

改善对 37 种脂肪酸甲酯的分析

使用三种类型的毛细管气相色谱柱

作者

Yun Zou

安捷伦科技（上海）有限公司，
中国上海，邮编 200131

Hua Wu

安捷伦科技（中国）有限公司，
中国北京，邮编 100102

摘要

脂肪酸甲酯 (FAME) 的分析可用于鉴定食品中的脂类组分，是食品分析中最重要的应用之一。本应用简报详细介绍了在 Agilent J&W CP-Sil 88 FAME 分析专用柱、Agilent J&W DB-FastFAME 柱和 Agilent J&W DB-FATWAX 超高惰性气相色谱柱上分离 37 组分 FAME 混标的相关信息。结果证明，使用 CP-Sil 88 FAME 分析专用柱能够获得良好的分离度。高效的 DB-FastFAME 色谱柱能够仅在 8 分钟内实现 37 种 FAME 的良好分离。而 DB-FATWAX 超高惰性色谱柱为大多数饱和与多不饱和 FAME 提供了独特的选择性。

前言

脂肪在食品营养与食品化学领域的研究中发挥着重要作用。脂肪由复杂的脂肪酸混合物组成，包括饱和、单不饱和以及多不饱和的各种碳链长度的化合物。由于脂肪酸在体内的作用取决于结构的不同，因此有必要对食品中含有的脂肪酸进行详细的组成分析。测定食品中的总脂肪与反式脂肪含量时，对脂肪酸及其甲酯衍生物 (FAME) 的气相色谱分析是脂肪表征的重要工具^{1,2}。不同的固定相以及其他色谱柱规格（如色谱柱长度、内径和膜厚）的选择主要取决于脂肪酸组成的复杂性与分离的具体要求。

常规情况下，使用聚乙二醇 (PEG) 型毛细管柱对海洋鱼油和肉类样品进行 FAME 分析，包括测定乳脂中的丁酸。这是因为 PEG 毛细管柱能够根据碳链长度和不饱和度分别洗脱 FAME 异构体。而据报道，PEG 色谱柱有一个严重局限，就是无法实现顺式-反式的分离。所有的顺反异构体均会发生共洗脱³。

许多常规的食品检测方法中，在使用 GC/FID 测定脂肪酸组成时都要求对特定的顺反脂肪酸异构体进行分离。分析食用油等更复杂的样品时，使用涂覆氰丙基固定相的毛细管柱能够获得出色的分离度。具有中等含量氰丙基固定相的 Agilent J&W DB-FastFAME 色谱柱能够实现复杂 FAME 混合物的快速出色分离以及某些顺反异构体的分离。如果需要实现更精细的顺反分离，首选强极性的氰丙基聚硅氧烷型色谱柱 (CP-Sil 88 FAME 分析专用柱/HP-88 柱)。而在氰丙基聚硅氧烷固定相上，一些碳链长度经常重叠，引起峰识别问题。因此需要较长的气相色谱柱（如 100 m）和较长的分析时间来实现良好分离，但这又会导致效率低下。

37 组分 FAME 混标专门为模拟多种食品样品的脂肪酸组成而设计，可用于鉴定多种食品中的关键脂肪酸甲酯 (FAME)。该混标中包含 C4:0 至 C24:1 范围的 FAME，包括多数重要的饱和、单不饱和和多不饱和 FAME（表 1）。

本应用简报介绍了使用以下三种类型 FAME 分析专用毛细管柱对 37 组分 FAME 混合物进行分析：Agilent J&W CP-Sil 88 FAME 分析专用柱、DB-FastFAME 柱和 Agilent J&W DB-FATWAX 超高惰性气相色谱柱。

实验部分

试剂与标准品

37 组分 FAME 混标（部件号 CDAA-252795-MIX-1 mL）购自上海安谱科学仪器有限公司。表 1 列出了混合物中每种组分的浓度。

PUFA No.1（来自海洋）、PUFA No.2（来自动物）和 PUFA No.3（来自鲑鱼油）购自深圳市明博林生物科技有限公司。混合物为 100 mg 净混合物，分别用丙酮稀释 100 倍。

仪器

使用配备火焰离子化检测器 (FID) 的 Agilent 7890B 气相色谱仪进行分析。使用配备 5 μ L 进样针（部件号 G4513-80213）和分流/不分流进样口的 Agilent 7683B 自动液体进样器进样。仪器配置与分析条件总结于表 2（CP-Sil 88 FAME 专用柱）、表 3（DB-FastFAME 色谱柱）、表 4（高效 DB-FastFAME 色谱柱）和表 5（DB-FATWAX UI 色谱柱）。表 6 列出了本研究中使用的其他备件。

表 1. 37 组分 FAME 混合物

编号	化合物 (甲酯)	缩写	浓度 (mg/mL)
1	丁酸	C4:0	403
2	羊蜡酸	C6:0	404
3	亚羊脂酸	C8:0	406
4	羊脂酸	C10:0	403
5	十一酸	C11:0	200
6	月桂酸	C12:0	399
7	十三酸	C13:0	200
8	肉豆蔻酸	C14:0	397
9	肉豆蔻油酸	C14:1	202
10	十五酸	C15:0	202
11	顺式-10-十五碳烯酸	C15:1	200
12	棕榈酸	C16:0	599
13	棕榈油酸	C16:1	200
14	十七酸	C17:0	201
15	顺式-10-十七碳烯酸	C17:1	200
16	硬脂酸	C18:0	399
17	油酸	C18:1 顺式 (n9)	400
18	反油酸	C18:1 反式 (n9)	200
19	亚油酸	C18:2 顺式 (n6)	203
20	反亚油酸	C18:2 反式 (n6)	200
21	γ -亚麻酸	C18:3n6	203
22	α -亚麻酸	C18:3n3	199
23	花生酸	C20:0	406
24	顺式-11-二十碳烯酸	C20:1(n9)	199
25	顺式-11,14-二十碳二烯酸	C20:2	200
26	顺式-8,11,14-二十碳三烯酸	C20:3n6	202
27	顺式-11,14,17-二十碳三烯酸	C20:3n3	200
28	花生四烯酸	C20:4n6 (ARA)	198
29	顺式-5,8,11,14,17-二十碳五烯酸	C20:5n3 (EPA)	201
30	二十一烷酸	C21:0	201
31	山萘酸	C22:0	400
32	芥酸	C22:1n9	202
33	顺式-13,16-二十碳二烯酸	C22:2	199
34	顺式-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸	C22:6(n3) (DHA)	197
35	二十三酸	C23:0	200
36	二十四酸	C24:0	405
37	神经酸	C24:1	201

表 2. Agilent J&W CP-Sil 88 FAME 分析专用柱方法条件

参数	值
气相色谱系统	Agilent 7890B/FID
色谱柱	Agilent J&W CP-Sil 88 FAME 分析专用柱, 100 m \times 0.25 mm, 0.20 μ m (部件号 CP7489)
载气	氦气, 32 psi, 恒压模式
进样口	分流/不分流, 260 $^{\circ}$ C, 分流比 50:1
柱温箱	100 $^{\circ}$ C (5 min), 8 $^{\circ}$ C/min 升至 180 $^{\circ}$ C (9 min), 1 $^{\circ}$ C/min 升至 230 $^{\circ}$ C (15 min)
FID	260 $^{\circ}$ C, 氢气: 40 mL/min 空气: 400 mL/min 尾吹气: 25 mL/min
进样量	1 μ L

表 3. Agilent J&W DB-FastFAME 方法条件

参数	值
气相色谱系统	Agilent 7890B/FID
色谱柱	Agilent J&W DB-FastFAME, 30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m (部件号 G3903-63011)
载气	氦气, 19 psi, 恒压模式
进样口	分流/不分流, 250 $^{\circ}$ C, 分流比 50:1
柱温箱	50 $^{\circ}$ C (0.5 min), 30 $^{\circ}$ C/min 升至 194 $^{\circ}$ C (3.5 min), 5 $^{\circ}$ C/min 升至 240 $^{\circ}$ C (1 min)
FID	280 $^{\circ}$ C, 氢气: 40 mL/min 空气: 400 mL/min 尾吹气: 25 mL/min
进样量	1 μ L

表 4. 高效 Agilent J&W DB-FastFAME 方法条件

参数	值
气相色谱系统	Agilent 7890B/FID
色谱柱	Agilent J&W DB-FastFAME, 20 m \times 0.18 mm, 0.20 μ m (G3903-63010)
载气	氦气, 28 psi, 恒压模式
进样口	分流/不分流, 250 $^{\circ}$ C, 分流比 50:1
柱温箱	80 $^{\circ}$ C (0.5 min), 65 $^{\circ}$ C/min 升至 175 $^{\circ}$ C, 10 $^{\circ}$ C/min 升至 185 $^{\circ}$ C (0.5 min), 7 $^{\circ}$ C/min 升至 230 $^{\circ}$ C
FID	280 $^{\circ}$ C, 氢气: 40 mL/min 空气: 400 mL/min 尾吹气: 25 mL/min
进样量	1 μ L

表 5. Agilent J&W DB-FATWAX 超高惰性柱方法条件

参数	值
气相色谱系统	Agilent 7890B/FID
色谱柱	Agilent J&W DB-FATWAX 超高惰性柱, 30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m (部件号 G3903-63008)
载气	氦气, 恒流模式, 30 cm/s
进样口	分流/不分流, 250 $^{\circ}$ C, 分流比 50:1
柱温箱	40 $^{\circ}$ C (2 min), 55 $^{\circ}$ C/min 升至 171 $^{\circ}$ C (25 min), 10 $^{\circ}$ C/min 升至 215 $^{\circ}$ C (25 min)
FID	280 $^{\circ}$ C, 氢气: 40 mL/min 空气: 400 mL/min 尾吹气: 25 mL/min
进样量	1 μ L

结果与讨论

强极性氰丙基聚硅氧烷固定相（如 CP-Sil 88 FAME 专用柱或 HP-88 柱），是专门以改善顺反式 FAME 分离为目的进行设计的。之前的研究中成功地证明了强极性氰丙基聚硅氧烷色谱柱对反式脂肪酸的测定效果。然而，很多应用中 37 组分 FAME 分析的洗脱图案都出现显著的碳链重叠，例如，C18:3n6、C18:3n3 和 C20:0；C20:3n3、C22:1n9 和 C20:4n6³。这会导致峰的识别出现问题。图 1 显示使用 CP-Sil 88 FAME 分析专用柱和 GC-FID 以优化方法分离 37 组分 FAME 参比标样获得了优异的选择性；所有 37 个组分均在一次运行中达到基线分离。

为了使 37 组分 FAME 混标中的所有化合物都获得良好的分离度，实验中选择了 100 m 的 CP-Sil 88 FAME 分析专用气相色谱柱，并将分析时间延长至 70 分钟以上。

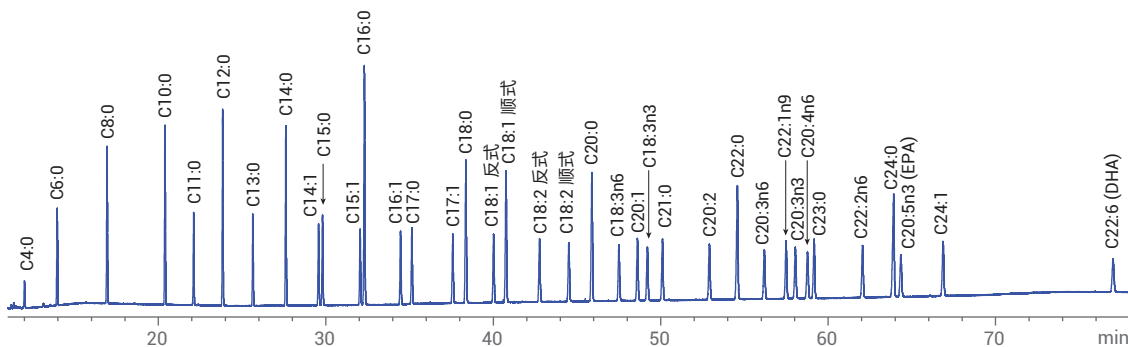


图 1. 使用方法 1（参见表 2），37 组分 FAME 混标在 100 m × 0.25 mm 内径、0.25 μm Agilent J&W CP-Sil 88 FAME 分析专用柱上得到的 GC/FID 色谱图

表 6. 流路备件

参数	值
样品瓶	棕色，带书写签，经认证，2 mL，螺口盖样品瓶套装（部件号 5182-0554）
隔垫	不粘连 BTO 隔垫（部件号 5183-4757）
柱螺帽	手拧式，进样口/检测器（部件号 5190-6194）
密封垫圈	15% 石墨：85% Vespel，短型，内径 0.4 mm，用于 0.1–0.25 mm 色谱柱（10/包，部件号 5181-3323）
衬管	带玻璃毛的安捷伦超高惰性分流衬管（部件号 5190-2295）
进样口密封垫	超高惰性，镀金，带垫圈（部件号 5190-6144）

分析复杂混合物中这些种类的 FAME 时使用的另一种替代方案是具有中等含量氰丙基固定相的气相色谱柱。J&W DB-FastFAME 气相色谱柱经过专门设计，可实现 FAME 混合物的快速分离。由于顺式异构体与氰基有较强的偶极相互作用，反式异构体比顺式异构体更早洗脱。因此，顺式与反式 FAME 可实现分离。

J&W DB-FastFAME 气相色谱柱

选择使用 30 m × 0.25 mm 内径、0.25 μm DB-FastFAME 色谱柱对 37 组分 FAME 混标进行分析。图 2 示出了典型 GC-FID 色谱图。混标中的所有化合物都得到了良好分离，分析时间不到 18 分钟。

高效 0.18 mm 内径气相色谱柱是一种改善分析效率而不损失测定性能的方法。这是因为减小内径能够增加色谱柱每米的柱效；如需保持分离度不变，可以缩短色谱柱长度。使用氢气作为载气能够加快分析速度且分离度几乎不变，这是因为氢气的高扩散性使最佳线性载气流速有所增大。图 3 所示为 37 组分 FAME 混标在 20 m × 0.18 mm 内径、0.20 μm DB-FastFAME

色谱柱上的分离结果。该方法将混标中的化合物完全分离（分离度 > 1.5），包括关键 AOAC 对，并将运行时间缩短至 8 分钟以内，表明使用高效色谱柱能够实现快速样品通量，而分离度不受影响。

可在图 2 和图 3 中观察到两种化合物对（EPA/c22:0 和 DHA/C24:1）的不同洗脱顺序。在温度程序运行中改变进样口压力，可能会改变化合物所受到的有效温度。如果改变载气、使用不同的进样口压力和膜厚度，可改变这两种化合物对在 DB-FastFAME 气相色谱柱上的洗脱顺序，进而实现用于复杂混合物中 EPA 和 DHA 分析的方法的优化。

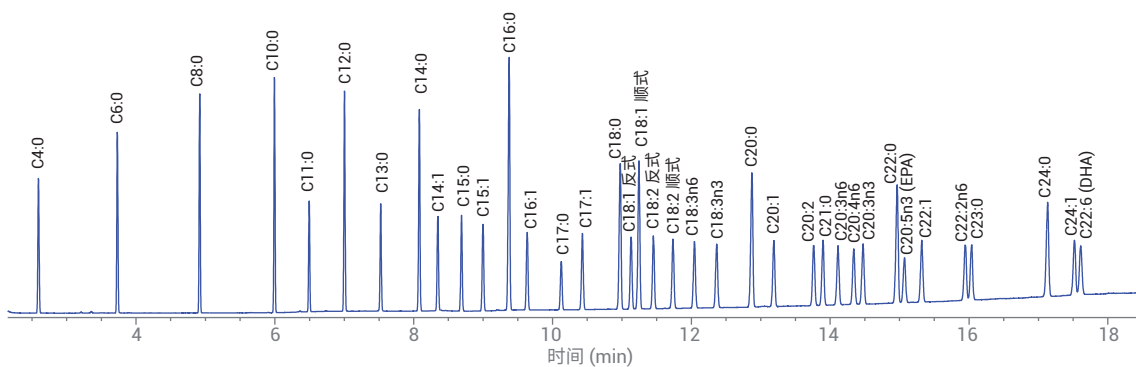


图 2. 使用方法 2（参见表 3），37 组分 FAME 混标在 30 m × 0.25 mm 内径、0.25 μm Agilent J&W DB-FastFAME 色谱柱上得到的 GC/FID 色谱图

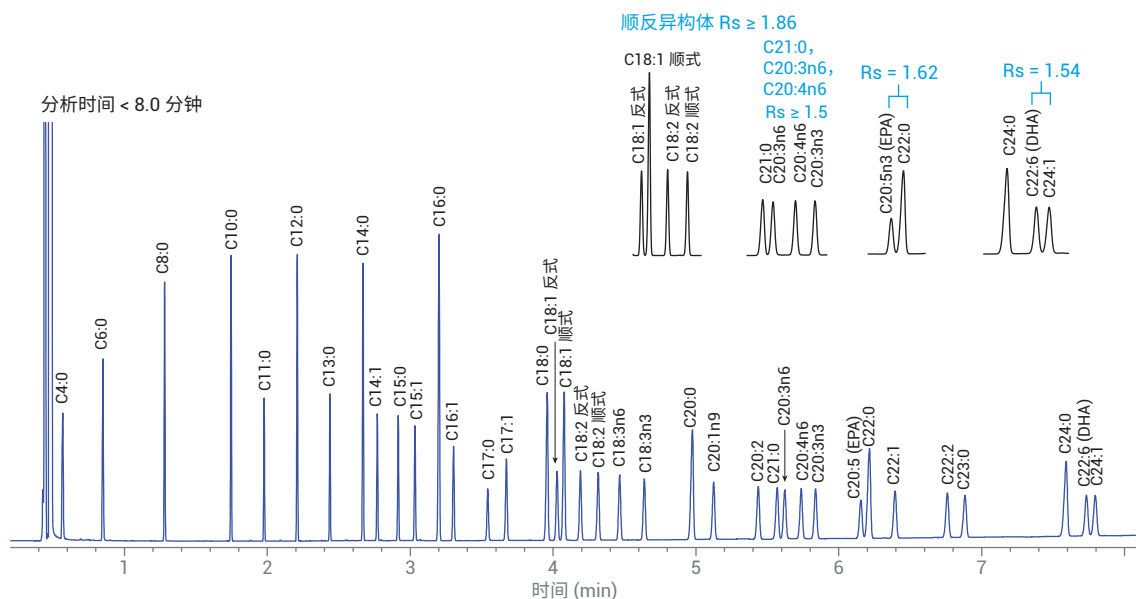


图 3. 使用方法 3（参见表 4），37 组分 FAME 混标在 20 m × 0.18 mm 内径、0.20 μm Agilent J&W DB-FastFAME 色谱柱上得到的 GC/FID 色谱图

通常情况下，PEG 色谱柱（WAX 色谱柱）可用于传统食用油和脂肪、海洋鱼油和肉类样品的 FAME 分析（包括乳脂中丁酸的测定）。这是因为它们能够根据碳链长度和不饱和度洗脱 FAME 异构体。但是结果中存在一些重叠，例如 C20:3 n6 和 C21:1 未能分离，而且 C22:6 与 C24:1 仍共洗脱；所有顺反异构体在传统 WAX 色谱柱上均未得到分离。

引入 J&W DB-FATWAX 超高惰性 (UI) 气相色谱柱有助于改善性能。图 4 所示为 37 组分 FAME 混标在 30 m × 0.25 mm 内径，0.25 μm DB-FATWAX 超高惰性气相色谱柱上的分离结果。除了 C18:1 顺式和 C18:1 反式异构体对均获得了良好的分离度；分离度为 0.56。这一对化合物在其他 WAX 色谱柱上通

常共洗脱，显示为一个峰。另一对顺反异构体顺式 C18:2 和反式 C18:2 可以在 DB-FATWAX 超高惰性气相色谱柱上实现基线分离，说明 DB-FATWAX 超高惰性色谱柱能够为多种顺式和反式异构体提供分离度，并使顺式异构体首先洗脱。

一组多不饱和脂肪酸 (PUFA) 中含有多个对人类营养有重大意义的双键，包括 Omega-3 和 Omega-6 脂肪酸，例如 C20:5n3 (EPA)、C22:6n3 (DHA) 和 C20:4n6 (ARA)。图 4 显示，这些 Omega-3 和 Omega-6 FAME 具有良好的分离度。图 5-7 提供了 PUFA 混合物的分离示例。关键 FAME 包括 EPA 和 DHA，可以轻松实现检测和定量分析。

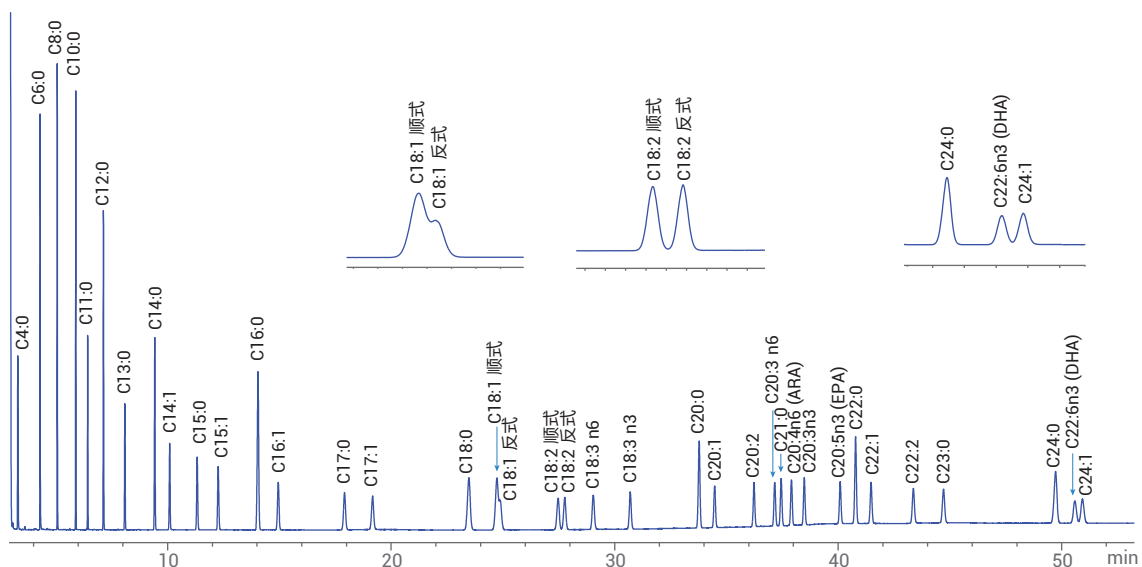
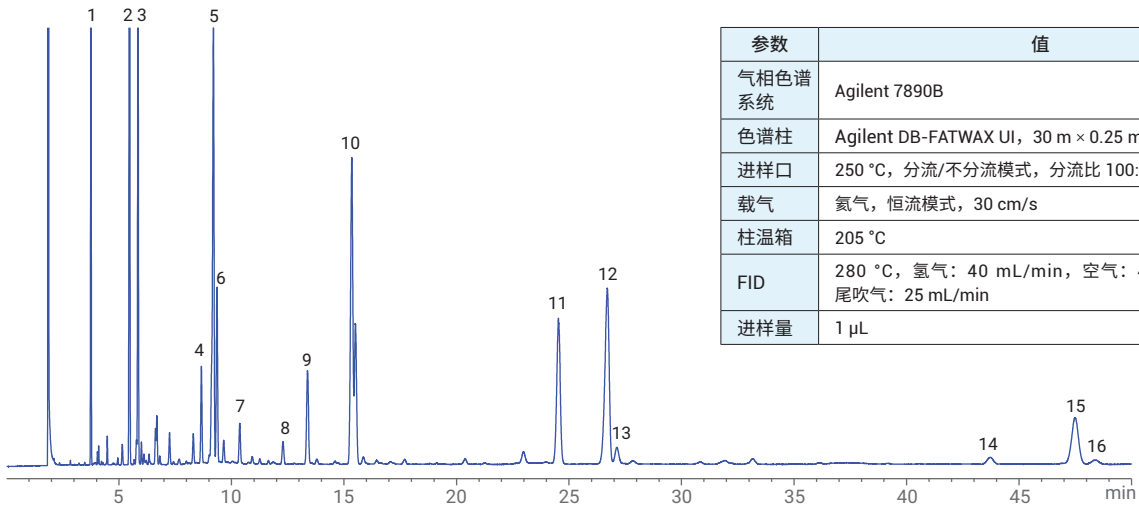


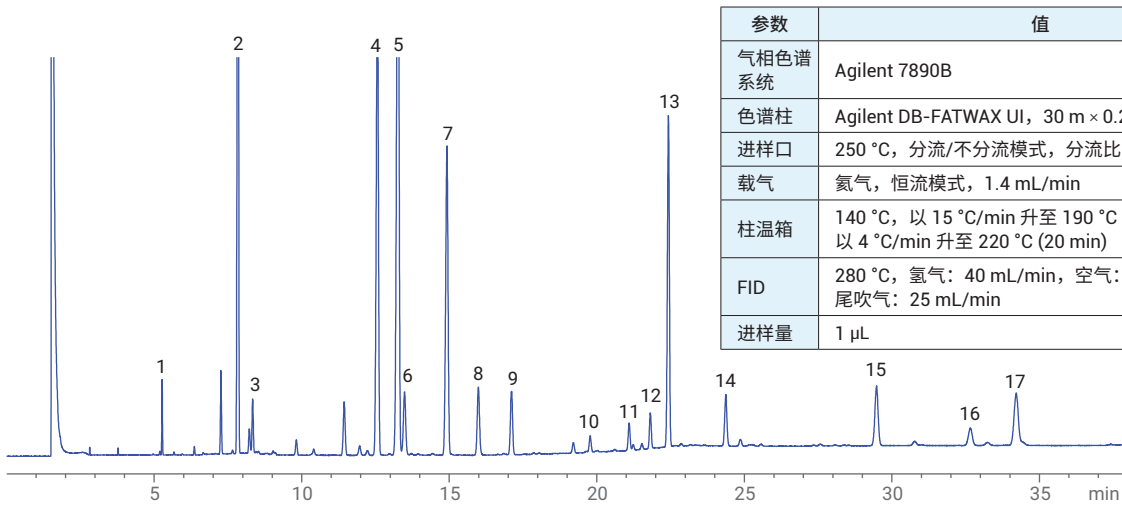
图 4. 使用方法 4（参见表 5），37 组分 FAME 混标在 30 m × 0.25 mm 内径、0.25 μm Agilent J&W DB-FATWAX 超高惰性气相色谱柱上得到的 GC/FID 色谱图



参数	值
气相色谱系统	Agilent 7890B
色谱柱	Agilent DB-FATWAX UI, 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm
进样口	250 °C, 分流/不分流模式, 分流比 100:1
载气	氮气, 恒流模式, 30 cm/s
柱温箱	205 °C
FID	280 °C, 氢气: 40 mL/min, 空气: 400 mL/min, 尾吹气: 25 mL/min
进样量	1 μL

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. C18:4n3
10. C20:1n9
11. C20:5n3 (EPA)
12. C22:1n11
13. C22:1n9
14. C22:5n3
15. C22:6n3 (DHA)
16. C24:1n9

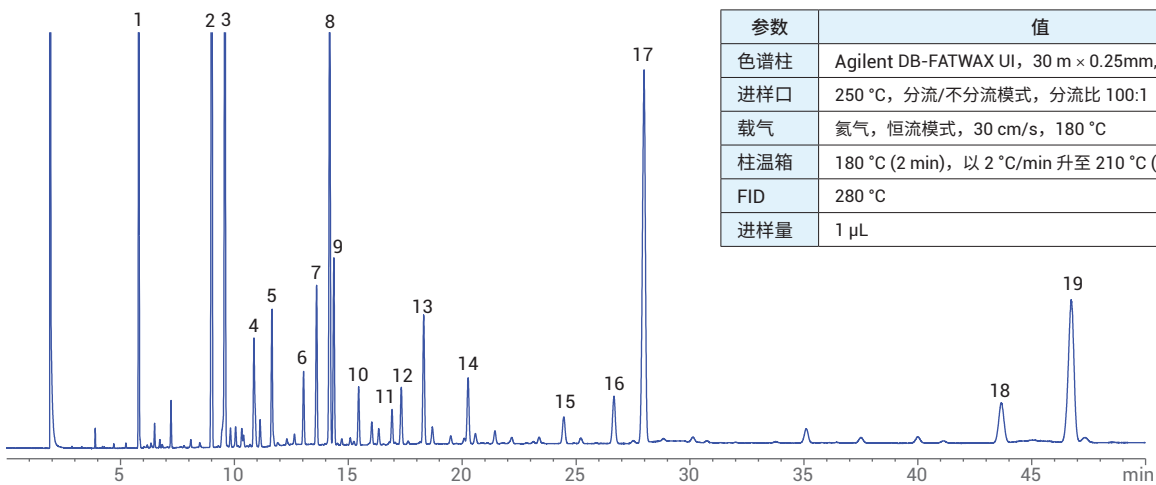
图 5. PUFA No.1 混合物 (来自海洋) 在 30 m × 0.25 mm 内径、0.25 μm Agilent J&W DB-FATWAX 超高惰性气相色谱柱上获得的 GC/FID 色谱图



参数	值
气相色谱系统	Agilent 7890B
色谱柱	Agilent DB-FATWAX UI, 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm
进样口	250 °C, 分流/不分流模式, 分流比 100:1
载气	氮气, 恒流模式, 1.4 mL/min
柱温箱	140 °C, 以 15 °C/min 升至 190 °C (11 min), 以 4 °C/min 升至 220 °C (20 min)
FID	280 °C, 氢气: 40 mL/min, 空气: 400 mL/min, 尾吹气: 25 mL/min
进样量	1 μL

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)

图 6. PUFA No.2 混合物 (来自动物) 在 30 m × 0.25 mm 内径、0.25 μm Agilent J&W DB-FATWAX 超高惰性气相色谱柱上获得的 GC/FID 色谱图



参数	值
色谱柱	Agilent DB-FATWAX UI, 30 m × 0.25mm, 0.25 μm
进样口	250 °C, 分流/不分流模式, 分流比 100:1
载气	氮气, 恒流模式, 30 cm/s, 180 °C
柱温箱	180 °C (2 min), 以 2 °C/min 升至 210 °C (35 min)
FID	280 °C
进样量	1 μL

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)

图 7. PUFA No.3 混合物 (来自鲑鱼油) 在 30 m × 0.25 mm 内径、0.25 μm Agilent J&W DB-FATWAX 超高惰性气相色谱柱上获得的 GC/FID 色谱图

结论

本应用简报介绍了使用三种专为 FAME 分析设计的毛细管柱来改善对 37 组分 FAME 混标的分析。强极性氰丙基聚硅氧烷固定相 Agilent J&W CP-Sil 88 FAME 分析专用柱是分离顺式和反式异构体的首选。本研究中展示了在 CP-Sil 88 FAME 分析专用柱上对 37 组分 FAME 混标中所有化合物的基线分离。Agilent J&W DB-FastFAME 气相色谱柱也能够为 37 组分 FAME 混标的分析提供出色的分离度。高效的 0.18 mm 内径 DB-FastFAME 气相色谱柱可以完全分离混标中的所有化合物，并将运行时间缩短至 8 分钟以内。而且使用高效色谱柱能够实现快速样品通量，而分离度也不受影响。Agilent J&W DB-FATWAX 超高惰性色谱柱为大多数饱和与多不饱和 FAME 提供了独特的选择性。除 C18:1 顺反异构体外，其他 FAME（包括 C18:2 顺式和反式异构体）均能够完全分离，例如 ARA、EPA 和 DHA。因此该色谱柱非常适用于分析鱼油、肉类脂肪和关键的 Omega 3 和 Omega 6 FAME。

参考文献

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. 脂肪酸甲酯分析色谱柱的选择, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5989-3760CHCN, **2005**

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。