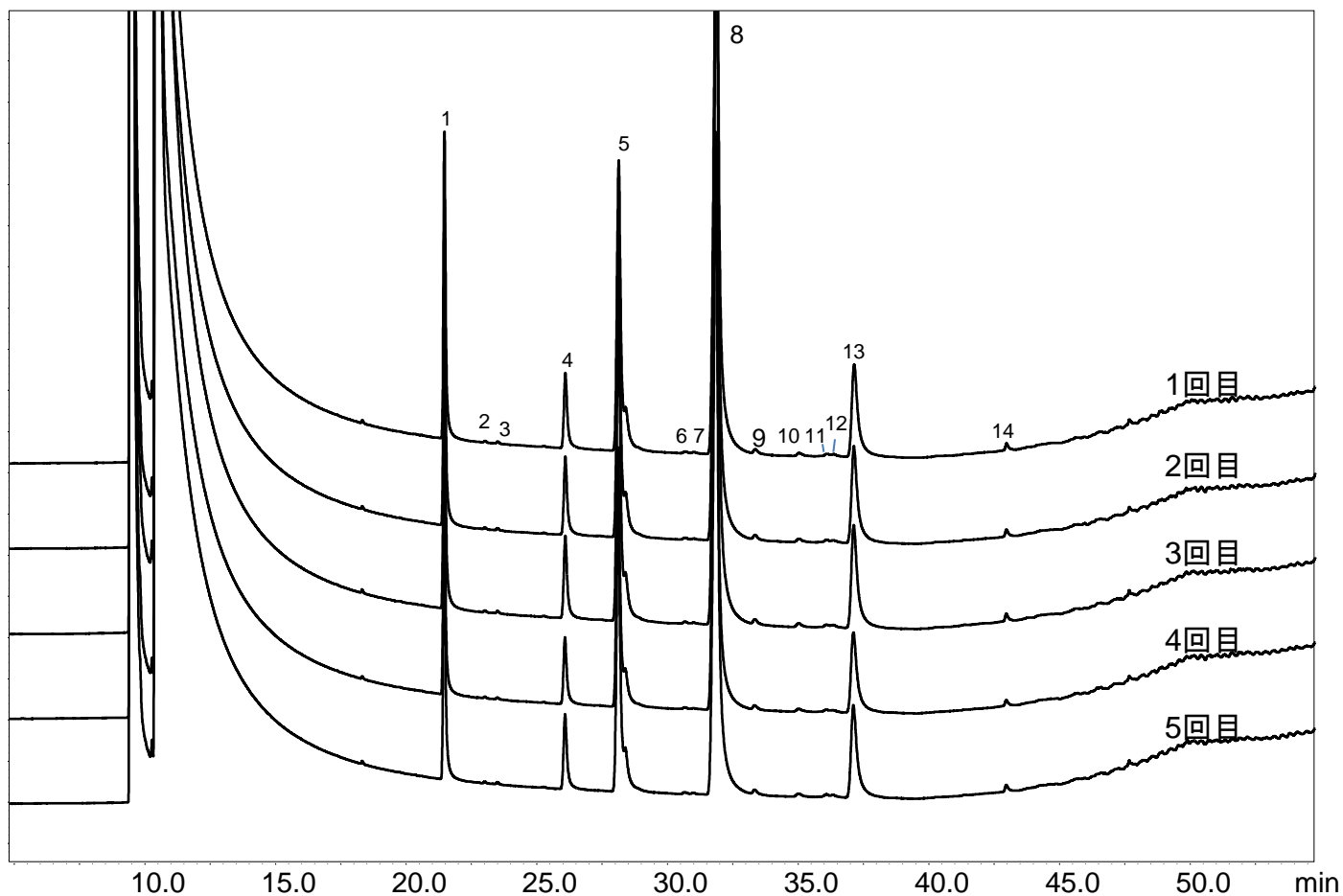
ピーク番号	成分名	面積値						標準偏差	CV%
		1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	平均		
1	C16:0	95775	97181	86569	92307	104847	95336	6710.0	7.04
2	C16:1	4039	4097	3559	3870	4296	3972	276.5	6.96
3	C17:0	830	790	645	860	874	800	92.5	11.57
4	C17:1	2679	2860	2241	2508	2551	2568	228.2	8.89
5	C18:0	43382	43546	37724	41169	46406	42446	3228.9	7.61
6	C18:1c	1569071	1598626	1414157	1519150	1721771	1564555	112448.9	7.19
7	C18:2(9c,12t)	1084	1135	968	1071	1164	1084	75.1	6.93
8	C18:2(9c,12c)	453863	462323	408442	438068	498356	452210	32977.5	7.29
9	C20:0	13397	13486	11541	12799	14533	13151	1095.2	8.33
10	C18:3(9c,12t,15c)	6377	7502	6088	6260	7433	6732	679.7	10.10
11	C18:3(9t,12c,15c)	3345	3533	3175	3319	3809	3436	244.3	7.11
12	C20:1n9	25927	26236	23129	24432	28419	25629	1995.4	7.79
13	C18:3(9c,12c,15c)	187136	189362	166028	176801	203227	184511	13979.9	7.58
14	C22:0	7195	7606	6459	7155	7978	7279	568.0	7.80

Table 8 なたね油脂肪酸組成比(%)再現性結果

ピーク番号	成分名	脂肪酸組成比(%)						標準偏差	CV%
		1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	平均		
1	C16:0	3.967	3.953	3.988	3.962	3.962	3.966	0.013	0.33
2	C16:1	0.167	0.167	0.164	0.166	0.162	0.165	0.002	1.31
3	C17:0	0.034	0.032	0.030	0.037	0.033	0.033	0.003	7.80
4	C17:1	0.111	0.116	0.103	0.108	0.096	0.107	0.008	7.17
5	C18:0	1.797	1.771	1.738	1.767	1.754	1.765	0.022	1.24
6	C18:1c	64.996	65.030	65.147	65.206	65.064	65.089	0.086	0.13
7	C18:2(9c,12t)	0.045	0.046	0.045	0.046	0.044	0.045	0.001	1.85
8	C18:2(9c,12c)	18.800	18.807	18.816	18.803	18.832	18.812	0.013	0.07
9	C20:0	0.555	0.549	0.532	0.549	0.549	0.547	0.009	1.59
10	C18:3(9c,12t,15c)	0.264	0.305	0.280	0.269	0.281	0.280	0.016	5.66
11	C18:3(9t,12c,15c)	0.139	0.144	0.146	0.142	0.144	0.143	0.003	1.85
12	C20:1n9	1.074	1.067	1.065	1.049	1.074	1.066	0.010	0.96
13	C18:3(9c,12c,15c)	7.752	7.703	7.649	7.589	7.680	7.675	0.061	0.79
14	C22:0	0.298	0.309	0.298	0.307	0.301	0.303	0.005	1.69

各成分脂肪酸組成比(%) = (各成分ピーク面積値 / 各成分ピーク面積値の合算値) x 100

Fig.7 大豆油クロマトグラム



大豆油クロマトグラムをFig.7に示しました。PAL-RTCによる自動化前処理を含む分析を連続5回行い、再現性を評価しました。

Table 9に面積値再現性を示しました。Table 10に脂肪酸組成比を示しました。

Table 9 大豆油面積値再現性結果

ピーク番号	成分名	面積値						標準偏差	CV%
		1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	平均		
1	C16:0	241146	248882	269208	211663	242769	242734	20655.4	8.51
2	C16:1	1445	1397	1640	1275	1574	1466	144.6	9.86
3	C17:0	1813	1935	1780	1508	1833	1774	159.4	8.99
4	C18:0	88519	91610	97888	76513	89215	88749	7773.5	8.76
5	C18:1c	358837	372294	401919	316000	362886	362387	30925.7	8.53
6	C18:2(9c,12t)	2325	2378	2312	2150	2146	2262	107.1	4.73
7	C18:2(9t,12c)	1639	1545	1566	1429	1599	1556	79.1	5.09
8	C18:2(9c,12c)	1173047	1220546	1314043	1030154	1183465	1184251	102512.6	8.66
9	C20:0	5693	5465	6026	5114	5515	5563	333.7	6.00
10	C18:3(9c,12t,15c)	5492	5931	5834	5225	5419	5580	294.8	5.28
11	C18:3(9t,12c,15c)	3405	3188	3789	3035	3392	3362	283.8	8.44
12	C20:1n9	3716	3744	4544	3234	3806	3809	469.8	12.33
13	C18:3(9c,12c,15c)	198371	203590	223056	172879	199507	199480	17899.4	8.97
14	C22:0	6615	7030	7478	5743	6706	6714	639.6	9.53

Table 10 大豆油脂肪酸組成比(%)再現性結果

ピーク番号	成分名	脂肪酸組成比(%)						標準偏差	CV%
		1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	平均		
1	C16:0	11.132	11.080	11.124	11.143	11.122	11.120	0.024	0.22
2	C16:1	0.067	0.062	0.068	0.067	0.072	0.067	0.004	5.30
3	C17:0	0.084	0.086	0.074	0.079	0.084	0.081	0.005	5.99
4	C18:0	4.086	4.078	4.045	4.028	4.087	4.065	0.027	0.66
5	C18:1c	16.565	16.574	16.608	16.635	16.625	16.601	0.031	0.19
6	C18:2(9c,12t)	0.107	0.106	0.096	0.113	0.098	0.104	0.007	6.70
7	C18:2(9t,12c)	0.076	0.069	0.065	0.075	0.073	0.072	0.005	6.37
8	C18:2(9c,12c)	54.151	54.336	54.299	54.230	54.220	54.247	0.072	0.13
9	C20:0	0.263	0.243	0.249	0.269	0.253	0.255	0.011	4.12
10	C18:3(9c,12t,15c)	0.254	0.264	0.241	0.275	0.248	0.256	0.013	5.22
11	C18:3(9t,12c,15c)	0.157	0.142	0.157	0.160	0.155	0.154	0.007	4.57
12	C20:1n9	0.172	0.167	0.188	0.170	0.174	0.174	0.008	4.67
13	C18:3(9c,12c,15c)	9.157	9.063	9.217	9.101	9.140	9.136	0.058	0.64
14	C22:0	0.305	0.313	0.309	0.302	0.307	0.307	0.004	1.35

各成分脂肪酸組成比(%) = (各成分ピーク面積値 / 各成分ピーク面積値の合算値) x 100

【まとめ】

nacalai tesque製脂肪酸メチルキットを用いた PAL-RTCによる脂肪酸メチルエステル分析で油脂実試料の脂肪酸組成比分析を実施することができました。前処理を含めた5回連続分析による再現性結果においても良好な結果を得ることができました。

従来法では溶媒抽出などの操作が必要ですが、今回の分析では脂肪酸メチルエステル分析を前処理操作を含めた自動分析を行なうことができます。

今回のPAL-RTCを用いた自動前処理ではGC分析中に並行して前処理操作を行なうことができるため、2回目以降の分析では前処理操作の時間を無視することができ、分析時間を短縮することができます。

<参考>

従来法の一例

① 油脂試料 数mg (溶媒は除去しておく)



② 0.5 mol/L KOH/メタノール溶液 1mL (100°C, 10分間反応後冷却)



③ 14% 三フッ化ホウ素/メタノール溶液 1.5mL (100°C, 5分間反応後冷却)



④ 飽和NaCl 水 8mL



⑤ ヘキサン2mLで4回抽出



⑥ 抽出溶液を1mLに濃縮してGC分析