Усовершенствование анализа метиловых эфиров жирных кислот с использованием автоматизированных методов подготовки проб

Методическая информация

Анализ пищевых продуктов и продукции сельского хозяйства

Автор

Ребекка Веененман (Rebecca Veeneman)
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
США

Резюме

В документе представлен автоматический метод этирификации жирных кислот в пробах канолового масла. С помощью системы Agilent 7696A Sample Prep WorkBench проводилось параллельное сравнение ручного метода с использованием автоматического пипеточного дозатора и метода, разработанного специально для данной автоматической системы. При использовании системы Agilent 7696A Sample Prep WorkBench подготовка 10 проб обеспечила значение ОСО 3% как для реакций, катализируемых кислотой, так и для реакций, катализируемых основаниями. В случае кислотного катализа, при сравнении автоматизированного метода и ручного метода значение ОСО улучшилось вдвое. Кроме того, автоматизация процесса подготовки жирных кислот позволила снизить количество используемых реагентов до 50 раз. В результате автоматизированный метод обеспечил наилучшую точность при использовании меньшего количества реагентов и уменьшении времени, требуемого от оператора на выполнение задачи.

Agilent Technologies

Введение

Анализ жирных кислот (ЖК) часто выполняется во многих отраслях промышленности. Рутинный анализ ЖК обычно проводится в пищевой промышленности, так как жиры являются основным компонентом масел, мяса, круп и других продуктов [1–5]. Кроме того, с повышением значимости жиров как части здоровой диеты и их роли в сохранении здоровья определение состава ЖК становится все более распространенным [1–2]. Биомедицинские методики используют ЖК-профили в качестве диагностического инструмента, так как состав ЖК оказывает влияние на биологические мембраны [3–4, 6–7]. Помимо всего прочего, жирные кислоты встречаются во многих товарах для дома и используются в промышленных масштабах при производстве косметики и ПАВ [2, 8].

С 1950-х преобладающей методикой анализа ЖК в этих отраслях является газовая хроматография [3–4, 9]. И хотя ЖК могут быть выделены и проанализированы в соответствующих условиях, их анализ связан с некоторыми трудностями из-за их полярности и высокой температуры кипения. Это обычно приводит к продолжительному времени удерживания и неприемлемой форме пиков. По этой причине в большинстве методов используются реакции получения производных, позволяющие преобразовать жирные кислоты в метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК), которые проще разделять, что обеспечивает лучшую форму пиков.

Преобразование жирных кислот в МЭЖК, независимо от матрицы и области применения, может быть достигнуто несколькими способами, которые обычно включают двухступенчатый процесс: омыление с последующим метилированием. Жидкости могут быть этерифицированы за один этап посредством процесса, известного как алкоголиз [4], хотя во многих областях применения, особенно при производстве пищевых продуктов, до сих пор используется двухступенчатый процесс [1, 2, 5]. Независимо от того, осуществляется ли преобразование жидких кислот в МЭЖК в один или несколько этапов, подобная реакция может происходить различными способами и, в зависимости от области применения, могут потребоваться различные реагенты для дериватизации [10]. В большинстве реакций используются кислоты, основания, силилирующие реагенты или диазометан. Каждый из реагентов имеет свои преимущества и недостатки.

При осуществлении реакций, катализируемых кислотой, наиболее часто используемыми реагентами являются трифторид бора (BF_3) в метаноле, соляная кислота (HCl) и серная кислота (H_2SO_4). Для достижения полного метилирования в методиках с использованием HCl или H_2SO_4 часто требуется нагревание реакционной смеси с обратным холодильником в течение до одного часа, в зависимости от концентрации кислоты и пробы, например, свободных жирных кислот, фосфоглицеридов или триглицеридов [3–4, 10].

Этот метод очень эффективен, но может быть дорогостоящим, а также требует наличия особой лабораторной посуды и квалификации оператора. Использование в качестве метилирующего агента BF_3 дает наиболее быстрые результаты, так как реакция завершается в течение двух минут во время кипения. Однако при этом возможно разложение нестабильных жирных кислот, а также продукты имеют ограниченный срок хранения при комнатной температуре [3].

В катализируемых основаниями реакциях используется гидроксид натрия (NaOH) или гидроксид калия (KOH) в метаноле. Этот способ имеет множество преимуществ. Он является быстрым, простым одноступенчатым процессом, протекающим при комнатной температуре, и позволяет избежать разложения нестабильных ЖК. Однако катализируемые основаниями реакции не подходят для свободных жирных кислот, и поэтому их применение ограничено [3–4, 10].

Можно также использовать два других реагента, хотя это делается очень редко. Диазометан позволяет обеспечить быстрое получение производных, но при его использовании выделяются побочные продукты, которые взаимодействуют с исследуемыми соединениями [3, 10]. В последние годы он редко используется из-за своей токсичности и взрывоопасности. Силилирующие реагенты также редко используются, так как они чувствительны к воздействию воды, хотя реакция происходит довольно быстро при умеренных температурах [10].

Автоматизация этих методов может быть целесообразной по многим причинам, и в последнее время многие автоматизированные и микромасштабные методы включают преобразование ЖК в МЭЖК [11–15]. В общем случае в автоматизированных методах используется меньшее количество реагентов, снижается воздействие потенциально опасных химических соединений на оператора, а также сокращается время выполнения задачи и обеспечивается работа без участия оператора в течение многих часов. Автоматизация получения МЭЖК возможна при использовании Agilent 7696A Sample Prep WorkBench (Рис. 1). Он имеет лоток емкостью 150 флаконов, два модуля дозирования жидкостей, нагреватель для каждого флакона, миксер и устройство считывания штрихкодов. Кроме того, имеется возможность нагревания или охлаждения отдельных штативов с флаконами. Модули дозирования жидкостей могут использоваться со стандартным шприцем или шприцем большого объема (250 или 500 мкл). В большинстве методик в одном модуле для точных манипуляций с жидкостями используется стандартный шприц (10 или 25 мкл), а в другом модуле для дозирования больших объемом используется большой шприц. Имея два модуля дозирования, миксер и нагреватель, Agilent 7696A Sample Prep WorkBench подходит для разведения проб, добавления внутренних стандартов, получения производных, жидкость-жидкостной экстракции и многих других задач.



Рис. 1. Agilent 7696A Sample Prep WorkBench.

Было проведено исследование двух методов получения и метилирования ЖК в каноловом масле с использованием Agilent 7696A Sample Prep WorkBench: реакция, катализируемая основанием, и реакция, катализируемая кислотой. Оба метода были построены на ранее опубликованных результатах ручного метода с использованием пробирок объемом 20 мл [5]. Степень извлечения продуктов составила от 93 до 107% с ОСО < 5%. Кроме того, при изменении ручного метода пробоподготовки на Agilent 7696A Sample Prep WorkBench время реакции сократилось с 2 часов до 20 минут при 50-кратном уменьшении количества используемых реагентов и растворителей.

Экспериментальная часть

Материалы

Гексан (ч. д. а.), изооктан и метанол (для ВЭЖХ) были приобретены в Burdick and Jackson (Muskegon, MI). Трифторид бора (BF_3) в метаноле (объемно-весовая концентрация 14%) был получен от Aldrich (St. Louis, MO). Раствор гидроксида натрия (ч. д. а., Sigma Aldrich, St. Louis, MO) в метаноле (NaOH) был приготовлен с концентрацией 2 н. Хлорид натрия (сертифицированный ACS, Fisher Scientific, Atlanta, GA) использовался для получения 1 М раствора в воде очищенной с помощью системы Millipore (H)O/NaCl). Хотя некоторые источники указывают на необходимость использования насыщенного раствора [2, 16], было обнаружено, что подобный концентрированный раствор оставляет остаток в системе и приводит к сбоям шприца.

Свободные жирные кислоты, а именно: каприловая, каприновая, лауриновая, миристиновая, пальмитиновая, стеариновая, арахидиновая и бегеновая — были полученны от Alltech (Waukegan, IL). Они использовались для создания 1 мг/мл раствора в гексане. Стандартные образцы МЭЖК были изготовлены из полученной от ChemService (West Chester, PA) специальной смеси, состоящей из метилпентоата, метилгексаноата, метилгептаноата, метилоктаноата, метилдеканоата, метиллаурата, метилмиристата, метилпальмитата, метилстеарата, метилэйкозаноата и метилбегената с концентрацией 1 мг/мл. Раствор 1 мг/мл лауриновой кислоты в гексане использовался в качестве суррогатного стандарта. В качестве внутреннего стандарта использовался 1 мг/мл раствор декана (99+% Sigma, St. Louis, MO), додекана (99+% Aldrich, St. Louis, MO), тетрадекана (99+% Fluka, St. Louis, MO) и гексадекана (99+% Aldrich, St. Louis, MO) в изооктане. Каноловое масло было приобретено в местном супермаркете.

В Agilent 7696A Sample Prep WorkBench использовалось два промывочных растворителя: гексан и ацетон (х. ч., Fisher Scientific, Atlanta, GA). Ацетон использовался на большинстве этапов, поскольку в нем растворимо большинство используемых реагентов.

Оборудование

Для приготовления образов для калибровочной кривой, проб свободных жирных кислот и проб канолового масла использовался прибор Agilent 7696A Sample Prep WorkBench (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Для этой методики модули дозирования жидкости использовались со шприцем объемом 25 мкл в заднем модуле и шприц объемом 500 мкл в переднем модуле для больших объемов.

Все стадии анализа проводились на системе газовой хроматографии (GC) Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), оборудованной с испарителем с/без деления потока, работающим в режиме разделения (10:1), и пламенно-ионизационным детектором. Температура испарителя поддерживалась на уровне 300 °C с постоянным расходом газа в колонке 3 мл/мин. При работе использовалась колонка Agilent HP5-MS (30 м × 0,25 мм, 0,25 мкм, Agilent Technologies, Santa Clara). Температурная программа, состоящая из удержания при 100 °C (5 мин) и подъема при скорости 7 °C/мин до 225 °C (5 мин), использовалась для разделения стандартных образцов МЭЖК. Такая же температурная программа использовалась и для проб канолового масла, хотя разделение по базовой линии было получено не для всех соединений. Температура детектора была 300 °C; сбор данных выполнялся с использованием Multi-Technique ChemStation.

Метод пробоподготовки программировался с помощью Easy SamplePrep, средства редактирования методов, разработанного специально для Agilent 7696A Sample Prep WorkBench. В Easy SamplePrep имеется Диспетчер ресурсов, позволяющий пользователю назначать флаконы в качестве химических источников или пустых флаконов. Таким образом пользователь

вводит все растворители, реагенты, стандарты и пустые флаконы, которые требуются для пробоподготовки, а Диспетчер ресурсов отслеживает флаконы по мере их использования в программе и последовательности (Рис. 2). После того как ресурсы были настроены в Диспетчере ресурсов, была создана программа пробоподготовки. Редактор методов Easy SamplePrep позволяет пользователю добавлять этапы способом, привычным при заполнении протокола или лабораторного журнала, и обеспечивает текстовое отображение этапов и доступных ресурсов (Рис. 3).

Каждый этап пробоподготовки имеет набор расширенных параметров, позволяющих настроить программу в соответствии с предпочтениями пользователя. На этапе добавления расширенные параметры позволяют пользователю задать такие показатели как объем промывания, скорость набора и дозирования, а также глубину погружения иглы (Рис. 4). Для этапа смешивания можно настроить параметры скорости и времени, а для этапа нагрева пользователь может задать контрольные значения времени и температуры. На этапе получения результата установка флага позволяет пользователю выбрать флакон, который содержит готовую для передачи в отчет пробу.

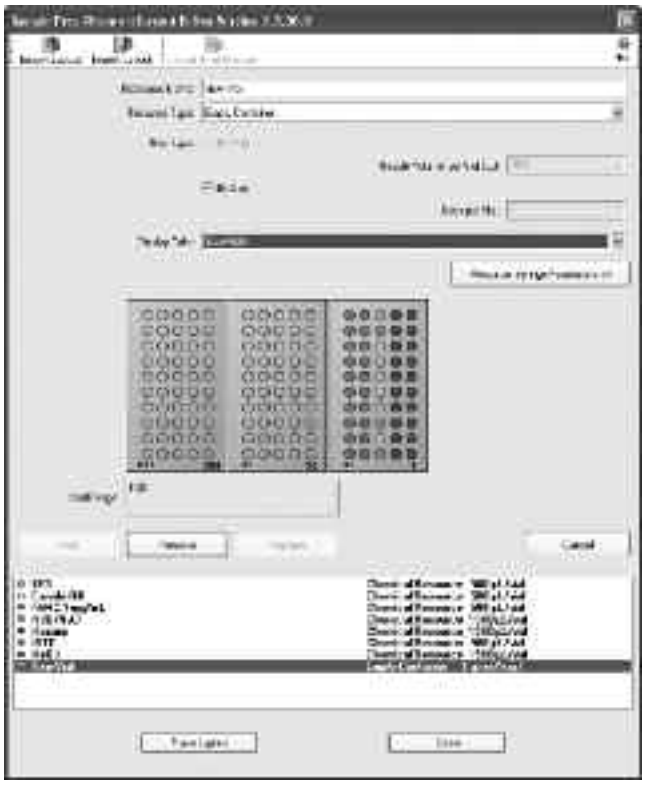


Рис. 2. Редактор ресурсов позволяет пользователям выделять химические ресурсы и пустые сосуды, которые будут использоваться во время пробоподготовки.

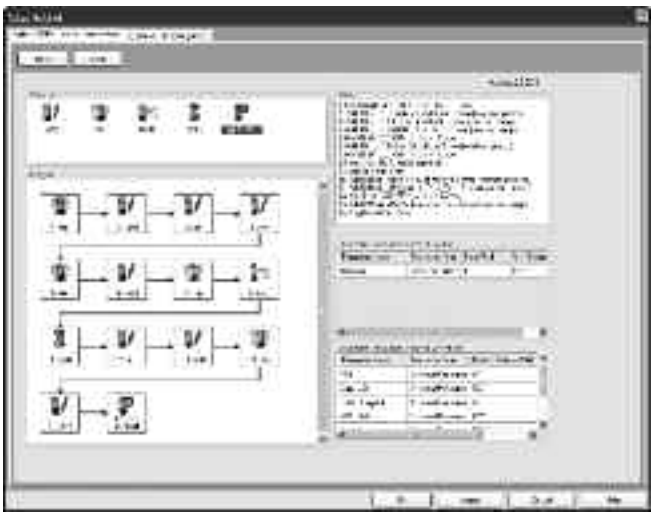


Рис. 3. Редактор методов SamplePrep поддерживает создание этапов программы путем перетаскивания значков. Ниже приведены этапы для реакции, катализируемой кислотой.



Рис. 4. Каждый этап пробоподготовки обладает дополнительными параметрами, как показанный ниже этап добавления, что позволяет пользователю тонко настроить операцию.

Создание калибровочной кривой

Перед подготовкой проб с помощью Agilent 7696A Sample Prep WorkBench с помощью прибора из стандартного образца МЭЖК была создана калибровочная кривая. Была получена восьмиуровневая калибровочная кривая, состоящая из 11 МЭЖК, для диапазона 1–500 ppm в приблизительно 100 мкл.

Пробоподготовка: реакция, катализируемая кислотой

Исходный ручной метод соответствовал указанному в документе «Официальные методы анализа Ассоциации аналитических химиков» (the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) Official Methods). В нем используется проба канолового масла 50 мг в пробирках объемом 20 мл, и он состоит из двух стадий нагревания — каждая при температуре 80 °C в течение 60 минут [5, 17].

При преобразовании метода AOAC в автоматизированный метод скорость реакции была намеренно снижена, поскольку Agilent 7696A Sample Prep WorkBench поддерживает только флаконы для автосамплера объемом 2 мл. Ручной метод был сокращен примерно в 50 раз и применялся как для пробы масла, так и для пробы свободной жирной кислоты.

Изначально на различных этапах добавлялись масло, суррогатный стандарт (лауриновая кислота) и внутренний стандарт (алканы). Однако из-за трудностей с достижением приемлемой воспроизводимости при подаче масла был создан раствор, состоящий из 0,4 мл пробы масла и 0,4 мл суррогатного стандарта, что позволило значительно повысить степень воспроизводимости метода.

Пустой флакон для автосамплера объемом 2 мл закрывался крышкой, и в него добавлялись 10 мкл пробы (проба свободных ЖК в гексане или раствор масла/суррогатного стандарта) и 10 мкл внутреннего стандарта. К пробе добавляли 40 мкл NaOH, и смесь перемешивалась в центрифуге со скоростью 1 000 об/мин в течение 30 сек. После омыления вносили 80 мкл BF_3, и смесь снова перемешивалась в центрифуге при 1 000 об/мин в течение 30 сек. Затем для ускорения реакции смесь нагревалась в течение 20 минут при температуре 65 °C. После нагрева смесь немного охлаждалась при комнатной температуре в течение 2 минут. К охлажденной смеси добавляли 100 мкл H_2O/NaCl и 100 мкл гексана для экстрагирования сформировавшихся МЭЖК в органическую фазу. В последний раз проба смешивалась в течение 20 секунд при 1 000 об/мин, и верхний слой (100 мкл) был перенесен в новый, пустой флакон автосамплера объемом 2 мл с крышкой с целью последующего использования для анализа методом газовой хроматографии.

Пробоподготовка: реакция, катализируемая основанием

Как и при реакции, катализируемой кислотой, подготовительныя действия для реакции, катализируемой основанием, превышают объем флакона автосамплера в 2 мл, поскольку для начала необходимо поместить пробу масла 100 мг в пробирку 20 мл [5]. Для того чтобы эта реакция могла использоваться в Agilent 7696A Sample Prep WorkBench, количество реагентов было снижено приблизительно в 10 раз.

Поскольку реакция, катализируемая основанием, не преобразовывает свободные жирные кислоты, использования суррогатного стандарта не требовалось. Для повышения воспроизводимости метода снова был использован раствор из 0,4 мл масла и 0,4 мл внутреннего стандарта. В пустой флакон автосамплера с колпачком объемом 2 мл добавлялось 10 мкл пробы (раствор из масла и внутреннего стандарта). Для метилирования ЖК и экстрагирования полученных МЭЖК 100 мкл NaOH и 500 мкл гексана смешивались в центрифуге при 1 000 об/мин в течение 30 сек. После ожидания в течение 2 минут верхний слой (100 мкл) был перемещен в новый пустой флакон для автосамплера объемом 2 мл с крышкой, откуда отбирались пробы для проведения ГХ. В отличие от реакции, катализируемой кислотой, подобная реакция, катализируемая основанием, происходит за один этап и завершается в течение нескольких минут.

Валидация реакции, катализируемой кислотой

Поскольку реакции, катализируемые кислотами, хорошо подходят как для жирных кислот связанных с липидами, так и для свободных жирных кислот, этот метод использовался для образца свободной жирной кислоты в гексане. За три дня было подготовлено пять проб с целью определения воспроизводимости между образцами, а также воспроизводимости в разные дни.

Те же действия были выполнены при проведении реакции вручную. Дополнительные порции добавляются с помощью настраиваемых пипеточных дозаторов, и реакция происходит в нагреваемом блоке с целью сравнения. Выполняемая вручную процедура осуществлялась параллельно с автоматизированной процедурой с целью обеспечения точного сравнения между ручным и автоматическим методом подготовки проб.

Результаты и обсуждение

Калибровка

Для восьми стандартных образцов, созданных с помощью Agilent 7696A Sample Prep WorkBench, была получена отличная линейность калибровочных кривых. Калибровочные данные приведены в таблице 1. Поскольку стандартные образцы были выбраны путем отбора насыщенных МЭЖК, только эти соединения и были выявлены и подвергнуты количественному анализу в пробах масла и в стандартных образцах жирных кислот.

Таблица 1. Данные калибровки прибора для стандартов МЭЖК, подготовленных с использованием Agilent 7696A Sample Prep WorkBench

Линейная регрессия R2 определяемых веществ		
Метилпентаноат	0,9997	y = 1,33x + 4,1175
Метилгексаноат	0,9998	y = 1,4876x + 8,9684
Метилгептаноат	0,9998	y = 1,5671x + 7,7412
Метилоктаноат	0,9998	y = 1,6669x + 8,2446
Метилдеканоат	0,9998	y = 1,7825x + 9,0499
Метиллаурат	0,9998	y = 1,8786x + 9,7365
Метилмиристат	0,9998	y = 1,9727x + 10,264
Метилпальмитат	0,9998	y = 1,9623x + 10,369
Метилстеарат	0,9998	y = 1,9828x + 10,64
Метилэйкозаноат	0,9998	y = 2,0155x + 10,826
Метилбегенат	0,9998	y = 2,087x + 11,266

Валидация методики

Перед анализом проб масла с помощью описанных выше автоматизированного и ручного методов для проверки системы Agilent 7696A Sample Prep WorkBench подготавливалась проба свободной жирной кислоты.

При использовании автоматизированного метода для пяти подготовленных за день проб было получено среднее значение ОСО < 2%. При сравнении пяти проб, полученных в три разных дня с помощью Agilent 7696A Sample Prep WorkBench, можно было убедиться в том, что вновь была достигнута хорошая

воспроизводимость результатов для всех соединений, а время удерживания было выше, чем для метилоктаноата. Среднее значение, стандартное отклонение, относительное стандартное отклонение и выходные значения приведены в таблице 2. Значения для метилоктаноата значительно ниже чем для других аналитов, что связано с его высокой летучестью и близостью к пику растворителя [3,4]. Эти данные охватывают 15 проб, подготовленных в течение трех дней посредством трех введений.

Таблица 2. Результаты катализируемой кислотой реакции пробы свободной жирной кислоты с использованием внешнего стандарта для определения концентрации и степени извлечения

Аналит	Количество (ppm)	Стандартное отклонение (ppm)	Относительное стандартное отклонение (%)	Выход (%)
Декан	81,8	0,968	1,18	97,3
Додекан	84,6	0,517	0,611	102,4
Тетрадекан	88,0	0,869	0,967	105,7
Гексадекан	92,2	1,02	1,11	111,4
Метилоктаноат	63,5	0,570	0,898	75,1
Метилдеканоат	101,2	0,175	0,173	97,5
Метиллаурат	110,1	0,681	0,619	104,8
Метилмиристат	97,0	0,713	0,735	102,6
Метилпальмитат	115,2	0,688	0,597	106,6
Метилстеарат	98,0	0,266	0,271	106,9
Метилэйкозаноат	80,6	0,394	0,489	104,0
Метилбегенат	90,0	1,12	1,25	99,9

Затем результаты, полученные при использовании автоматизированного метода, сравнивались с результатами, полученными при использовании ручного метода. В каждый из трех дней проведения испытаний результаты ручного метода были значительно хуже. Результаты обработки данных, полученных вручную, теми же методами, что и данных, полученных при использовании автоматического метода, а именно значения среднего, стандартное отклонение, относительное стандартное отклонение и выходные значения, приведены в таблице 3. Выходные значения обычно выше для проб, подготовленных вручную, нежели для проб, полученных при использовании автоматизированного метода, из-за того, что было добавлено несколько большее количество стандарта или несколько меньшее количество гексана (что наиболее вероятно).

Таблица 3. Результаты катализируемой кислотой реакции подготовленной ручным методом пробы свободной жирной кислоты с использованием внешнего стандарта для определения концентрации и извлечения

Аналит	Количество (ppm)	Стандартное отклонение (ppm)	Относительное стандартное отклонение (%)	Выход (%)
Декан	88,2	13,2	14,9	104,9
Додекан	98,1	7,92	8,08	118,8
Тетрадекан	104,2	6,81	6,53	125,0
Гексадекан	109,8	6,66	6,06	132,8
Метилоктаноат	94,6	14,1	14,9	111,9
Метилдеканоат	126,4	13,8	10,9	121,8
Метиллаурат	130,0	12,1	9,33	123,8
Метилмиристат	113,1	10,0	8,84	119,6
Метилпальмитат	134,4	12,0	8,93	124,3
Метилстеарат	114,0	9,89	8,67	124,3
Метилэйкозаноат	93,6	8,41	8,98	120,8
Метилбегенат	104,7	9,83	9,39	116,3

Хотя результаты, приведенные в таблицах 2 и 3, были получены при использовании внешней калибровки, данные также были оценены с использованием внутреннего стандарта. Площади пиков были нормированы по отношению к метиллаурату, что позволило получить более стабильные общие результаты, нежели при использовании абсолютных площадей пиков. Использование в качестве внутреннего стандарта метиллаурата дает результаты, не зависящие от степени разбавления. При этом обычно улучшается показатель ОСО. В таблице 4 показано полученное по данным приведенных площадей пиков относительное стандартное отклонение для проб, подготовленных в течение трех дней ручным и автоматизированным методами. Сравнение результатов автоматизированного и ручного методов позволяет говорить о том, что автоматизированный метод представляет собой надежное решение по выделению жирных кислот и может повысить воспроизводимость и выход продукта.

Таблица 4. Результаты нормализованных к метиллаурату проб свободной жирной кислоты, подготовленных ручным и автоматизированным методом катализируемой кислотой реакции.

Аналит	Относительное стандартное отклонение (автоматич.) (%)	Относительное стандартное отклонение (ручн.)
Метилоктаноат	1,31	7,65
Метилдеканоат	0,452	2,63
Метиллаурат	–	–
Метилмиристат	0,425	1,05
Метилпальмитат	0,779	1,80
Метилстеарат	1,10	1,93
Метилэйкозаноат	1,59	1,72
Метилбегенат	2,62	1,77

Анализ канолового масла

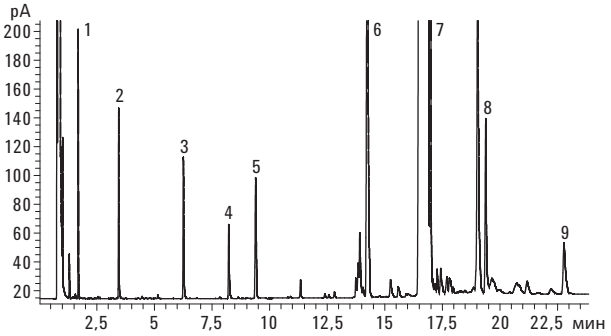
После валидации автоматизированного метода с использованием пробы свободной жирной кислоты система Agilent 7696A Sample Prep WorkBench была использована для подготовки проб масла. Как указано выше, подача канолового масла оказалась более трудной задачей, чем ранее предполагалось, из-за его высокой вязкости. Однако, смешивая пробу масла с суррогатным стандартом, можно получить раствор, вязкость которого значительно ближе к вязкости гексана, поэтому воспроизводимость его подачи значительно выше. Результаты приведены в таблице 5, а соответствующая хроматограмма представлена на рис. 5.

За два дня было подготовлено одиннадцать проб масла. Поскольку каждый день подготавливался свежий раствор масла и лауриновой кислоты, привести среднее значение ОСО для всех 11 проб не представляется возможным. Однако по-прежнему удалось установить, что воспроизводимость осталась на высоком уровне. Среднее значение ОСО для шести подготовленных в первый день проб составило 3,6%. Среднее значение ОСО для шести подготовленных во второй день проб было несколько ниже и составило 2,5%. При использовании метиллаурата в качестве внутреннего стандарта для нормализации МЭЖК среднее значение ОСО для всех одиннадцати проб снизилось (см. таблицу 5). Средний выход для этих проб составил 101%.

Таблица 5. Результаты использования внешнего стандарта (ES) и внутреннего стандарта (IS) для проб канолового масла, подготовленных с использованием Agilent 7696A Sample Prep WorkBench и катализируемой кислотой реакции.

Аналит	Количество (ppm)	Стандартное отклонение (%)	Относительное стандартное отклонение-ES (%)	Относительное стандартное отклонение-IS (%)	Выход (%)
Метиллаурат	51,0	1,91	3,74	–	97,1
Метилпальмитат	1499,6	57,8	3,85	0,778	
Метилстеарат	306,8	12,9	4,20	0,928	–
Метилэйкозаноат	226,8	9,44	4,16	1,10	–
Метилбегенат	111,6	4,73	4,24	0,861	–

Рис. 5. Типичная хроматограмма пробы канолового масла после автоматизированной пробоподготовки с использованием катализируемой кислотой реакции и анализ методом ГХ. Выявленные и подвергнутые количественному анализу соединения:



1) декан; 2) додекан; 3) тетрадекан; 4) метиллаурат; 5) гексадекан; 6) метилпальмитат; 7) метилстеарат; 8) метилэйкозаноат; 9) метилбегенат. Другие неопределенные некалиброванные пики соответствуют различным ненасыщенным МЭЖК.

Реакция, катализируемая основанием, также продемонстрировала отличные результаты. За один день было подготовлено 10 проб и все они продемонстрировали сходную воспроизводимость (таблица 6). Среднее значение ОСО для 10 проб составило 3,2%. Использование гексадекана в качестве внутреннего стандарта для нормализации площадей пиков не привело к достаточному снижению ОСО, как это было в случае реакции, катализируемой кислотой. Средний показатель степени извлечения составил 94%.

Таблица 6. Результаты использования внешнего стандарта (ES) и внутреннего стандарта (IS) для пробы канолового масла, подготовленных с использованием Agilent 7696A Sample Prep WorkBench и катализируемой основанием реакции.

Аналит	Количество (ppm)	Стандартное отклонение	Относительное стандартное отклонение-ES	Относительное стандартное отклонение-IS (%)	Выход (%)
Гексадекан	9,66	0,215	2,23	–	99,2
Метилпальмитат	312,5	13,01	4,16	2,69	–
Метилстеарат	49,95	3,39	6,80	4,89	–
Метилэйкозаноат	40,98	1,66	4,04	2,15	–
Метилбегенат	18,07	0,945	5,23	2,83	–

Преимущества автоматизированной пробоподготовки

Автоматизация пробоподготовки обладает различными преимуществами. Переход к автоматизированному методу позволяет уменьшить скорость реакции. При этом уменьшается уровень химических выбросов, а также количество используемого растворителя и реагента. Это повышает безопасность метода, а также снижает стоимость анализа.

Также, что более важно, автоматизация метода позволяет обеспечить более высокий выход и воспроизводимость. Автоматизация данного метода позволяет как минимум вдвое повысить воспроизводимость по сравнению с ручным методом.

Выводы

В данной методической информации приведены два автоматизированных метода выделения сложных метиловых эфиров жирных кислот. С помощью Agilent 7696A Sample Prep WorkBench реакции для получения производных легко были переведены с ручного метода на автоматизированный, что привело к повышению воспроизводимости. Кроме того, использовалось меньшее количество растворителей и реагентов, что значительно снизило стоимость анализа. Превосходная воспроизводимость и высокая степень извлечения были достигнуты для большей части соединений как для стандарта жирных кислот, так и для пробы канолового масла. Эти результаты демонстрируют, что подобные методы могут быть легко адаптированы для использования с Agilent 7696A Sample Prep WorkBench.

Литература

1 M. Petrovic, N. Kezic, and V. Bolanca, *Food Chemistry*, **122**, 285-291(2010). [М. Петрович, Н. Кежик и В. Боланка, *Химия пищевых продуктов*, **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). [К. М. Джиффин и В. Х. Вилсон, «Подготовка и анализ МЭЖК методом автоматизированной эстерификации/капиллярной ГХ», Методическая информация 288–357, Hewlett-Packard № (23)5965-1110E (1996)].

3 K. Eder, *J. Chromatogr.*, B, **671**, 113-131 (1995). [К. Эдер, *Ж. Хроматогр.*, В, **671**, 113-131 (1995)].

4 G. Gutnikov, *J. Chromatogr.*, B, **671**, 71-89 (1995). [Г. Гутников, *Ж. Хроматогр.*, В, **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). [Ф. Дэвид, П. Сандра, П. Вайли, «Усовершенствование анализа метиловых эфиров жирных кислот с использованием метода с фиксацией времени удерживания баз данных с фиксацией времен удерживания», Методическая информация 5990–4822RU, публикация Agilent Technologies 5988-5871RU (2003)].

6. W. Welz, W. Sattler, H.-J. Leis, and E. Malle, *J. Chromatogr.*, B, **526**, 319-329 (1990). [В. Вельц, В. Заттлер, Х.-Дж. Лейс и Е. Малле, *Ж. Хроматогр.*, В, **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). [Н. Санчез-Авила, Х. М. Мата-Гранадос, Х. Руис-Хименес и М. Д. Луке де Кастро, Ж. Хроматогр., А, **1216**, 6864–6874 (2009)].

8. R. W. Johnson in Fatty Acids, E. Pryde (editor), AOCS Press, Champaign, IL, p. 608 and Part VIII (1979). [Р. В. Джонсон «Жирные кислоты», Е. Прайд (редактор), AOCS Press, Шампань, Иллинойс, стр. 608 и часть VIII (1979)].

9. T. Seppanen-Laakso, I. Laakso, and R. Hiltunen, Anal. *Chim. Acta*, **465**, 39-62 (2002). [Т. Сеппанен-Лааксо, И. Лааксо и Р. Хилтунен, Акт. анал. хим., **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). [В. В. Кристи в *Инновации в методологии исследования жиров — два*, В. В. Кристи (редактор), Oily Press, Данди, Мичиган, стр. 69–111 (1993)].

11. L. Mondello, P. Quinto Tranchida, P. Dugo, and G. Dugo, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**, 1566-1570 (2006). [Л. Монделло, П. Кинто Транчида, П. Дуго и Г. Дуго, *Ж. Фарм. биомед. анал.*, **41**, 1566–1570 (2006)].

12. R. Perkins, K. Summerhill, and J. Angove, *Chromatography Today*, Sept/Oct, 17-19 (2008). [Р. Перкинс, К. Саммерхил и Дж. Ангов, *Хроматография сегодня*, сент./окт., 17–19 (2008)].

13. M. Athar Masood and N. Salem Jr., *Lipids*, **43**, 171-180 (2008). [М. Атар Масуд и Н. Салем мл., *Жиры*, **43**, 171–180 (2008)].

14. E. Ballesteros, M. Gallego, and M. Valcarcel, *Anal. Chim. Acta*, **282**, 581-588 (1993). [Е. Баллестрос, М. Галлего и М. Валкарсел,, Акт. анал. хим., **282**, 581–588 (1993)].

15. P. W. Park and R. E. Goins, *J. Food Sci*., **59**, 1262-1266 (1994). [П. В. Парк и Р. Е. Джойнс, *Ж. Пищев. наук*.., **59**, 1262–1266 (1994)].

16. L.-E. Dayhuff and M. J. M. Wells, *J Chromatogr.*, A, **1098**, 144-149 (2005). [Л.-Е. Дайхуф и М. Дж. М. Веллс, *Ж. Хроматография.*, А, **1098**, 144-149 (2005)].

17. AOAC Official Methods of Analysis (1990), method 969.33. [Официальные методы анализа AOAC (1990), метод 969.33].

Дополнительные сведения

Дополнительную информацию о продуктах и услугах нашей компании см. на веб-сайте www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Компания Agilent не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

Информация, описания и технические характеристики в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2011.

Напечатано в США
21 апреля 2011 г.
5990-6873RU

Agilent Technologies