



用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统 UHPLC 进行完整甘油三酯的高分离度反 相高效液相色谱分析

应用报告

食品，石化

作者

迈克尔·伍德曼
安捷伦科技公司
2850 桑特维利路
威尔明顿, 特拉华州 19808
美国

摘要

使用配置紫外/可见光 (UV/VIS) 二极管阵列检测器 (DAD) 的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统在水反相梯度条件下, 分析大豆油中的甘油三酯。使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统在不同长度、1.8 μm 充填粒度、600bar (9000psi) 或 1200bar (18,000 psi) 压力下、内径为 3.0 mm 和 2.1 mm 的 C18 色谱柱上进行样品的色谱分离。本报告演示了异丙醇 (IPA) 或甲基叔丁基醚 (MTBE) 作为强溶剂和乙腈作为弱组分的混合流动相条件下, Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统能够采用高分离度长色谱柱。



Agilent Technologies

前言

对来自动物或植物的完整甘油三酯进行分析具有很强的实用价值，包括加深对甘油三酯化学组成的理解、评估燃料潜热、了解生物系统的脂代谢行为。高效液相色谱（HPLC）成功分析这些组分的基本条件包括：梯度洗脱及整体分离过程的低波长监测。甘油三酯发色团相对较少，这有利于使用蒸发光散射检测器（ELSD）或质谱仪，以便于实现分离的其他目的。

在此应用的开发过程中，我们对来自大豆、玉米、米糠、红花、葡萄籽、橄榄及棕榈油的植物油进行了分析。由于大豆油在美国广泛使用，且对生物燃料生产的意义不断增长，本应用的主要工作是最大限度地使大豆油甘油三酯的分离度符合标准要求。这些基本条件也适用于各种包括源自动物脂肪的样品。

完整甘油三酯通常水溶性非常低，因此常采用常规色谱法进行分离，该方法主要依靠极性功能团的差异分离样品，或非水分离模式的反相色谱法，它对于如链长或链不饱和度等碳性的微小差异有更好的选择性。

据珀金斯公布的资料[1]，在大豆油中发现的主要脂肪酸（甘油三酯的甘油骨干组成部分）是肉豆蔻（14:0）、棕榈（16:0）、油酸（18:1）、亚油酸（18:2）和亚麻酸（18:3），也存在许多其他小脂肪酸。因为脂肪酸都是随机构造为甘油三酯，所以脂肪酸亚结构的广泛转换是可能存在的。由于脂肪酸之间的主要差别是碳链长度和双键数，所以甘油三酯的多样性主要呈现非极性有机结构的特征。因此，反相色谱最适于此类应用。由于甘油三酯的水溶性极差，您可以选择一个与水含量相关的较高的有机起始点，或如本报告，选择一个完全无水的分离环境。

甘油三酯的典型结构如图 1 所示[2]。

在这个图中，从上到下，分别为棕榈酸（C16:0）、油酸（C18:1）、 α -亚麻酸（C18:3），显示了其链长和不饱和度。化学式为 $C_{55}H_{98}O_6$ 。

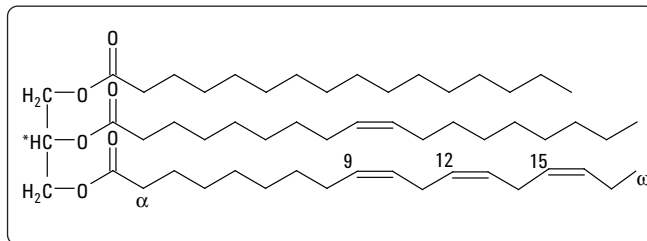


图 1. 典型的甘油三酯结构图

实验

样品制备

初始溶液的浓度为 10 mg/mL，异丙醇或甲醇/甲基叔丁基醚体积比为 2:1，随后根据需要稀释到更低浓度。LC/DAD 系统的进样量为 0.2-2 μ L。

LC 方法详细说明

液相色谱条件

Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统二元泵 G4220A,

Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统自动进样器 G4226A

配切换阀的安捷伦柱温箱 G1316C

配有 10mm 通径光纤流通池的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统二极管阵列紫外/可见检测器 G4212A

色谱柱: (具体使用见各自的色谱图)

Agilent ZORBAX SB-C18 RRHT, 3 mm $\times$ 150 mm, 1.8 μ m
600 bar, 部件号 829975-302

Agilent ZORBAX SB-C18 RRHD, 2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μ m
1200 bar, 部件号 858700-902

Agilent ZORBAX SB-C18 RRHD, 2.1 mm $\times$ 150 mm, 1.8 μ m
1200 bar, 部件号 859700-902

某些情况下，色谱柱要串联以增加长度和分离度

柱温: 20 $^{\circ}$ C 或 30 $^{\circ}$ C

流动相: A=乙腈

B=异丙醇(IPA)或甲基叔丁基醚(MTBE) (具体流动相见各自的色谱图)

流速: 具体流速见各自的色谱图

梯度: 基于与 IPA 相比，MTBE 的洗脱强度高，梯度条件为 20% 至 60% 的异丙醇或 10% 至 40% 的 MTBE。对于异丙醇梯度，梯度斜率一直维持在每柱容增加 2.6% 的有机相，MTBE 为 2.0%，相应地改变梯度时间和流速。这是使用安捷伦方法转化器计算而确定的[3]。

UV 条件:

监测 210 nm、220 nm 和 230nm，带宽 4nm，参考波长关闭

结果和讨论

以乙腈 IPA 梯度对甘油三酯的典型梯度分离如图 2 所示。

一些通用的解释适用于图 2 中所示的条件和色谱图。虽然最理想的弱洗脱液是价格略低的甲醇，而甲醇或者是含有甲醇的改性乙

醇的引入使甘油三酯的整体分离度显著降低。当从异丙醇到乙腈的梯度运行时，操作压力的大幅度增加明显受限，不可取。采用提高色谱柱的操作温度来降低溶剂粘度的方法已被证明是不可取的，因为色谱分离能力往往随着温度上升而衰减。

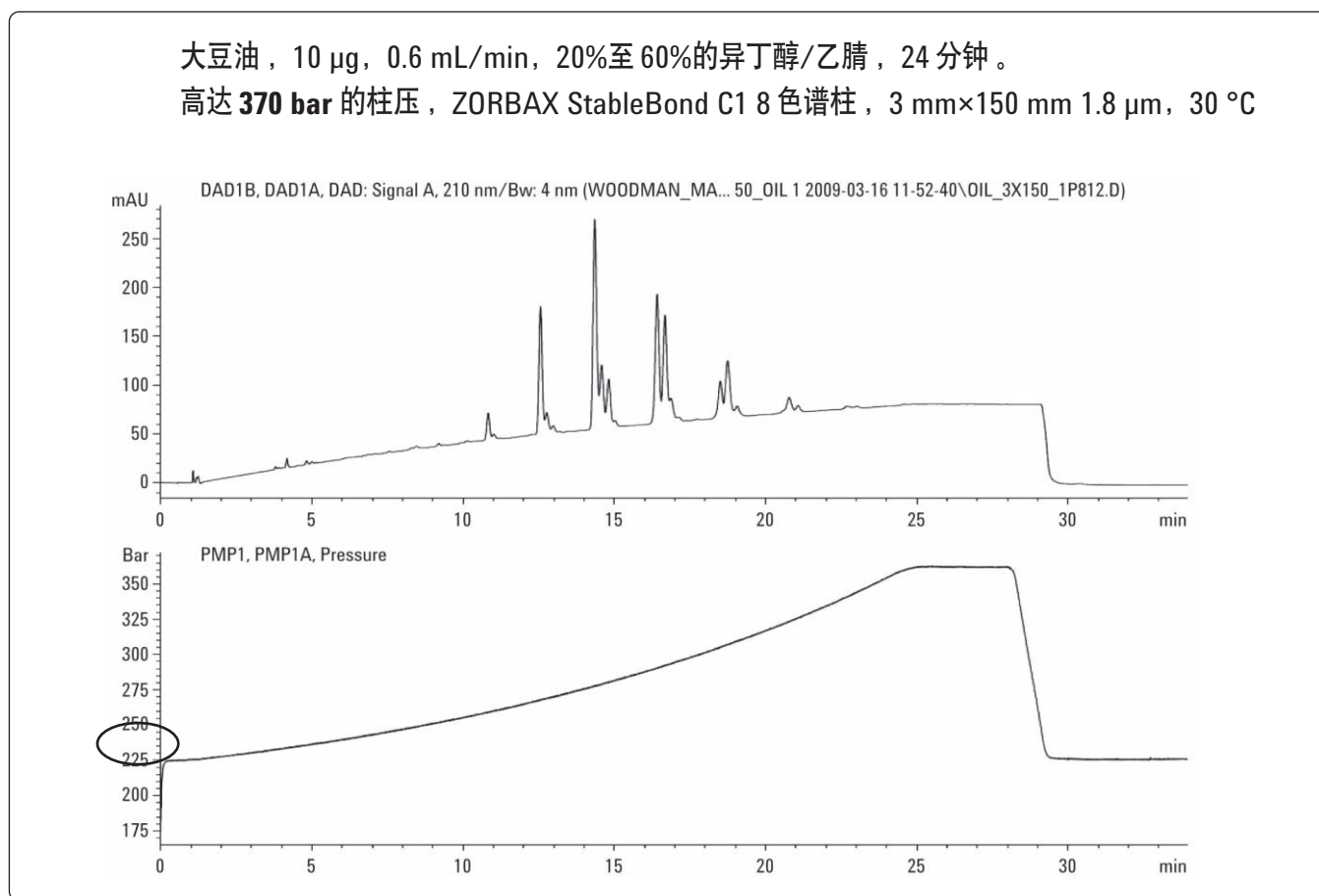


图2. 3 mm $\times$ 150 mm ZORBAX 快速分离高通量 (RRHT) 色谱柱，1.8 μm 柱上大豆油样品的 210-nm UV 色谱图，上图。系统压力跟踪显示梯度洗脱的总进程，下图。流速 0.6 mL/min，梯度时间 24 分钟。强溶剂，异丙醇。色谱图表明了此类分离所遇到的典型困难，即类似甘油三酯的小簇色谱峰。这些小簇并非碳原子数和饱和度相同的位置异构体，而是在质谱评估中链长和双键数不同的化合物的混合物

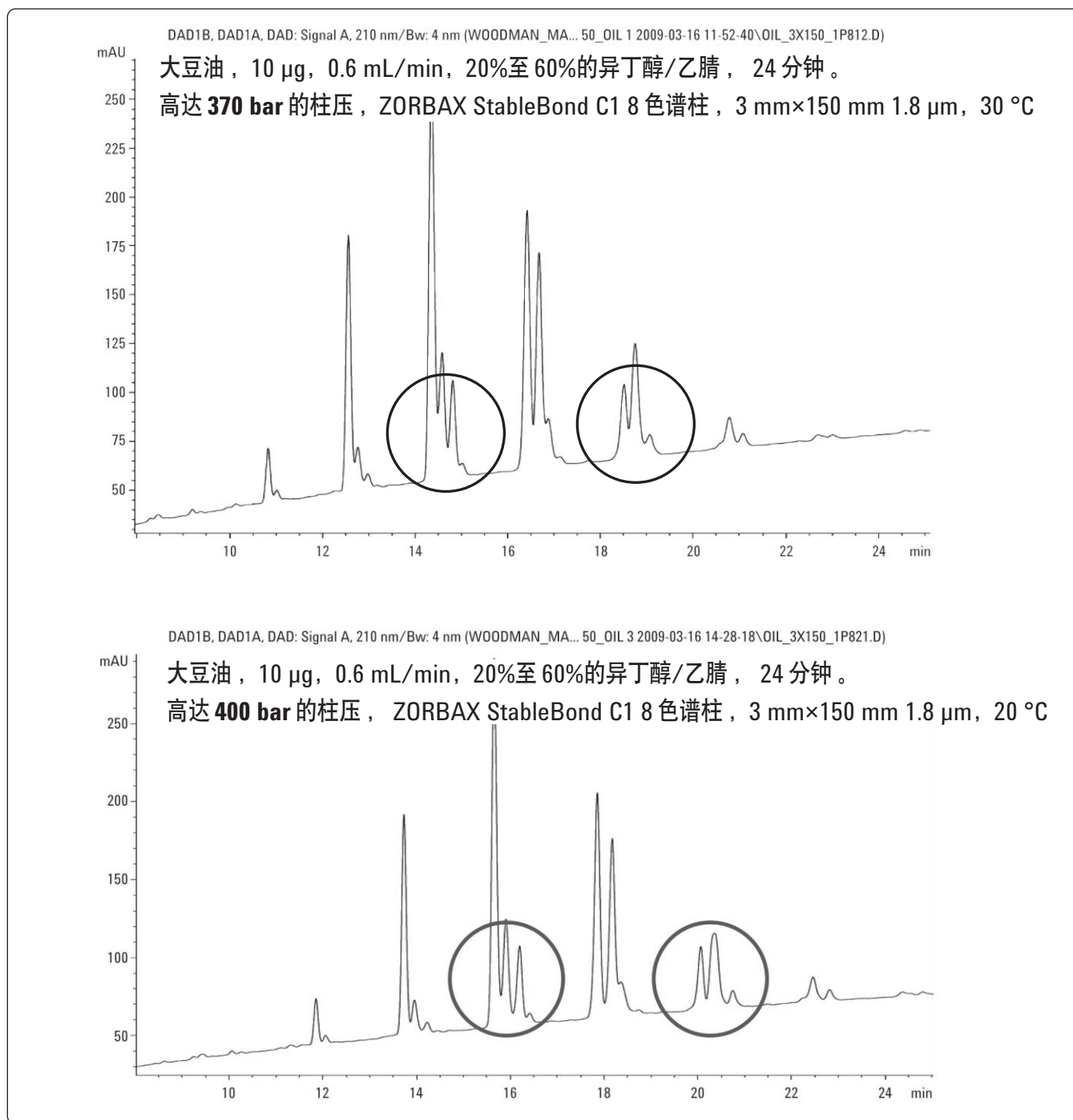


图3. 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 时图2 所示色谱图的扩展展示，上图，与图2 相同条件下操作柱温为 20 $^{\circ}\text{C}$ 时进行比较

从图3可见，分离操作温度为 20 $^{\circ}\text{C}$ ，而非 30 $^{\circ}\text{C}$ 时，分离效果得到改善。温度更低时，操作压力增加约 10%。由于需折衷考虑分离和操作压力，许多操作在 30 $^{\circ}\text{C}$ 进行；而借助操作压力更高的

Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统，使我们能将温度降至 20 $^{\circ}\text{C}$ ，并有效改善分离效果。

大豆油，10 μg ，0.29 mL/min，20%至 60%的异丁醇/乙腈，27 分钟。

高达 **760 bar** 的柱压，ZORBAX StableBond C18 色谱柱，2.1 mm $\times$ 250 mm 1.8 μm ，20 $^{\circ}\text{C}$

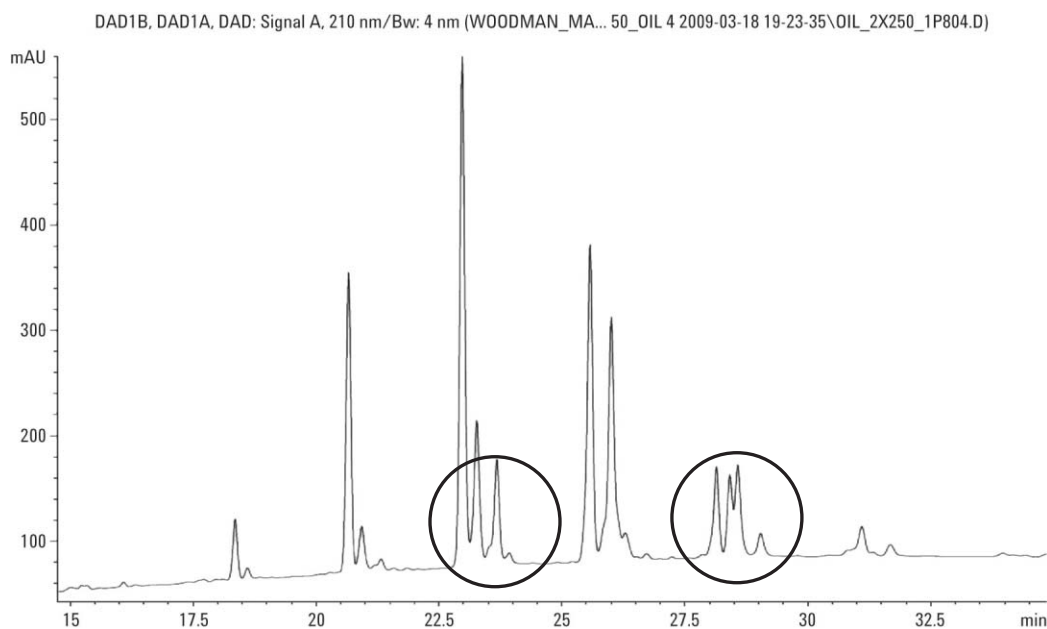


图 4. 大豆油样品的分析在 Agilent ZORBAX StableBond C18 色谱柱，2.1 mm $\times$ 250 mm，1.8 μm ，(150 mm 与 100 mm 连接)，在 1200bar 压力限值下操作。流速 0.29 mL/min，梯度时间 27 分钟。观测到的最大压力为 760bar

从图 4 可见，柱长增加使得一些观测组分的分离度显著增加。为了进一步提高分离度，需开发更长的色谱柱、寻找可替代流动相或色谱柱填充物质。与大多数高效分离一样，速度限制因素包括操作压力、操作温度和最高流速。迄今已评估过的甘油三酯分离方法在更高柱温或更高流速条件下，尚不被接受。这可能是由于

甘油三酯相对较高的分子量和柔性有机结构。即使非常小心地转换梯度斜率，以确保方法转化时，有机溶剂强度仍保持一致，但在更高的流速操作时，仍持续呈现整体分离能力的退化。由于异丙醇有很高的粘度和压力，应考虑其他易混溶于乙腈并易于低紫外检测的非极性溶剂，作为异丙醇的替代品。

大豆油，10 µg，0.29 mL/min，10%至 40%的异丁醇/乙腈，27 分钟。

高达 **440 bar** ZORBAX 的柱压，StableBond C18 色谱柱，2.1 mm×250 mm 1.8 µm，20 °C

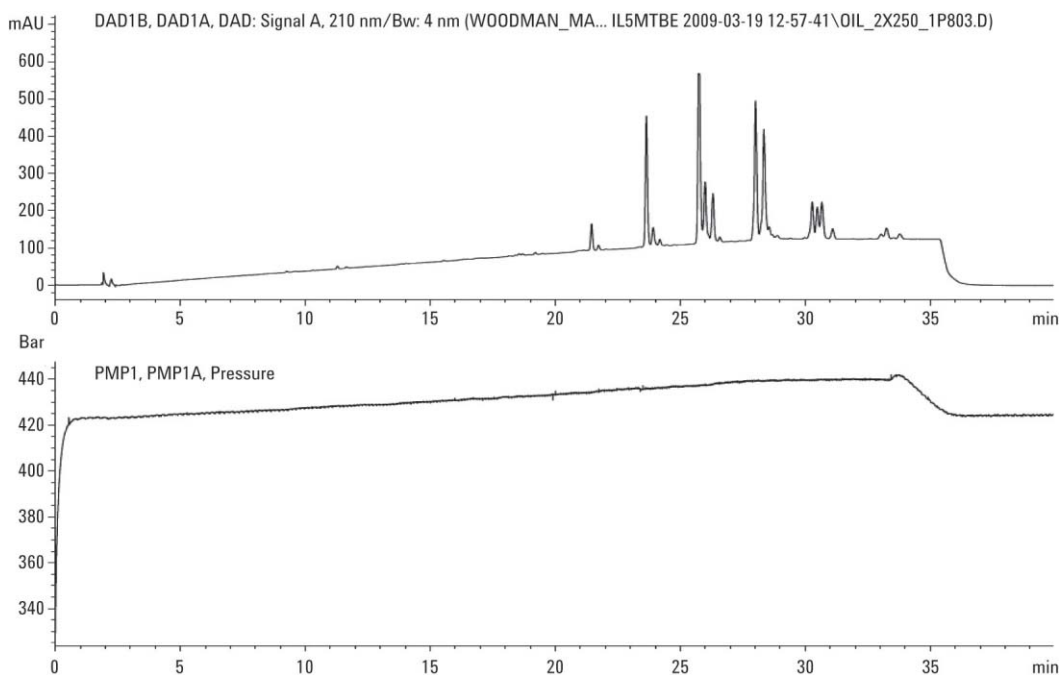


图 5. 用甲基叔丁基醚取代异丙醇，其它条件与图 4 相同，然后重新优化梯度以大幅提高甲基叔丁基醚的洗脱强度。采用一套新的操作条件，在整个梯度运行时只有一个微小的操作压力差异。流速：0.29 mL/min；梯度：27 分钟，10%至 40%的甲基叔丁基醚，观测到的最大压力 440 bar

在图 5 中，甲基叔丁基醚的更换和随后的梯度调整产生的分离，可以与原异丙醇的分离匹敌，但最大操作压力要低得多。之前的证据和评论认为温度或流速升高将造成分离退化，继续增加色谱柱的长度是利用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统新操作压力优

势最恰当的方法。Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统和相关的 ZORBAX 化学品的最大操作压力可达 1200 bar 或约 18,000 psi。为了确保系统的持久稳固运行，许多用户通常指定压力上限，其值略小于额定操作压力的 80%。

大豆油，30 μg ，0.29 mL/min，10%至40%的 MTBE/乙腈，43 分钟。
柱压高达 **730 bar**，ZORBAX StableBond C18 色谱柱，2.1 mm $\times$ 400 mm 1.8 μm ，20 $^{\circ}\text{C}$

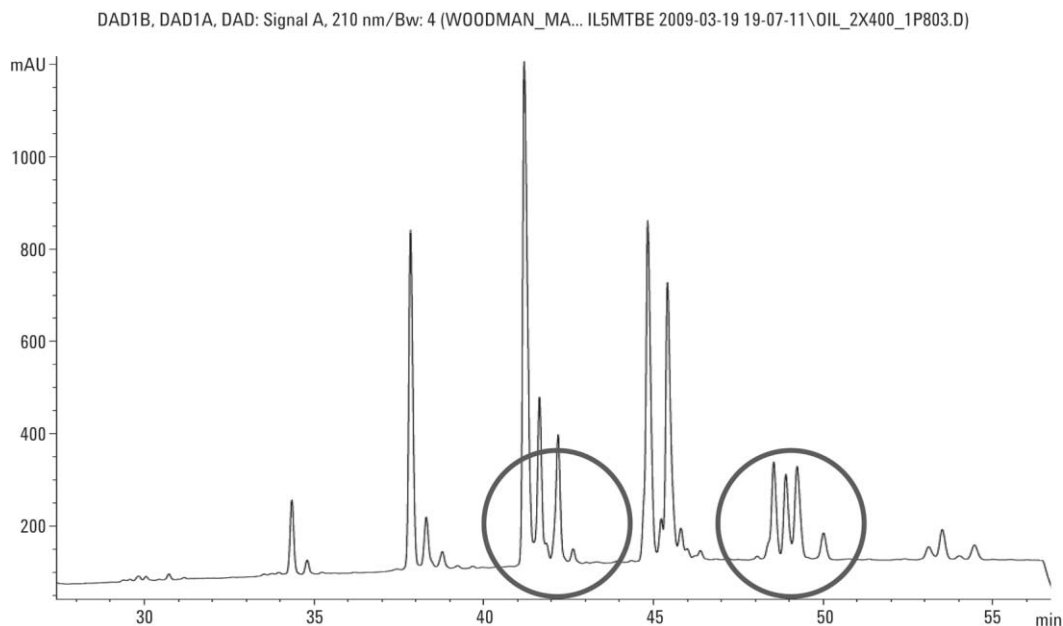


图 6. 大豆油样品的分离在 2.1 mm $\times$ 400 mm 的 ZORBAX StableBond C18, 1.8 μm 1200 bar 色谱柱 (150mm+ 150mm+100mm 串联)。流速 0.29mL/min，梯度时间 43 分钟，梯度为 10%至 40%的甲基叔丁基醚。在 20 $^{\circ}\text{C}$ 最大工作压力 730 bar

如图 6 所示，经过此前优化了柱温、操作流速和梯度斜率以达到分离能力和分析时间最佳的可能平衡，在研究多种可以作为弱溶剂和强溶剂的候选溶剂后，最后证明只有在理想条件下用 1.8 μm 粒度的长色谱柱组适合甘油三酯类的分离。操作压力仅为 730bar，约为 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统额定能力的 60%，这样就可以考虑更长的柱长或进一步降低操作温度，两者似乎都有希望提供混合物更高的分离能力。

甲基叔丁基醚或异丙醇的分离可以使用质谱仪作为检测器。在以前的研究（见 www.Agilent.com/chem. ASMS 2009 查找本主题的海报）中，我们已经能够证明其能迅速、准确地鉴别在本样品和其他样品中发现的甘油三酯成分。为了在无、非缓冲环境下实现最优电喷雾性能，可在 UV 检测器后增加一个甲醇和水混合物的甲酸铵电离缓冲器，以增强离子化程度，并确保分子态离子进入质谱仪。麦金太尔[4]也表明，流动相中甲酸铵的存在显著提高分子态离子形成并提高保留在质谱仪质量分析器部分的可能性。

结论

使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统，我们能够很容易地证明：在操作参数范围内，UHPLC 性能优异。通过使用亚环境温度的柱箱环境和亚 2 μ m 粒度的长色谱柱，分离度显著增强，将大大有助于我们对本样品和其他类似材料中的主要和次要成分的了解。这将显著增强液相色谱在研究种子油成分、甘油三酯的代谢作用和油脂领域的深入理解，在以上研究领域液相色谱分离与高分离度飞行时间质谱（LC/TOF）联用已引起极大的兴趣。

参考文献

1. E. G. Perkins, "Analyses of Fats, Oils, and Derivatives," AOCS Press, 1993
2. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Fat_triglyceride_shorthand_formula.PNG
3. (<http://www.chem.agilent.com/en-US/products/instruments/lc/pages/gp60931.aspx>)
4. D. McIntyre, "The Analysis of Triglycerides in Edible Oils by APCI LC/MS", May, 2000 Agilent Technologies publication 5968-0878E

欲了解更多信息

欲了解更多的产品和服务信息，请浏览网站
www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担任何责任。

本出版物中的信息、描述和规格如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司版权所有，2009 年
中国印刷
2009 年 7 月 24 日
5990 – 4292CHCN



Agilent Technologies