

Agilent 8890 气相色谱仪的脂肪酸甲酯 (FAME) 分析及其在实际样品中的应用

作者

Jie Zhang
安捷伦科技有限公司
中国上海

摘要

本应用简报采用方法 GB5009.168-2016¹ 和 5009.257-2016² 并使用长极性色谱柱在 Agilent 8890 气相色谱仪上进行 FAME 分析。气相色谱方法经过优化用于在 80 分钟内分离 37 种代表性 FAME 和 21 种代表性反式 FAME。评估了系统保留时间 (RT)、峰面积重现性和线性，并分析了由实际油样制得的 FAME 混合物。

前言

脂肪主要为脂肪酸和甘油的三酯，通常称为甘油三酯。出于对营养标签的考虑，脂肪被定义为食品中脂肪酸的总和，不论其来源，均表示为甘油三酯当量。脂肪酸包括不同类型，根据其不饱和度可分为：饱和、单不饱和及多不饱和。反式脂肪酸是不饱和脂肪酸，其含有至少一个非共轭和反式双键。

食品中的脂肪含量一直以来都是被广泛讨论和审查的营养元素。出于健康、营养、减肥等目的，许多消费者十分关注食品中的脂肪含量。

目前已开发了多种方法用于分析食品中的脂肪，例如 GB 5009.168-2016¹ 和 GB 5009.257-2016²。以上两种方法描述了从不同食物基质中提取脂肪，将脂肪酸进行酯交换生成脂肪酸甲酯 (FAME) 的方法，以及推荐用于分离和数据分析的气相色谱方法。方法 168 主要集中于 37 种代表性脂肪酸的分析，而方法 257 则侧重于反式脂肪酸的分析。

材料

设备

- Agilent 8890 气相色谱仪，配备分流/不分流进样口和 FID 检测器
- Agilent 7693A 自动液体进样器 (ALS) (部件号 G4567A)

化学品

- 37 组分 FAME 混标 (CDAA-252795-MIX-1 mL) 购自上海安谱实验科技股份有限公司，含有浓度范围在 200–400 ng/μL 的 C4–C24 FAME

- 13 组分反式 FAME 混标 (CDAA-2527, 15–100 mg) 和 8 组分顺式/反式十八碳三烯酸甲酯 (CDAB-CRM47792) 购自上海安谱实验科技股份有限公司，两种混标中每种组分的重量百分比范围为 3%–30%

样品

大豆油、花生油和芝麻油样品由上海市质量监督检验技术研究院根据 GB 5009.168-2016 提供并进行前处理。

仪器

表 1. 仪器条件

气相色谱系统	8890A 气相色谱仪
分流/不分流进样口	250 °C, 分流比 = 100:1,
衬管	低压降超高惰性分流衬管, 带玻璃毛 (部件号 5190-2295)
柱温箱升温程序	100 °C (13 分钟), 以 10 °C/min 升至 180 °C (6 分钟), 以 1 °C/min 升至 200 °C (20 分钟), 以 4 °C/min 升至 230 °C (7 分钟)
载气	氮气, 40 psi, 恒压模式
色谱柱	Agilent HP-88, 100 m × 0.25 mm, 0.20 μm (部件号 112-88A7)
检测器	280 °C, H ₂ : 40 mL/min 空气: 400 mL/min 尾吹气: 25 mL/min

结果与讨论

使用 GB 5009.168-2016 中推荐的柱温箱升温程序。使用恒压模式，柱头压经优化采用 40 psi 以获得满意的分离，其中关键物质对 (C20:0/C20:3n6) 的最小分离度为 1.3，超过了该方法规定的 1.25 的分离度要求。

将 37 种 FAME 的混标稀释至每种组分为 50–100 ng/μL，用于测试系统重现性。该标准品根据 GB 方法选择，并且它经过专门配制可用于模拟许多食品样品的脂肪酸组成。柱温箱升温程序较长，如图所示，37 种 FAME 在 81 分钟内分离 (图 1)。所有组分都得到了良好的分离。六次进样的叠加色谱图显示了出色的峰面积和 RT 重现性 (图 1)。表 2 列出了每个峰的 RT、峰面积和精密度。峰面积重现性在

1.1%–3.4% 范围内 (图 2)，其中一个组分的峰面积 RSD% 达到了 4.0%。由于样品溶剂为己烷，且每次进样的运行时间超过 80 分钟，因此在分离期间样品 (尤其是溶剂) 的蒸发导致样品浓度略有变化。每种组分上样到色谱柱上的样品量在 0.5–1 ng 范围内。样品量少以及溶剂的蒸发导致峰面积 RSD% 略高过 2%，但仍然符合定量分析要求。

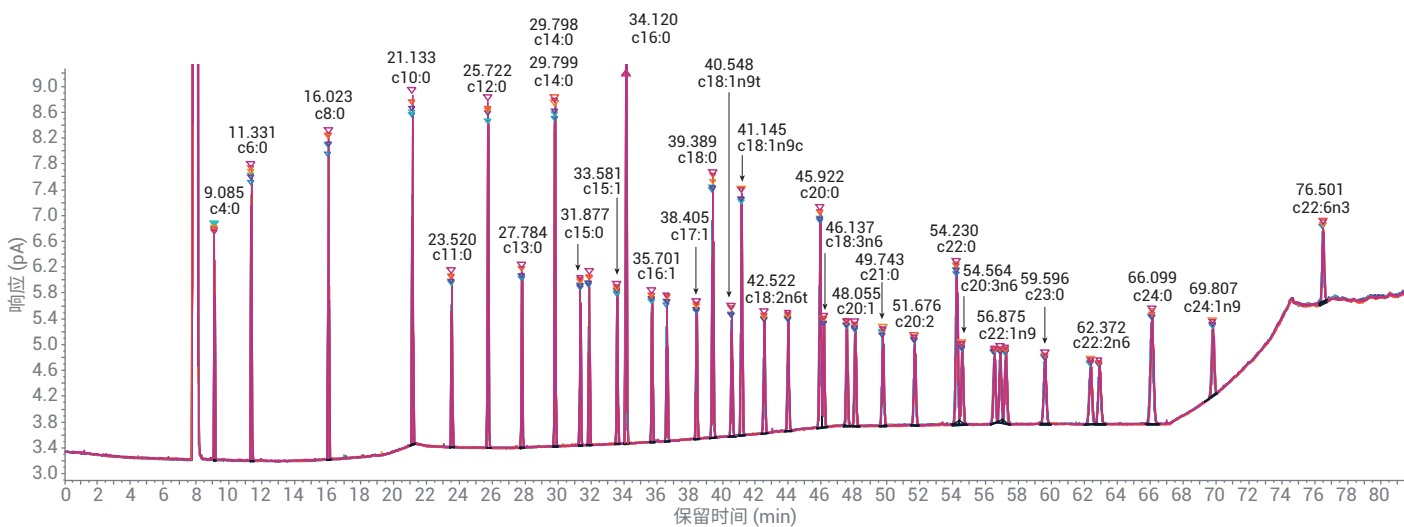


图 1. 在 8890 气相色谱仪上进行六次 37 种 FAME 进样的叠加色谱图

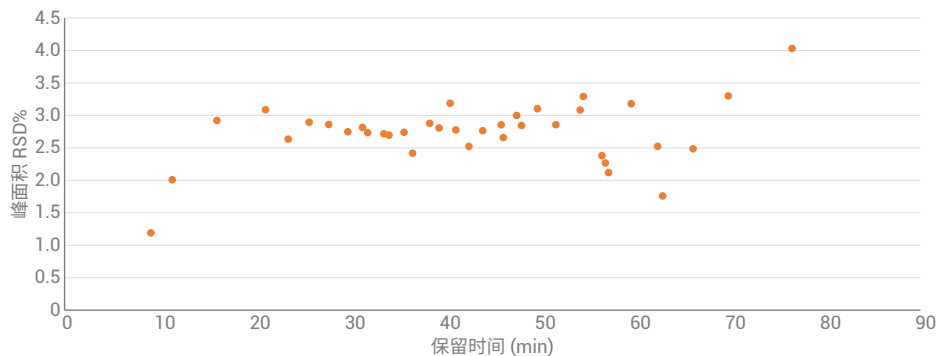


图 2. 六次进样中 37 种 FAME 的峰面积精密度

保留时间重现性在 0.01%–0.03% 范围内 (图 3)。尽管长时间运行很难使系统实现出色的重现性, 但 8890A 气相色谱仪可以精准、稳定地控制柱温箱温度、进样口压力和检测器流速, 有助于生成高度可重现的色谱图, 并确保得到可靠的鉴定结果。

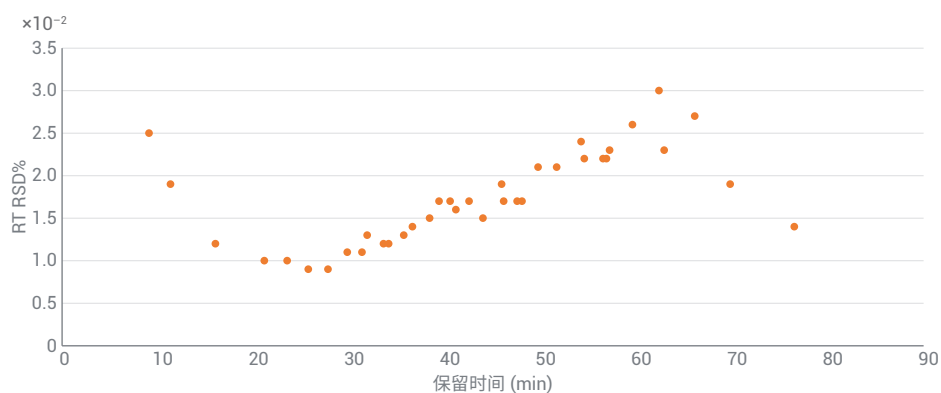


图 3. 六次进样中 37 种 FAME 的 RT 精密度

表 2. 六次进样中 37 种化合物的 RT、峰面积和各自的精密度

化合物	平均 RT (min)	RT RSD (%)	平均峰面积	峰面积 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
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

通过计算五个浓度水平下 C18:1c FAME 和 C18:2c FAME 的响应因子 (RF) 的相对标准偏差 (RSD%) 来评估系统线性。表 3 中两种探针化合物的 RF RSD% 低至 4%，在峰响应方面表现出优异的线性。一些实验室使用 ESTD 方法进行定量分析，即使使用单点 ESTD 方法，较宽浓度范围内出色的检测器线性也可确保准确的定量分析。

图 4 展示了 13 组分反式 FAME 和 8 组分十八碳三烯酸甲酯异构体的混合物的分离。根据 GB 5009.257-2016 得到结果。所使用的柱温箱升温程序与 37 种 FAME 混标的分析相同。C18:3 反式 FAME 异构体的 8 种异构体特别难以分离，特别是考虑到与 C18:3 FAME 共存的其他 FAME 必须在同一次运行中分离。然而，在十八碳三烯酸甲酯洗脱部分的放大视图中，八

种异构体在 100 m HP-88 色谱柱上产生了八个峰 (图 5)。虽然分离度远不及基线分离，但与 GB 5009.257-2016 中参比色谱图的对比表明，所实现的分离在可接受范围内。此外，顺式-9,12,15-十八碳三烯酸甲酯能与其他七种反式异构体很好地分离。鉴于营养标签行业中对反式脂肪酸的标示，这是一个十分重要的实际考虑因素。

表 3. C18:1-顺式和 C18:2-顺式的峰面积响应线性

组分	浓度	峰面积 (PA*S)	RF (响应/含量)	RF 的 RSD%
C18:1-顺式	1.7 ppm	0.330	0.194	4.7%
	17 ppm	3.002	0.177	
	170 ppm	29.152	0.171	
	1700 ppm	301.107	0.177	
	17000 ppm	3065.390	0.180	
C18:2-顺式	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	
	8600 ppm	1550.921	0.180	

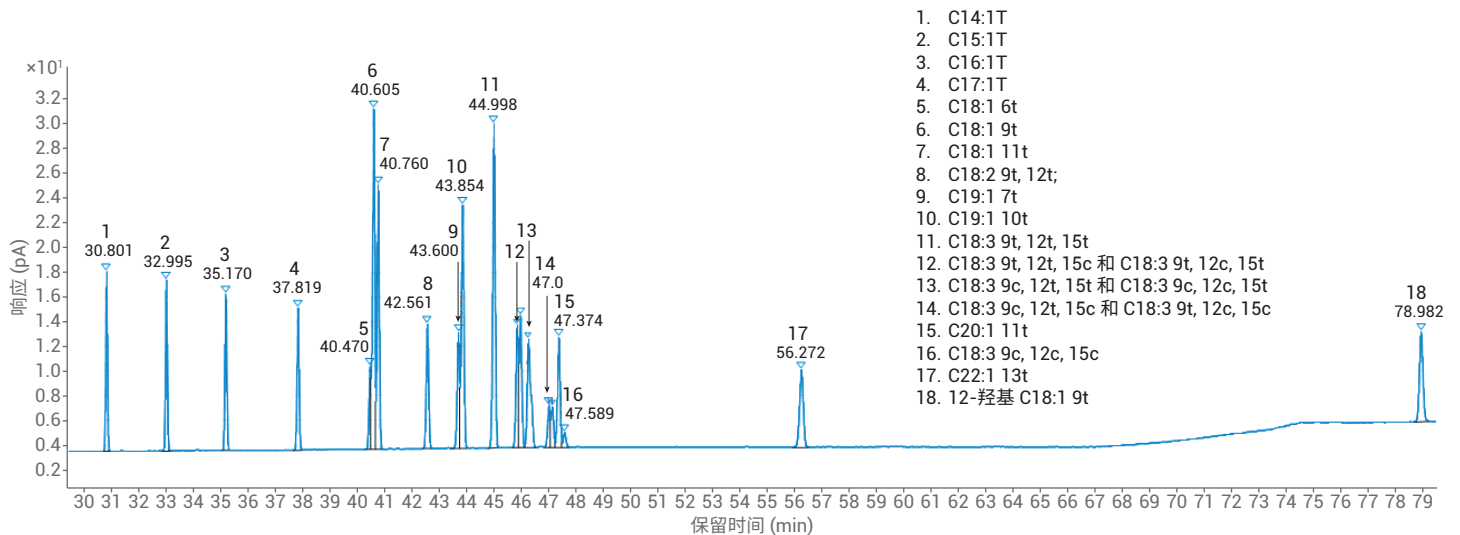


图 4. 21 种反式 FAME 在 HP-88 色谱柱上的色谱图

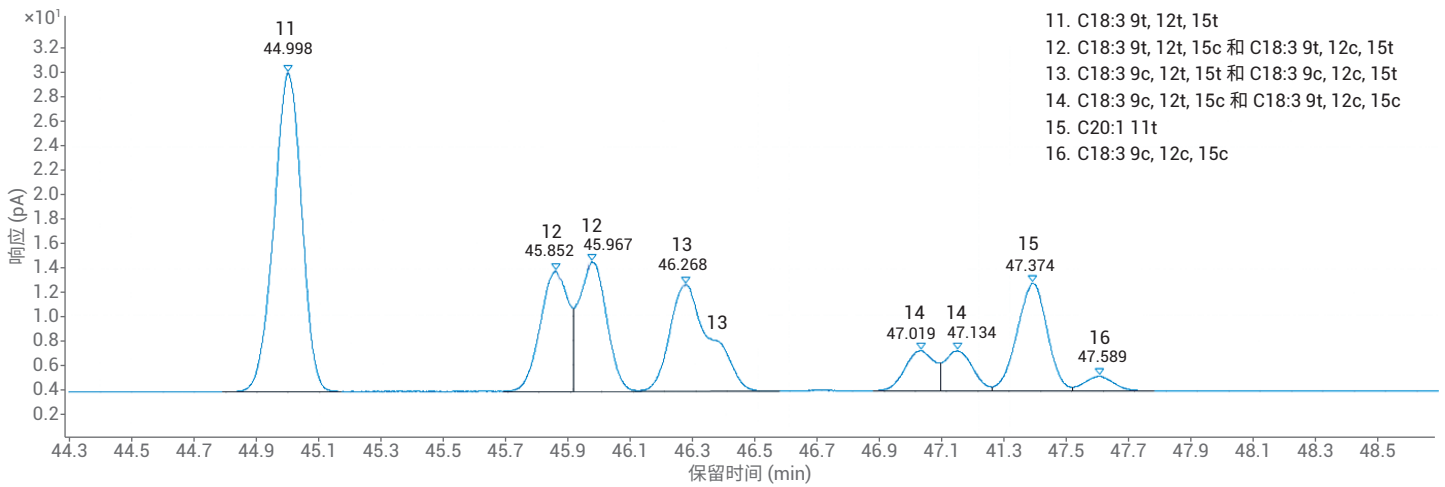


图 5. 十八碳三烯酸甲酯异构体的放大色谱图

根据 GB 5009.168-2016, 在 8890 气相色谱平台上对实际油样品 (包括大豆油、花生油和芝麻油) 进行提取、衍生化和分析。图 6A、6B 和 6C 所示为生成的色谱图。C16:0、C18:0、C18:1n9c、C18:2n6c、C18:3n3 和 C20:1 是三种油样品中鉴定出的主要脂肪酸 (图 6A、6B

和 6C 中的红色字体标签是方法校准表中列出, 但未在实际样品中鉴定出的化合物)。

有一种 FAME 分析解决方案可在较短的聚氰丙基硅氧烷色谱柱上在 10 分钟内快速分离 37 种代表性 FAME, 从而实现快速分析³。然而, 快速分析对顺式和反式

FAME 的分离存在某些限制。因此开发了使用长极性色谱柱的 60–80 分钟的 FAME 分析方法, 以处理需要分离复杂顺式/反式脂肪酸或其他具有分离难度的异构体的样品。在某些应用中, 例如特级初榨橄榄油的质量测试, 顺式/反式 FAME 的有效分离比分析时间更为重要。

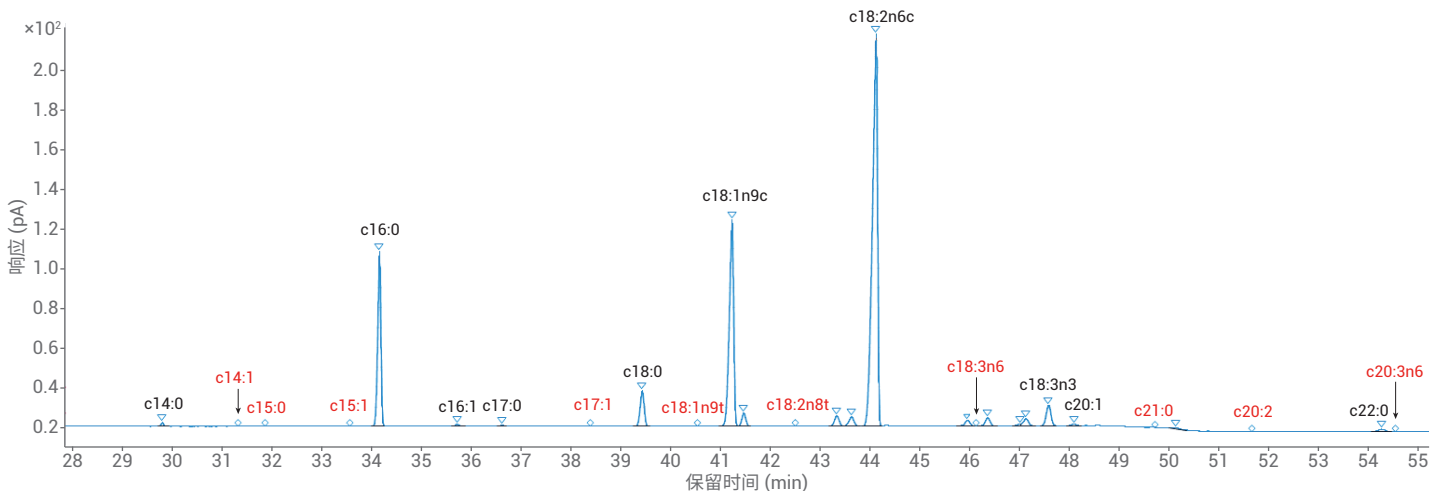


图 6A. 芝麻油分析色谱图

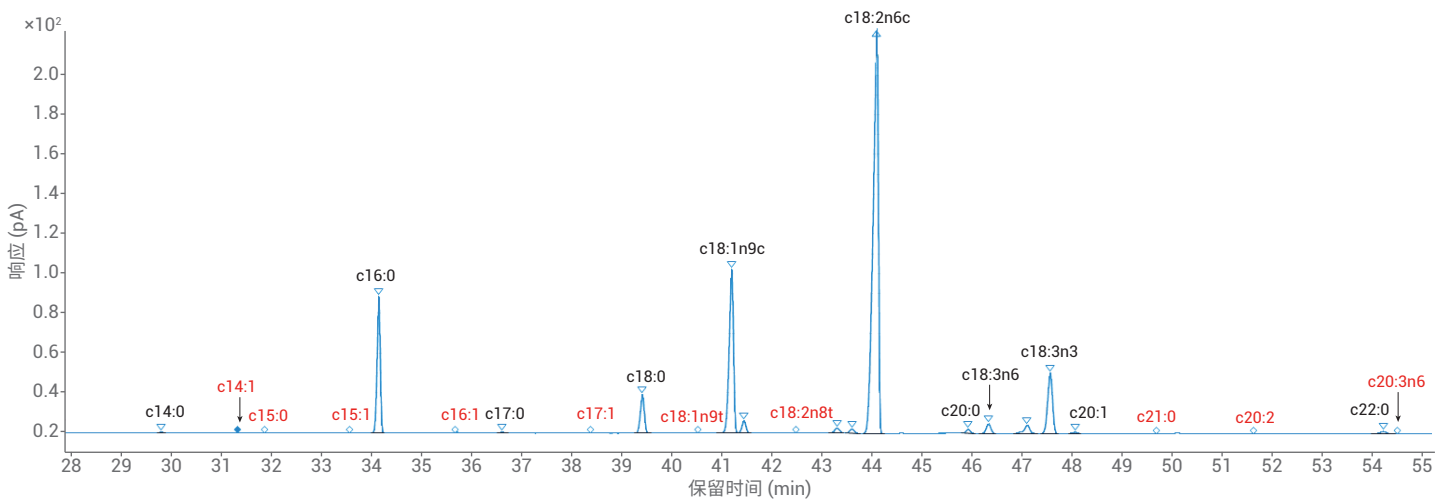


图 6B. 大豆油分析色谱图

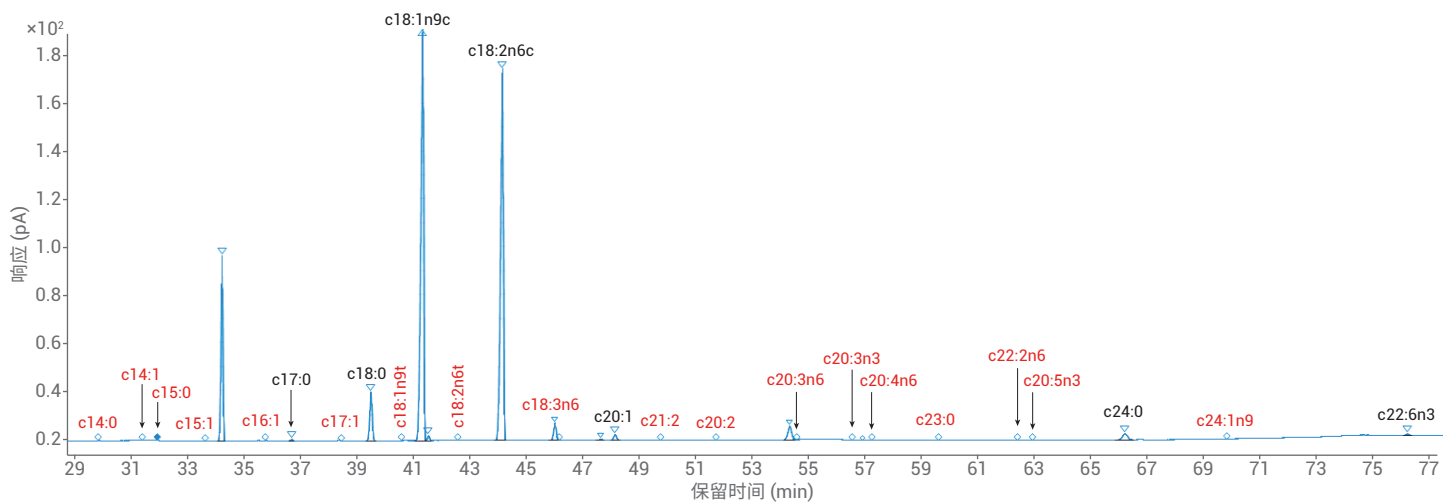


图 6C. 花生油分析色谱图

结论

使用 8890A 气相色谱仪和 HP-88 色谱柱分析 37 种代表性 FAME 和 21 种反式 FAME，结果证明两种类型的样品均得到了很好的分离。关键化合物对的分离度满足甚至超出了 GB 5009.168-2016 和 GB 5009.257-2016 方法的要求。出色的保留时间和峰面积重现性以及 FID 的宽线性检测范围证明 8890A 气相色谱仪是可靠地分析 FAME 的理想平台。

参考文献

1. 《食品中脂肪酸的测定》，GB5009.168-2016 方法
2. 《食品中反式脂肪酸的测定》，GB5009.257-2016 方法
3. 利用 Intuvo 9000 气相色谱仪快速分析 FAME，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-9482ZHCN

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。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2019
2019 年 1 月 2 日，中国出版
5994-0549ZHCN