

Улучшение качества анализа 37 метиловых эфиров жирных кислот

С использованием трех типов капиллярных
колонок для ГХ

Авторы

Юнь Цзоу (Yun Zou)
Agilent Technologies
(Shanghai) Co.Ltd,
Шанхай 200131 КНР

Хуа У (Hua Wu)
Agilent Technologies (China)
Co.Ltd,
Пекин 100102 КНР

Аннотация

Анализ метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК, FAME) используется для определения характеристик липидной фракции пищевых продуктов и является одной из наиболее важных прикладных задач в анализе пищевых продуктов. В данных Методических рекомендациях подробно описывается разделение 37-компонентной стандартной смеси МЭЖК на колонках для ГХ Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME, Agilent J&W DB-FastFAME и Agilent J&W DB-FATWAX Ultra Inert. Хорошее разрешение было продемонстрировано с использованием колонки для ГХ CP-Sil 88 for FAME. Высокоэффективная колонка DB-FastFAME обеспечивает отличное разделение 37 МЭЖК всего за 8 минут. В то же время колонка DB-FATWAX Ultra Inert показывает уникальную селективность для большинства насыщенных и полиненасыщенных МЭЖК.

Введение

Жиры играют важную роль в таких областях исследования как диетология и химия пищевых продуктов. Состав жирных кислот в жире представляет собой сложную смесь насыщенных, мононенасыщенных и полиненасыщенных соединений с различной длиной углеродных цепей. Поскольку роль жирных кислот в организме изменяется в зависимости от их структуры, необходимо проводить детальный композиционный анализ жирных кислот, содержащихся в продуктах питания. ГХ-анализ жирных кислот в виде их производных – сложных метиловых эфиров (МЭЖК) является важным инструментом для характеристизации жиров при определении содержания общего жира и транс-жиров в пищевых продуктах^{1,2}. Выбор неподвижных фаз, длины и внутреннего диаметра колонки, толщины пленки и других параметров зависит в основном от сложности состава жирных кислот и требований к уровню разделения.

В повседневной практике для анализа МЭЖК в жире морских рыб, мяса, а также определения масляной кислоты в молочных жирах, используются капиллярные колонки с полиэтиленгликолем (ПЭГ). Это связано с тем, что капиллярные колонки с ПЭГ разделяют изомеры МЭЖК в соответствии с длиной углеродной цепи и степенью ненасыщенности. Однако, как сообщалось, одним из наиболее серьезных ограничений для использования колонок с ПЭГ является отсутствие дифференциации цис- и транс-изомеров. Все цис- и транс-изомеры элюируются совместно³.

Для многих стандартизованных методов анализа пищевых продуктов требуется разделение специфичных цис- и транс-изомеров жирных кислот при определении состава жирных кислот с помощью ГХ-ПИД. Для анализа проб более сложного состава, таких как пищевые масла, дополнительное разделение МЭЖК достигается при использовании капиллярной колонки с цианопропильным покрытием в качестве неподвижной фазы. Колонка для ГХ Agilent J&W DB-FastFAME с цианопропильной фазой средней концентрации обеспечивает быстрое и превосходное разделение сложных смесей МЭЖК и позволяет достичь разделения некоторых цис- и транс-изомеров. Для более полного цис-транс разделения предпочтительны колонки с высокополярной цианополисилоксановой неподвижной фазой (CP-Sil 88 for FAME/HP-88). Однако соединения с углеродными цепями определенной длины на цианополисилоксановых фазах обычно перекрываются, что вызывает проблемы с идентификацией пиков. Поэтому для достижения хорошего разделения МЭЖК необходимы длинные колонки для ГХ (например, 100 м) и длительное время анализа, что, однако, приводит к низкой производительности.

37-компонентная стандартная смесь МЭЖК предназначена для имитации состава жирных кислот многих пищевых продуктов и может использоваться для идентификации ключевых эфиров жирных кислот (МЭЖК) во многих продуктах питания. Эта смесь содержит МЭЖК в диапазоне от C4:0 до C24:1, включая большинство важных насыщенных, мононенасыщенных и полиненасыщенных МЭЖК (табл. 1).

В данных Методических рекомендациях представлены результаты анализа 37-компонентной смеси МЭЖК с использованием трех типов капиллярных колонок, предназначенных для анализа МЭЖК, включая колонки для ГХ Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME, DB-FastFAME и Agilent J&W DB-FATWAX Ultra Inert.

Экспериментальная часть

Химические вещества и стандарты

Стандартная 37-компонентная смесь МЭЖК (кат. № CDAA-252795-MIX-1 mL) была приобретена у ANPEL Scientific Instrument Co. Ltd (Шанхай, Китай). В табл. 1 приведена концентрация каждого компонента в смеси.

Смесь ПНЖК (полиненасыщенных жирных кислот) №1 (морского происхождения), смесь ПНЖК №2 (животного происхождения), и смесь ПНЖК №3 (из жира менгады) были приобретены у Minn Bolin Bio-Tech Co. LTD (Шэньчжэнь, Китай). Смесь поставляется в виде 100 мг чистой неразбавленной смеси, которую разбавляли 100 раз ацетоном.

Оборудование

Анализ проводили с использованием газового хроматографа Agilent 7890B GC, оборудованного пламенно-ионизационным детектором (ПИД). Введение проб проводили с использованием автоматизированного пробоотборника Agilent 7683B с шприцем на 5 мкл (кат. № G4513-80213) и портом для ввода пробы с делением и без деления потока. Конфигурация приборов и условия анализа обобщены в табл. 2 (колонка CP-Sil 88 for FAME), табл. 3 (колонка DB-FastFAME), табл. 4 (высокоэффективная колонка DB-FastFAME), и табл. 5 (колонка DB-FATWAX UI). В табл. 6 перечислены прочие материалы, использованные в данном исследовании.

Таблица 1. 37-компонентная смесь МЭЖК.

Номер	Компонент (метиловые эфиры)	Сокращение	Концентрация (мг/мл)
1	Масляная кислота	C4:0	403
2	Капроновая кислота	C6:0	404
3	Каприловая кислота	C8:0	406
4	Каприновая кислота	C10:0	403
5	Ундеокановая кислота	C11:0	200
6	Лауриновая кислота	C12:0	399
7	Тридекановая кислота	C13:0	200
8	Миристиновая кислота	C14:0	397
9	Миристолеиновая кислота	C14:1	202
10	Пентадекановая кислота	C15:0	202
11	цис-10-Пентадекановая кислота	C15:1	200
12	Пальмитиновая кислота	C16:0	599
13	Пальмитолеиновая кислота	C16:1	200
14	Гептадекановая кислота	C17:0	201
15	цис-10-Гептадекановая кислота	C17:1	200
16	Стеариновая кислота	C18:0	399
17	Олеиновая кислота	цис-C18:1 (n-9)	400
18	Элаидиновая кислота	транс-C18:1 (n-9)	200
19	Линолевая кислота	цис-C18:2 (n-6)	203
20	Октиадекадиеновая кислота	транс-C18:2 (n-6)	200
21	γ-Линоленовая кислота	C18:3 n-6	203
22	α-Линоленовая кислота	C18:3 n-3	199
23	Арахиновая кислота	C20:0	406
24	цис-11-Эйкозеновая кислота	C20:1 (n-9)	199
25	цис-11,14-Эйкозадиеновая кислота	C20:2	200
26	цис-8,11,14-Эйкозатриеновая кислота	C20:3 n-6	202
27	цис-11,14,17-Эйкозатриеновая кислота	C20:3 n-3	200
28	Арахидоновая кислота	C20:4 n-6 (ARA)	198
29	цис-5,8,11,14,17-Эйкозапентаеновая кислота	C20:5 n-3 (EPA)	201
30	Генэйкозановая кислота	C21:0	201
31	Бегеновая кислота	C22:0	400
32	Эруковая кислота	C22:1 n-9	202
33	цис-13,16-Докозадиеновая кислота	C22:2	199
34	цис-4,7,10,13,16,19-Докозагексаеновая кислота	C22:6(n-3) (DHA)	197
35	Трикозановая кислота	C23:0	200
36	Лигноцериновая кислота	C24:0	405
37	Нервоновая кислота	C24:1	201

Таблица 2. Параметры методики Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME.

Параметр	Значение
Система ГХ	Agilent 7890B/ПИД
Колонка	Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME, 100 м x 0,25 мм, 0,20 мкм (кат. № CP7489)
Газ-носитель	Гелий, 2,2 бара (32 psi), режим постоянного давления
Ввод	С делением/без деления потока, 260 °C, коэффициент деления 50:1
Термостат	100 °C (5 мин), 8 °C/мин до 180 °C (9 мин), 1 °C/мин до 230 °C (15 мин)
ПИД	260 °C, водород: 40 мл/мин Воздух: 400 мл/мин Подпиточный газ: 25 мл/мин
Ввод	1 мкл

Таблица 3. Параметры методики Agilent J&W DB-FastFAME.

Параметр	Значение
Система ГХ	Agilent 7890B/ПИД
Колонка	Agilent J&W DB-FastFAME, 30 м x 0,25 мм, 0,25 мкм (кат. № G3903-63011)
Газ-носитель	Гелий, 1 бара (14 psi), режим постоянного давления
Ввод	С делением/без деления потока, 250 °C, коэффициент деления 50:1
Термостат	50 °C (0,5 мин), 25 °C/мин до 194 °C (1 мин), 5 °C/мин до 245 °C (3 мин)
ПИД	280 °C, водород: 40 мл/мин Воздух: 400 мл/мин Подпиточный газ: 25 мл/мин
Ввод	1 мкл

Таблица 4. Параметры методики для высокоэффективной колонки Agilent J&W DB-FastFAME.

Параметр	Значение
Система ГХ	Agilent 7890B/ПИД
Колонка	Agilent J&W DB-FastFAME, 20 м x 0,18 мм, 0,20 мкм (кат. № G3903-63010)
Газ-носитель	Гелий, 2 бара (28 psi), режим постоянного давления
Ввод	С делением/без деления потока, 250 °C, коэффициент деления 50:1
Термостат	80 °C (0,5 мин), 65 °C/мин до 175 °C, 10 °C/мин до 185 °C (0,5 мин), 7 °C/мин до 230 °C
ПИД	280 °C, водород: 40 мл/мин Воздух: 400 мл/мин Подпиточный газ: 25 мл/мин
Ввод	1 мкл

Таблица 5. Параметры методики Agilent J&W DB-FATWAX Ultra Inert.

Параметр	Значение
Система ГХ	Agilent 7890B/ПИД
Колонка	Agilent J&W DB-FATWAX Ultra Inert, 30 м x 0,25 мм, 0,25 мкм (кат. № G3903-63008)
Газ-носитель	Гелий, постоянный поток. 30 см/с
Ввод	С делением/без деления потока, 250 °C, коэффициент деления 50:1
Термостат	40 °C (2 минуты), 55 °C/мин до 171 °C (25 минут), 10 °C/мин до 215 °C (25 минут)
ПИД	280 °C, водород: 40 мл/мин Воздух: 400 мл/мин Подпиточный газ: 25 мл/мин
Ввод	1 мкл

Результаты и их обсуждение

Высокополярные цианополисилоксановые неподвижные фазы, такие как CP-SIL 88 for FAME или HP-88, были разработаны с заданной целью улучшения разделения *цис*- и *транс*-МЭЖК. Эффективность высокополярных цианопропилсилоксановых колонок для определения *транс*-изомеров жирных кислот была успешно продемонстрирована ранее. Тем не менее, существует значительное перекрытие зон углеродных цепей в картинах элюирования при анализе 37-компонентной смеси МЭЖК по многим методикам, например, C18:3 *n*-6 или C18:3 *n*-3 и C20:0; C20:3 *n*-3, C22:1 *n*-9 и C20:4 *n*-6³. Это может привести к проблемам с идентификацией пиков. На рис. 1 показан оптимизированный метод разделения 37-компонентной смеси стандартов МЭЖК с использованием колонки CP-Sil 88 for FAME и ГХ-ПИД, дающий превосходную селективность; все 37 компонентов разрешены по базовой линии за один цикл анализа.

Для достижения хорошего разрешения для всех соединений в стандартной 37-компонентной смеси МЭЖК, была выбрана колонка для ГХ CP-Sil 88 for FAME, 100 м, время анализа составляло более 70 минут.

Таблица 6. Расходные материалы тракта.

Параметр	Значение
Флаконы	Янтарного цвета, участок для сигнатуры, сертифицированные комплекты флаконов с резьбой 2 мл (кат. № 5182-0554)
Септы	Nonstick BTO септа (кат. № 5183-4757)
Накидная гайка для колонки	Самозатягивающаяся, для соединения с испарителем/датчиком (кат. № 5190-6194)
Феррулы	15% графит: 85% Vespel, короткие, внутренний диаметр 0,4 мм, для колонок от 0,1 до 0,25 мм (10 шт/уп., кат. № 5181-3323)
Лайнер	Agilent Ultra Inert, с делением потока, стекловата (кат. № 5190-2295)
Уплотнение испарителя	позолоченное уплотнение Ultra Inert с шайбой (кат. № 5190-6144)

Другой распространенной альтернативой, используемой для анализа этих типов МЭЖК в сложных смесях, является использование колонок для ГХ с цианопропильной неподвижной фазой средней концентрации. Колонка для ГХ J&W DB-FastFAME была специально разработана для быстрого разделения смесей МЭЖК. Из-за более сильного взаимодействия *цис*-изомеров с циано-диполем *транс*-изомеры элюируются до *цис*-изомеров. Таким образом, они могут обеспечить определенную степень разделения *цис*-и *транс*-МЭЖК.

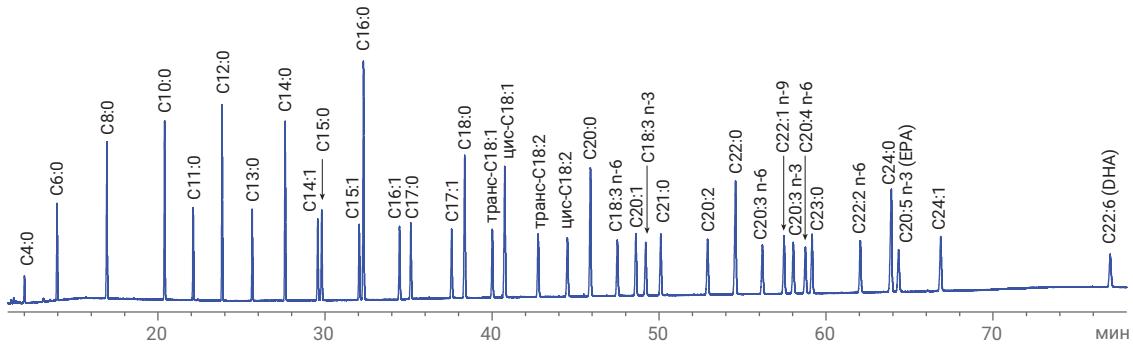


Рис. 1. ГХ-ПИД хроматограмма 37-компонентной стандартной смеси МЭЖК на колонке Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME 100 м x 0,25 мм x 0,25 мкм с использованием методики 1 (см. табл. 2).

ГХ-колонка Agilent J&W DB-FastFAME

Колонка DB-FastFAME 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм была выбрана для анализа 37-компонентной стандартной смеси МЭЖК. На рис. 2 показана типичная ГХ-ПИД хроматограмма. Все соединения в стандартной смеси были хорошо разрешены, а время анализа составляло менее 18 минут.

Применение высокоеффективных колонок для ГХ с внутренним диаметром 0,18 мм – один из возможных способов повышения производительности без снижения характеристик измерения. Это связано с тем, что уменьшение внутреннего диаметра приводит к увеличению эффективности колонки отнесенной на метр ее длины; длина колонки может быть уменьшена при сохранении разрешения на том же уровне. Использование водорода в качестве газа-носителя обеспечивает более быстрый анализ с почти эквивалентным разрешением, поскольку оптимальная линейная скорость газа-носителя выше из-за более высокой диффузионности водорода. На рис. 3 показано

разделение 37-компонентной стандартной смеси МЭЖК на колонке DB-FastFAME 20 м × 0,18 мм × 0,20 мкм. В этом методе все соединения стандартной смеси были полностью разделены (степень разрешения >1,5), включая критические пары АОАС, и время одного анализа было сокращено до 8 минут, что показывает возможности метода при использовании высокоеффективных колонок в условиях высокого пробопотока без ущерба для разрешения.

Различный порядок элюирования двух пар соединений: EPA (эйкозапентаеновая кислота)/C22:0 и DHA (докозагексаеновая кислота)/C24:1 показан на рис. 2 и 3. Изменение входного давления в программе изменения температурного режима термостата может изменить фактическую температуру, которая воздействует на соединения. Метод анализа EPA и DHA в сложных смесях может быть оптимизирован путем изменения порядка элюирования этих двух пар соединений на колонке для ГХ DB-FastFAME при замене газа-носителя с использованием различного входного давления и толщины пленки.

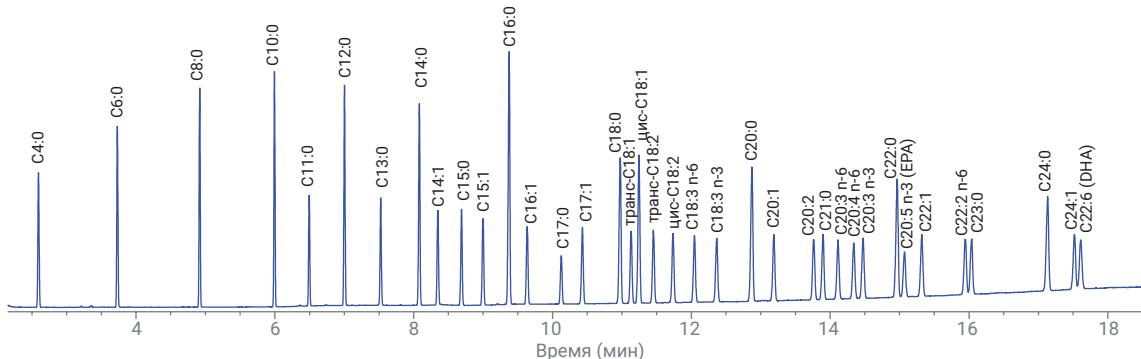


Рис. 2. ГХ-ПИД хроматограмма 37-компонентной стандартной смеси МЭЖК на колонке Agilent J&W DB-FastFAME 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм с использованием методики 2 (см. табл. 3).

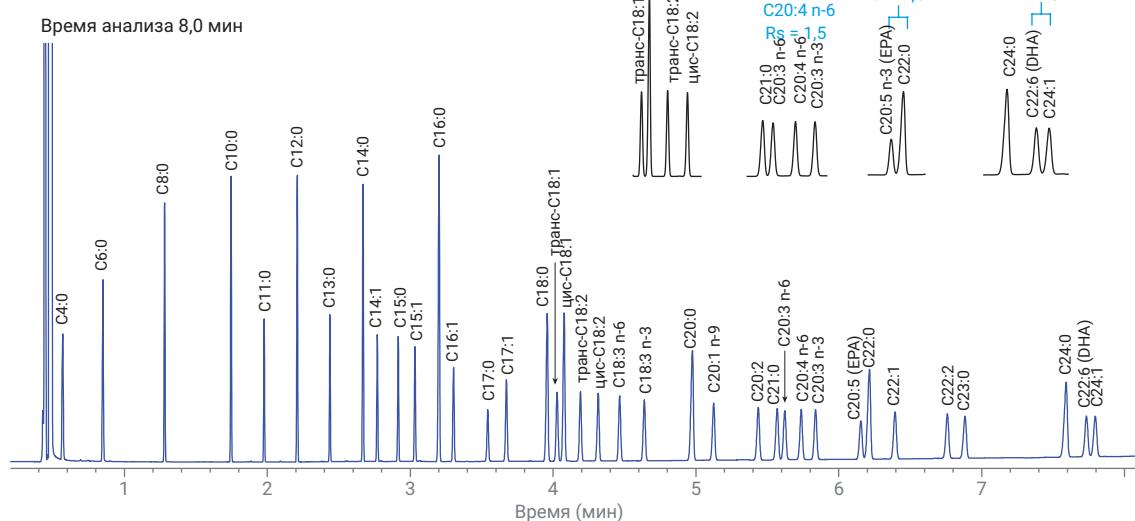


Рис. 3. ГХ-ПИД хроматограмма 37-компонентной стандартной смеси МЭЖК на колонке Agilent J&W DB-FastFAME 20 м × 0,18 мм × 0,20 мкм с использованием методики 3 (см. табл. 4).

В повседневной практике колонки с ПЭГ (колонки WAX) полезны для анализа МЭЖК классических пищевых масел и жиров, рыбных жиров морских рыб и мяса, включая определение масляной кислоты в молочном жире. Это связано с тем, что они разделяют изомеры МЭЖК в соответствии с длиной углеродной цепи и степенью ненасыщенности. Но в этом случае некоторые пики перекрываются, например, C20:3 н-6 и C21:1 не разделяются, также C22:6 и C24:1 элюируются совместно. Разделение цис- и транс-изомеров на традиционных колонках WAX не достигается.

Была предложена колонка для ГХ J&W DB-FATWAX Ultra Inert (UI) с улучшенными характеристиками. На рис. 4 показано разделение 37-компонентной стандартной смеси МЭЖК на колонке для ГХ DB-FATWAX Ultra Inert 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм. Было получено хорошее разделение, за исключением одной пары C18:1 цис- и C18:1 транс-изомеров; степень разрешения 0,56. Обычно эта пара соединений на других колонках WAX элюируется совместно, появляясь

как один пик. Другая пара цис-транс-изомеров, C18:2 цис и C18:2 транс, может быть разделена до уровня базовой линии на колонке для ГХ DB-FATWAX UI; это указывает, что колонки DB-FATWAX UI демонстрируют, в определенной степени, разделение цис- и транс-изомеров, при этом цис-изомер элюируется первым.

В группу имеющих важное значение для питания человека полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), имеющих множественные двойные связи, входят жирные кислоты омега-3 и омега-6, такие как C20:5н3 (EPA, эйкозапентаеновая кислота), C22:6 н3 (DHA, докозагексаеновая кислота) и C20:4 н6 (ARA, арахидоновая кислота). На рис. 4 показано хорошее разрешение для этих омега-3 и омега-6 МЭЖК. На рис. 5–7 приведены примеры разделений, полученных для смесей ПНЖК. Ключевые МЭЖК, включая EPA и DHA, могут быть легко обнаружены и определены количественно.

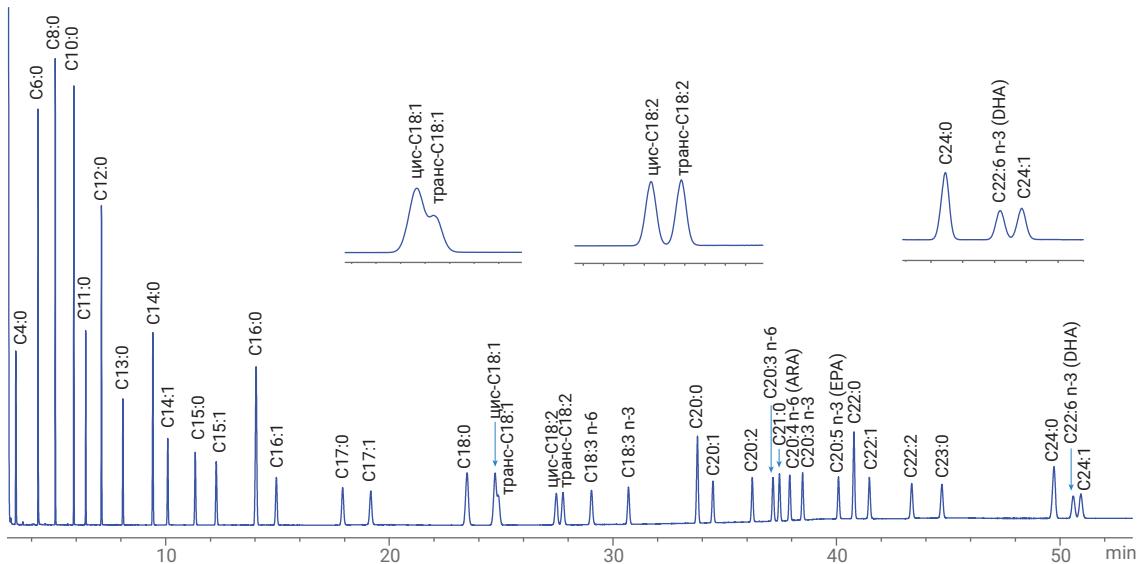


Рис. 4. ГХ-ПИД хроматограмма 37-компонентной стандартной смеси МЭЖК на колонке Agilent J&W DB-FATWAX 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм с использованием методики 4 (см. табл. 5).

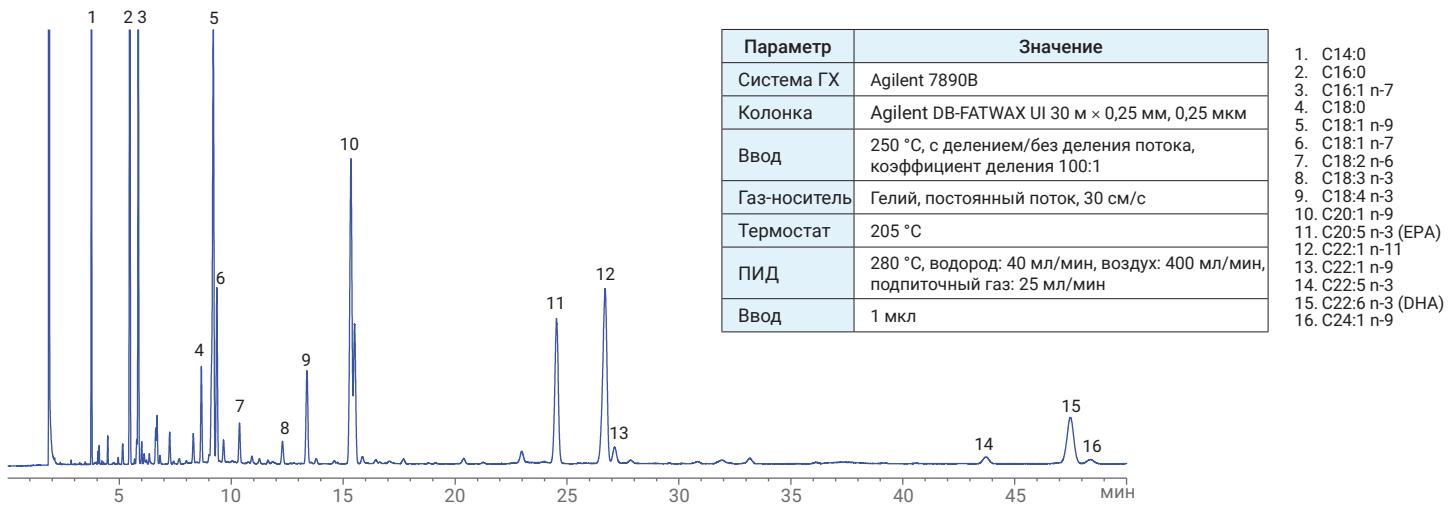


Рис. 5. ГХ-ПИД хроматограмма смеси ПНЖК №1 (морского происхождения) на колонке для ГХ Agilent J&W DB-FATWAX Ultra Inert 30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм.

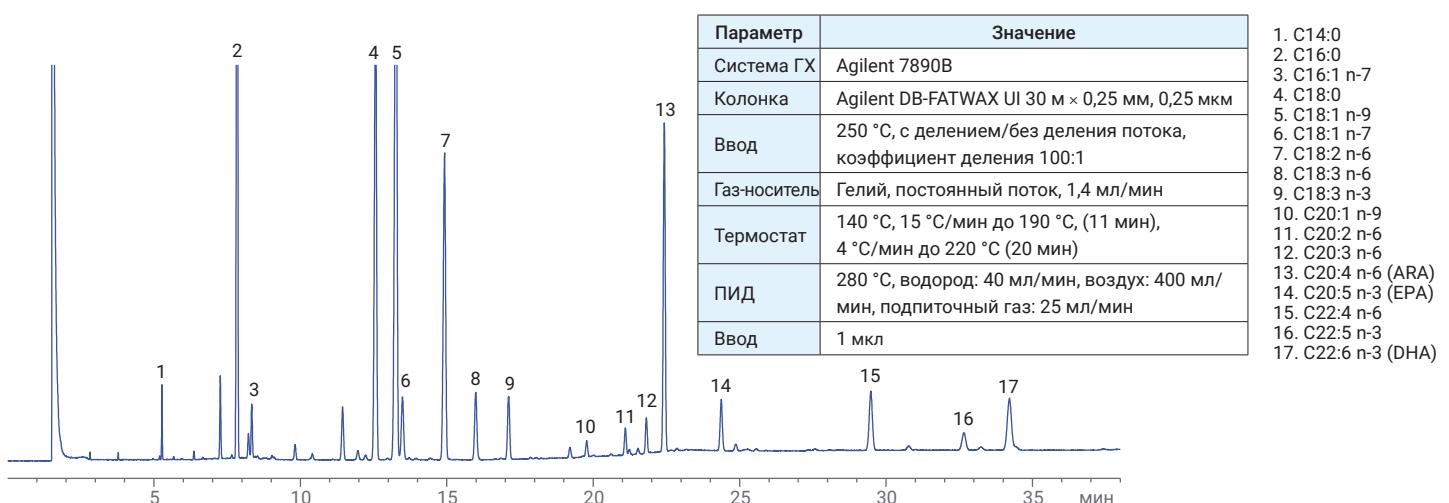


Рис. 6. ГХ-ПИД хроматограмма смеси ПНЖК №2 (животного происхождения) на колонке для ГХ Agilent J&W DB-FATWAX Ultra Inert 30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм.

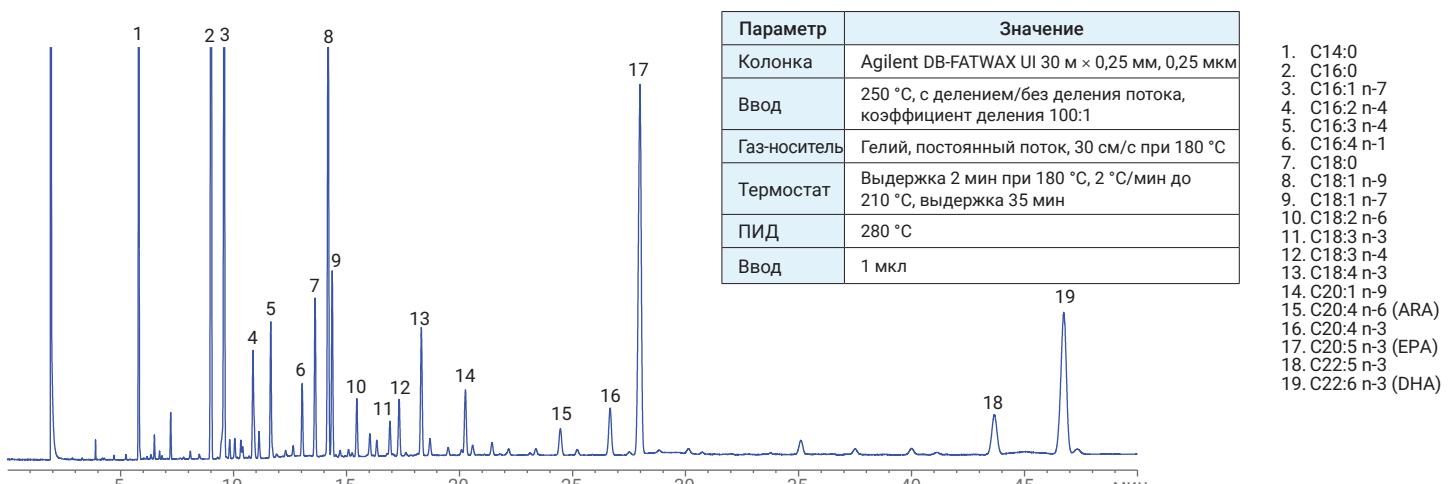


Рис. 7. ГХ-ПИД хроматограмма смеси ПНЖК №3 (из жира менгады) на колонке для ГХ Agilent J&W DB-FATWAX Ultra Inert 30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм.

Выводы

В данных Методических рекомендациях представлен усовершенствованный метод анализа 37-компонентной стандартной смеси МЭЖК на трех типах капиллярных колонок для ГХ предназначенных для анализа МЭЖК. Выбор колонки Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME с высокополярной цианополисилоксановой неподвижной фазой был предпочтительным для разделения цис- и транс-изомеров. В этой работе было продемонстрировано разделение до уровня базовой линии всех соединений в 37-компонентной стандартной смеси МЭЖК на CP-Sil 88 for FAME. Колонка для ГХ Agilent J&W DB-FastFAME также может обеспечить отличное разрешение при анализе 37-компонентной стандартной смеси МЭЖК. Высокоэффективная колонка для ГХ DB-FastFAME с внутренним диаметром 0,18 мм может полностью разделить все соединения в стандартном смеси и сократить время анализа до 8 минут. Это обеспечивает возможность высокого пробопотока при использовании высокоэффективных колонок без ущерба для разрешения. В то же время колонка DB-FATWAX Ultra Inert показывает уникальную селективность для большинства насыщенных и полиненасыщенных МЭЖК. За исключением цис-транс-изомеров C18:1, остальные МЭЖК, включая цис- и транс-изомеры C18:2, такие как ARA (арахидоновая кислота), EPA (эйкозапентаеновая кислота), и DHA (докозагексаеновая кислота) могут быть полностью разделены. Колонка идеально подходит для анализа рыбьего жира, жиров мяса, и ключевых омега-3 и омега-6 МЭЖК.

Литература

1. AOAC Official Methods of Analysis (**2000**), method Ce 2-66.
2. IUPAC, Standard methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives, Blackwell Scientific Publications, IUPAC Method 2.301.
3. F. David, P. Sandra, A. K. Vickers. Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5989-3760EN, **2005**.

www.agilent.com/chem

Информация в этом документе может быть изменена без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2017, 2018
Напечатано в США 29 мая 2018 г.
5991-8706RU

 **Agilent**
Trusted Answers