

Agilent 8890 GC를 이용한 Fatty Acid Methyl Ester(FAME) 분석 및 실제 시료 응용

저자

Jie Zhang
Agilent Technologies, Inc.
Shanghai, China

개요

본 응용 자료는 Agilent 8890 GC의 길이가 길고 극성인 컬럼을 이용하여 GB5009.168-2016¹ 및 5009.257-2016² 분석법을 FAME 분석에 적용하였습니다. 이 GC 분석법은 대표적인 FAME 37종 및 *trans* FAME 21종을 80분 내에 분리하도록 최적화하였습니다. 시스템 머무름 시간(RT), 면적 재현성 및 직선성을 평가하였고, 실제 오일 시료를 전처리한 FAME 혼합물을 분석하였습니다.

서론

지방은 주로 지방산 및 글리세롤의 triester이며, 일반적으로 triglyceride라고 부릅니다. 영양성분표에서, 지방은 식품의 지방산 총합으로 정의되며 출처와 무관하게 triglyceride 등가물로 표시합니다. 지방산의 종류는 다양하며, 불포화도에 따라

분류합니다. 포화(saturated), 단일불포화(monounsaturated) 및 다불포화(polyunsaturated) *trans* 지방산은 불포화 지방산으로서, 적어도 하나의 비공연계(non-conjugate) 및 *trans* 이중 결합을 포함합니다.

식품의 지방 함량은 항상 널리 논의되고 면밀히 조사되는 영양 요소입니다. 건강, 영양, 체중 감량 등을 위해 많은 구매자들은 식품의 지방 함양에 주목합니다.

식품의 지방 분석을 위해 GB 5009.168-2016¹ 및 GB 5009.257-2016² 등과 같은 많은 분석법이 개발되었습니다. 이 두 가지 분석법은 서로 다른 식품 매질에서의 지방 추출 및 지방산의 *trans*-에스테르화로 fatty acid methyl esters(FAME) 변환 접근법과 분리 및 데이터 분석을 위한 권장 GC 분석법을 기술합니다. 분석법 168은 주로 대표적인 지방산 37종 분석에, 분석법 257은 *trans* 지방산 분석에 중점을 두고 있습니다.

재료

장비

- 분할/비분할 주입구 및 FID 검출기를 갖춘 Agilent 8890 GC
- Agilent 7693A 자동 시료 주입기(ALS) (p/n G4567A)

화학 물질

- 37성분 FAME 혼합물(CDAA-252795-MIX-1mL)은 ANPEL Laboratory Technologies(Shanghai) Inc.에서 구매, 200~400ng/ μ L 농도 범위로 C4~C24 FAME 포함.

기기

표 1. 기기 조건

GC 시스템	8890A GC
S/SL 주입구	250°C, 분할비 100:1,
라이너	Split, Ultra inert, glass wool, low pressure drop(p/n 5190-2295)
오븐 승온 프로그램	100°C(13분), 10°C/분으로 180°C까지(6분), 1°C/분으로 200°C까지(20분), 4°C/분으로 230°C까지(7분)
운반 가스	질소, 40psi, 일정 압력 모드
컬럼	Agilent HP-88, 100m×0.25mm, 0.20 μ m(p/n 112-88A7)
검출기	280°C, H ₂ : 40mL/분 공기: 400mL/분 보충 가스: 25mL/분

- 13성분 *trans* FAME 혼합물(CDAA-2527,15~100mg) 및 8성분 *cis/trans* octadecatrienoic acid methyl esters(CDAB-CRM47792), ANPEL Laboratory Technologies(Shanghai) Inc.에서 구매, 두 혼합물의 각 성분에 대한 %중량 범위는 3~30%임.

시료

GB 5009. 168-2016에 따라 Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research에서 대두유, 땅콩 기름 및 참기름 시료를 제공 및 전처리하였습니다.

결과 및 토의

GB 5009.168-2016의 권장 오븐 온도 프로그램을 사용하였습니다. 일정 압력 모드로 컬럼 헤드 압력을 40psi로 최적화하여 주요 화합물 쌍인 C20:0/C20:3n6에 대해 최소 분리능 1.3인 만족스러운 분리를 얻었으며, 이는 분석법에 명시된 분리능 요건 1.25를 초과한 값입니다.

37종 FAME 표준 혼합용액의 각 성분 농도를 50~100ng/ μ L으로 희석하고 시스템 반복성 시험에 사용하였습니다. 많은 식품 시료의 지방산 성분을 모방하도록 설계되었기 때문에, 이 표준물질은 GB 분석법에 따라 선택되었습니다. 오븐 승온 프로그램은 꽤 길었습니다. 그림과 같이, 37종 FAME는 81분만에 분리되었습니다(그림 1). 모든 성분은 양호하게 분리되었습니다. 6회 주입, 오버레이 크로마토그램은 우수한 면적 및 RT 반복성을 보였습니다(그림 1). 각 피크의

RT, 면적 및 정밀도는 표 2와 같습니다. 면적 반복성은 1.1~3.4% 범위(그림 2)이고, 한 성분의 면적 RSD%는 4.0%였습니다. 시료 용매는 hexane이며, 분석 시간은 주입 당 80분 이상으로, 분리하는 동안 시료(특히 용매)의 증발로 시료 농도가 약간 변하였습니다. 각 성분에 대해 컬럼에 로딩된 시료 양은 0.5~1ng 범위였습니다. 용매 증발로 인해 소량인 시료의 면적 RSD%는 2%를 살짝 초과하였지만, 여전히 정량 요건을 만족하였습니다.

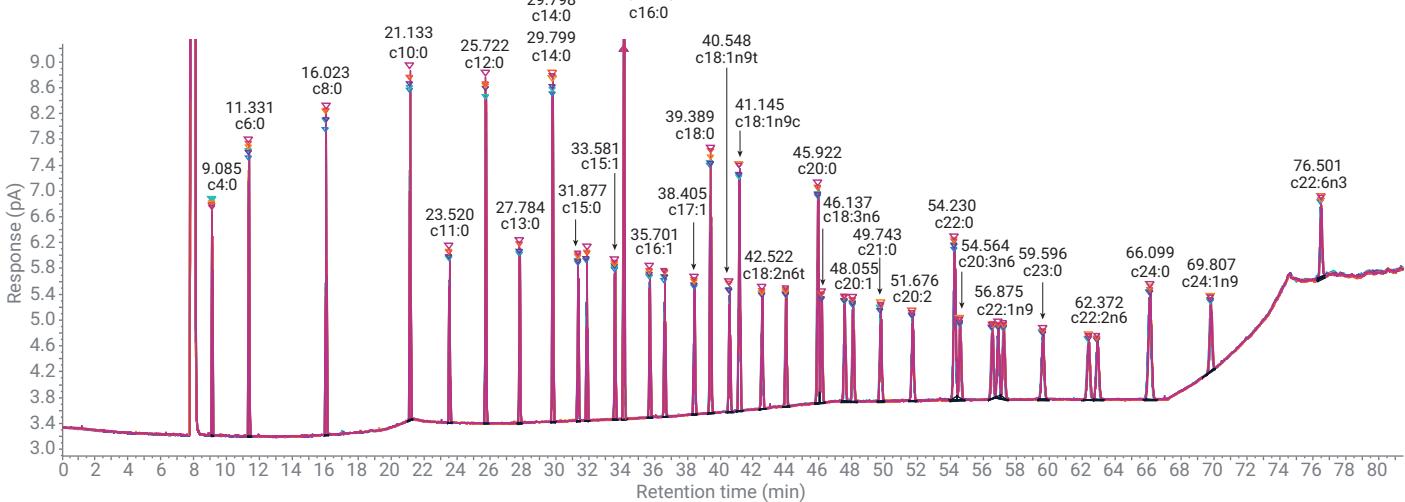


그림 1. 8890 GC을 이용한 37종 FAME의 6회 주입 오버레이 크로마토그램

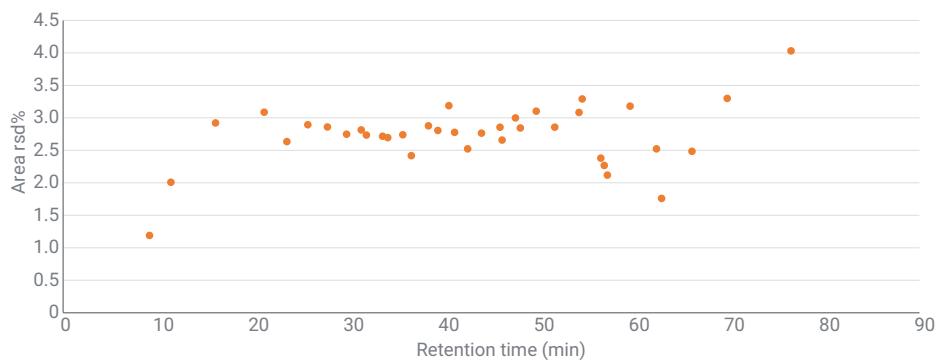


그림 2. 6회 주입, 37종 FAME의 면적 정밀도

머무름 시간 반복성은 0.01~0.03% 범위였습니다(그림3). 긴 분석 시간으로 시스템의 탁월한 반복성 실현은 더욱 어려워졌지만, 8890A GC는 오븐 온도, 주입구 압력 및 검출기 유속의 정확하고 정밀하며 안정적인 제어로 높은 반복성을 가진 크로마토그램의 생성을 지원하고 신뢰할 수 있는 식별 결과를 보장합니다.

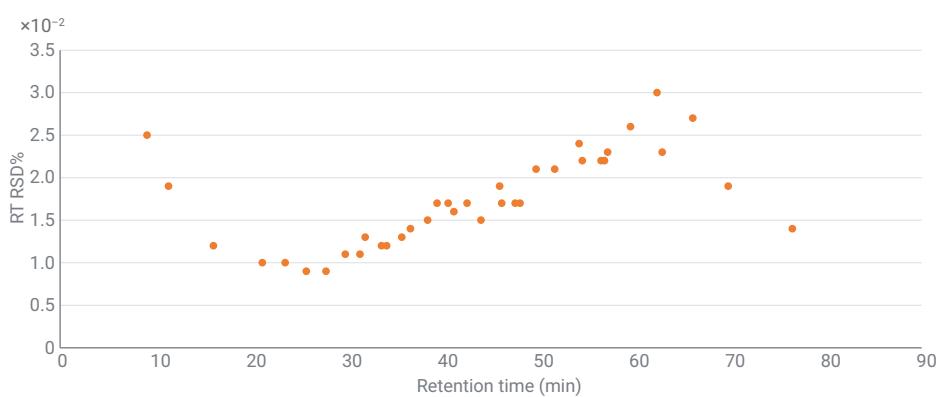


그림 3. 6회 주입, 37종 FAME의 RT 정밀도

표2. 6회 주입, 37종 화합물의 RT, 면적 및 정밀도

화합물	평균 RT (분)	RT RSD (%)	평균 면적	면적 RSD (%)
C4:0	9.086	0.025	6.903	1.189
C6:0	11.331	0.019	12.795	2.008
C8:0	16.022	0.012	16.599	2.921
C10:0	21.131	0.01	17.995	3.086
C11:0	23.518	0.01	9.365	2.633
C12:0	25.721	0.009	18.702	2.893
C13:0	27.783	0.009	9.655	2.859
C14:0	29.796	0.011	19.362	2.747
C14:1	31.333	0.011	9.57	2.813
C15:0	31.874	0.013	9.9	2.733
C15:1	33.58	0.012	9.818	2.716
C16:0	34.119	0.012	29.97	2.694
C16:1	35.699	0.013	9.999	2.739
C17:0	36.602	0.014	10.125	2.417
C17:1	38.4	0.015	10.053	2.876
C18:0	39.385	0.017	20.432	2.805
C18:1n9t	40.544	0.017	10.294	3.186
C18:1n9c	41.142	0.016	20.389	2.776
C18:2n6t	42.519	0.017	10.188	2.522

화합물	평균 RT (분)	RT RSD (%)	평균 면적	면적 RSD (%)
C18:2n6c	43.972	0.015	10.363	2.763
C20:0	45.919	0.019	20.719	2.854
C18:3n6	46.135	0.017	10.003	2.657
C18:3n3	47.54	0.017	10.167	2.998
C20:1	48.052	0.017	10.354	2.843
C21:0	49.731	0.021	10.554	3.102
C20:2	51.671	0.021	10.302	2.855
C22:0	54.225	0.024	21.046	3.082
C20:3n6	54.554	0.022	10.28	3.29
C20:3n3	56.514	0.022	10.244	2.379
C22:1n9	56.871	0.022	10.273	2.266
C20:4n6	57.204	0.023	10.633	2.117
C23:0	59.588	0.026	10.693	3.179
C22:2n6	62.36	0.03	10.415	2.521
C20:5n3	62.903	0.023	10.177	1.758
C24:0	66.093	0.027	21.326	2.484
C24:1n9	69.797	0.019	10.863	3.298
C22:6n3	76.499	0.014	9.456	4.03

다섯 가지 농도 수준에서 C18:1c FAME 및 C18:2c FAME의 감응 계수(RF) 상대 표준 편차(RSD%)를 계산하여 시스템 직선성을 평가하였습니다. 표 3은 두 개의 프로브 화합물에 대해 4%의 낮은 RF RSD%를 보여주며, 피크 감응 측면에서 우수한 직선성을 보여줍니다. 일부 실험실은 정량에 ESTD법을 사용합니다; 넓은 농도 범위에서의 우수한 검출기 직선성은 단일 포인트 ESTD 법의 사용에도 정확한 정량을 보장할 수 있습니다.

그림 4는 13성분 *trans* FAME 및 8성분 octadecatrienoic acid methyl esters 이성질체 혼합물의 분리입니다. 결과는 GB 5009.257-2016에 부합합니다. 사용한 오븐 온도 프로그램은 37종 FAME 혼합물 분석과 동일합니다. 특히 동일 분석에 C18:3 FAME와 함께 있는 다른 FAME를 반드시 분리해야 하는 것을 고려할 때, C18:3 *trans* FAME 이성질체의 여덟 가지 이성질체 분리는 대단히 어려운 문제입니다. 그러나, 100m 길이 HP-88 컬럼은 octadecatrienoic acid methyl esters의

확대한 용리 부분에서 8개 이성질체에 대한 피크 8개를 나타냈습니다(그림 5). 베이스라인 분리와 분해능은 큰 차이가 있지만, GB 5009.257-2016의 참조 크로마토그램과 비교했을 때 달성한 분리는 허용 한계 내에 있음을 알 수 있습니다. 또한, cis-9,cis-12,cis-15-octadecatrienoic acid methyl ester는 다른 7종 *trans* 이성질체와 잘 분리되었습니다. 영양 라벨링 업계의 *trans* 지방산 라벨링의 성격에 비추어 볼 때, 이는 중요한 실질적인 고려 사항입니다.

표 3. C18:1-*cis* 및 C18:2-*cis*의 면적 감응 직선성

성분	농도	면적(PA*S)	RF(양 당 감응)	RF RSD%
C18:1- <i>cis</i>	1.7ppm	0.330	0.194	4.7%
	17ppm	3.002	0.177	
	170ppm	29.152	0.171	
	1,700ppm	301.107	0.177	
	17,000ppm	3,065.390	0.180	
C18:2- <i>cis</i>	0.86ppm	0.155	0.180	3.0%
	8.6ppm	1.628	0.189	
	86ppm	14.833	0.172	
	860ppm	152.562	0.177	
	8,600ppm	1,550.921	0.180	

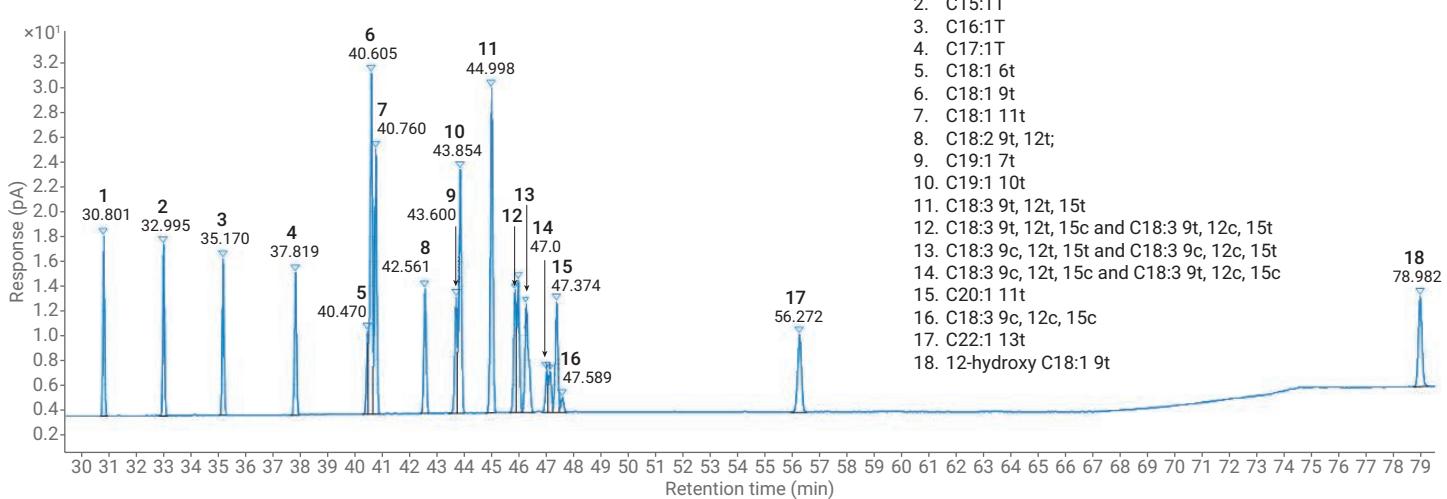


그림 4. HP-88 컬럼의 21종 *trans* FAME 크로마토그램

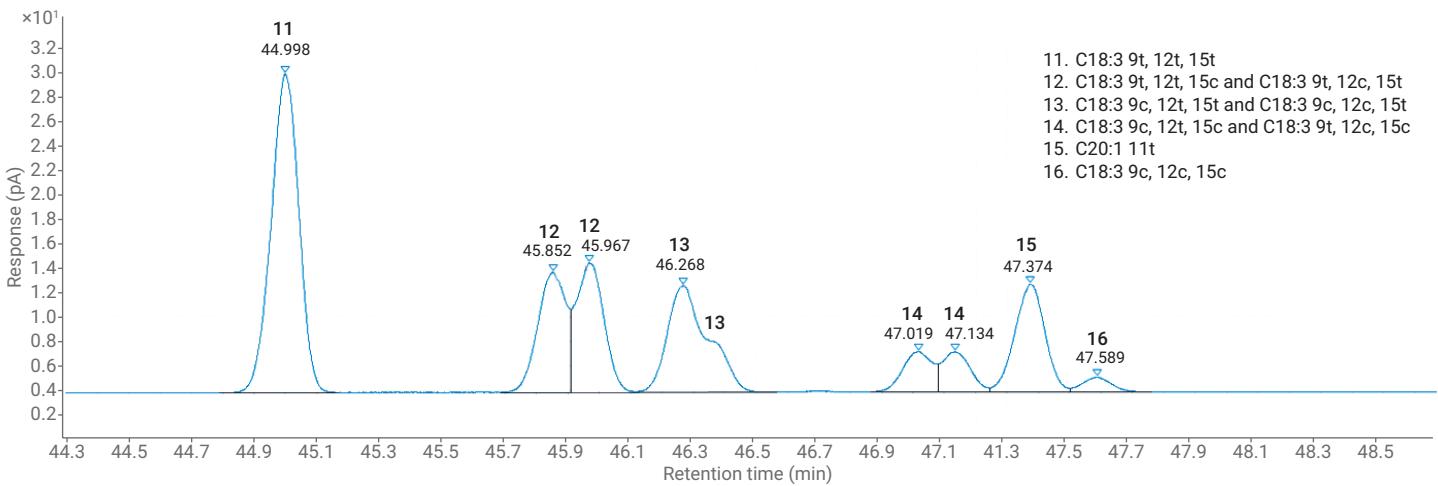


그림 5. Octadecatrienoic acid methyl ester 이성질체의 확대한 크로마토그램

GB 5009.168-2016에 따라, 8890 GC 플랫폼으로 대두유, 땅콩 기름 및 참기름을 포함한 실제 기름 시료를 추출, 유도체화 및 분석하였습니다. 결과 크로마토그램은 그림 6A, 6B 및 6C입니다. C16:0, C18:0, C18:1n9c, C18:2n6c, C18:3n3 및 C20:1은 세 종류 기름 시료에서 식별된 주요 지방산입니다(그림 6A, 6B 및 6C의 빨간색

글자 라벨 화합물은 분석법 검량 테이블에는 열거되어 있지만, 실제 시료에서는 식별되지 않았습니다).

짧은 polycyanopropyl siloxane 컬럼으로 10분 내에 대표적인 37종 FAME를 분리하는 빠른 분석을 지원하는 FAME 분석 솔루션이 있습니다³. 그러나, 빠른 분석은 cis 및 trans FAME 분리에 특정한 제한이 있습니다.

긴 극성 컬럼을 사용한 60~80분의 FAME 분석은 복잡한 cis/trans 지방산 또는 기타 어려운 이성질체의 분리가 필요한 시료를 처리하기 위해 개발되었습니다. 엑스트라 버진 올리브 오일의 품질 시험과 같은 특정 응용에서는 cis/trans FAME의 효과적인 분리가 분석 시간보다 중요합니다.

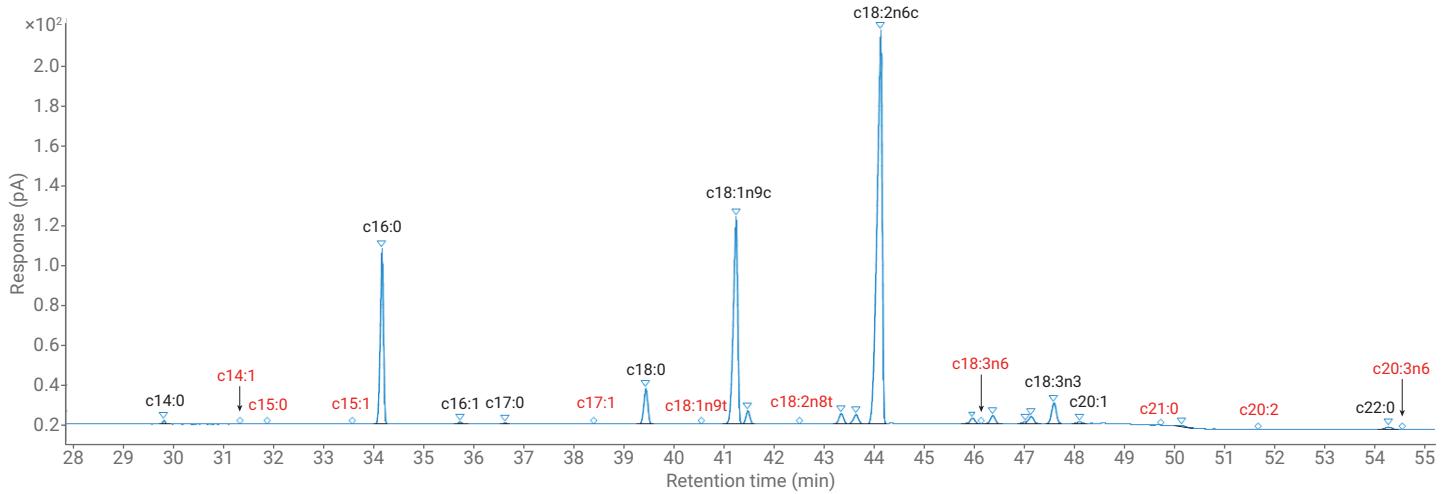


그림 6A. 참기름 분석 크로마토그램

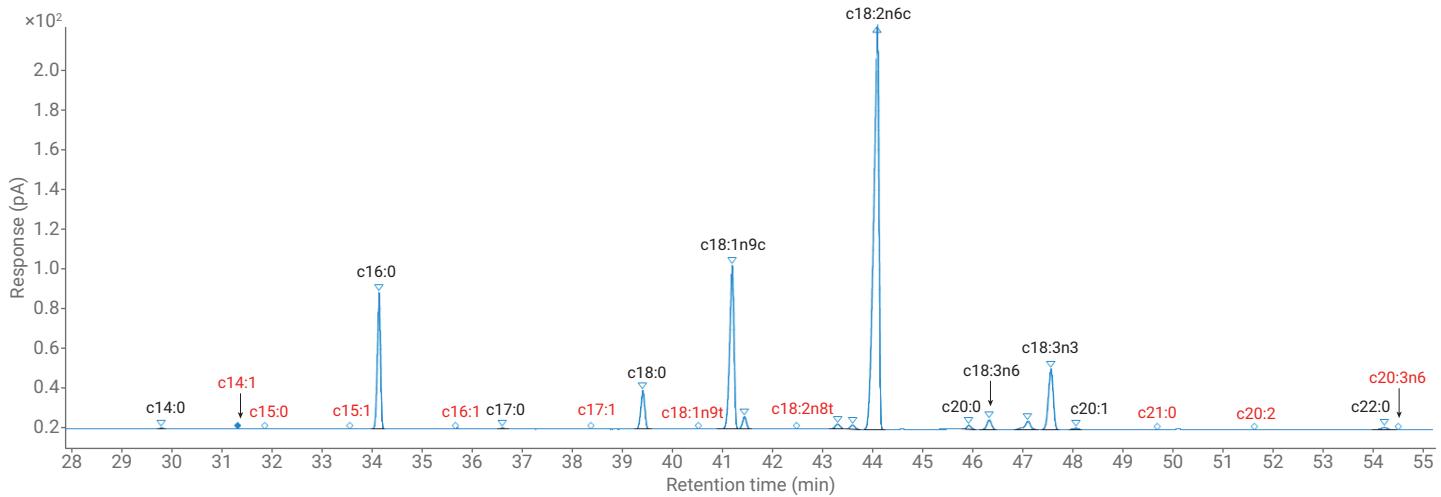


그림 6B. 대두유 분석 크로마토그램

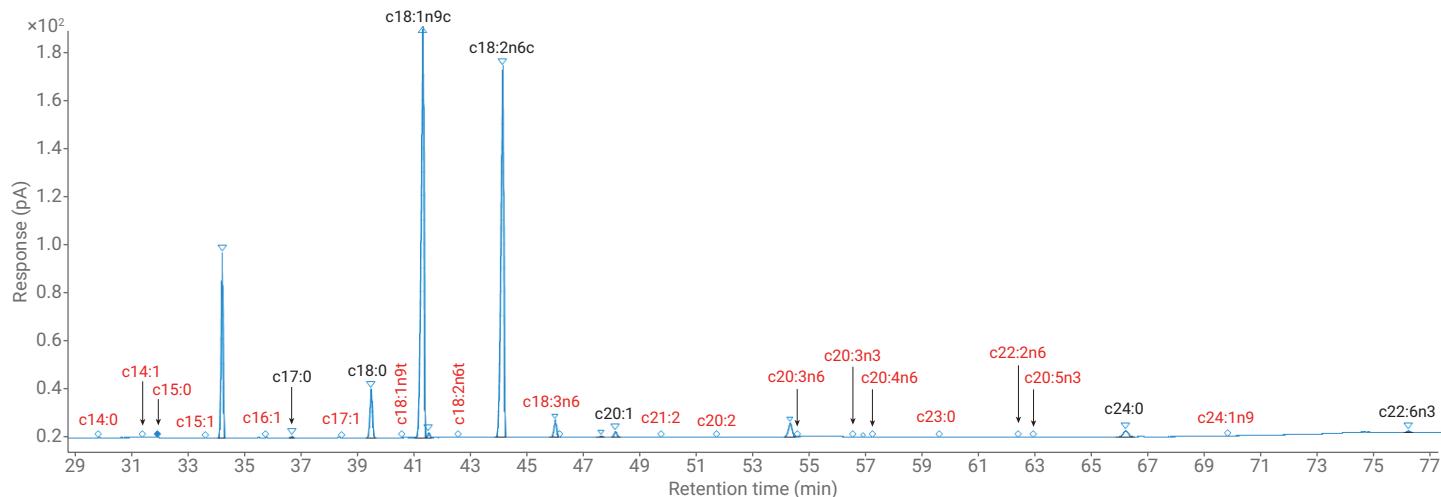


그림 6C. 땅콩 기름 분석 크로마토그램

결론

8890A GC와 HP-88 컬럼을 사용한 대표적인 37종 FAME 및 21종 *trans* FAME의 분석은 두 종류 시료 모두에서 우수한 분리능을 가집니다. 주요 화합물 쌍의 분리능은 GB 5009.168-2016 및 GB 5009.257-2016 분석법 요건을 충족하고 초과하였습니다. 우수한 머무름 시간, 면적 반복성 및 FID의 넓은 선형 검출 범위는 8890A GC가 신뢰할 수 있는 FAME 분석을 위한 이상적인 플랫폼임을 입증하였습니다.

참고 문헌

1. Determination of fatty acids in food, GB5009.168-2016 method.
2. Determination of *trans* fatty acids in food, GB5009.257-2016 method
3. A fast analysis of FAME by Intuvo 9000 GC, Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-9482EN.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 1월 2일, 한국에서 인쇄
5994-0549KO

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

