

# Análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) com um GC Agilent 8890 e sua aplicação em amostras reais

## Autor

Jie Zhang  
Agilent Technologies, Inc.  
Shanghai, China

## Resumo

Esta nota de aplicação aplicou os métodos GB 5009.168-2016<sup>1</sup> e 5009.257-2016<sup>2</sup> à análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) usando uma coluna polar longa no GC Agilent 8890. O método de GC foi otimizado para a separação de 37 FAMES representativos e 21 FAMES *trans* representativos em 80 minutos. O tempo de retenção (TR) do sistema, a repetibilidade da área e a linearidade foram avaliados, e uma mistura de FAMES preparada com amostras de óleo reais foi analisada.

## Introdução

As gorduras são os triésteres principais de ácidos graxos e glicerol e são comumente chamadas de triglicerídeos. Para a finalidade de rotulagem de informações nutricionais, define-se gordura como a soma dos ácidos graxos nos alimentos, independentemente da fonte, expressa em equivalentes de triglicerídeos. Existem três tipos diferentes de ácidos graxos, classificados de acordo com o seu grau de insaturação: saturados, monoinsaturados e poliinsaturados. Ácidos graxos *trans* são ácidos graxos insaturados que contêm pelo menos uma ligação dupla *trans* e não conjugada.

O teor de gordura dos alimentos é um elemento nutricional que sempre foi alvo de discussão e escrutínio. Muitos consumidores se interessam pela quantidade de gordura nos alimentos por questões de saúde, nutrição, emagrecimento e mais.

Vários métodos, como o GB 5009.168-2016<sup>1</sup> e o GB 5009.257-2016<sup>2</sup>, foram desenvolvidos para analisar as gorduras nos alimentos. Esses dois métodos descrevem abordagens para extração de gorduras de diferentes matrizes alimentares, *trans*-esterificação de ácidos graxos em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) e os métodos de GC recomendados para separação e análise de dados. O método 168 foca principalmente na análise de 37 ácidos graxos representativos, sendo que o método 257 foca na análise de ácidos graxos *trans*.

## Materiais

### Equipamento

- GC Agilent 8890 equipado com uma entrada split/splitless e detector FID
- Amostrador automático de líquidos (ALS) Agilent Série 7693A (p/n G4567A)

### Produtos químicos

- Mistura de FAMES com 37 componentes (CDAA-252795-MIX-1 mL), adquirida da ANPEL Laboratory Technologies (Shanghai) Inc., contendo FAMES C4–C24 na faixa de concentração de 200–400 ng/μL.

- Mistura de FAMES *trans* de 13 componentes (CDAA-2527,15–100 mg) e mistura de ésteres metílicos de ácido *cis/trans* octadecatrienóico de 8 componentes (CDAB-CRM47792), adquiridas da ANPEL Laboratory Technologies (Shanghai) Inc. A porcentagem de peso de cada componente nas duas misturas foi de 3–30%.

### Amostras

Amostras de óleo de soja, óleo de amendoim e óleo de gergelim foram fornecidas e preparadas pelo Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research segundo o método GB 5009.168-2016.

## Instrumentação

Tabela 1. Condições do instrumento.

Sistema GC	GC 8890A
Entrada split/splitless	250 °C, razão de split = 100:1
Liner	Split, ultra inerte, lâ de vidro, queda de pressão baixa (p/n 5190-2295)
Programa de rampa de temperatura do forno	100 °C (13 minutos), 10 °C/min a 180 °C (6 minutos), 1 °C/min a 200 °C (20 minutos), 4 °C/min a 230 °C (7 minutos)
Gás de arraste	Nitrogênio, 40 psi, modo de pressão constante
Coluna	Agilent HP-88, 100 m × 0,25 mm, 0,20 μm (p/n 112-88A7)
Detector	280 °C, H <sub>2</sub> : 40 mL/min Ar: 400 mL/min Gás make-up: 25 mL/min

## Resultados e discussão

Utilizou-se o programa de temperatura do forno recomendado no GB 5009.168-2016. Utilizou-se o modo de pressão constante e a pressão de entrada da coluna foi otimizada em 40 psi para possibilitar uma separação satisfatória com resolução mínima de 1,3 para pares críticos, ou seja, C20:0/C20:3n6, o que excede o requisito de resolução de 1,25 especificado pelo método.

Um padrão de mistura de 37 FAMES foi diluído para 50–100 ng/μL para cada componente e usado para testar a repetibilidade do sistema. Este padrão foi escolhido de acordo com o método GB e em função de ter sido desenvolvido para imitar a composição de ácidos graxos de várias amostras alimentares. O programa de rampa de temperatura do forno foi bem longo; conforme mostrado, os 37 FAMES foram separados em 81 minutos (Figura 1). Todos os componentes foram bem resolvidos. Os cromatogramas sobrepostos de seis injeções mostraram repetibilidade da área e TR excelentes (Figura 1). A Tabela 2 lista o TR, a área e a precisão de cada

pico. A repetibilidade da área ficou na faixa de 1,1–3,4% (Figura 2), com o desvio padrão relativo de um componente tendo atingido 4,0%. Como o solvente da amostra foi o hexano e o tempo de corrida foi de mais de 80 minutos por injeção, a evaporação da amostra (especialmente do solvente) durante a separação resultou em uma pequena variação na concentração da amostra.

A quantidade de amostra carregada na coluna para cada componente foi de 0,5–1 ng. Esta quantidade pequena de amostra, somada à evaporação do solvente, resultou em um desvio padrão relativo um pouco acima de 2%, mas ainda dentro do requisito de quantificação.

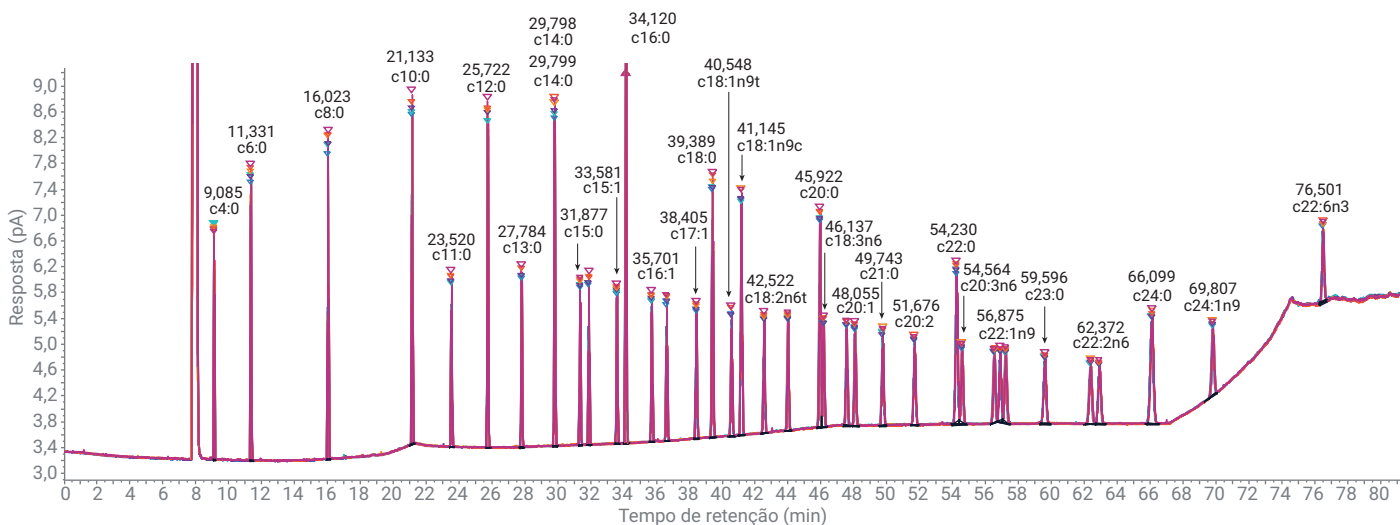


Figura 1. Cromatogramas sobrepostos de seis injeções de 37 FAMES em um GC 8890.

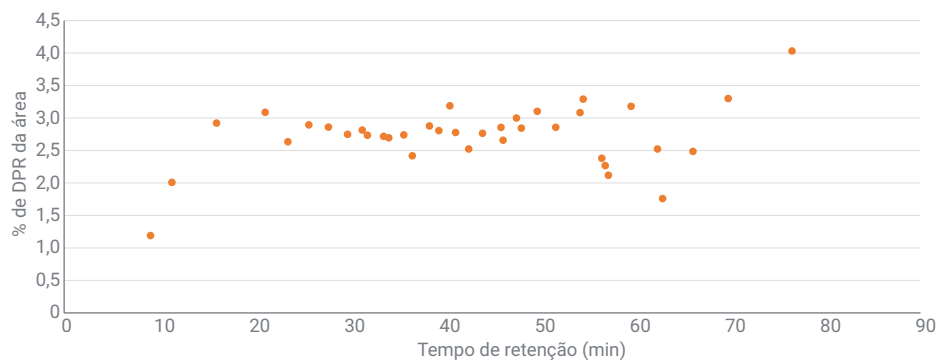


Figura 2. Precisão da área de 37 FAMES em seis injeções.

A repetibilidade do tempo de retenção ficou na faixa de 0,01–0,03% (Figura 3). Embora o tempo de corrida longo dificulte atingir uma repetibilidade do sistema excelente, o GC 8890A forneceu controle exato, preciso e estável da temperatura do forno, da pressão de entrada e da vazão do detector, o que ajudou a produzir cromatogramas altamente repetíveis e garantir resultados de identificação confiáveis.

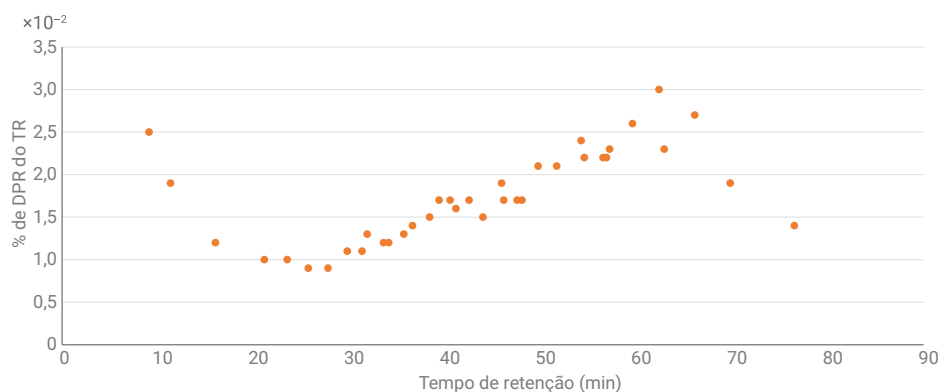


Figura 3. Precisão do TR de 37 FAMES em seis injeções.

Tabela 2. TR, área e sua precisão para 37 compostos em seis injeções.

Composto	TR médio (min)	DPR do TR (%)	Média de área	DPR da área (%)
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
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

Composto	TR médio (min)	DPR do TR (%)	Média de área	DPR da área (%)
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

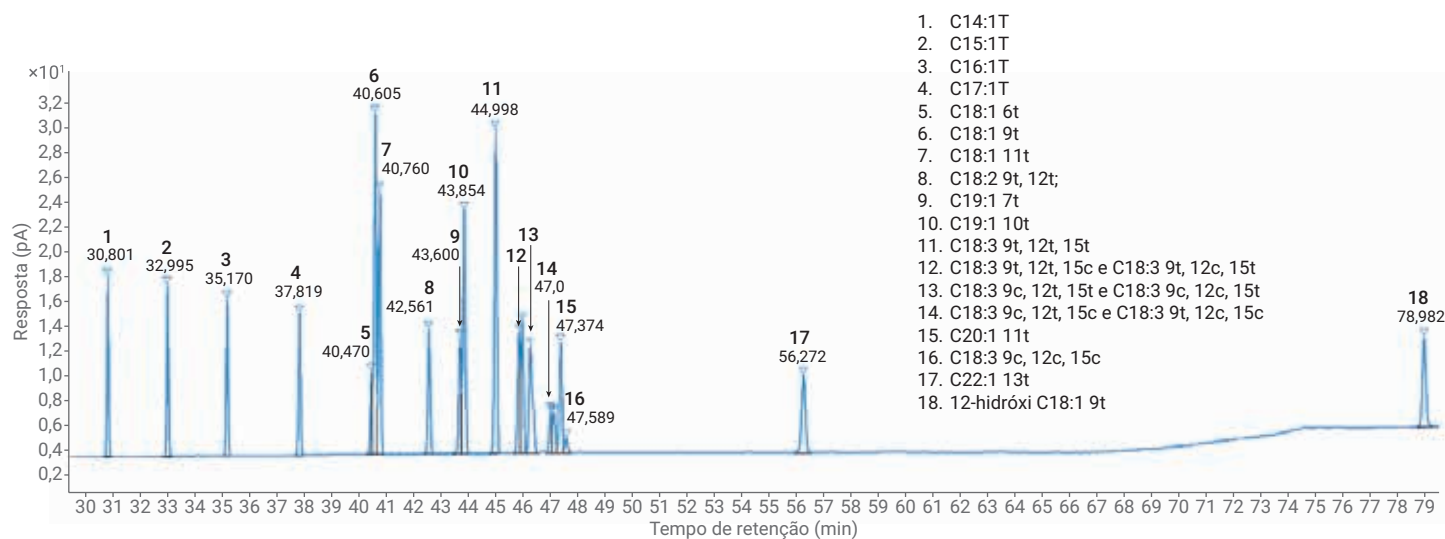
A linearidade do sistema foi avaliada calculando o desvio padrão relativo (DPR) do fator de resposta (FR) do FAME C18:1c e do FAME C18:2c em cinco níveis de concentração. A Tabela 3 mostra um desvio padrão relativo do FR tão baixo quanto 4% para os dois compostos testados, o que demonstra uma excelente linearidade em termos de resposta do pico. Alguns laboratórios usam o método ESTD para quantificação. Uma boa linearidade do detector em uma faixa ampla de concentração pode garantir a quantificação precisa, mesmo quando um método ESTD de ponto único é usado.

A Figura 4 mostra a separação de uma mistura de FAMES com 13 componentes *trans* e de isômeros de ésteres metílicos de ácido octadecatrienóico com 8 componentes. Os resultados foram atingidos de acordo com o GB 5009.257-2016. O programa de temperatura do forno usado foi o mesmo que para a análise da mistura dos 37 FAMES. Os oito isômeros de FAMES C18:3 *trans* são particularmente difíceis de resolver, especialmente considerando que os outros FAMES que estavam junto com os FAMES C18:3 têm que ser resolvidos na mesma corrida. Contudo, a coluna HP-88 de 100 m resultou em oito picos para os oito isômeros na seção

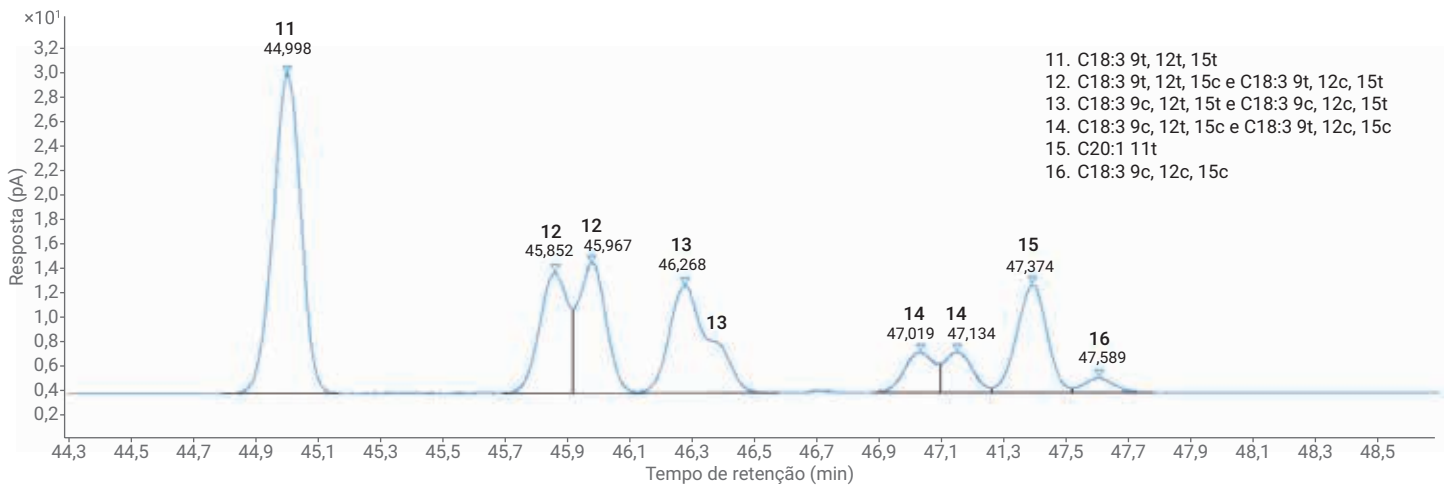
de eluição ampliada para os ésteres metílicos de ácido octadecatrienóico (Figura 5). Embora a resolução tenha ficado longe da separação na linha de base, a comparação com o cromatograma de referência no GB 5009.257-2016 mostra que a separação obtida estava dentro dos limites aceitáveis. Além disso, o éster metílico de ácido *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15-octadecatrienóico foi bem separado dos outros sete isômeros *trans*. Esta é uma consideração prática importante à luz da natureza das informações nutricionais sobre ácidos graxos *trans* exibidas nos rótulos pela indústria de rotulagem de informações nutricionais.

**Tabela 3.** Linearidade de resposta de área para C18:1-*cis* e C18:2-*cis*.

Componente	Concentração	Área (PA*S)	FR (resposta por quantidade)	% de DPR do FR
C18:1- <i>cis</i>	1,7 ppm	0,330	0,194	4,7%
	17 ppm	3,002	0,177	
	170 ppm	29,152	0,171	
	1.700 ppm	301,107	0,177	
	17.000 ppm	3.065,390	0,180	
C18:2- <i>cis</i>	0,86 ppm	0,155	0,180	3,0%
	8,6 ppm	1,628	0,189	
	86 ppm	14,833	0,172	
	860 ppm	152,562	0,177	
	8.600 ppm	1.550,921	0,180	



**Figura 4.** Cromatograma de 21 FAMES *trans* em uma coluna HP-88.



**Figura 5.** Cromatograma ampliado de isômeros de ésteres metílicos de ácido octadecatrienóico.

Amostras de óleo reais, incluindo óleo de soja, óleo de amendoim e óleo de gergelim, foram extraídas, derivatizadas e analisadas em uma plataforma de GC 8890 segundo o GB 5009.168-2016. As Figuras 6A, 6B e 6C mostram os cromatogramas resultantes. C16:0, C18:0, C18:1n9c, C18:2n6c, C18:3n3 e C20:1 foram os principais ácidos graxos identificados nos três tipos de amostras de óleo (o rótulo em fonte vermelha nas Figuras 6A, 6B

e 6C são compostos listados na tabela de calibração do método, mas não identificados na amostra real).

Há uma solução para a análise de FAMES que oferece análise rápida para resolver os 37 FAMES representativos em uma coluna curta de poli-cianopropil siloxano em 10 minutos<sup>3</sup>. Contudo, a análise rápida tem certas limitações na separação de FAMES *cis* e *trans*.

A análise de FAMES de 60–80 minutos, usando uma coluna polar longa, foi desenvolvida para analisar amostras que requerem separação de ácidos graxos *cis/trans* complexos ou de outros isômeros difíceis. Em determinadas aplicações, como testes de qualidade de azeite de oliva extra virgem, a separação eficaz de FAMES *cis/trans* é mais importante que o tempo de análise.

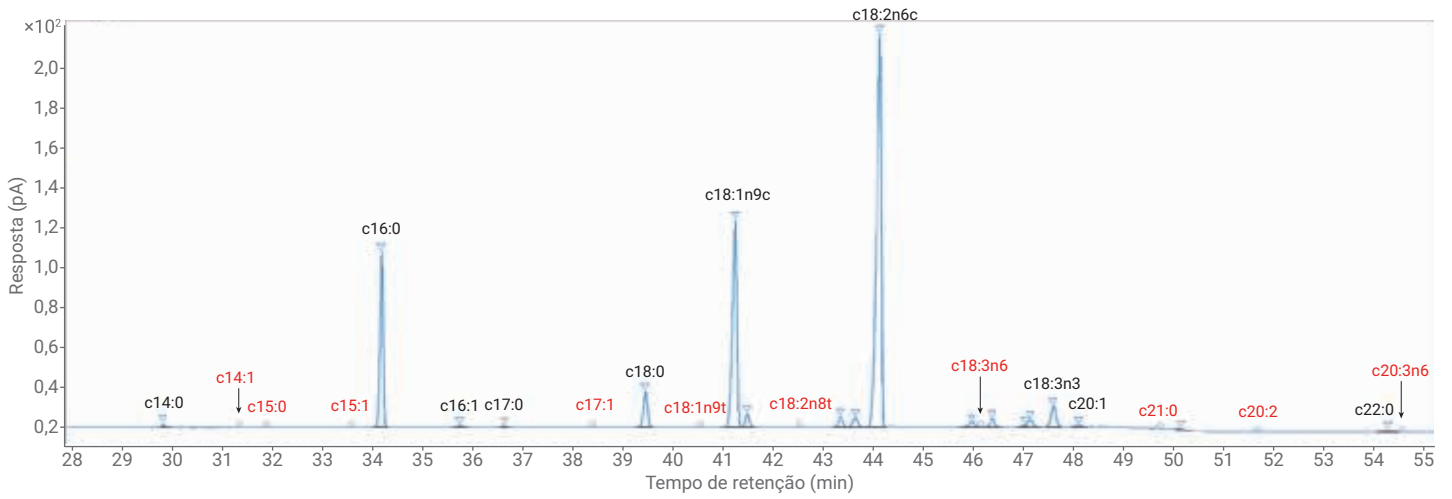


Figura 6A. Cromatograma da análise de óleo de gergelim.

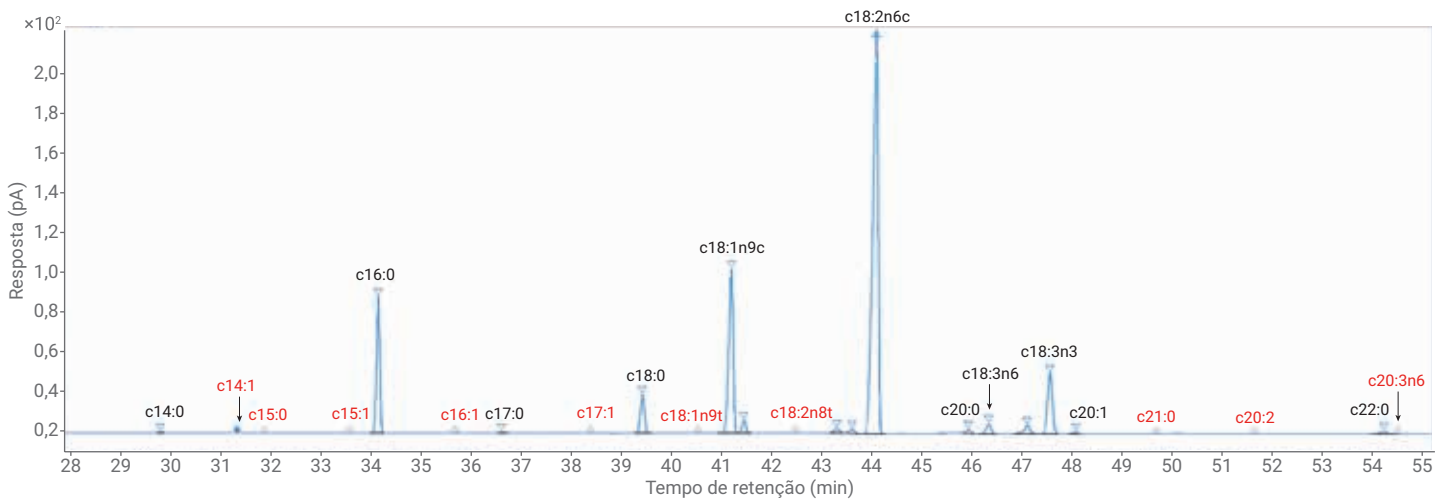


Figura 6B. Cromatograma da análise de óleo de soja.

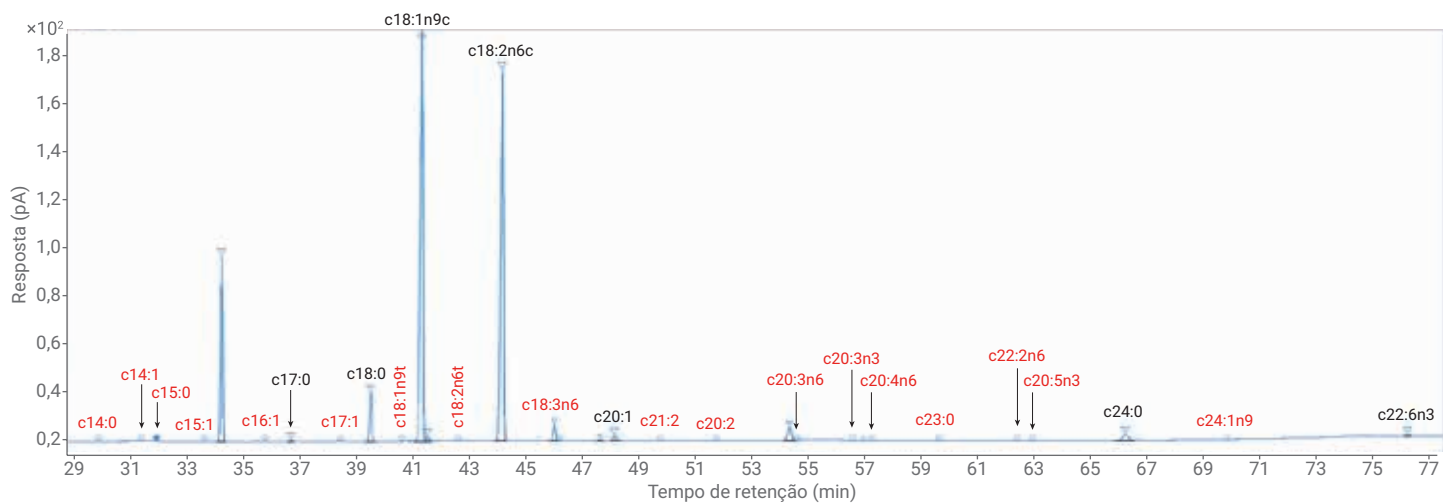


Figura 6C. Cromatograma da análise de óleo de amendoim.

## Conclusões

O uso de um GC 8890A juntamente com uma coluna HP-88 para a análise de 37 FAMES representativos e 21 FAMES *trans* resultou em boa resolução com ambos os tipos de amostra. A resolução do par de compostos críticos atendeu e superou os requisitos dos métodos GB 5009.168-2016 e GB 5009.257-2016. O tempo de retenção excelente, a repetibilidade da área e a faixa de detecção linear ampla do FID comprovaram que o GC 8890A é uma plataforma ideal para a análise confiável de FAMES.

## Referências

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](http://www.agilent.com/chem)

Estas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc. 2019  
Impresso nos EUA, 2 de janeiro de 2019  
5994-0549PTBR