

Анализ метиловых эфиров жирных кислот на *цис-транс* - изомеры согласно методике AOAC 2012.13 на газовом хроматографе Agilent 8890 с использованием опции фиксации времен удерживания

Автор

Рэйчел Чиотти (Rachael Ciotti)
Agilent Technologies, Inc.

Аннотация

Методика AOAC 2012.13 позволяет определять содержание жирных кислот в молочных продуктах и детских молочных смесях посредством капиллярной газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием. Эта методика была реализована на системе газовой хроматографии Agilent 8890 с колонкой CP-Sil 88 длиной 100 м, и, помимо обычного набора из 37 метиловых эфиров жирных кислот, была продемонстрирована способность к более детальному разделению олеиновой, линолевой и линоленовой кислот, для чего использовали 19 моно- и полиненасыщенных *цис-транс*-изомеров семейства C18. Разрешение между основными критическими парами *цис*- и *транс*- изомеров метиловых эфиров жирных кислот (Fatty Acid Methyl Esters – FAME) оценивали с использованием качественного стандарта. Наконец, в данной системе была также реализована опция фиксации времен удерживания (Retention Time Locking, RTL), позволяющая избежать необходимости в повторной юстировке системы после технического обслуживания колонки.

Введение

Молочные и растительные жиры содержат триглицериды, являющиеся сложными эфирами глицерина, соединенного с тремя остатками жирных кислот. Жирные кислоты состоят из концевой карбоксильной группы, соединенной с углеводородной цепочкой, которая может быть короткой или длинной, линейной или разветвленной, а также насыщенной либо моно- или полиненасыщенной. Конфигурация и положение двойной связи в ненасыщенных жирах дает в результате большое количество их позиционных и конфигурационных *цис-транс*-изомеров. Правильная идентификация изомеров важна для точной маркировки пищевых продуктов.

Разделение и идентификация гомологов и изомеров жирных кислот на фоне сложной матрицы достаточно проблематичны. После этерификации соответствующих жирных кислот их метиловые эфиры (Fatty Acid Methyl Esters, FAME) можно довольно точно и воспроизводимо проанализировать посредством газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием. Порядок элюирования и эффективность разделения изомеров в большой степени зависят от типа неподвижной фазы и длины колонки. Хотя нет таких колонок, которые бы полностью разрешили все разнообразие имеющихся *цис-транс*-изомеров метиловых эфиров жирных кислот, капиллярная колонка CP-Sil 88 длиной 100 м с высокополярной цианопропильной неподвижной фазой позволяет проводить надежное и подробное разделение большинства *цис*- и *транс*-изомеров метиловых эфиров жирных кислот. В отличие от традиционных колонок типа WAX, в такой колонке на высокополярной цианопропильной неподвижной фазе *транс*-изомеры элюируются быстрее *цис*-изомеров.

Экспериментальная часть

Для получения данных использовали газовый хроматограф Agilent 8890, сконфигурированный с инжектором для ввода проб с делением / без деления потока (SSL), пламенно-ионизационным детектором (ПИД) и жидкостным автосамплером Agilent 7693A.

Реактивы

Для оценки характеристик различных метиловых эфиров жирных кислот были закуплены следующие аналитические стандарты:

- 37-компонентная смесь метиловых эфиров жирных кислот (47885-U), содержащая эфиры с длиной углеводородной цепи от C4 до C24 в диапазоне концентраций от 100 до 600 мкг/мл.

- Четырехкомпонентная смесь *цис-транс*-изомеров метилового эфира линолевой кислоты с общей концентрацией 10 мг/мл (CRM47791).
- Восьмикомпонентная смесь изомеров метилового эфира линоленовой кислоты (L6031), содержащая каждый компонент с концентрацией в диапазоне от 3 до 30 масс. %.
- Смесь *цис-транс*-изомеров метиловых эфиров жирных кислот для определения рабочих характеристик колонок Column Performance Mix (40495-U), содержащая различные эфиры в концентрации 2,5 мг/мл.

Все вышеупомянутые смеси были закуплены у компании MilliporeSigma (Сент-Луис, штат Миссури). Восьмикомпонентная смесь *цис-транс*-изомеров метиловых эфиров жирных кислот (35079) была закуплена у компании Restek (Беллефон, штат Пенсильвания).

Таблица 1. Рабочие параметры прибора.

Рабочие параметры ГХ Agilent 8890 Официальная методика AOAC 2012.13	
Ввод	
Размер шприца	10 мкл, кат. № G4513-80204
Вводимый объем	1 мкл
Испаритель	SSL, режим с делением потока
Температура	250 °C
Коэффициент разделения	10:1
Поток продувки септы	3 мл/мин
Колонка	Agilent CP-Sil 88, кат. № CP7489
Размеры	100 м × 0,25 мм, 0,20 мкм
Газ-носитель	He, 0,8 мл/мин, постоянный поток
Термостат	
Начальная температура	60 °C
Начальная выдержка	5 мин
Изменение	15 °C/мин до 165 °C, выдержка 1 мин 2 °C/мин до 225 °C, выдержка 20 мин
Детектор	
Тип	ПИД
Температура	250 °C
Поток воздуха	400 мл/мин
Поток топливного H ₂	40 мл/мин
Поток подпитки N ₂	25 мл/мин

Результаты и их обсуждение

Чтобы оценить разделение по всему диапазону (рис. 1), в аналитическую систему вводили смесь из 37 метиловых эфиров жирных кислот от C4:0 до C24:0 с дихлорметаном в качестве растворителя. Заданная начальная температура термостата в 60 °С и время выдержки обеспечивают отделение C4:0 (важного показателя качества молока) от фронта растворителя. Программа плавного изменения температуры термостата позволяет проводить эффективное разделение *цис-транс*-изомеров и длинноцепочечных полиненасыщенных метиловых эфиров жирных кислот, отличающихся от тех, которые дают пики совместного элюирования между C23:0 и C20:4n6 приблизительно при 48 мин. Однако C23:0 обычно не присутствует в молочных продуктах, и, следовательно, это не представляет проблемы.

Подробное разделение *цис-транс*-изомеров апробировали, используя представленные сегодня на рынке эталонные стандартные смеси. Восьмикомпонентная смесь *цис-транс*-изомеров метиловых эфиров жирных кислот в дихлорметане от компании Restek разбавляли 20-кратно и вводили в систему ГХ. Методика хорошо подходит для разрешения шести *цис-транс*-изомеров метиловых эфиров жирных кислот C18:1 (рис. 2).

Хотя среди *транс*-изомеров наблюдается некоторое минимальное совместное элюирование, их группа хорошо отделяется от *цис*-мононенасыщенных изомеров с длиной цепи C18, что является обязательным условием, поскольку *транс*-изомеры жирных кислот согласно официальной методике AOAC 2012.13 регистрируются в виде группы.

Для характеристики разделения изомеров C18:2 смесь изомеров метилового эфира линолевой кислоты в дихлорметане (MilliporeSigma CRM47791) разбавляли до конечной концентрации 500 мг/л. На рис. 3 показано, что каждый из изомеров линолевых метиловых эфиров жирных кислот имеет хорошее разрешение.

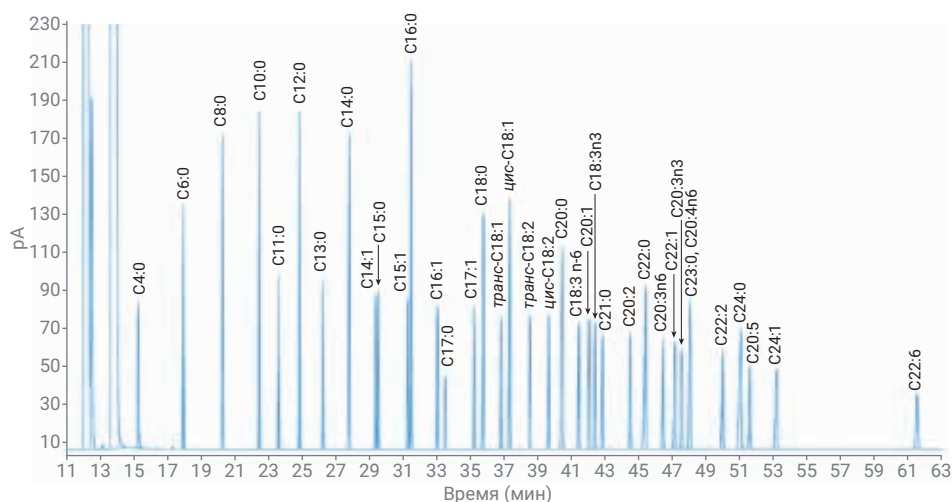


Рис. 1. Хроматограмма 37 метиловых эфиров жирных кислот.

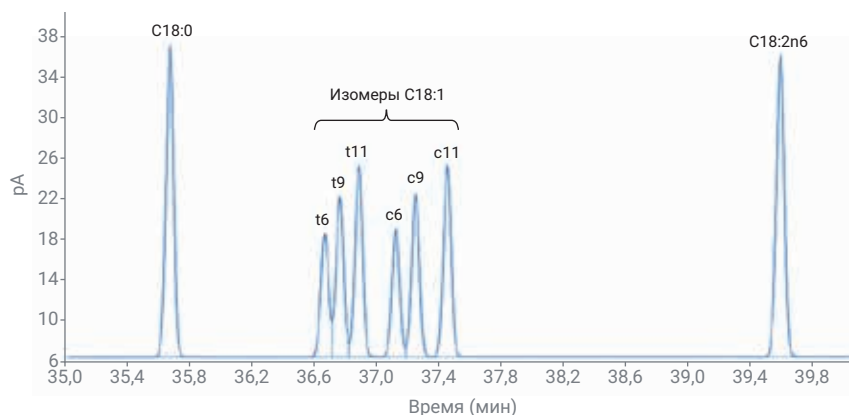


Рис. 2. Увеличенная хроматограмма изомеров C18:1 согласно методике AOAC 2012.13.

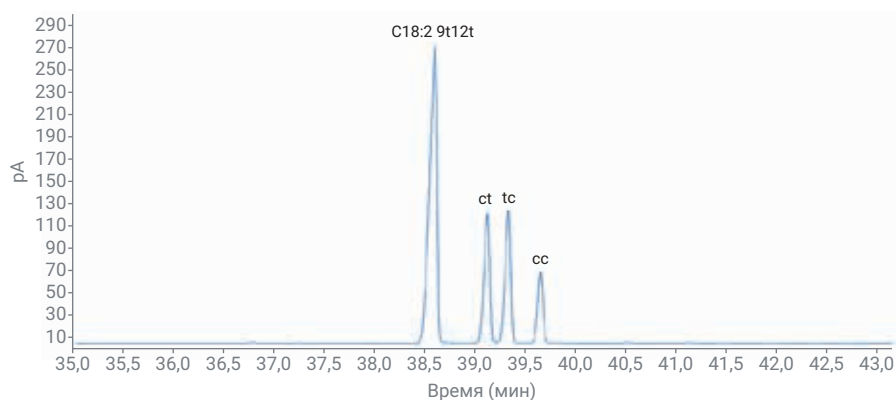


Рис. 3. Увеличенная хроматограмма изомеров C18:2 согласно методике AOAC 2012.13.

Наконец, рабочие характеристики методики в отношении изомеров C18:3 были проверены путем ввода смеси метиловых эфиров линоленовой кислоты (MilliporeSigma L6031), разбавленной до концентрации 2,5 мг/мл в дихлорметане (рис. 4). Никакая колонка не может полностью разрешить изомеры линоленовой кислоты, однако для целей отчетности по качеству пищевых продуктов достаточно, что изомеры, содержащие *транс*-конфигурацию, хорошо отделяются от метилового эфира *альфа*-линоленовой кислоты.

Методика AOAC 2012.13 требует оценочной проверки рабочих характеристик системы перед ее калибровкой. Определяется разрешение между пиками *транс*-C18:1n13t/C18:1n14t и *цис*-C18:1n9c/C18:1n10c (рис. 5, вставка). Если для оценки использовать уравнение 1, то приемлемое разрешение достигается, когда величина R эквивалентна или выше чем 1,00. Было сделано пять повторных вводов смеси *цис-транс*-изомеров метиловых эфиров жирных кислот для качественного определения рабочих характеристик колонок (Column Performance Mix от MilliporeSigma, 40495-U), чтобы оценить разрешение, а также повторяемость величин площади и времен удерживания.

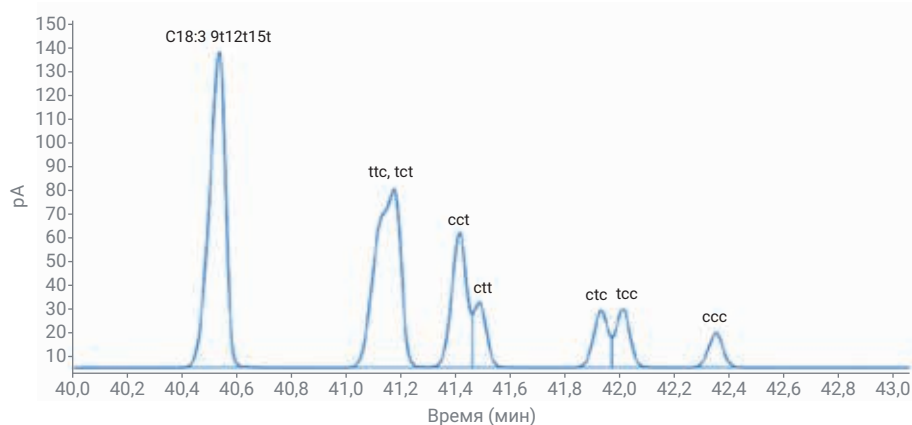


Рис. 4. Увеличенная хроматограмма, показывающая разрешение изомеров C18:3 согласно методике AOAC 2012.13.

$$R = 1,18 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0,5h1} + W_{0,5h2}} \right)$$

Уравнение 1. Разрешение пиков на половине высоты.

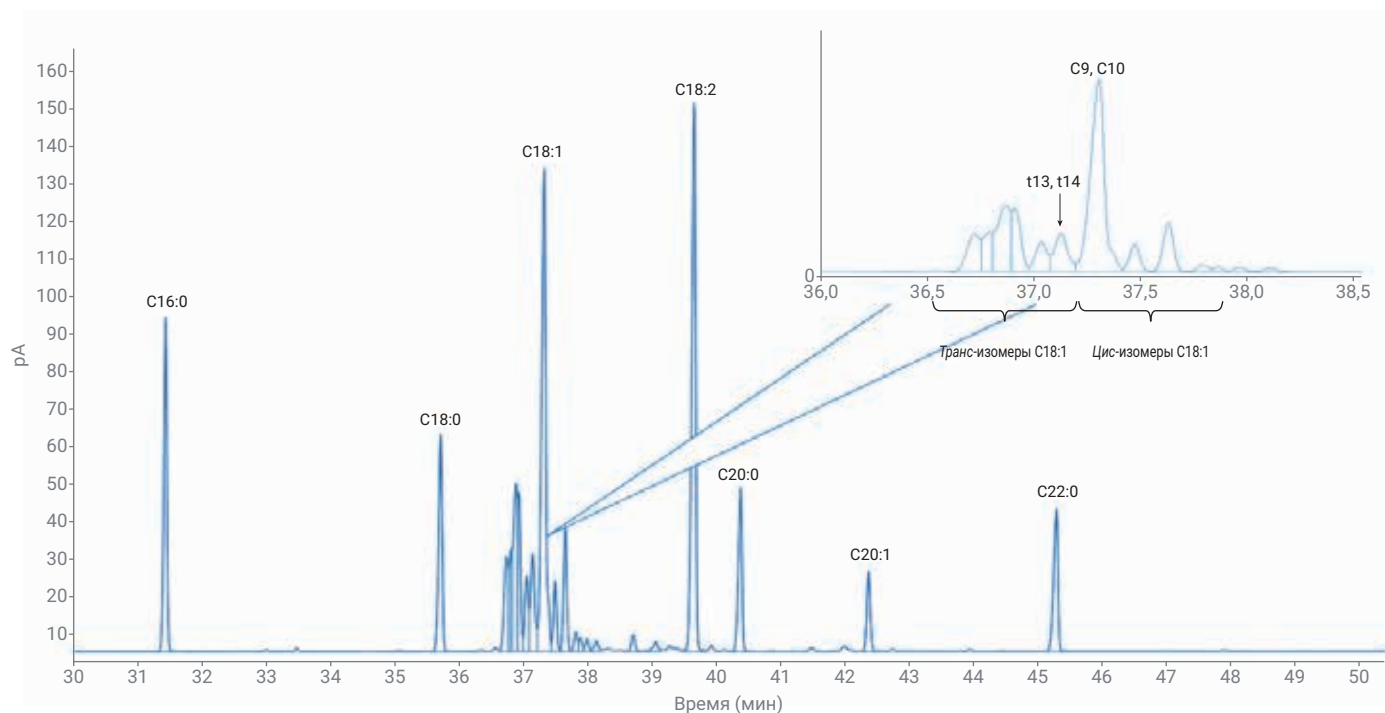


Рис. 5. Увеличенная хроматограмма качественного стандарта для оценки рабочих характеристик колонок.

В табл. 2 приведена сводка результатов для критических пар изомеров, использованных при проверке разрешения, при этом повторяемость значений времен удерживания для обоих изомеров можно оценить как отличную с относительным стандартным отклонением (RSD), равным всего лишь 0,007%. Прецизионность в отношении площадей пиков для каждого изомера характеризуется RSD, меньшим чем 2,5%. Среднее разрешение пиков на половине высоты, равное 1,494, превышает минимальные требования, специфицированные в методике для разрешения.

Фиксация времен удерживания

Весь набор метиловых эфиров жирных кислот, определяемых по методике AOAC 2012.13, для надлежащей идентификации требует строгого соблюдения точности как по температуре, так и по скорости пропускания, следовательно эта методика является отличным кандидатом для реализации опции фиксации времен удерживания (Retention Time Locking, RTL). Опция, RTL обеспечивает долговременную повторяемость результатов измерений на данном приборе и исключает необходимость в повторных настройках времен удерживания после технического обслуживания колонки. Она может сохранять одни и те же значения времен удерживания после переноса методики на другой газовый хроматограф, что облегчает саму передачу методики и упрощает межлабораторное сравнение результатов. Опция RTL точно сопоставляет и фиксирует времена удерживания для конкретного соединения путем исследования зависимостей между параметрами ввода и значениями времен удерживания в ходе ряда эталонных прогонов, калибровки системы с использованием полученных результатов и сохранения зависимостей в файле методики.

Программное обеспечение Agilent OpenLab CDS 2 Acquisition предлагает оператору помощь в виде RTL-мастера, который проводит его по всей процедуре, включая выбор методики сбора данных для фиксации и целевого соединения, которое также можно выбрать из файла ранее полученных данных. Затем на основании параметров, специфицированных выбранной методикой сбора данных, RTL-мастер задает ряд прогонов для калибровки давления. Один прогон делается с использованием исходной установки

давления, а два других делаются с отклонением по давлению в 15% выше и ниже установки по данной методике, соответственно. Отклонение в установках давления моделирует изменения в длине колонок, которые обычно наблюдаются после проведения их техобслуживания, например после подрезания колонок. Зафиксированные методики не требуют повторного определения времен удерживания после проведения технического обслуживания или даже

замены колонок, и более того, исходные значения времен удерживания прибора могут быть согласованы посредством простого стандарта повторной фиксации. Если стандарт повторных фиксаций также служит в качестве стандарта для оценки технических характеристик колонок, пользователи могут выполнить специфицированные методикой AOAC 2012.13 требования по оценке характеристик колонок всего лишь за один шаг.

Таблица 2. Результаты пяти повторных вводов стандартной смеси метиловых эфиров жирных кислот для качественной оценки характеристик колонок.

Значение	Описание	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Повтор 4	Повтор 5	RSD
t _{R1}	Время удерживания в минутах, пик t13/t14	37,124	37,125	37,128	37,128	37,13	0,007%
t _{R2}	Время удерживания 2 в минутах, пик c9/c10	37,304	37,305	37,308	37,308	37,31	0,007%
	Площадь пика t13/t14	115,605	113,463	117,747	115,944	120,812	2,356%
	Площадь пика c9/c10	599,259	588,91	610,828	602,276	628,644	2,458%
W _{0.5h1}	Ширина на половине высоты, пик t13/t14	0,073	0,072	0,073	0,073	0,074	0,969%
W _{0.5h2}	Ширина на половине высоты, пик c9/c10	0,069	0,069	0,069	0,069	0,07	0,646%
R	Разрешение пика на половине высоты	1,496	1,506	1,496	1,496	1,475	0,77%

To complete the RTL calibration, the wizard will perform three runs. The first run is completed at a flow/pressure lower than the method setpoint, the second run is completed at the flow/pressure in the method, and the third run is completed at a higher flow/pressure than the method setpoint. Specify the pressure change for runs 1 and 3, and specify the sample vials for each of the runs. For liquid samples, this can be the same vial. For headspace samples, prepare three separate vials.

Run #

% Change in Pressure

Pressure

Vial Number

1

- 15%

21.673 psi

107

2

25.498 psi

107

3

+ 15%

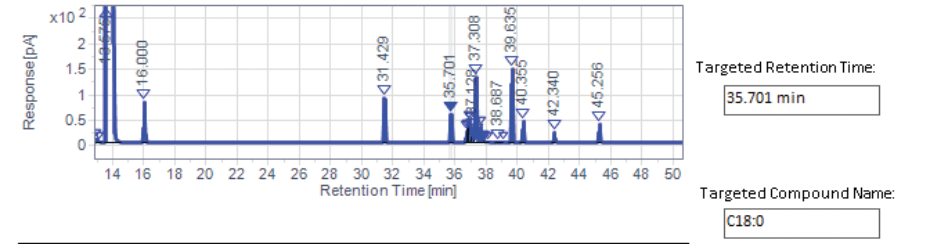
29.323 psi

107

Injection Source:

GC Injector - Front

From the chromatogram or table below, please select the retention time of your locking compound. If you wish to set that retention time to a specific value, please enter that in the "Targeted Retention Time" box.



Peak Number	Compound Name	Retention Time	Area
7	C18:0	35.7009	229.6815
8	C18:1n6t	36.7209	113.8100
9	C18:1n9t	36.7966	77.3611
10	C18:1n11t	36.8657	202.8851
11		36.9096	129.4210
12		37.0350	89.3177

Рис. 6. Экран настройки мастера фиксации времен удерживания.

Для фиксации методики по временам удерживания использовали смесь *цис-транс*-изомеров метиловых эфиров жирных кислот для оценки технических характеристик колонок (Column Performance Mix). Из ранее полученных данных по вводу стандарта смеси для определения характеристик колонок выбирали методику сбора данных, методику их обработки и файл обработанных результатов. В качестве целевого соединения для RTL выбрали C18:0. Как показано на рис. 6, RTL-мастер управляет проведением процесса калибровки давления с использованием пика C18:0 с целевым значением времени удерживания, равным 35,701 мин. Калибровочная кривая давления, полученная по результатам трех прогонов, автоматически запрограммированных RTL-мастером, показала отличную корреляцию (рис. 7). Затем аналитическая методика была зафиксирована при указанном давлении, равном 25,498 psi. После этого было проведено техническое обслуживание колонки CP-Sil 88 длиной 100 м, при котором была сделана ее обрезка примерно на 0,5 м со стороны входа.

Чтобы оценить степень потери в удерживании после изменения длины колонки в результате проведения ее техобслуживания, был проведен повторный анализ стандарта смеси *цис-транс*-изомеров метиловых

эфиров жирных кислот Column Performance Mix. При этом значение времени удерживания для целевого пика C18:0 сдвинулось вперед примерно на 0,232 мин. Если бы система не была зафиксирована по времени удерживания, оператору потребовалось бы снова проанализировать стандарт, содержащий полный набор желаемых метиловых эфиров жирных кислот, и вручную еще раз ввести значения времен удерживания для анализируемых веществ в используемой методике обработки данных.

Вместо того чтобы вручную повторно вводить новые значения времен удерживания для анализируемых веществ, аналитическая методика просто подвергается повторной фиксации (перификсации), опять же с использованием RTL-мастера, и при этом вводится новая установка по давлению, равная 25,253 psi. Новая установка по давлению учитывает изменение в длине колонки, так чтобы удостоверить ожидаемые значения

времен удерживания, и в результате облегчает и ускоряет приведение системы в состояние готовности. Чтобы удостовериться в том, что новые установки по давлению приведут к ожидаемым значениям времен удерживания, провели повторный ввод стандарта смеси *цис-транс*-изомеров метиловых эфиров жирных кислот Column Performance Mix. На рис. 8 показана сводка полученных результатов, а также наложенные хроматограммы. Времена удерживания после повторной фиксации и обрезки колонки очень близко соответствовали их исходным значениям, т. е. до обрезки колонки, при этом для каждого ключевого анализируемого вещества на колонке длиной 100 м изменения во времени удерживания варьировались в пределах от 0,000 до 0,009 мин. Следует отметить, что реальное время удерживания для C18:0, равное 35,700 мин, относительно целевого времени удерживания, равного 35,701 мин, имеет относительное процентное отличие всего лишь 0,0028%.



Рис. 7. Результаты калибровки давления при фиксации времен удерживания.

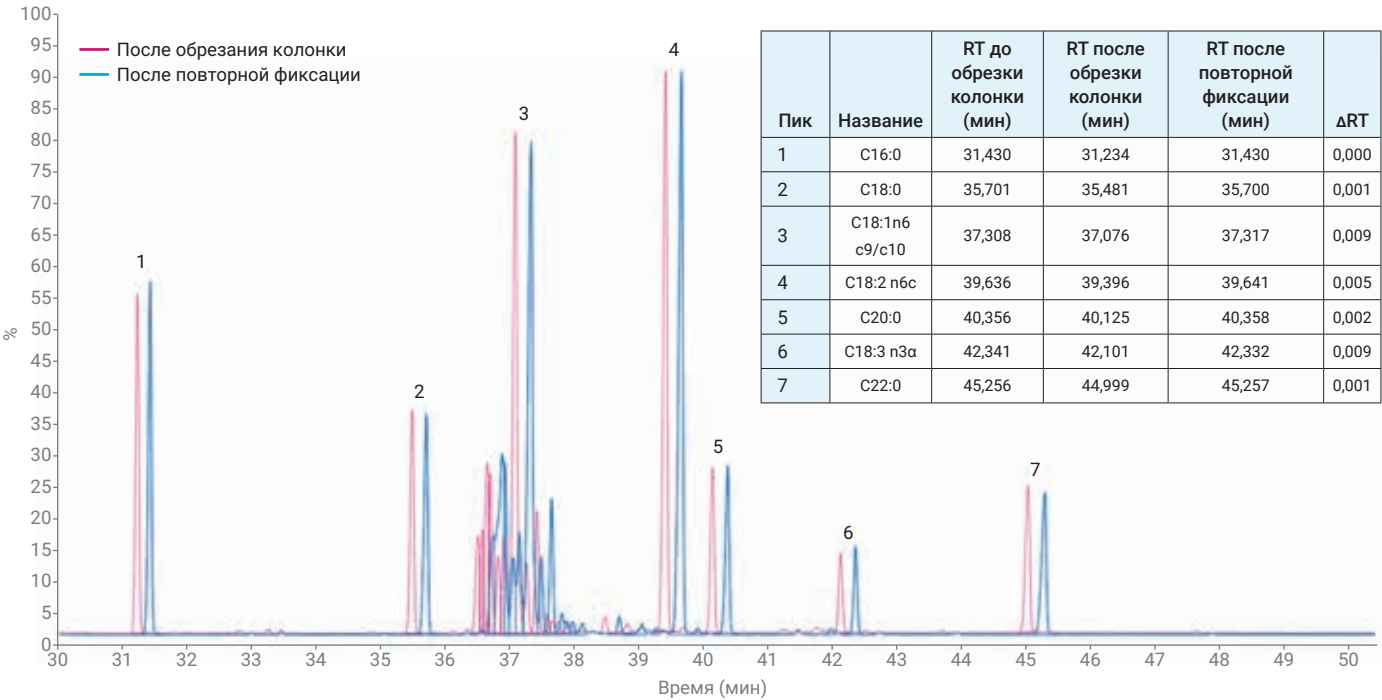


Рис. 8. Результаты и увеличенные наложенные хроматограммы стандарта для определения характеристик колонок до и после повторной фиксации.

Выводы

Разделение изомеров метиловых эфиров жирных кислот на колонке Agilent CP-Sil 88 длиной 100 м на газовом хроматографе Agilent 8890 позволяет проводить надежное разрешение, превышающее минимально необходимые требования по оценке рабочих характеристик, специфицированные в методике AOAC 2012.13. При повторных вводах специализированного стандарта метиловых эфиров жирных кислот для оценки рабочих характеристик колонок была продемонстрирована отличная повторяемость результатов с величинами RSD, равными 0,007%, для времен удерживания у двух ключевых изомеров C18. И наконец, использование стандарта для оценки рабочих характеристик колонок в сочетании с уникальной опцией RTL от Agilent позволяет последовательно корректировать идентификацию изомеров метиловых эфиров жирных кислот, быстрее приводить прибор в состояние готовности после его технического обслуживания и легче проводить сравнение результатов, полученных в разных лабораториях.

Литература

1. Official Methods of Analysis AOAC International, Method 2012.13, **2012**.
2. David, F.; Sandra, P.; Vickers, A. K. Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters. *Методический обзор, Agilent Technologies*, номер публикации, 5989-3760EN, **2005** г.
3. Zou, Y.; Wu, H. Улучшение качества анализа 37 метиловых эфиров жирных кислот. Методический обзор, Agilent Technologies, номер публикации 5991-8706RU, **2018** г.

www.agilent.com/chem

Информация в этом документе может быть изменена
без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2019
Напечатано в США 15 ноября 2019 г.
5994-1184RU

