

37가지 지방산 메틸 에스테르 분석 능력 향상

3가지 Capillary GC 컬럼 사용

저자

Yun Zou
Agilent Technologies
(Shanghai) Co.Ltd,
Shanghai 200131 P.R.China

Hua Wu
Agilent Technologies (China)
Co.Ltd,
Beijing 100102 P.R.China

개요

지방산 메틸 에스테르(FAME) 분석은 식품 내 지방 성분을 특성화하는 데 사용되며, 식품 분석에서 가장 중요한 분석 중 하나입니다. 이 응용 자료는 Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME, Agilent J&W DB-FastFAME, Agilent J&W DB-FATWAX Ultra Inert GC 컬럼에서 37가지 성분 FAME 혼합물 표준품을 분리하는 것에 대한 내용을 담고 있습니다. CP-Sil 88 for FAME GC 컬럼을 이용한 분석에서 우수한 분리능을 얻었습니다. 고효율의 DB-FastFAME 컬럼은 단 8분만에 37가지 성분의 FAME 혼합물을 완벽히 분리했습니다. 한편, DB-FATWAX Ultra Inert 컬럼은 대부분의 포화 및 다중불포화 FAME에 대해 독보적인 선택성을 보였습니다.

소개

지방산은 식품 영양 및 식품 화학 분야에서 매우 중요한 역할을 하는 성분입니다. 지방의 지방산 조성은 다양한 탄소 사슬 길이의 포화, 단일불포화, 다중불포화 성분의 복잡한 혼합체입니다. 지방산의 체내 기능은 그 구조에 따라 매우 다르기 때문에, 식품 내 지방산 조성을 자세히 분석할 필요가 있습니다. GC로 메틸 에스테르 형태의 지방산(FAME)을 분석하는 것은 식품 내 총 지방 및 트랜스지방 함량을 측정하고 특성화하는 중요한 방식입니다^{1,2}. 컬럼 길이, 내부 직경, 필름 두께 등의 컬럼 조건 및 고정상 선택은 지방산 조성의 복잡성과 분리 요건에 따라 달라집니다.

폴리에틸렌 글리콜(PEG) 타입의 Capillary 컬럼은 유지방 내 부티르산 분석과 같은 어유(fish oil) 및 육류 시료 내 FAME 분석에 사용됩니다. 이는 PEG Capillary 컬럼이 탄소 사슬 길이와 불포화도에 따라 FAME 이성질체를 용출하기 때문입니다. 그러나 PEG 컬럼의 큰 제한점 중 하나는 *cis-trans* 이성질체를 분별하는 능력이 부족하다는 것입니다. 이 컬럼을 사용할 때 모든 *cis-trans* 이성질체는 함께 용출됩니다³.

다수의 식품 테스트 규제 방법은 GC/FID로 지방산 조성 분석 시 특정 *cis-trans* 지방산 이성질체의 분리를 요구합니다. 식용유와 같은 더 복잡한 시료를 분석하기 위해서는 시아노프로필 고정상으로 코팅된 Capillary 컬럼을 이용해 FAME를 추가 분석하게 됩니다. 중간 수준의 시아노프로필 상으로 코팅된 Agilent J&W DB-FastFAME GC 컬럼은 복잡한 FAME 혼합물을 빠르고 우수하게 분석하며, 어느 정도의 *cis/trans* 분리 능력 역시 보유하고 있습니다. *cis-trans* 이성질체의 추가 분리를 위해서는 높은 극성의 시아노-폴리실록산 컬럼(CP-Sil 88 for FAME/HP-88)이 사용됩니다. 그러나, 일부 탄소 사슬 길이는 시아노-폴리실록산 상에서 겹치는 경우가 많아 피크 식별에 문제를 일으킵니다. 따라서 긴 GC 컬럼(예를 들어 100m 길이)을 사용하고 분석 시간을 늘리면 우수한 FAME 분리를 얻을 수 있으나 생산성이 저하될 수 있습니다.

37가지 성분의 FAME 혼합물 표준품은 다수의 식품 시료 내 지방산 조성을 시뮬레이션하여 만들어졌기 때문에 많은 식품의 지방산 에스테르(FAME) 식별에 사용될 수 있습니다. 이 혼합물에는 C4:0부터 C24:1까지의 다양한 FAME이 포함되어 있으며, 이 중에는 가장 중요한 포화, 단일불포화, 다중불포화 FAME들도 있습니다(표 1).

이 응용 자료는 FAME 분석을 위해 설계된 3가지 Capillary 컬럼 - Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME, DB-FastFAME, Agilent J&W DB-FATWAX Ultra Inert GC 컬럼을 이용해 37가지 성분의 FAME 혼합물 표준품을 분석하는 것에 대한 내용을 담고 있습니다.

실험

화학물질 및 표준품

37가지 성분의 FAME 혼합물 표준품(p/n CDAA-252795-MIX-1mL)은 ANPEL Scientific Instrument Co. Ltd (중국 상하이)에서 구입하였습니다. 표 1에는 혼합물의 각 성분 농도가 기재되어 있습니다.

PUFA No.1(해양어류에서 채취한 시료), PUFA No.2(동물에서 채취한 시료), PUFA No.3(청어 기름)은 Minn Bolin Bio-Tech Co. LTD(중국 선전)에서 구입하였습니다. 혼합물은 100mg 혼합물로 이용 가능하며, 각각 아세톤으로 100배 희석되었습니다.

기기

분석은 불꽃 이온화 검출기(FID)가 장착된 Agilent 7890B GC를 이용해 진행되었습니다. 시료 주입은 Agilent 7683B 자동 액체 샘플러, 5 μ L 시린지(p/n G4513-80213) 및 split/splitless 주입 포트를 이용해 이루어졌습니다. 기기 설정 및 분석 조건은 표 2(CP-Sil 88 for FAME 컬럼), 표 3(DB-FastFAME 컬럼), 표 4(고효율 DB-FastFAME 컬럼), 표 5(DB-FATWAX UI 컬럼)에 요약되어 있습니다. 표 6에는 이 연구에 사용된 기타 소모품이 기재되어 있습니다.

표 1. 37가지 성분 FAME 혼합물

번호	성분 (메틸 에스테르)	약어	농도 (mg/mL)
1	Butyric acid	C4:0	403
2	Caproic acid	C6:0	404
3	Caprylic acid	C8:0	406
4	Capric acid	C10:0	403
5	Undecanoic acid	C11:0	200
6	Lauric acid	C12:0	399
7	Tridecanoic acid	C13:0	200
8	Myristic acid	C14:0	397
9	Myristoleic acid	C14:1	202
10	Pentadecanoic acid	C15:0	202
11	<i>cis</i> -10-Pentadecenoic acid	C15:1	200
12	Palmitic acid	C16:0	599
13	Palmitoleic acid	C16:1	200
14	Heptadecanoic acid	C17:0	201
15	<i>cis</i> -10-Heptadecenoic acid	C17:1	200
16	Stearic acid	C18:0	399
17	Oleic acid	C18:1 <i>cis</i> (n9)	400
18	Elaidic acid	C18:1 <i>trans</i> (n9)	200
19	Linoleic acid	C18:2 <i>cis</i> (n6)	203
20	Linolelaidic acid	C18:2 <i>trans</i> (n6)	200
21	γ -Linolenic acid	C18:3n6	203
22	α -Linolenic acid	C18:3n3	199
23	Arachidic acid	C20:0	406
24	<i>cis</i> -11-Eicosenoic acid	C20:1(n9)	199
25	<i>cis</i> -11,14-Eicosadienoic acid	C20:2	200
26	<i>cis</i> -8,11,14-Eicosatrienoic acid	C20:3n6	202
27	<i>cis</i> -11,14,17-Eicosatrienoic acid	C20:3n3	200
28	Arachidonic acid	C20:4n6 (ARA)	198
29	<i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic	C20:5n3(EPA)	201
30	Henicosanoic acid	C21:0	201
31	Behenic acid	C22:0	400
32	Erucic acid	C22:1n9	202
33	<i>cis</i> -13,16-Docosadienoic acid	C22:2	199
34	<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid	C22:6(n3) (DHA)	197
35	Tricosanoic acid	C23:0	200
36	Lignoceric acid	C24:0	405
37	Nervonic acid	C24:1	201

표 2. Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME 분석법 조건

파라미터	값
GC 시스템	Agilent 7890B/FID
컬럼	Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME, 100m × 0.25mm, 0.20 μ m(p/n CP7489)
운반 가스	헬륨, 32psi, 일정 압력 모드
주입구	Split/splitless, 260°C, split ratio 50:1
오븐	100°C(5min), 8°C/min to 180°C(9min), 1°C/min to 230°C(15min)
FID	260°C, Hydrogen: 40mL/min Air: 400mL/min Make-up gas: 25mL/min
주입량	1 μ L

표 3. Agilent J&W DB-FastFAME 분석법 조건

파라미터	값
GC 시스템	Agilent 7890B/FID
컬럼	Agilent J&W DB-FastFAME, 30m × 0.25mm, 0.25 μ m (p/n G3903-63011)
운반 가스	헬륨, 14psi, 일정 압력 모드
주입구	Split/splitless, 250°C, split ratio 50:1
오븐	50°C(0.5min), 25°C/min to 194°C(1min), 5°C/min to 245°C(3min)
FID	280°C, Hydrogen: 40mL/min Air: 400mL/min Make-up gas: 25mL/min
주입량	1 μ L

표 4. 고효율 Agilent J&W DB-FastFAME 분석법 조건

파라미터	값
GC 시스템	Agilent 7890B/FID
컬럼	Agilent J&W DB-FastFAME, 20m × 0.18mm, 0.20 μ m(G3903-63010)
운반 가스	수소, 28psi, 일정 압력 모드
주입구	Split/splitless, 250°C, split ratio 50:1
오븐	80°C(0.5min), 65°C/min to 175°C, 10°C/min to 185°C(0.5min), 7°C/min to 230°C
FID	280°C, Hydrogen: 40mL/min Air: 400mL/min Make-up gas: 25mL/min
주입량	1 μ L

표 5. Agilent J&W DB-FATWAX Ultra Inert 분석법 조건

파라미터	값
GC 시스템	Agilent 7890B/FID
컬럼	Agilent J&W DB-FATWAX Ultra Inert, 30m × 0.25mm, 0.25 μ m(p/n G3903-63008)
운반 가스	헬륨, 일정 유속 모드 30cm/s
주입구	Split/splitless, 250°C, split ratio 50:1
오븐	40°C(2min), 55°C/min to 171°C(25min), 10°C/min to 215°C(25min)
FID	280°C, Hydrogen: 40mL/min Air: 400mL/min Make-up gas: 25mL/min
주입량	1 μ L

결과 및 토의

높은 극성의 시아노프로필 실록산 상(CP-SIL 88 for FAME 또는 HP-88)은 *cis-trans* FAME의 빠르고 우수한 분리를 위해 설계되었습니다. 높은 극성의 시아노프로필 실록산 컬럼으로 트랜스 지방산을 측정하는 효과는 이전에 성공적으로 시연된 바 있습니다. 그러나 많은 실험의 37가지 성분 FAME 분석 용출 패턴에서 현저한 탄소 사슬 겹침 현상이 일어났으며, 구체적으로는 C18:3n6 또는 C18:3n3, C20:0; C20:3n3, C22:1n9, C20:4n6 등이 있습니다³. 이는 피크 식별 문제로 이어질 수 있습니다. 그림 1은 CP-Sil 88 for FAME 컬럼과 GC-FID를 이용한 37가지 성분 FAME 참조 표준품의 최적화된 분리를 보여줍니다. 모든 37가지 성분이 단일 분석에서 베이스라인 분리되어 놀라운 선택성을 자랑합니다. 혼합물 표준품 내 모든 37가지 성분을 우수하게 분리하기 위해 100m CP-Sil 88 for FAME GC 컬럼이 선택되었으며, 분석 시간은 70분 이상이었습니다.

표 6. 유동 경로 소모품

파라미터	값
Vials	Amber, write-on spot, certified, 2mL, screw top vial packs(p/n 5182-0554)
Septa	Nonstick BTO septa(p/n 5183-4757)
Column nut	Self tightening, inlet/detector(p/n 5190-6194)
Ferrules	15 % Graphite: 85% Vespel, short, 0.4mm id, for 0.1 to 0.25mm columns(10/pk, p/n 5181-3323)
Liner	Agilent Ultra Inert split liner with glass wool(p/n 5190-2295)
Inlet seal	Ultra Inert, gold-plated, with washer(p/n 5190-6144)

이런 유형의 FAME 혼합물 분석에 쓰이는 또다른 흔한 대안은 중간 수준의 시아노프로필 상 GC 컬럼입니다. J&W DB-FastFAME GC 컬럼은 빠른 FAME 혼합물 분석을 위해 특별히 고안되었습니다. Cyano-dipole과 *cis* 이성질체의 강한 상호작용으로 인해 *trans* 이성질체가 *cis* 이성질체 이전에 용출됩니다. 따라서, 이 컬럼을 이용하면 *cis/trans* FAME 분리가 어느 정도 진행됩니다.

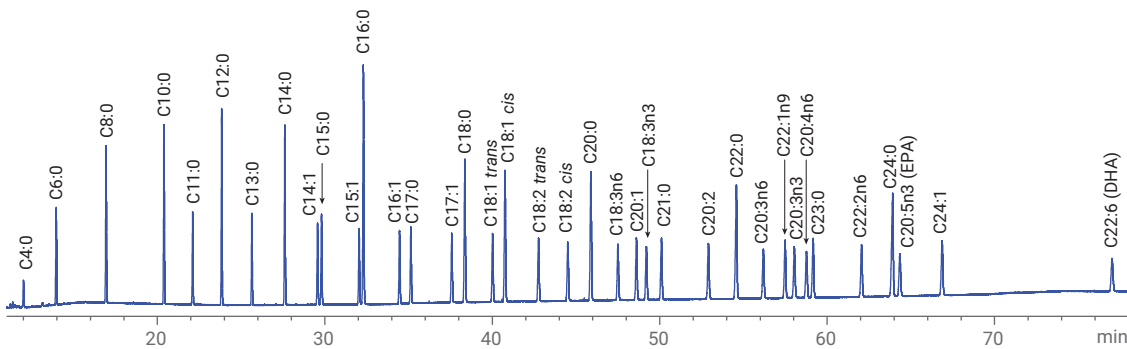


그림 1. 100m × 0.25mm id, 0.25µm Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME 컬럼과 분석법 1(표 2 참조)을 사용한 37가지 성분 FAME 혼합물 표준품의 GC/FID 크로마토그램

J&W DB-FastFAME GC 컬럼

37가지 성분 FAME 혼합물 표준품 분석에 30m × 0.25mm id, 0.25µm DB-FastFAME 컬럼을 사용하였습니다. 그림 2는 전형적인 GC-FID 크로마토그램을 보여줍니다. 표준품 혼합물 내의 모든 화합물이 잘 분리되었으며, 분석 시간은 18분 이내였습니다.

고효율 0.18mm id GC 컬럼은 분석 성능의 손실 없이 생산성을 향상시킬 수 있는 방법 중 하나입니다. 내부 직경을 감소시키면 길이당 컬럼 효율이 향상되어, 일관된 분리능을 유지하면서 컬럼 길이를 줄일 수 있기 때문입니다. 수소를 운반 가스로 사용하면 거의 동일한 분리능을 유지하면서 분석 속도를 향상시킬 수 있는데, 이는 수소의 분산성이 상대적으로 높아 최적의 선형 운반 가스 속도가 높기 때문입니다. 그림 3은 20m × 0.18mm id, 0.20µm

DB-FastFAME 컬럼을 이용한 37가지 성분 FAME 혼합물 표준품 분리를 보여줍니다. 이 분석법으로 AOAC critical pairs를 포함한 모든 혼합물 표준품 성분이 완벽하게 분리되었으며(분리능 >1.5) 분석 시간은 8분 이내로 감소했습니다. 이는 고효율 컬럼 사용 시 분리능의 저하 없이 빠른 시료 분석이 가능함을 의미합니다.

그림 2와 3에서 두 가지 화합물 쌍 EPA/c22:0와 DHA/C24:1의 서로 다른 용출 순서를 확인할 수 있습니다. 온도 프로그램 실행에서 Inlet 압력을 변화시키면 화합물의 유효 온도를 변화시킬 수 있습니다. 혼합물 내 EPA와 DHA를 분석하는 실험에서 운반 가스를 변경할 때, 서로 다른 Inlet 압력과 필름 두께를 사용해 두 화합물 쌍이 DB-FastFAME GC 컬럼에서 용출되는 순서를 변경함으로써 분석법을 최적화할 수 있습니다.

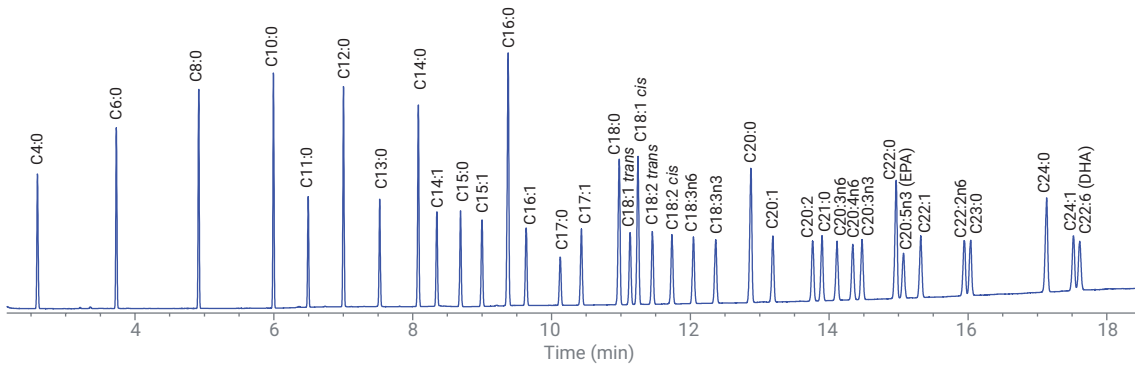


그림 2. 30m × 0.25mm id, 0.25µm Agilent J&W DB-FastFAME 컬럼과 분석법 2(표 3 참조)를 사용한 37가지 성분 FAME 혼합물 표준품의 GC/FID 크로마토그램

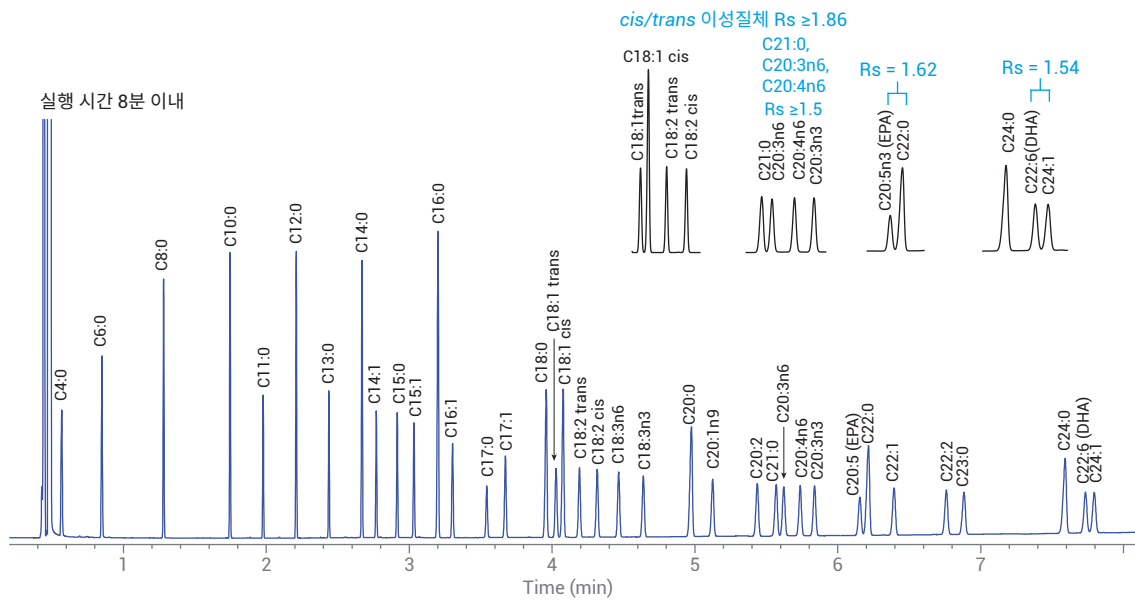


그림 3. 20m × 0.18mm id, 0.20µm Agilent J&W DB-FastFAME 컬럼과 분석법 2(표 3 참조)를 사용한 37가지 성분 FAME 혼합물 표준품의 GC/FID 크로마토그램

PEG 컬럼(WAX 컬럼)은 일반적으로 유지방 내 부티르산 분석과 같은 식용유 및 지방, 어유(fish oil) 및 육류 시료 내 FAME 분석에 사용됩니다. 이는 컬럼이 탄소 사슬 길이 및 불포화도에 따라 FAME 이성질체를 용출하기 때문입니다. 그러나 다소간의 겹침 현상이 있을 수 있는데 이를테면 C20:3 n6 및 C21:1이 분리되지 않거나, C22:6과 C24:1이 함께 용출될 수 있습니다. *cis-trans* 이성질체는 전통 WAX 컬럼에서는 분리되지 않았습니다.

J&W DB-FATWAX Ultra Inert (UI) GC 컬럼은 보다 향상된 성능으로 출시되었습니다. 그림 4는 30m × 0.25mm id, 0.25µm DB-FATWAX Ultra Inert GC 컬럼을 이용한 37가지 성분 FAME 혼합물 표준품 분리를 보여줍니다. 1쌍의 C18:1 *cis* 및 C18:1 *trans* 이성질체를 제외하고는 분리 결과는 우수한 편이었습니다 (분리능 0.56). 이 화합물 쌍은 보통 함께 용출되어 여타 WAX

컬럼에서 동일한 피크로 나타납니다. 또다른 *cis-trans* 이성질체 쌍인 C18:2 *cis* 및 C18:2 *trans*는 DB-FATWAX UI GC 컬럼에서 베이스라인 분리될 수 있는데, 이는 DB-FATWAX UI 컬럼이 어느 정도의 *cis/trans* 이성질체 분리능을 가지고 있으며, *cis* 이성질체가 먼저 용출됨을 의미합니다.

인간에게 영양학적으로 중요한 여러 개의 이중결합을 가지고 있는 다중불포화 지방산(PUFA) 그룹에는 C20:5n3(EPA), C22:6n3(DHA), C20:4n6(ARA)과 같은 오메가-3, 오메가-6 지방산이 포함되어 있습니다. 그림 4는 이와 같은 오메가-3, 오메가-6 FAME에 대한 우수한 분리능을 보여줍니다. 그림 5-7은 PUFA 혼합물 분리 사례를 보여줍니다. EPA, DHA를 포함한 주요 FAME 성분은 쉽게 검출 및 정량화할 수 있습니다.

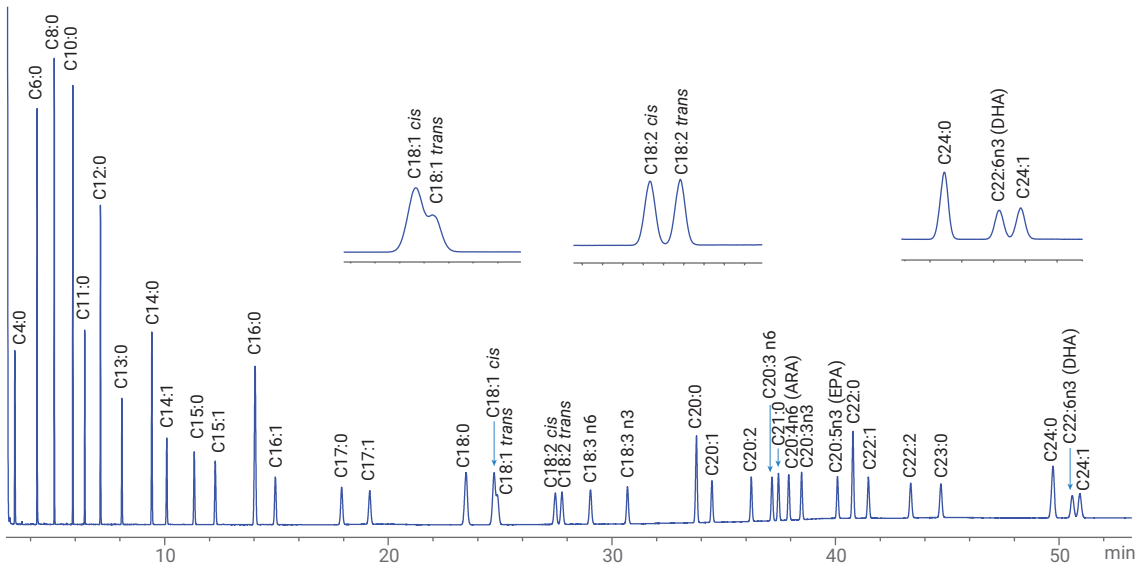
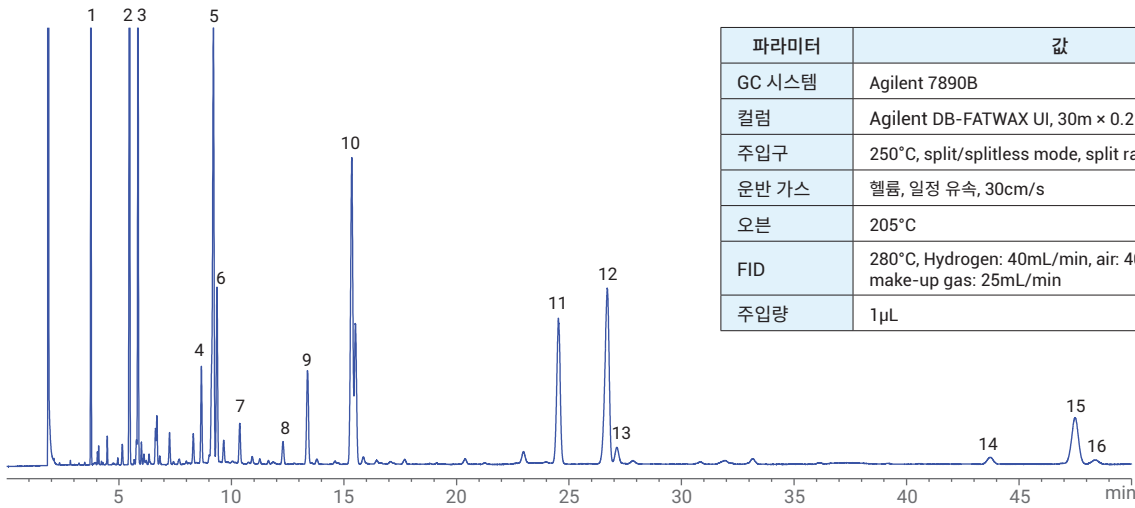


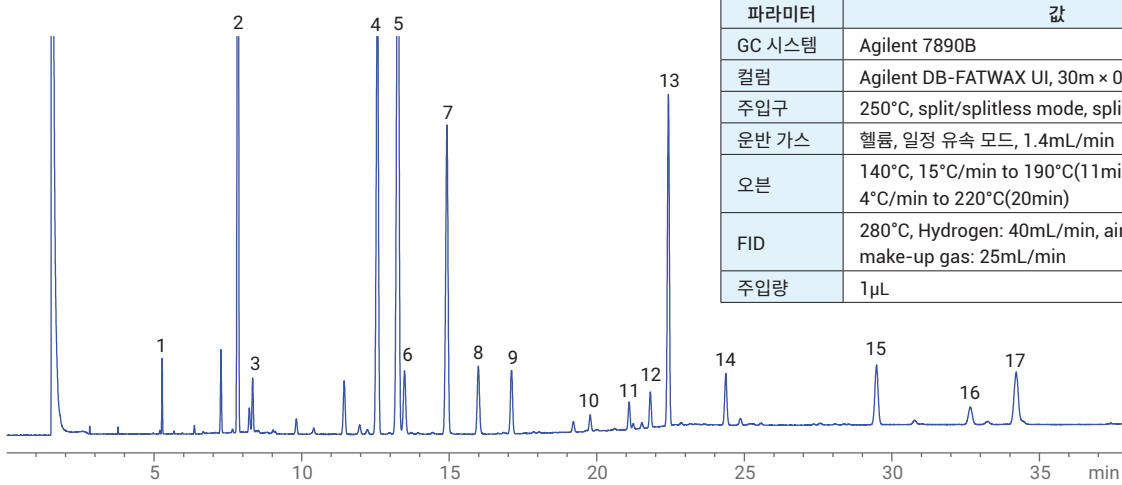
그림 4. 30m × 0.25mm id, 0.25µm Agilent J&W DB-FATWAX Ultra Inert GC 컬럼과 분석법 4(표 5 참조)를 사용한 37가지 성분 FAME 혼합물 표준품의 GC/FID 크로마토그램



파라미터	값
GC 시스템	Agilent 7890B
컬럼	Agilent DB-FATWAX UI, 30m × 0.25mm, 0.25µm
주입구	250°C, split/splitless mode, split ratio 100:1
운반 가스	헬륨, 일정 유속, 30cm/s
오븐	205°C
FID	280°C, Hydrogen: 40mL/min, air: 400mL/min, make-up gas: 25mL/min
주입량	1µL

1. C14:0
2. C16:0
3. C16:1n7
4. C18:0
5. C18:1n9
6. C18:1n7
7. C18:2n6
8. C18:3n3
9. C18:4n3
10. C20:1n9
11. C20:5n3 (EPA)
12. C22:1n11
13. C22:1n9
14. C22:5n3
15. C22:6n3 (DHA)
16. C24:1n9

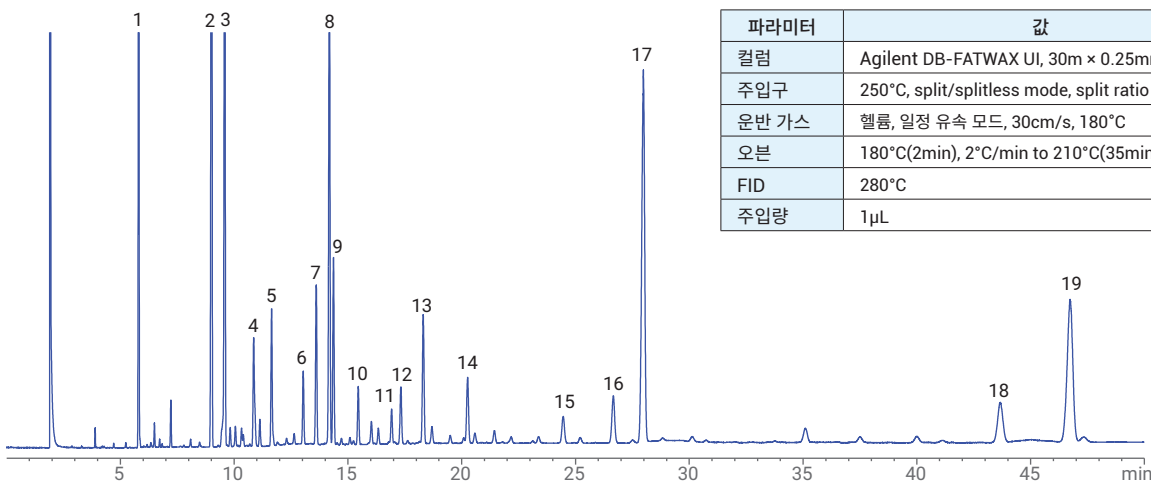
그림 5. 30m × 0.25mm id, 0.25µm Agilent J&W DB-FATWAX Ultra Inert GC 컬럼을 사용한 PUFA No.1 혼합물(해양어류에서 채취한 시료)의 GC/FID 크로마토그램



파라미터	값
GC 시스템	Agilent 7890B
컬럼	Agilent DB-FATWAX UI, 30m × 0.25mm, 0.25µm
주입구	250°C, split/splitless mode, split ratio 100:1
운반 가스	헬륨, 일정 유속 모드, 1.4mL/min
오븐	140°C, 15°C/min to 190°C(11min), 4°C/min to 220°C(20min)
FID	280°C, Hydrogen: 40mL/min, air: 400mL/min, make-up gas: 25mL/min
주입량	1µL

1. C14:0
2. C16:0
3. C16:1n7
4. C18:0
5. C18:1n9
6. C18:1n7
7. C18:2n6
8. C18:3n6
9. C18:3n3
10. C20:1n9
11. C20:2n6
12. C20:3n6
13. C20:4n6 (ARA)
14. C20:5n3 (EPA)
15. C22:4n6
16. C22:5n3
17. C22:6n3 (DHA)

그림 6. 30m × 0.25mm id, 0.25µm Agilent J&W DB-FATWAX Ultra Inert GC 컬럼을 사용한 PUFA No.2 혼합물(동물에서 채취한 시료)의 GC/FID 크로마토그램



파라미터	값
컬럼	Agilent DB-FATWAX UI, 30m × 0.25mm, 0.25µm
주입구	250°C, split/splitless mode, split ratio 100:1
운반 가스	헬륨, 일정 유속 모드, 30cm/s, 180°C
오븐	180°C(2min), 2°C/min to 210°C(35min)
FID	280°C
주입량	1µL

1. C14:0
2. C16:0
3. C16:1n7
4. C16:2n4
5. C16:3n4
6. C16:4n1
7. C18:0
8. C18:1n9
9. C18:1n7
10. C18:2n6
11. C18:3n3
12. C18:3n4
13. C18:4n3
14. C20:1n9
15. C20:4n6 (ARA)
16. C20:4n3
17. C20:5n3(EPA)
18. C22:5n3
19. C22:6n3(DHA)

그림 7. 30m × 0.25mm id, 0.25µm Agilent J&W DB-FATWAX Ultra Inert GC 컬럼을 사용한 PUFA No.3 혼합물(청어 기름)의 GC/FID 크로마토그램

결론

이 응용 자료는 FAME 분석용으로 설계된 3가지 Capillary 컬럼을 이용해 향상된 37가지 성분 FAME 혼합물 표준품에 대한 분석 결과를 다루고 있습니다. 높은 극성의 시아노프로필 실록산 상으로 코팅된 Agilent J&W CP-Sil 88 for FAME 컬럼은 *cis-trans* 이성질체 분리에 적합합니다. 이 분석 결과, FAME 혼합물 표준품 내 모든 37가지 성분이 CP-Sil 88 for FAME 컬럼에서 베이스라인 분리되었습니다. Agilent J&W DB-FastFAME GC 컬럼은 또한 37가지 성분 FAME 혼합물 표준품 분석에서 탁월한 분리능을 선보였습니다. 고효율 0.18mm id DB-FastFAME GC 컬럼은 혼합물 표준품 내 모든 성분을 완벽하게 분리할 수 있으며, 분석 시간은 8분 이내였습니다. 이 분석에서는 고효율 컬럼을 이용해 분리능의 손실 없이 빠른 시료 분석이 가능했습니다. Agilent J&W DB-FATWAX UI 컬럼은 대부분의 포화 및 다중불포화 FAME에 대해 독보적인 선택성을 보였습니다. C18:1 *cis-trans* 이성질체를 제외하고, C18:2 C18:2 *cis-trans* 이성질체를 포함해 ARA, EPA, DHA 등 여타 FAME은 모두 제대로 분리되었습니다. 이 컬럼은 어유, 육류 지방, 주요 오메가 3 및 오메가 6 FAME 분석에 최적입니다.

참고문헌

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

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2017, 2018
2018년 5월 29일, 한국에서 인쇄
5991-8706KO

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