

자동 시료 제조 기법을 이용한 Fatty Acid Methyl Ester 분석 개선

응용 자료

식품 검사 및 농업

저자

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

개요

카놀라유 시료의 지방산 에스테르화에 대한 자동 분석법입니다. Agilent 7696A Sample Prep WorkBench를 사용하여 자동 피펫을 사용한 수동 분석법과 이 자동 시스템을 위해 개발한 분석법을 비교하는 단계별 비교를 수행했습니다. Agilent 7696A Sample Prep WorkBench를 사용해 시료 10개를 제조하여 산 촉매 및 염기 촉매 반응 모두에서 3% RSD를 얻었습니다. 자동화된 산 촉매 분석법을 수동 제조와 비교했을 때 RSD가 2배로 향상되었습니다. 뿐만 아니라, 지방산 제조 자동화로 시약 소모량을 최대 50배까지 줄였습니다. 전반적으로 자동 분석법은 보다 적은 양의 시약 사용에도 더 나은 정밀성 및 정확성을 가지며 사용자가 작업을 완료하는 데 필요한 시간을 단축합니다.



Agilent Technologies

서론

지방산(FA) 분석은 많은 산업에서 일반적으로 수행됩니다. 식품업계는 지질이 오일, 육류, 종자 및 기타 제품의 주요 성분이기 때문에 FA 분석을 일상적으로 수행합니다[1-5]. 또한, 식이 건강의 일부로 지방의 중요성이 높아지고, 건강한 기질 유지에 역할이 커짐에 따라, FA 조성 분석이 점차 일반화되고 있습니다[1-2]. FA 조성이 생체막에 영향을 미치므로 생체의학 응용에서는 FA 프로파일을 진단 도구로 사용합니다[3-4, 6-7]. 지방산은 또한, 많은 가정용품에서도 발견되며 그 중에서도 특히 화장품 및 계면활성제 산업에 사용됩니다[2,8].

가스 크로마토그래피는 1950년대부터 이러한 산업 전반에 걸친 FA 분석에 사용되는 주된 기법입니다[3-4,9]. 적절한 분석 조건으로 FA를 분리/분석할 수 있지만, FA의 극성 및 높은 비점으로 인해 여러 가지 문제가 발생합니다. 이는 일반적으로 긴 머무름 시간 및 나쁜 피크 모양의 원인이 됩니다. 이러한 이유로, 대부분의 분석법은 유도체화 반응으로 보다 쉬운 분리와 더 좋은 피크 모양을 나타내는 fatty acid methyl ester(FAME)로 FA를 변환합니다.

매질 또는 응용과 관계없이 다양한 방법으로 FA를 FAME로 변환할 수 있으며, 종종 두 단계의 비누화 과정 후 메틸화를 수반합니다. 특히, 식품 응용을 비롯한 많은 응용에서는 여전히 두 단계의 절차[1,2,5]를 사용하지만, 알코올 분해[4]로 알려진 과정으로 지질을 단일 단계 에스테르화할 수 있습니다. 여러 단계든, 단일 단계든 관계없이, FA를 FAME로 변환하는 과정은 다양한 방법으로 수행할 수 있으며, 응용 분야에 따라 다양한 유도체화 시약이 필요합니다[10]. 대부분의 반응은 산, 염기 또는 실릴화 시약 또는 diazomethane 을 사용으로 분류할 수 있으며 각각은 장단점이 있습니다.

산 촉매 반응에서 가장 일반적인 시약은 methanol의 boron trifluoride(BF_3), hydrochloric acid(HCl) 및 sulfuric acid(H_2SO_4)입니다. HCl 또는 H_2SO_4 를 사용한 절차의 완전한 메틸화를 위해, 유리 지방산, phosphoglyceride 또는 triglyceride와 같은 산 농도 및 시료에 따라 종종 최대 1시간 동안의 산 환류가 필요합니다[3-4,10]. 이 분석법은 매우

효과적이지만 비용이 많이 들 수 있고, 특정한 유리 기구와 교육이 필요합니다. BF_3 를 메틸화 시약으로 사용하면, 끓이면 2분 이내에 완료할 수 있으므로 가장 빠른 결과를 얻을 수 있습니다. 그러나, 불안정한 지방산은 변성될 수 있어, 실온에서는 보존 기간이 제한될 수 있습니다[3].

염기 촉매 반응은 sodium hydroxide(NaOH) 또는 methanol의 potassium hydroxide(KOH)을 사용합니다. 이 분석법은 여러 가지 이점이 있습니다. 그것은 빠르고 간단한 단일 단계 과정으로 실온 반응이며 불안정한 FA의 변성을 제거합니다. 그러나 염기 촉매 반응은 유리 지방산에는 반응하지 않으므로 그것의 적용이 제한될 수 있습니다 [3-4,10].

이 외에 사용할 수 있는 시약이 2개 더 있지만, 거의 사용하지 않습니다. Diazomethane은 빠른 유도체화 기법을 제공하지만, 관심 화합물을 방해하는 부산물을 생성할 수 있습니다[3,10]. 그것의 독성과 폭발 가능성으로 최근 몇 년간은 시약으로 거의 사용되지 않았습니다. 실릴화 시약은 또한, 적당한 온도에서 매우 빠르게 반응하지만 물에 민감하여 거의 사용하지 않습니다[10].

이러한 분석법의 자동화는 많은 면에서 이로울 수 있으며 최근에는 FA를 FAME로 변환하기 위한 보다 자동화된 마이크로 스케일 분석법이 등장했습니다[11-15]. 일반적으로, 자동 분석법은 보다 적은 양의 시약 사용, 유해 화학물질 사용자 노출 가능성 감소, 작업 시간 단축 및 몇 시간 동안 개입이 필요 없는 운용을 제공합니다. FAME 제조 자동화는 7696A Sample Prep WorkBench로 가능합니다(그림 1). 그것은 150개 바이알 트레이, 액체 분주 모듈 2개, 단일 바이알 가열 장치, 교반기 및 바코드 판독기를 특징으로 합니다. 또한, 개별 바이알 랙의 가열 또는 냉각을 지원합니다. 액체 분주 모듈은 표준 시린지 또는 대용량(250 μL 또는 500 μL) 시린지로 구성할 수 있습니다. 대부분 응용에서는 액체의 미세한 조작을 위해 한 모듈에는 표준 시린지(10 또는 25 μL)를 다른 모듈에는 더 많은 양의 분주를 위해 대용량 시린지를 사용합니다. 분주 모듈 2개와 교반기 및 가열 장치를 갖춘 Agilent 7696A Sample Prep WorkBench는 시료 희석, 내부 표준물질 추가, 유도체화, 액/액 추출을 비롯한 기타 여러 가지 작업을 수행할 수 있습니다.



그림 1. Agilent 7696A Sample Prep WorkBench

Agilent 7696A Sample Prep WorkBench를 사용하여, 카놀라유에서 FA를 추출 및 메틸화하는 두 가지 분석법을 시험하였습니다. 염기 및 산 촉매 반응 두 분석법 모두 20mL 시험관을 사용하는 기존에 발표된 수동 분석법을 적용했습니다[5]. RSD < 5%인 93~107%의 회수율을 얻었습니다. 또한, Agilent 7696A Sample Prep WorkBench에 적용하기 위한 수동 분석법의 수정으로 반응 시간은 2시간에서 20분으로 단축하고 시약과 용매 사용량은 최대 50배 감소했습니다.

실험

재료

Hexane(시약 등급), isooctane, methanol(HPLC 등급)은 Burdick and Jackson(Muskegon, Michigan)에서 구매했습니다. Methanol의 Boron trifluoride(BF₃, 14% w/v)는 Aldrich(St. Louis, MO)에서 구매했습니다. Methanol의 sodium hydroxide(NaOH, 시약 등급, Sigma Aldrich, St. Louis, MO)을 2N 용액으로 만들었습니다. Sodium chloride(인증된 ACS, Fisher Scientific, Atlanta, GA)은 Milipure 물 용액(H₂O/NaCl)의 1M 용액으로 만들었습니다. 일부 보고서에서는 포화 용액[2,16]의 사용을 권장하고 있지만, 이러한 농축액은 시스템에 침전되어 시린지 오류의 원인인 것으로 밝혀졌습니다.

개별 FA는 Alltech(Waukegan, IL)에서 구매했으며, caprylic acid, capric acid, lauric acid, myristic acid, palmitic acid, stearic acid, arachidic acid 및 behenic acid로 구성되어 있습니다. 개별 FA는 hexane 1mg/mL 용액을 만드는 데 사용했습니다. FAME 표준물질은 ChemService(West Chester, PA)에서 구매한 맞춤형 혼합물로서 1mg/mL의 methyl pentanoate, methyl hexanoate, methyl heptanoate, methyl octanoate, methyl decanoate, methyl laurate, methyl myristate, methyl palmitate, methyl stearate, methyl eicosanoate 및 methyl behenate로 구성되었습니다. Hexane의 lauric acid 1mg/mL 용액을 대체 표준물질로 사용했습니다. 내부 표준물질로는 Isooctane의 decane(99+% Sigma, St. Louis, MO), dodecane(99+% Aldrich, St. Louis, MO), tetradecane(99+% Fluka, St. Louis, MO) 및 hexadecane(99+% Aldrich, St. Louis, MO) 1mg/mL 용액을 사용했습니다. 카놀라유는 현지 슈퍼마켓에서 구매했습니다.

Agilent 7696A Sample Prep WorkBench에 두 가지 세척 용매를 사용했습니다: hexane 및 acetone(실험실 등급, Fisher Scientific, Atlanta, GA). Acetone은 사용한 모든 시약의 혼합 용매로 대부분의 세척 단계에서 사용하였습니다.

기기

Agilent 7696A Sample Prep WorkBench(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)로 검량 표준물질, 유리 FA 시료 및 카놀라유 시료를 제조 및 제조했습니다. 본 응용 자료는 액체 분주 모듈로 후면 모듈은 25μL 시린지로 전면 모듈은 대용량인 500μL 시린지로 구성하였습니다.

모든 분석은 분할 모드(10:1) 및 불꽃 이온화 검출기로 운용되는 분할/비분할 주입구를 갖춘 Agilent 7890A 가스 크로마토그래피(GC) 시스템(Agilent Technologies, Santa Clara CA)으로 수행하였습니다. 주입구는 300°C 및 3mL/분, 일정한 컬럼 유속을 유지했습니다. Agilent HP5-MS 컬럼(30m×0.25mm, 0.25μm, Agilent Technologies, Santa Clara)을 사용하였습니다. 100°C(5분 유지), 7°C/분으로 225°C(5분)까지의 온도 프로그램으로 FAME 표준물질을 분리했습니다. 카놀라유 시료도 동일한 온도 프로그램을 사용했지만, 모든 화합물의 베이스라인 분리는 달성되지 않았습니다. 검출기는 300°C를 유지하고, Multi-Technique ChemStation으로 데이터를 수집했습니다.

Agilent 7696A Sample Prep WorkBench를 위해 개발된 끌어 놓기(drag and drop) 분석법 편집기인 Easy SamplePrep으로 시료 제조 방법 프로그래밍을 수행했습니다. Easy SamplePrep은 사용자가 바이알을 화학적 리소스 또는 빈 바이알로 배정할 수 있는 리소스 관리자를 특징으로

합니다. 이러한 방법으로 사용자는 시료 제조에 필요한 모든 용매, 시약, 표준물질 및 빈 바이알을 입력하고 리소스 관리자는 프로그램 및 시퀀스 전반에서 바이알의 사용을 추적합니다(그림 2). 리소스 관리자에 구성된 리소스로 시료 제조 프로그램을 구축합니다. Easy SamplePrep 분석법 편집기는 사용자가 유사한 방식으로 프로토콜 또는 실험실 노트북에 단계를 추가할 수 있도록 지원하며, 사용 가능한 단계 및 리소스를 텍스트로 표시합니다(그림 3).

각 시료 제조 단계는 일련의 고급 파라미터를 사용하여 완전한 맞춤형 프로그램을 구성할 수 있습니다. 단계 추가에서는 고급 파라미터로 세척 부피, 추출 및 분주 속도, 니들 깊이와 같은 파라미터를 설정할 수 있습니다(그림 4). 혼합 단계에서는 속도 및 시간을 맞춤 구성할 수 있으며, 가열 단계는 시간 및 온도 설정 값을 사용자가 지정할 수 있습니다. 결과 단계인 플래그에서는 사용자가 보고 목적으로 완성한 시료를 포함한 바이알을 선택할 수 있도록 합니다.

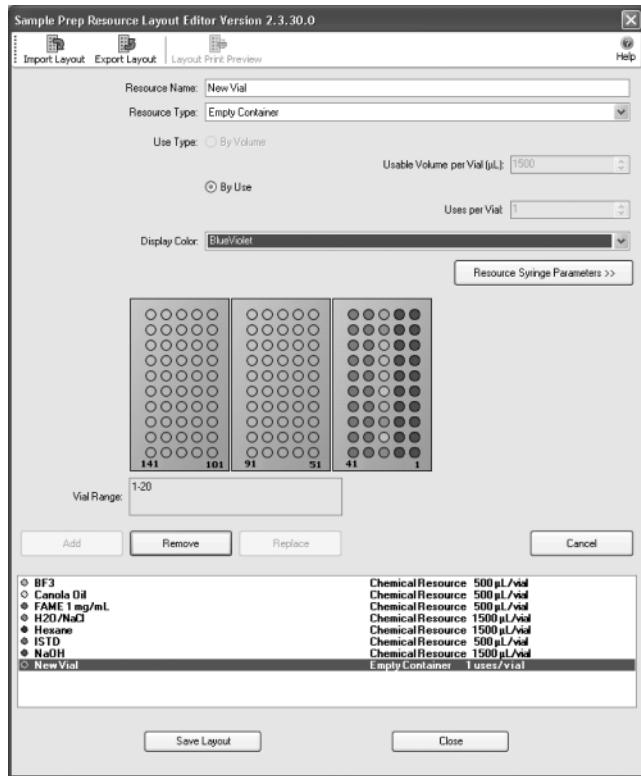


그림 2. 리소스 편집기로 사용자는 시료 제조 과정에서 사용할 화학적 리소스와 빈 바이알을 배정할 수 있습니다.

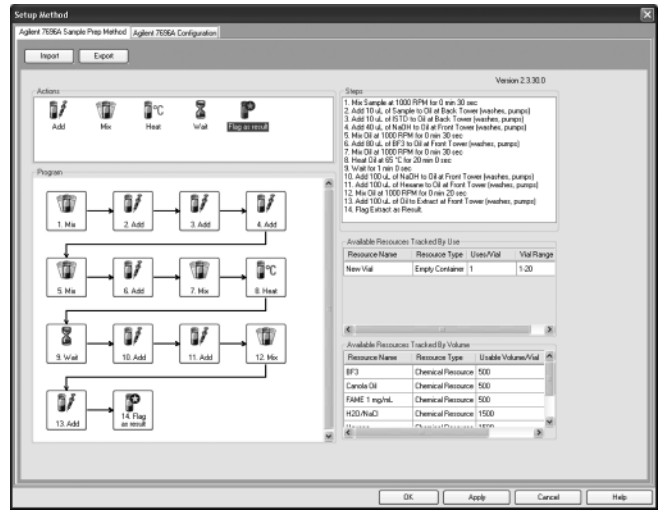


그림 3. SamplePrep 분석법 편집기는 간편한 단계별 프로그래밍을 위한 끌어 놓기 아이콘을 특징으로 합니다. 산 촉매 반응 단계는 그림과 같습니다.

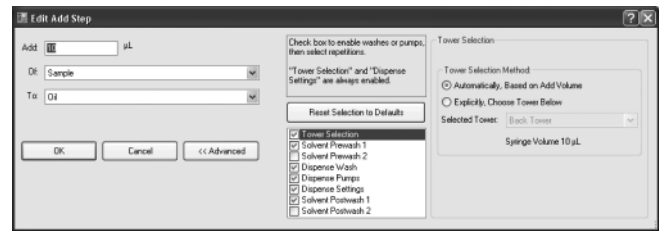


그림 4. 각 시료 제조 단계에는 여기에 표시한 추가 단계와 같은 사용자가 작동을 완전히 맞춤 구성할 수 있는 고급 파라미터가 있습니다.

검량선 생성

Agilent 7696A Sample Prep WorkBench 시료 제조 전, 기기에서 FAME 표준물질의 검량선을 생성했습니다. FAME 11종의 약 100µL, 1~500ppm범위의 8개 수준 검량선을 생성하였습니다.

시료 제조: 산 촉매 반응

원래 수동 분석법은 미국공인분석화학회 분석법에 따라, 20mL 테스트 튜브에 카놀라유 시료 50mg 로 시작하며 각각 80°C에서 60분간의 가열 단계 2개를 포함하였습니다 [5,17].

Agilent 7696A Sample Prep WorkBench는 2mL 자동 시료 주입기 바이알만 사용하므로 AOAC 분석법의 자동 분석법 변환 시 반응의 규모는 감소할 수 밖에 없었습니다. 수동 분석법은 약 50배 감소하며, 오일 시료와 유리 FA 시료 모두에 적용되었습니다.

처음에는 오일, 대체 표준물질(lauric acid) 및 내부 표준물질(alkane)을 별도의 단계로 추가했습니다. 그러나, 오일 분주에서는 허용 가능한 재현성을 얻기가 어려우므로, 오일 시료 0.4mL와 대체 표준물질 0.4mL 구성의 용액을 만들어 분석법의 재현성을 크게 개선했습니다.

빈 2mL 자동 시료 주입기 바이알의 마개를 닫고 시료(hexane 또는 오일/대체 표준물질 용액의 유리 FA 시료) 10µL와 내부 표준물질 10µL를 추가했습니다. 이 시료에 NaOH 40µL를 추가하고, 이 혼합물을 30초간 1,000rpm으로 vortex했습니다. 비누화 후, BF₃ 80µL를 추가하고 이 혼합물을 다시 30초간 1,000rpm으로 vortex했습니다. 그런 다음, 반응 촉진을 위해 혼합물을 20분간 65°C로 가열했습니다. 가열 후, 혼합물을 실온에서 2분간 두어 약간 식혔습니다. 식은 혼합물에 H₂O/NaCl 100µL와 hexane 100µL를 추가해, 새로 형성된 FAME를 유기물 층으로 추출했습니다. 시료를 마지막으로 20초간 1,000rpm으로 혼합하고 최상층(100µL)을 새롭고 빈, 마개를 닫은 2mL 자동 시료 주입기 바이알로 옮겨 분석을 위해 GC로 보냈습니다.

시료 제조: 염기 촉매 반응

산 촉매 반응과 같이, 염기 촉매 반응의 수동 제조는 20mL 시험관의 오일 시료 100mg로 시작하여 너무 큰 용량으로 2mL 자동 시료 주입기 바이알로 제조할 수 없었습니다[5]. Agilent 7696A Sample Prep WorkBench에서의 반응을 위해, 용량을 약 10배 줄였습니다.

염기 촉매 반응은 유리 지방산 변환이 없으므로, 대체 표준물질은 생략하였습니다. 분석법의 재현성 개선을 위해, 오일 0.4mL와 내부 표준물질 0.4mL 구성의 용액을 다시 사용했습니다. 빈 마개 닫은 2mL 자동 시료 주입기 바이알에 시료(오일/내부 표준물질 용액) 10µL를 추가했습니다. FA 메틸화 및 새로 형성된 FAME 추출을 위해, NaOH 100µL와 hexane 500µL를 추가하고 이 혼합물을 30초간 1,000rpm으로 vortex했습니다. 2분간 기다린 후, 최상층(100µL)을 새롭고 빈 마개 닫은 2mL 자동 시료 주입기 바이알로 옮겨 분석을 위해 GC로 보냈습니다. 산 촉매 반응과 달리, 염기 촉매 반응은 단일 단계로 발생하여 몇 분 내에 완료됩니다.

산 촉매 반응 밸리데이션

산 촉매 반응은 유리 지방산과 마찬가지로 지질 결합 지방산에서 잘 일어나므로, hexane의 유리 FA 시료에서 분석법을 수행했습니다. 매일의 재현성은 물론, 시료 간 반복성 측정을 위해 시료 5개를 3일에 걸쳐 제조했습니다.

수동 반응을 수행에도 동일한 절차를 따랐습니다. 비교를 위해, 조절 가능한 피펫으로 부피를 늘리고, 가열 블록에서 반응을 일으켰습니다. 수동 및 자동 제조의 정확한 비교를 위해, 수동과 자동 절차를 함께 수행했습니다.

결과 및 토의

검량

Agilent 7696A Sample Prep WorkBench로 제조한 표준물질 8개는 뛰어난 직선성을 보입니다. 검량 데이터는 표 1과 같습니다. 표준물질은 포화 FAME를 선별하여 만들어, 오일 및 FA 표준물질 시료에서 식별 및 정량된 유일한 화합물이었습니다.

표 1. Agilent 7696A Sample Prep WorkBench로 제조한 FAME 표준물질의 기기 검량 데이터

분석물질 R2 선형 회귀

Methyl pentanoate	0.9997	$y = 1.33x + 4.1175$
Methyl hexanoate	0.9998	$y = 1.4876x + 8.9684$
Methyl heptanoate	0.9998	$y = 1.5671x + 7.7412$
Methyl octanoate	0.9998	$y = 1.6669x + 8.2446$
Methyl decanoate	0.9998	$y = 1.7825x + 9.0499$
Methyl laurate	0.9998	$y = 1.8786x + 9.7365$
Methyl myristate	0.9998	$y = 1.9727x + 10.264$
Methyl palmitate	0.9998	$y = 1.9623x + 10.369$
Methyl stearate	0.9998	$y = 1.9828x + 10.64$
Methyl eicosanoate	0.9998	$y = 2.0155x + 10.826$
Methyl behenate	0.9998	$y = 2.087x + 11.266$

분석법 밸리데이션

오일 시료 시험 전, Agilent 7696A Sample Prep WorkBench의 사용 검증을 위해 상기에 설명한 자동 및 수동 분석법으로 유리 FA 시료를 제조했습니다.

자동 분석법의 경우, 임의의 날 제조한 5개 시료의 평균 RSD는 < 2%였습니다. Agilent 7696A Sample Prep WorkBench로 3일 동안 제조한 시료 5개를 비교했을 때, methyl octanoate 보다 머무름 시간이 긴 모든 화합물의 재현성은 마찬가지로 우수했습니다. 평균, 표준 편차,

상대 표준 편차 및 회수율은 표 2와 같습니다. Methyl octanoate는 휘발성과 용매 피크 근접성으로, 다른 분석물 질보다 현저히 낮았습니다[3,4]. 이 데이터는 삼중 주입으로 3일 동안 제조한 시료 15개로 구성됩니다.

표 2. 농도 및 회수율 측정을 위해 외부 표준물질을 사용한 유리 지방산 시료 산 촉매 반응 결과

분석물질	양 (ppm)	표준 편차 (ppm)	상대 표준 편차 (%)	회수율 (%)
Decane	81.8	0.968	1.18	97.3
Dodecane	84.6	0.517	0.611	102.4
Tetradecane	88.0	0.869	0.967	105.7
Hexadecane	92.2	1.02	1.11	111.4
Methyl octanoate	63.5	0.570	0.898	75.1
Methyl decanoate	101.2	0.175	0.173	97.5
Methyl laurate	110.1	0.681	0.619	104.8
Methyl myristate	97.0	0.713	0.735	102.6
Methyl palmitate	115.2	0.688	0.597	106.6
Methyl stearate	98.0	0.266	0.271	106.9
Methyl eicosanoate	80.6	0.394	0.489	104.0
Methyl behenate	90.0	1.12	1.25	99.9

그런 다음, 자동 분석법의 결과를 수동 분석법의 결과와 비교했습니다. 시험한 3일 모두의 수동 분석법 재현성은 훨씬 더 나빴습니다. 수동 데이터를 자동 데이터와 동일한 방식으로 처리한 평균, 표준 편차, 상대 표준 편차 및 회수율은 표 3과 같습니다. 수동 제조 시료의 회수율은 자동 제조 시료보다 일반적으로 더 높습니다.

표 3. 농도 및 회수율 측정을 위해 외부 표준물질을 이용한 산 촉매 제조 및 유리 지방산 시료 수동 제조 결과

분석물질	양 (ppm)	표준 편차 (ppm)	상대 표준 편차 (%)	회수율 (%)
Decane	88.2	13.2	14.9	104.9
Dodecane	98.1	7.92	8.08	118.8
Tetradecane	104.2	6.81	6.53	125.0
Hexadecane	109.8	6.66	6.06	132.8
Methyl octanoate	94.6	14.1	14.9	111.9
Methyl decanoate	126.4	13.8	10.9	121.8
Methyl laurate	130.0	12.1	9.33	123.8
Methyl myristate	113.1	10.0	8.84	119.6
Methyl palmitate	134.4	12.0	8.93	124.3
Methyl stearate	114.0	9.89	8.67	124.3
Methyl eicosanoate	93.6	8.41	8.98	120.8
Methyl behenate	104.7	9.83	9.39	116.3

표준물질을 더 많이 추가하거나 hexane을 더 적게 추가하므로 후자일 가능성이 높습니다.

표 2 및 3의 결과는 외부 검량으로 측정하는 반면, 데이터는 내부 표준물질로 검사했습니다. 피크 면적은 절대 피크 면적보다 전반적으로 더 우수한 결과를 생성한 methyl laurate로 표준화하였습니다. 여기서 내부 표준물질로 사용한 methyl laurate로의 표준화로 희석에 영향을 받지 않는 결과를 얻었습니다. 이렇게 함으로써, RSD는 일반적으로 향상되었습니다. 표준화된 피크 면적을 사용하여, 3일 동안 수동 및 자동 분석법으로 제조한 시료의 상대 표준 편차는 표 4에 나와 있습니다. 수동 및 자동 결과의 비교로, 자동 분석법이 지방산 유도체화를 위한 최적의 솔루션이며 재현성과 회수율을 개선할 수 있는 것을 분명히 알 수 있습니다.

표 4. 수동 및 자동 산 촉매 반응으로 제조해 Methyl Laurate로 표준화한 유리 지방산 시료 결과

분석물질	상대 표준 편차-자동 (%)	상대 표준 편차-수동 (%)
Methyl octanoate	1.31	7.65
Methyl decanoate	0.452	2.63
Methyl laurate	-	-
Methyl myristate	0.425	1.05
Methyl palmitate	0.779	1.80
Methyl stearate	1.10	1.93
Methyl eicosanoate	1.59	1.72
Methyl behenate	2.62	1.77

카놀라유 분석

유리 FA 시료로 자동 분석법 검증 후, Agilent 7696A Sample Prep WorkBench로 오일 시료를 제조했습니다. 앞서 언급한 대로, 카놀라유 분주는 그것의 높은 점도로 처음 생각한 것보다 더 어려운 것으로 밝혀졌습니다. 그러나, 오일 시료와 대체 표준물질의 혼합으로 용액의 점도가 hexane의 점도에 훨씬 더 가까워지므로 재현성있는 분주가 더 쉬워졌습니다. 그 결과는 표 5와 같으며 대표적인 크로마토그램은 그림 5입니다.

오일 시료 11개를 2일 동안 제조했습니다. 매일 오일 및 lauric acid의 신선한 용액을 만들어, 11개 시료의 평균 RSD는 결정할 수 없습니다. 그러나, 여전히 우수한 재현성은 확인되었습니다. 첫째 날 제조한 시료 6개의 평균 RSD는 3.6%였습니다. 둘째 날 제조한 시료 5개의 평균 RSD는 그보다 조금 더 낮은 2.5%였습니다. 내부 표준물질인 methyl laurate을 사용한 FAME 표준화로, 표 5와 같이 시료 11개의 평균 RSD는 감소하였습니다. 이러한 시료의 평균 회수율은 101%였습니다.

표 5. Agilent 7696A Sample Prep WorkBench와 산 촉매 반응을 사용해 제조한 카놀라유 시료의 외부 표준물질(ES) 및 내부 표준물질(IS) 사용 결과

분석물질	양 (ppm)	표준 편차 (%)	상대 표준 편차-ES (%)	상대 표준 편차-IS (%)	회수율 (%)
Methyl laurate	51.0	1.91	3.74	-	97.1
Methyl palmitate	1499.6	57.8	3.85	0.778	-
Methyl stearate	306.8	12.9	4.20	0.928	-
Methyl eicosanoate	226.8	9.44	4.16	1.10	-
Methyl behenate	111.6	4.73	4.24	0.861	-

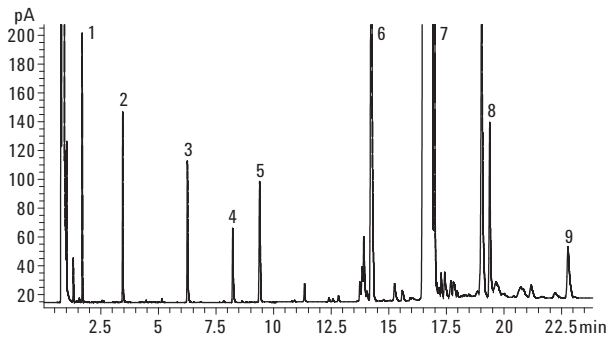


그림 5. 자동 산 촉매 시료 제조 및 GC 분석 후, 카놀라유 시료의 일반적인 크로마토그램. 식별 및 정량 화합물은 1) decane, 2) dodecane, 3) tetradecane, 4) methyl laurate, 5) hexadecane, 6) methyl palmitate, 7) methyl stearate, 8) methyl eicosanoate, 9) methyl behenate였습니다. 그 밖에 식별 및 정량이 불가능한 피크는 다양한 불포화 FAME입니다.

염기 촉매 반응 또한, 뛰어난 결과를 보였습니다. 하루 동안 총 10개의 시료를 제조하여, 유사한 재현성을 산출하였습니다 (표 6). 시료 10개의 평균 RSD는 3.2%였습니다. 내부 표준 물질인 Hexadecane을 사용한 피크 면적 표준화는, 산 촉매 반응과 같이 RSD가 충분히 낮지 않았습니다. 평균 회수율은 94%였습니다.

표 6. Agilent 7696A Sample Prep WorkBench와 염기 촉매 반응을 사용해 제조한 카놀라유 시료의 외부 표준물질(ES) 및 내부 표준물질(IS) 사용 결과

분석물질	양 (ppm)	표준 편차 (%)	상대 표준 편차-ES (%)	상대 표준 편차-IS (%)	회수율 (%)
Hexadecane	9.66	0.215	2.23	-	99.2
Methyl palmitate	312.5	13.01	4.16	2.69	-
Methyl stearate	49.95	3.39	6.80	4.89	-
Methyl eicosanoate	40.98	1.66	4.04	2.15	-
Methyl behenate	18.07	0.945	5.23	2.83	-

자동 시료 제조의 이점

시료 제조 절차를 자동화할 경우, 여러 면에서 유리하다는 것이 입증되었습니다. 이 분석법을 자동 분석법에 적용함으로써 반응의 규모를 줄였습니다. 이렇게 함으로써, 사용한 용매 및 시약의 양뿐 아니라 화학적 노출도 감소했습니다. 이로 인해 분석법의 안전성이 높아지고, 분석 비용을 절감합니다.

더 중요한 것은, 이 분석법의 자동화로 더 나은 회수율 및 재현성을 나타낸 것입니다. 이 분석법의 자동화로 수동 분석법 대비 재현성이 최소 2배 이상 향상되었습니다.

결론

본 응용 자료에서는 지방산을 fatty acid methyl ester로 유도체화하는 두 가지 자동 분석법을 설명했습니다. Agilent 7696A Sample Prep WorkBench를 사용하여 유도체화 반응을 높은 재현성을 가진 자동 분석법으로 손쉽게 변환합니다. 뿐만 아니라, 용매와 시약의 더 적은 사용으로 분석 당 비용을 크게 절감하였습니다. 지방산 표준 물질 및 카놀라유 시료 모두에서 대부분의 화합물에 대해 뛰어난 재현성과 회수율을 얻었습니다. 이러한 결과는 분석법을 Agilent 7696A Sample Prep WorkBench에 쉽게 적용할 수 있으며 많은 이점을 얻을 수 있다는 것을 의미합니다.

참고 문헌

- 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.

자세한 정보

애질런트 제품 및 서비스에 대한 자세한 정보는 애질런트 웹사이트(www.agilent.com/chem)를 방문하십시오.

www.agilent.com/chem

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2011
2011년 4월 21일, 한국에서 인쇄
5990-6873KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies