

Agilent 8860 가스 크로마토그래피를 이용한 37가지 FAME의 빠른 분석

저자

Youjuan Zhang
Agilent Technologies
(Shanghai) Co. Ltd.,
Shanghai 200131 P. R. China

개요

애질런트 분할/비분할 주입구와 불꽃 이온화 검출기(FID)가 장착된 Agilent 8860 GC를 사용하여 37가지 성분의 Fatty Acid Methyl Ester(FAME) 표준 혼합물과 단백질 가수분해 조제분유의 실제 시료를 분석하였습니다. 이 응용 자료에서는 GB 5009.168-2016보다 빠르고 뛰어난 분리를 보이는 37가지 FAME 혼합물 분석에 대해 설명합니다.

서론

지방산은 중성지방, 인지질 및 글리코지질의 주요 성분입니다. 지방산은 포화 지방산, 불포화 지방산 및 고도 불포화 지방산 등 3개 카테고리로 분류할 수 있습니다. 리놀레산과 같은 일부 지방산은 인체 내에서 합성될 수 없는 필수 지방산이며, 반드시 음식을 통해 섭취해야 합니다. 인간에게 영양학적으로 중요한 ARA(arachidonic acid), EPA(eicosapentaenoic acid), DHA(docosahexaenoic acid)와 같은 오메가 3 및 오메가 6 지방산은 고도 불포화 지방산입니다. 오메가 3 지방산은 심장 질환 및 고혈압과 같은 질병을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있습니다. 지방은 영양 및 식품 화학 분야에서 매우 중요한 역할을 담당합니다.

가수분해 및 메틸화는 지방산 측정에 가장 많이 사용되는 분석법이며, 지방산의 에스테르화는 극성을 감소하고 불포화 이성질체의 분리를 촉진할 수 있습니다. Fatty Acid Methyl Ester(FAME)의 분석은 식품 분석에서 가장 중요한 응용 중 하나입니다.

식품 중 37가지 지방산 측정은 규제 GB 5009.168-2016에 따릅니다. 이 분석법에서는 시료 전처리와 가스 크로마토그래피(GC) 파라미터를 자세히 소개하였으며, 여기에서는 매우 높은 극성인 시아노-폴리실록산(cyano-polysiloxane) 유형의 컬럼(100m × 0.25mm, 0.2µm)을 권장합니다. 이 분석법을 이용하면 37가지 FAME를 82분 내에 분리할 수 있습니다. 이전의 애질런트 응용 자료에서는 Agilent J&W DB-FastFAME Intuvo GC 컬럼을 장착한 Agilent Intuvo 9000 GC 시스템에서 헬륨을 운반 가스로 사용하는 분석법을 설명하였으며, 8분 내에 37가지 FAME를 분석해냈습니다². 이 빠른 분석은 Intuvo 직접 가열 기술의 이점을 활용하여 컬럼을 250°C/분으로 가열할 수 있습니다.

이 응용 자료에서는 질소를 운반 가스로 이용하여 8860 GC 시스템을 통해 2개의 서로 다른 길이의 DB-FastFAME 컬럼으로 수행하는 상대적인 빠른 분석법에 대해 설명합니다. 또한 면적 RSD를 측정하였으며, ARA, EPA, DHA와 같은 주요 중성지방을 정량 분석하였습니다. 분석법 적용성을 입증하기 위해, 이 응용 자료에서는 영아용 조제분유 시료도 분석하였습니다.

실험

화학물질 및 표준물질

37가지 성분의 FAME 표준 혼합물 (p/n CDAA-252795-MIX-1mL), C20:4n6의 단일 표준물질(p/n CDAA-253207M-10mg), C20:5n3(p/n CDAA-253209M-10mg) 및 C22:6n3(p/n CDAA-253228M-10mg)은 ANPEL Scientific Instrument Co. Ltd. (중국 상하이)에서 구입하였습니다. 이 혼합물의 성분별 농도는 200~400mg/mL입니다.

영아용 조제분유 시료는 현지에서 구매하였습니다. 시료 전처리는 GB 5009.168-2016에 따라 수행하였습니다.

기기

FAME 분석은 불꽃 이온화 검출기(FID)가 장착된 8860 GC를 이용해 진행되었습니다. 시료 주입은 Agilent 7693A 자동 시료 주입기, 5µL 시린지 및 분할/비분할 주입 포트를 이용해 이루어졌습니다. 표 1과 2는 기기와 조건을 보여줍니다.

표 1. Agilent DB-FastFAME 30m × 0.25mm, 0.25µm의 분석법 조건

파라미터	값
GC 시스템	8860 GC/FID
주입구	분할/비분할, 250°C, 분할비 100:1; 라이너(p/n 5190-2295)
컬럼	DB-FastFAME, 30m × 0.25mm, 0.25µm(p/n G3903-63011)
운반 가스	질소 12psi, 일정 압력
오븐	80°C(0.5분), 40°C/분으로 165°C까지(1분 유지), 4°C/분으로 230°C까지(4분 유지)
FID	260°C; 수소: 40mL/분; 공기: 400mL/분; 보충 가스(N ₂): 25mL/분
주입	1µL

표 2. Agilent DB-FastFAME 20m × 0.18mm, 0.2µm의 분석법 조건

파라미터	값
GC 시스템	8860/FID
주입구	분할/비분할, 250°C, 분할비 100:1; 라이너(p/n 5190-2295)
컬럼	DB-FastFAME, 20m × 0.18mm, 0.2µm(p/n G3903-63010)
운반 가스	질소 20psi, 일정 압력
오븐	80°C, 35°C/분으로 194°C까지(1분 유지), 5°C/분으로 245°C까지
FID	260°C; 수소: 40mL/분; 공기: 400mL/분; 보충 가스(N ₂): 25mL/분
주입	1µL

결과 및 토의

그림 1은 30-m DB-FastFAME 컬럼에서 얻은 37가지 FAME 표준 혼합물의 일반적인 분석 크로마토그램을 보여줍니다. 일부 응용에서, *cis*- 및 *trans*-C18:1, *cis*- 및 *trans*-C18:2, C22:0, C20:3, C22:6 및 C24:1은 동시용리될 수 있으며, 피크 식별 문제를 일으킬 수 있습니다. 그림 1은 이와 같은 조건을 이용해 모든 37가지 화합물을 8860 GC 시스템에서 뾰족하고 대칭적인 피크로 잘 분리하였으며, 분석 시간이 24분 이내로 감소하였다는 것을 보여줍니다. 또한 *cis-trans* 이성질체와 EPA, DHA 성분도 분리되었습니다. 이 분석법은 복잡한 혼합물 중 지방산 정량 분석, 특히 어유와 같은 매트릭스 중의 EPA와 DHA 측정에 매우 유용합니다. 내경이 0.18mm인 컬럼과 비교하면, 30m x 0.25mm, 0.25 μ m 컬럼의 더 큰 내경 및 두꺼운 필름은 보다 높은 컬럼 용량 및 긴 컬럼 수명을 자랑합니다.

단백질 가수분해 조제분유는 우유 알레르기가 있는 아기들에게 좋은 선택이며, 가수분해의 정도에 따라 부분 가수분해 조제분유, 완전 가수분해 조제분유 및 아미노산 조제분유 등 3개 종류로 분류될 수 있습니다. 그림 2 ~ 4는 단백질 가수분해 조제분유의 3개 종류에 대한 분석을 보여줍니다. C18:2n6, C18:3n3, ARA 및 DHA를 포함한 주요 FAME는 쉽게 검출 및 정량 가능합니다.

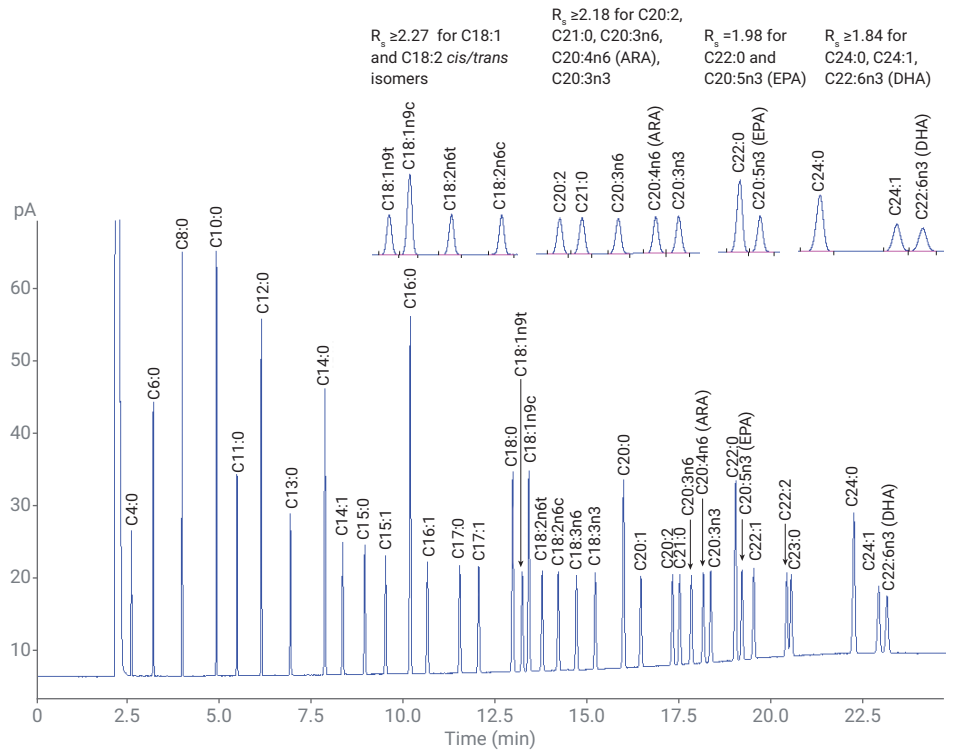


그림 1. 30m x 0.25mm, 0.25 μ m DB-FastFAME Ultra Inert 컬럼(p/n G3903-63011)을 이용한 37가지 성분 FAME 표준 혼합물의 GC/FID 크로마토그램

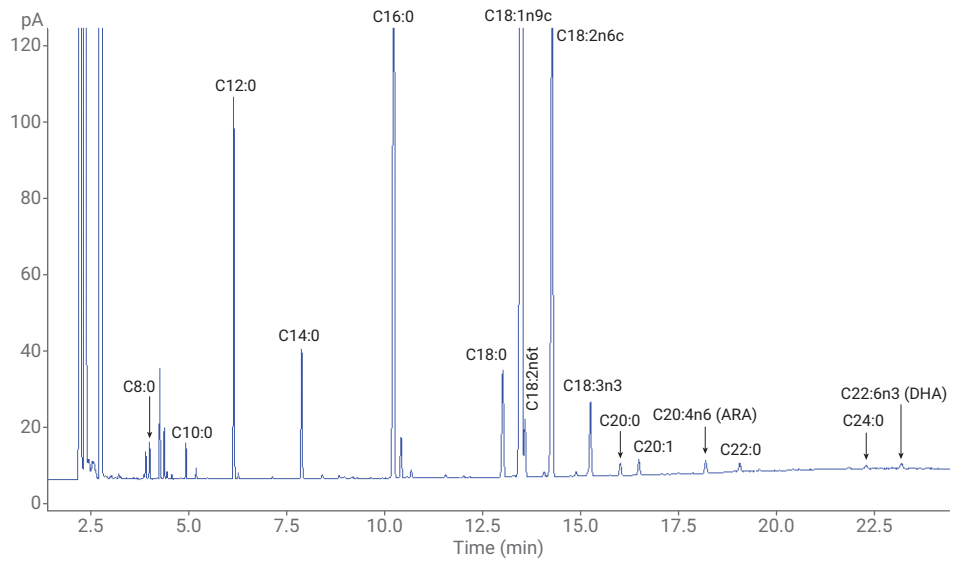


그림 2. 30m x 0.25mm, 0.25 μ m DB-FastFAME Ultra Inert 컬럼을 이용한 아미노산 조제분유 중 FAME의 GC/FID 크로마토그램

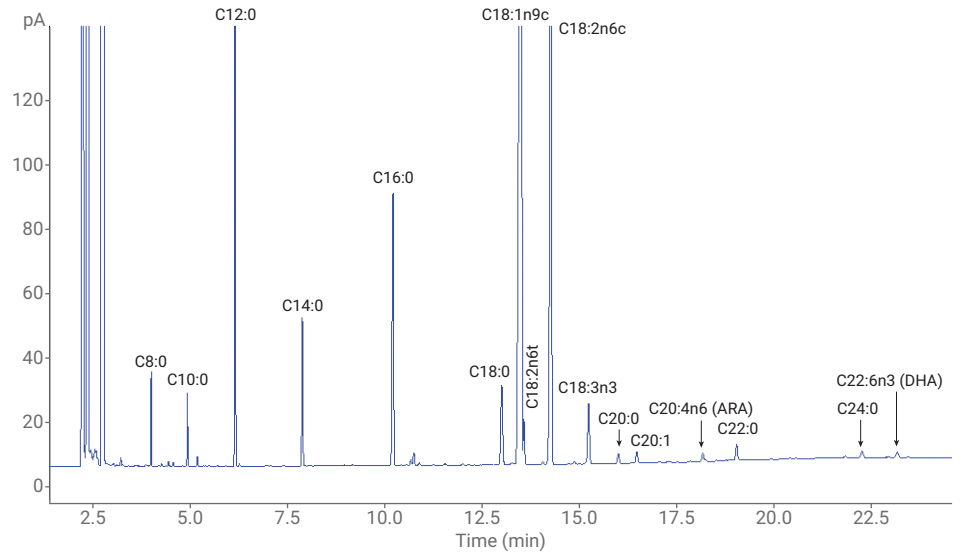


그림 3. 30m × 0.25mm, 0.25µm DB-FastFAME Ultra Inert 컬럼을 이용한 완전 가수분해 조제분유 중 FAME의 GC/FID 크로마토그램

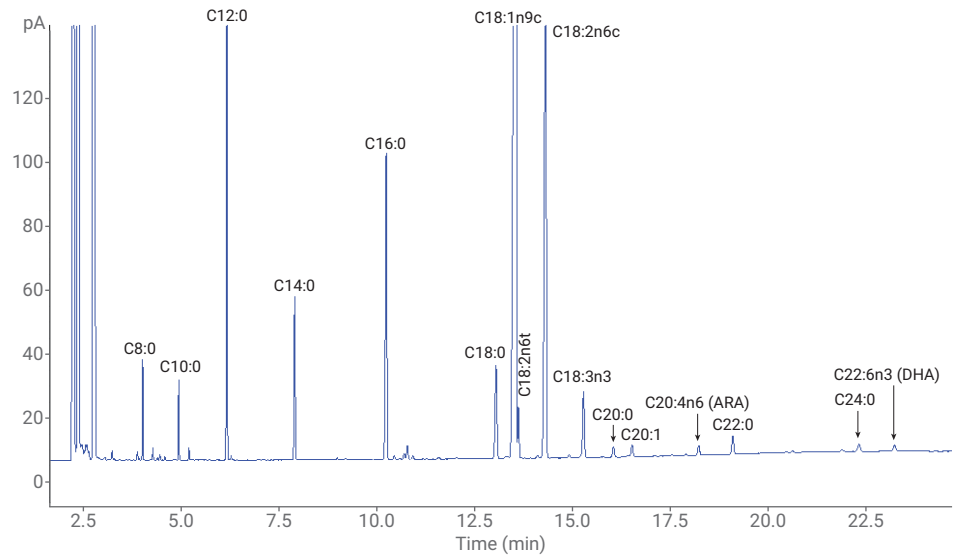


그림 4. 30m × 0.25mm, 0.25µm DB-FastFAME Ultra Inert 컬럼을 이용한 부분 가수분해 조제분유 중 FAME의 GC/FID 크로마토그램

5, 10, 50, 100, 250, 1,000mg/L의 농도로 ARA, EPA, DHA의 검량 표준물질을 제조하였습니다. 3가지 화합물의 결정 계수 (R^2)는 ≥ 0.9997 였습니다. 그림 5, 6, 7은 검량선을 보여줍니다.

표준 혼합물질의 6회 주입을 통해 분석법 재현성을 테스트하였습니다. 그림 8은 C4:0을 제외한 모든 화합물의 면적 RSD%가 1% 미만임을 보여줍니다. 이는 8860 GC 시스템이 신뢰성 있는 지방산 분석용 시스템임을 증명합니다.

내경이 0.18mm인 고효율 컬럼은 생산성을 향상시킬 수 있으며, 분석 성능 저하 없이 분석 시간을 단축시킬 수 있습니다. 그림 9에 나와 있듯이, 이 짧은 컬럼은 거의 동일한 분리능으로 더 빠른 분석(14분 이내)을 제공합니다. 주요 화합물의 분리능 값은 그림 1과 9에 나타나 있습니다.

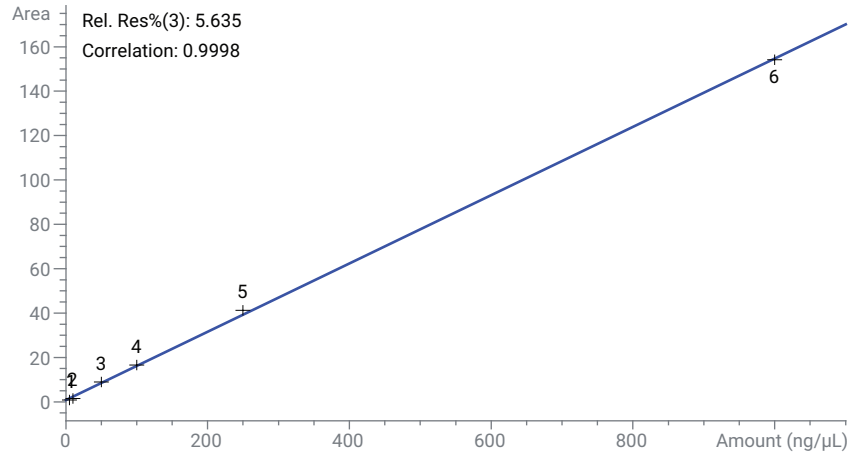


그림 5. 30m × 0.25mm, 0.25μm DB-FastFAME Ultra Inert 컬럼을 이용한 5~1,000μg/mL C20:4n6(ARA)의 검량

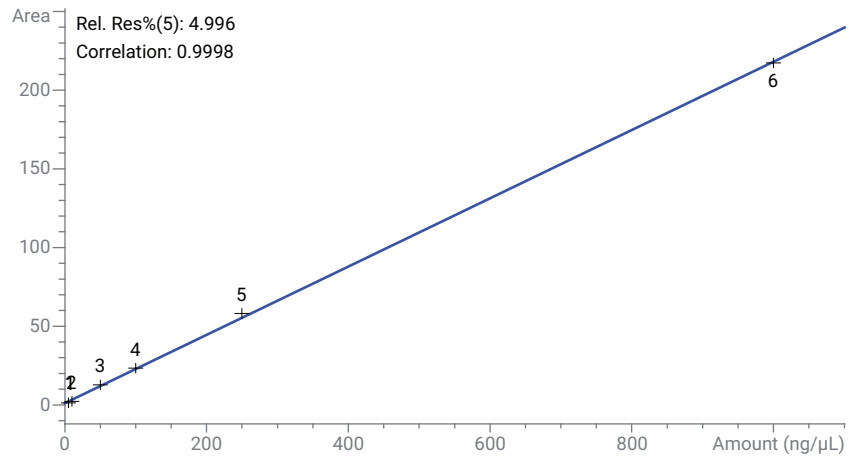


그림 6. 30m × 0.25mm, 0.25μm DB-FastFAME Ultra Inert 컬럼을 이용한 5~1,000μg/mL C20:5n3(EPA)의 검량

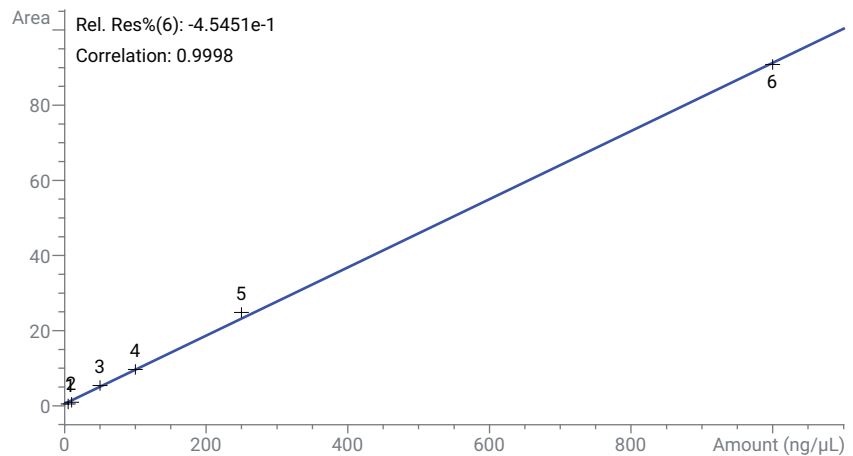


그림 7. 30m × 0.25mm, 0.25μm DB-FastFAME Ultra Inert 컬럼을 이용한 5~1,000μg/mL C22:6n3(DHA)의 검량

결론

이 응용 자료에서는 자동 주입과 FID로 구성된 8860 GC로 37가지 FAME 분석을 위한 더 빠르고 신뢰할 수 있는 솔루션을 제공할 수 있음을 입증하였습니다. FAME 분석용으로 설계된 2가지 종류의 캐필러리 컬럼을 사용하여, 이 두가지 컬럼 모두에서 분리능 저하 없이 훌륭한 효율성을 나타냈습니다. 30m DB-FastFAME 컬럼은 더 높은 컬럼 용량과 더 우수한 내구성을 제공하였으며, 20m DB-FastFAME 컬럼은 더 빠른 분석 시간을 제공하였습니다. 16개 시료 바이알 용량의 7693A 자동 시료 주입기와 8860 GC EPC 제어는 우수한 재현성과 쉬운 운용성을 갖추고 있어 일반 분석과 패스트푸드 산업에 매우 적합합니다.

참고 문헌

1. Zhou, Y.; Wu, H. Improving the analysis of 37 fatty acid methyl esters, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-8706EN, **2018**.
2. Zhou, Y. Rapid separation of fatty acid methyl esters, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5994-0116EN, **2018**.

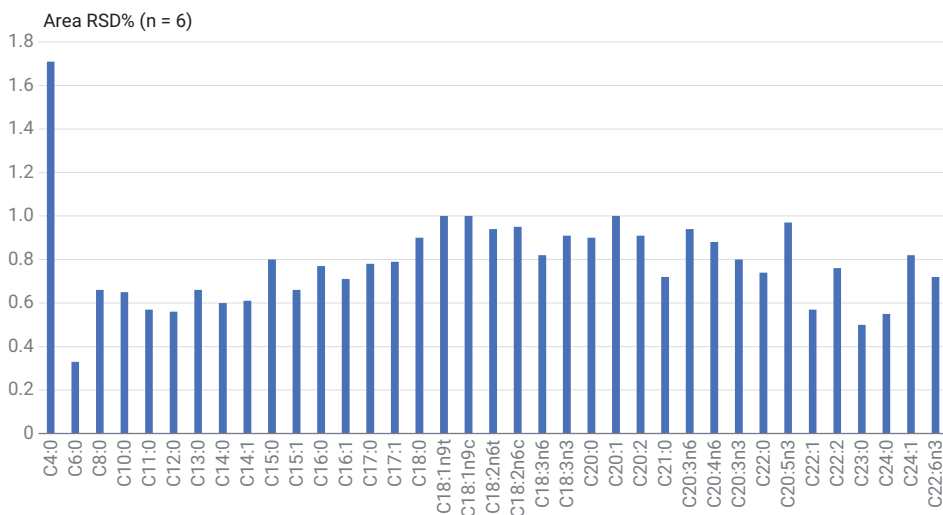


그림 8. 30m × 0.25mm, 0.25µm DB-FastFAME Ultra Inert 컬럼을 이용한 37가지 성분 FAME 표준 혼합물의 6회 반복 주입 면적 RSD%

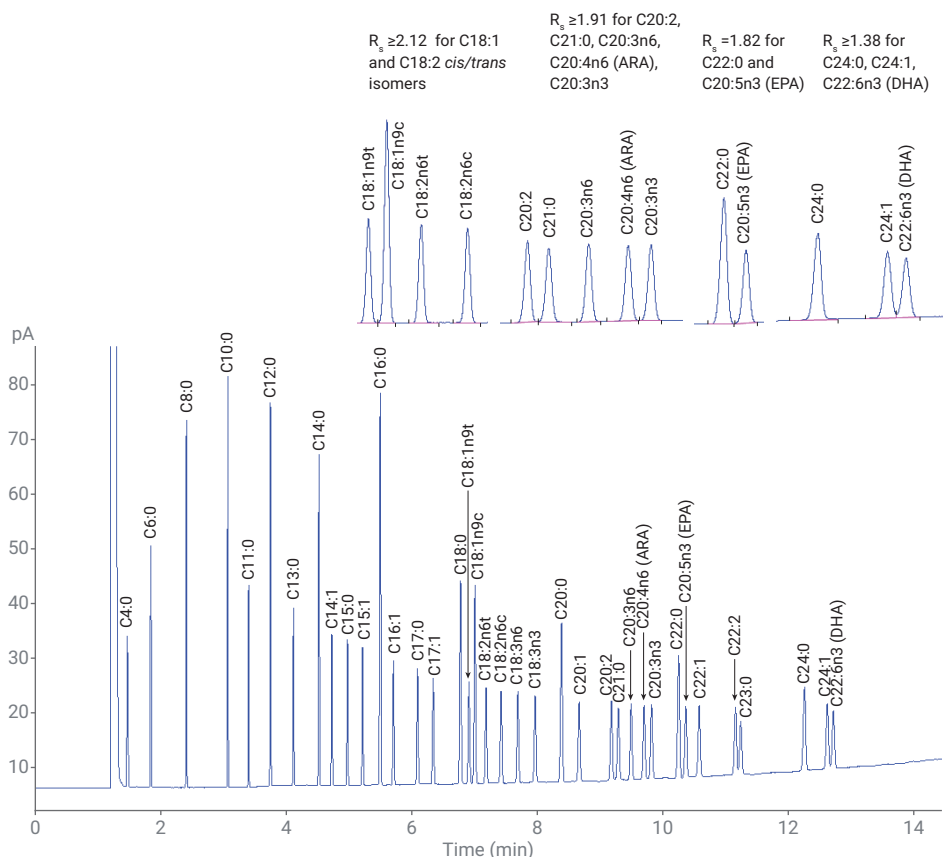


그림 9. 20m × 0.18mm, 0.2µm DB-FastFAME Ultra Inert 컬럼(p/n G3903-63010)을 이용한 37가지 성분 FAME 표준 혼합물의 GC/FID 크로마토그램

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 2월 19일, 한국에서 인쇄
5994-0687KO

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