使用 Agilent J&W DB-5ms 超高惰性色谱柱分析膳食脂肪酸、固醇和木脂素

应用简报

食品检测和农业

作者

Pat Sasso 和 Ken Lynam
安捷伦科技公司

摘要

Agilent J&W 超高惰性毛细管气相色谱柱的介绍说明与该色谱柱获得的峰形改善表明，可无需通过制备脂肪酸甲酯 (FAME) 来完成脂肪酸组分的测定。因此，可将 Agilent 7696A 制备工作台用于制备菜籽油和特级初榨橄榄油样品，以便对其水解产物脂肪酸进行分析。固醇和木脂素以天然形态被共萃取和分析。通过 Agilent J&W DB-5ms 超高惰性气相色谱柱可对反应的完成情况进行监测。在对不饱和脂肪酸到山嵛酸 (C22) 的分析过程中，已经证实可以获得良好的峰形。已经在一典型样品成功分离硬脂酸 (C18:0) 与油酸 (C18:1)。

前言

甲基酯化合物具有良好的峰形，且相对于游离脂肪酸而言其挥发性更低，可借助这些优势来使用分析工具，如负离子模式电喷雾，同时这些优势也为 HPLC 领域内的有机酸分析提供了一个可行的检测技术。这些化合物具有低波长 UV 发色团，因此在使用常规 HPLC 流动相或缓冲溶液调节分离度时会遇到一些挑战。若能够制备可同时应用于 GC 与 HPLC 分析的样品，可为完成分析任务、节约时间和资源方面提供更大的灵活性。许多长期从事膳食营养成分研究的现代化实验室均配备了气相和液相色谱，并且 LC/MS 的使用也在显著增加。虽然所有消费型动物和植物脂肪中的脂肪酸组分均已确定 [1]，但是水解这些与水不混溶的高粘度基质的能力仍然会为自动化液体处理系统带来挑战。7696A 制备工作台可以在样品被精确称量并与己烷以 1:1 的比例混合后完成样品制备过程中的所有步骤。最有效的水解技术是用 NaOH 以 3:1 的摩尔比进行皂化，但这需要相当长的时间，至少需要 24 h。通过批量处理多达 20 到 30 个样品，并在无人照看的情况下彻夜自动运行的方式，可部分缓解样品制备速度过慢这一瓶颈。气相色谱分析的运行时间大约为 40 min，能够监测未反应的植物油甘油三酯 [2]。

材料与方法

将 Agilent 7890A 系列 GC 与 Agilent 5975C 系列 GC/MSD 系统（惰性 EI 350 无涂层）联用。使用 FID 检测器进行粗料反应监测时也采用了类似的设置。

条件

GC 条件

色谱柱：	Agilent J&W DB-5ms UI，10 m × 0.25 mm，0.25 µm（部件号 122-5532UI）

样品制备

样品：	菜籽油，特级初榨橄榄油，皂化并经己烷提取
载气：	MSD 氦气，FID 氢气，用于反应监测，恒流模式，流速均为 1.0 mL/min
柱温箱：	120 °C（保持 1 min），以 20 °C/min 速度升温至 325 °C，保持 20 min
进样量：	分流/不分流进样，分流流速 100 mL/min，在 5 min 时开启载气节省，吹扫流量 3 mL/min
进样口温度：	280 °C
检测器：	FID，在 325 °C 下进行反应监测
MSD 传输辅助温度：	325 °C
GC:	Agilent 7890A 系列 GC
进样器：	Agilent 7693 自动液体进样器，5 µL 进样针 进样量 0.1 µL，分流比 20:1

质谱条件

MS:	配备 EI 惰性 350 离子源，串联轴检测器的 Agilent 5975C 系列 GC/MSD 系统
溶剂延迟：	1 min
MS 温度：	300 °C（离子源）；150 °C（四极杆）
扫描范围：	30 至 550

流路消耗品

样品瓶：	棕色螺口盖（部件号 5182-0716）
瓶盖：	蓝色螺口盖（部件号 5282-0723）
样品瓶内插管：	250 µL 玻璃材质，带聚合物支脚（部件号 5181-1270）
进样针：	5 µL（部件号 5181-1273）
隔垫：	红色低流失与温度优化隔垫（BTO，部件号 5183-4757）
进样口衬管：	双锥形直接连接衬管（部件号 G1544-80700）
放大器：	20 倍（部件号 430-1020）

标准品制备

使用含六种组分的测试混合物，溶于己烷中，浓度为10 ng/µL，组分碳原子数介于 12 到 22 之间，对色谱柱在其最高允许操作温度下所能获得的峰形进行评估。这些化合物能够以纯标准品套装的形式从 Grace（偶数个碳原子，部件号 186021）购买，每种化合物的含量为 100 mg。松脂醇购自 Sigma-Aldrich 公司（目录号 SML-0073-1MG）。图 1 表明混合标样中所有组分的色谱峰峰形的目视检查结果是可以接受的。

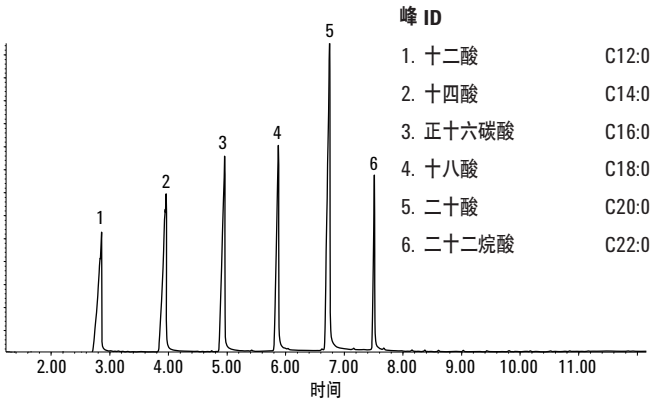


图 1. 六组分脂肪酸评估混合物的 TIC

样品制备

利用 7696A 制备工作台对待测植物油样品进行反应/皂化，并进行萃取，并在无人照看的情况下彻夜运行。用刀切开富含 omega-3 FAME 的鱼油胶囊。用水冲洗内容物，用己烷从制剂中除去甘油；不需要皂化。可通过依次使用己烷:甲醇和己烷:乙腈进行多次液液提取来完成特级初榨橄榄油和木脂素标记物的分离 [3]。图 2 是 7696A 制备工作台参数的屏幕截图。该系统允许同时使用多种不同的反应条件。待解决的主要问题就是如何将反应物油从 NaOH 水溶液中分离出来。酸转化率可达 90%，可以提供足够的酸进行定量，经过与报道中的数据进行对比，能够确认所获得的结果是准确的 [4]。

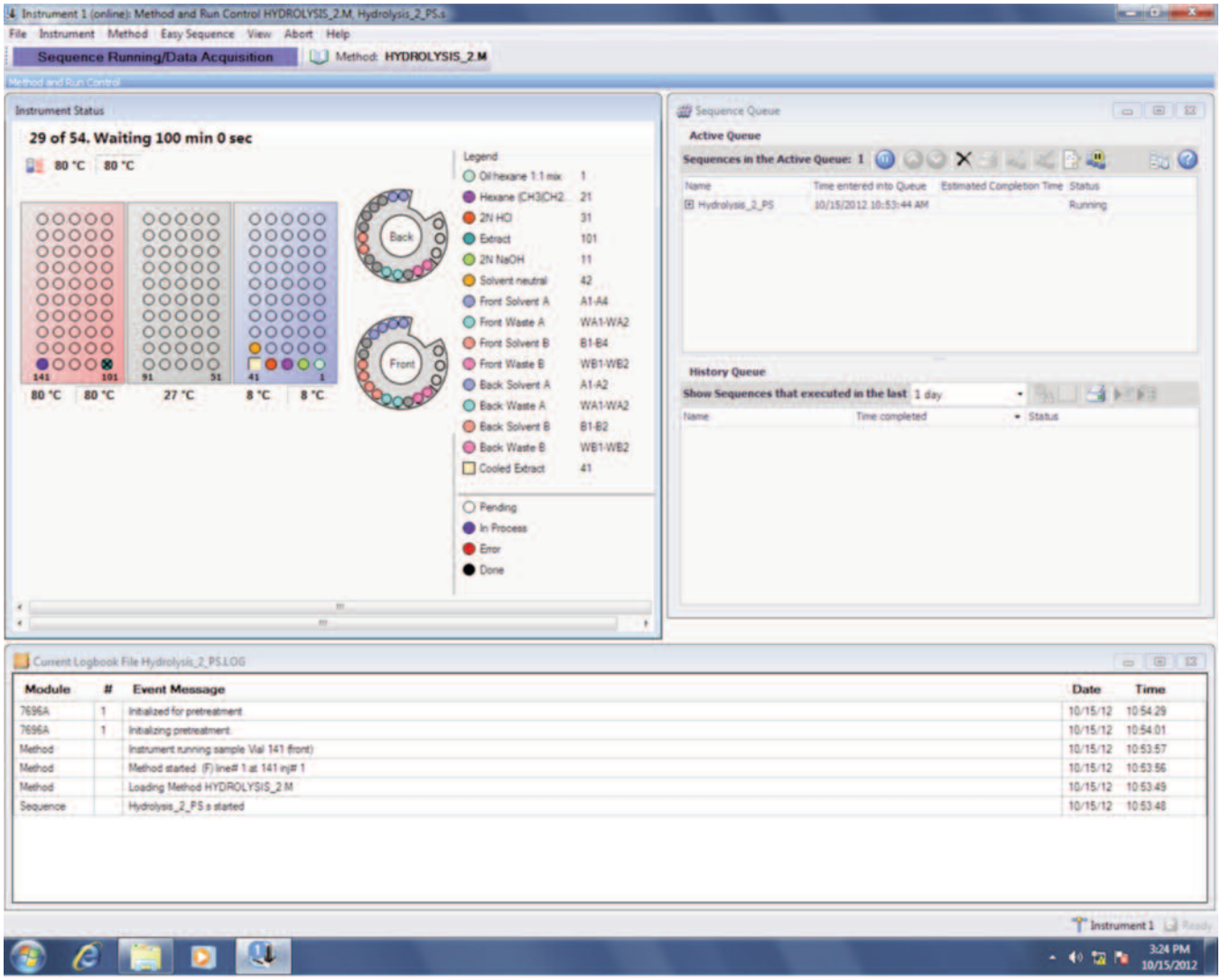


图 2. Agilent 7696A 制备工作台用于水解时的试剂及温度

图 3 所示为早期粗反应进行过半时所洗出的未反应甘油单酯、甘油二酯以及色谱运行结束时的甘油三酯。

结果与讨论

表 1 列出了图 1 中各色谱峰的峰宽和拖尾因子，此数据由 Agilent ChemStation 软件计算得出的。此时游离酸的峰宽要比脂肪酸甲酯的峰宽大得多，以菜籽油和橄榄油为例，图 4 中很清晰地给出了痕量硬脂酸 (C18:0) 与主组分油酸 (C18:1) 的分离情况。顺反异构体的分离需要氰基官能团键合相，这种键合相存在于气相和液相色谱柱中。对于 C18 异构体，可使用 Agilent J&W Select FAME 固定相色谱柱（部件号 CP7421），通过气相色谱法对其甲酯进行分离。在天然存在的油类中双键均为顺式构型 [5]，但在加工和提纯过程中会发生构型异构化。包括维生素 E（生育酚）在内的植物固醇的回收率和分离情况可见于图 5 中的总离子流 (TIC) 色谱图。

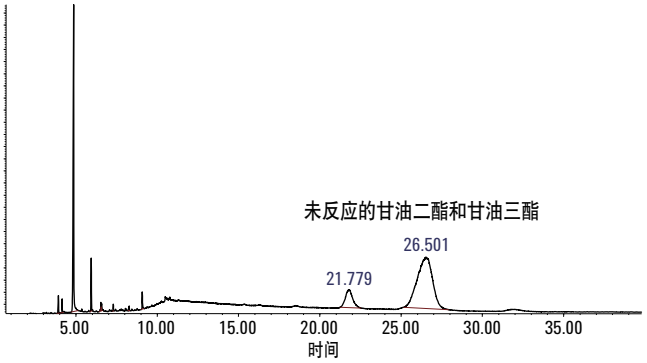


图 3. Agilent 7696A 制备工作台在反应进度约为 50% 时使用 GC 条件洗脱所有反应物

表 1. 峰宽及拖尾因子的计算结果

组分	峰宽	拖尾
C_{12} 十二酸	0.324	0.53
C_{14} 十四酸	0.390	0.55
C_{16} 正十六碳酸	0.372	0.57
C_{18} 十八酸	0.238	0.61
C_{20} 二十酸	0.258	0.58
C_{22} 二十二酸	0.193	0.71

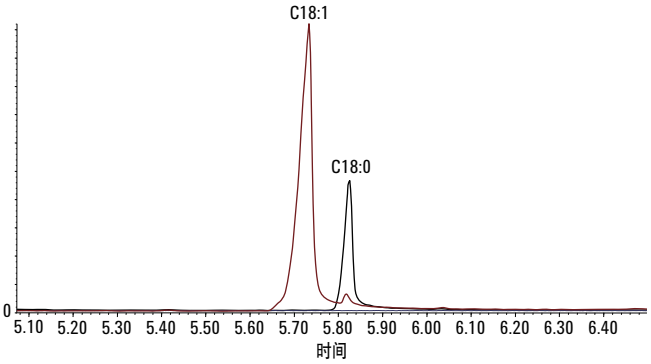


图 4. 关键物质对（硬脂酸 (C18:0) 和油酸 (C18:1)）的分离情况

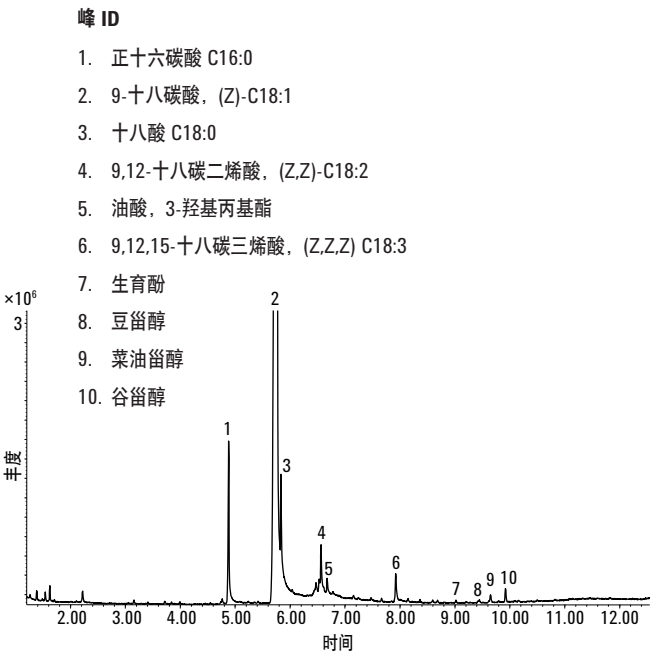


图 5. 水解菜籽油的 TIC 色谱图，显示出所有脂肪酸和植物固醇。

如图 6 中所示，特级初榨橄榄油木脂素标记物（松脂醇和 1-乙酰氧基松脂酚）为痕量组分，同时还展示了其 EI 图谱。最新的 NIST11 质谱库中未收录这两个化合物。鱼油中 DHA（二十二碳六烯酸）和 EPA（二十碳五烯酸）omega-3 酯的峰形见图 7。

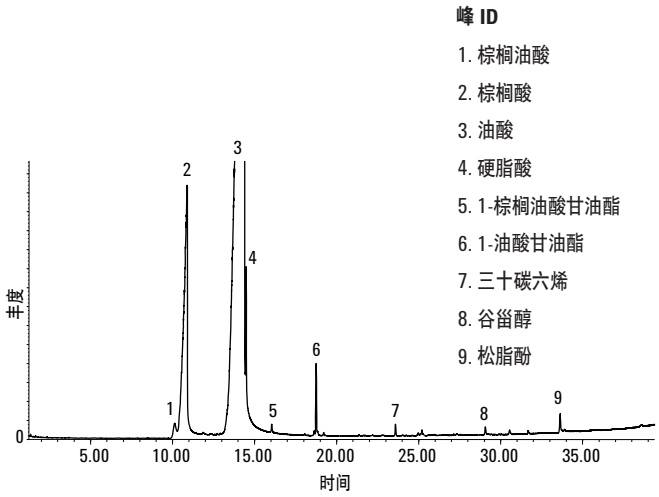


图 6. 水解特级初榨橄榄油的 TIC 色谱图，显示出脂肪酸和木脂素标记物的 EI 图谱

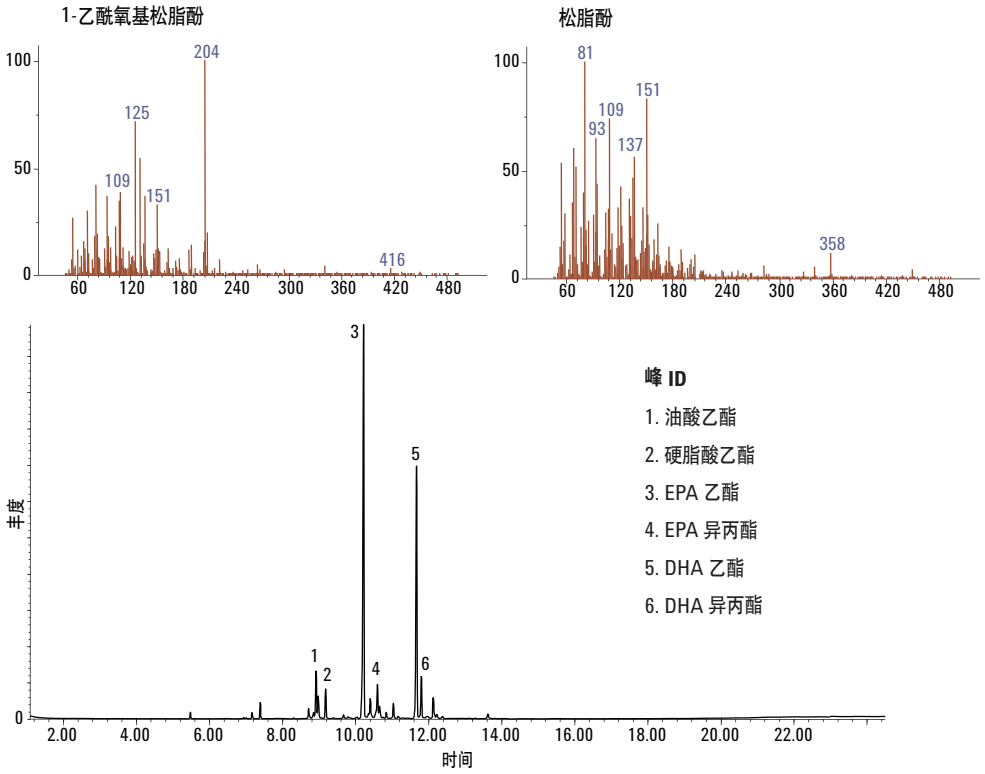


图 7. 利用大气压化学电离 LC/MS 对市售鱼油 omega-3 酯进行分析测定所获得的 TIC 色谱图

结论

对于游离脂肪酸类化合物，Agilent J&W DB-5ms 超高惰性气相色谱柱可提供较好的峰形。色谱柱化学性质和样品自动制备技术的发展可以使 GC/MS 分析方法灵活地转换为 LC/MS 分析方法，同时可以通过拓展仪器资源的使用范围（相对于典型应用范围而言）来提高实验室整体效率和分析通量。在分析方法的正常发展过程中，经常有根据用户的要求进行样品制备的需求，这也给用户带来了很多挑战。解决冗长的样品制备过程等困难可以为提高实验室效率指明正确的方向。

致谢

作者对 Rebecca Veeneman 在脂肪酸色谱评估领域内所做出的巨大贡献表示感谢。

参考文献

1. S. Rossi. Does Canola Oil Have Omega-6 Fatty Acids? Livestong Foundation. http://www.livestrong.com/article/430013-does-canola-oil-have-omega-6-fatty-acids/

2. N. Helle, M. Bzduch, R. Veeneman. “Determination of Fatty Acid Methyl Esters (FAMEs) in Salmon Oil Using Automated Sample Preparation”（采用自动化样品制备方法测定鲑鱼油中的脂肪酸甲酯 (FAME) 含量）。安捷伦科技公司应用简报，出版号 5990-9799EN (2012)。

3. M. Brenes, F. J. Hidalgo, A. García, J. J. Rios, P. García, R. Zamora, A. Garrido. Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc*. 77, 715 (2000).

4. Fatty acids content in dietary fats. Wikipedia. http://en.wikipedia.org/wiki/fatty_acid

5. 美国官方分析化学师协会标准。AOAC 官方方法 2000.10。AOAC International, Gaithersburg, MD, USA. http://www.aoac.org/vmeth/E_methodEX2000.10.PDF

如需更多信息

这些数据仅代表典型结果。有关我们的产品和服务的详细信息，请访问我们的网站：www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料中可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
中国印制
2013 年 1 月 10 日
5991-1715CHCN

Agilent Technologies