

确保依照 AOAC 2012.13 在具有保留时间锁定功能的 Agilent 8890 气相色谱系统上分析顺-反脂肪酸甲酯的系统适用性

作者

Rachael Ciotti
安捷伦科技有限公司

摘要

AOAC 方法 2012.13 利用配备火焰离子化检测器的毛细管气相色谱测定乳制品和婴儿配方奶中的脂肪酸含量。本应用简报在配备 100 m CP-Sil 88 色谱柱的 Agilent 8890 气相色谱系统上运行本方法，分析常见的 37 种脂肪酸甲酯系列化合物，并使用 19 种 C18 系列的单不饱和和多不饱和顺-反异构体评估了油酸、亚油酸和亚麻酸的精细分离效率；使用定性标准品评估关键脂肪酸甲酯顺式、反式异构体之间的分离度；最后，还实施了保留时间锁定 (RTL)，以免在色谱柱维护后重新进行校准。

前言

乳制品和植物脂肪中包含的甘油三酯，是一种由甘油和三个脂肪酸链结合形成的酯。脂肪酸由烃链末端连接羧基形成，烃链可以是长链、短链、直链、支链，饱和度可以是饱和、单不饱和或多不饱和。不饱和脂肪中双键的不同构型和位置，会产生许多位置异构体和顺-反异构体。正确鉴定异构体对于准确的营养标示至关重要。

分离和鉴定复杂基质中的脂肪酸同系物和异构体一直是一项比较有挑战性的工作。经过酯化作用得到相应的脂肪酸甲酯 (FAME)，之后可通过配备火焰离子化检测器的气相色谱实现可重现的分析。色谱柱固定相的类型和长度对异构体洗脱顺序和分离效率有很大的影响。目前没有色谱柱能够完全分离各种脂肪酸甲酯顺-反异构体。使用涂覆有高级性氟丙基固定相 (如 CP-Sil 88) 的 100 m 毛细管柱能够可靠、精细地分离大多数顺式和反式脂肪酸甲酯异构体。与传统的 WAX 色谱柱不同，在高级性氟丙基固定相上，反式异构体会先于顺式异构体洗脱。

实验部分

利用配备分流/不分流进样口 (SSL)、火焰离子化检测器 (FID) 和 Agilent 7693A 自动液体进样器 (ALS) 的 Agilent 8890 气相色谱仪生成数据。

化学品

购买以下分析标准品，来评估脂肪酸甲酯分析性能：

- 37 种组分的脂肪酸甲酯混合物 (47885-U)，包含 C4-C24 脂肪酸甲酯，浓度范围 100-600 µg/mL
- 4 种组分的总顺-反亚油酸甲酯混合物 (CRM47791)，10 mg/mL

- 8 种组分的亚麻酸甲酯异构体混合物 (L6031)，各组分重量百分比在 3-30% 范围内
- 顺-反脂肪酸甲酯色谱柱性能评估混合物 (40495-U)，包含各种浓度 2.5 mg/mL 的脂肪酸甲酯

以上所有混合物均购自 MilliporeSigma (St. Louis, MO)。8 种组分的顺-反脂肪酸甲酯混合物 (35079)，购自 Restek (Bellefonte, PA)。

表 1. 仪器条件

Agilent 8890 气相色谱条件 — AOAC 官方方法 2012.13	
进样量	
进样针规格	10 µL, 部件号 G4513-80204
进样量	1 µL
进样口	SSL, 分流模式
温度	250 °C
分流比	10:1
隔垫吹扫流速	3 mL/min
色谱柱	Agilent CP-Sil 88, 部件号 CP7489
尺寸	100 m × 0.25 mm, 0.20 µm
载气	氮气, 0.8 mL/min, 恒流模式
柱温箱	
初始温度	60 °C
初始保持时间	5 min
升温	以 15 °C/min 的速率升至 165 °C, 保持 1 分钟 以 2 °C/min 的速率升至 225 °C, 保持 20 分钟
检测器	
类型	FID
温度	250 °C
空气流速	400 mL/min
H ₂ 燃气流速	40 mL/min
N ₂ 补偿气流速	25 mL/min

结果与讨论

进样分析 37 种脂肪酸甲酯 (C4:0–C24:0) 混合物的二氯甲烷溶液, 评估整个范围内的分离度 (图 1)。将初始柱温箱温度设为 60 °C, 设置保持时间, 可确保分离 C4:0 (牛奶质量的重要指标) 与溶剂前沿峰。采用梯度柱温箱温度程序, 可高效分离顺-反异构体和长链多不饱和脂肪酸甲酯, 避免 C23:0 和 C20:4n6 峰在约 48 分钟处共洗脱。不过 C23:0 在乳制品中并不常见, 这一点在大部分情况下可以忽略不计。

使用市售参比标准混合物, 考察对顺-反异构体的精细分离。将顺-反脂肪酸甲酯混合物 (8 种组分, 购自 Restek) 的二氯甲烷溶液用二氯甲烷稀释 20 倍, 进样至 GC 中。这种方法非常适合分离六种顺-反 C18:1 脂肪酸甲酯异构体 (图 2)。

虽然反式异构体之间存在轻微的共洗脱, 但该组化合物与顺式 C18 单不饱和异构体仍然得以充分分离。这一结果非常重要, 因为 AOAC 官方方法 2012.13 中会报告反式脂肪酸化合物。

将亚油酸甲酯脂肪酸甲酯混合物 (MilliporeSigma CRM47791) 的二氯甲烷溶液稀释至最终浓度 500 mg/L, 表征 C18:2 异构体的分离。如图 3 所示, 各种亚油酸脂肪酸甲酯异构体均得到充分分离。

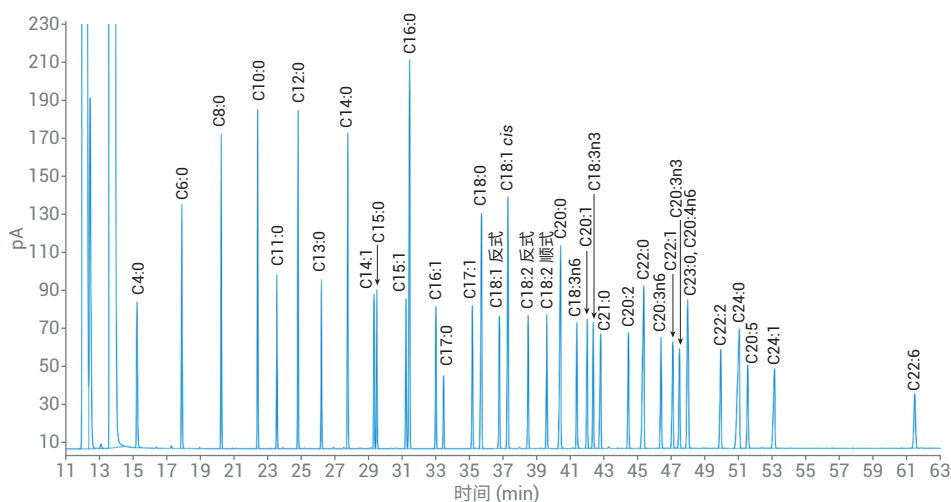


图 1. 37 种脂肪酸甲酯的色谱图

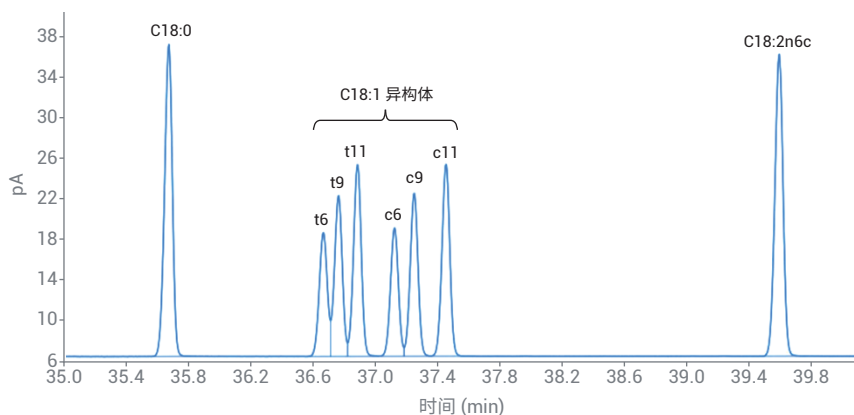


图 2. 依照 AOAC 2012.13 得到的 C18:1 异构体放大色谱图

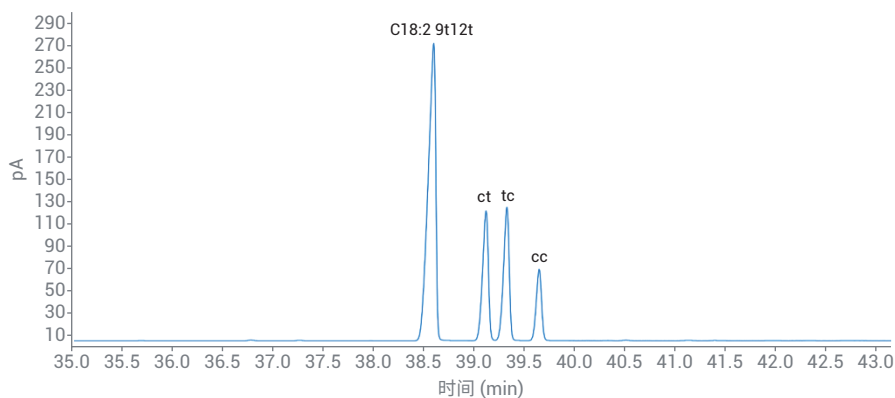


图 3. 依照 AOAC 方法 2012.13 得到的 C18:2 异构体放大色谱图

最后，进样分析亚麻酸甲酯混合物 (MilliporeSigma L6031) 的二氯甲烷溶液 (2.5 mg/mL)，考察分析 C18:3 异构体的方法性能 (图 4)。没有色谱柱能够完全分离亚麻酸异构体；但本简报所述方法可以充分分离反式异构体和 α -亚麻酸甲酯，可以达到营养报告的要求。

方法 AOAC 2012.13 要求在校准前进行性能评估检查。确定反式-C18:1n13t/C18:1n14t 与顺式-C18:1n9c/C18:1n10c 峰之间的分离度 (图 5，内插图)。使用公式 1，当计算出的 R 值等于或大于 1.00 时，分离度可接受。重复进样五次定性的顺-反脂肪酸甲酯色谱柱性能评估混合物 (MilliporeSigma 40495-U)，评估分离度和峰面积/保留时间重现性。

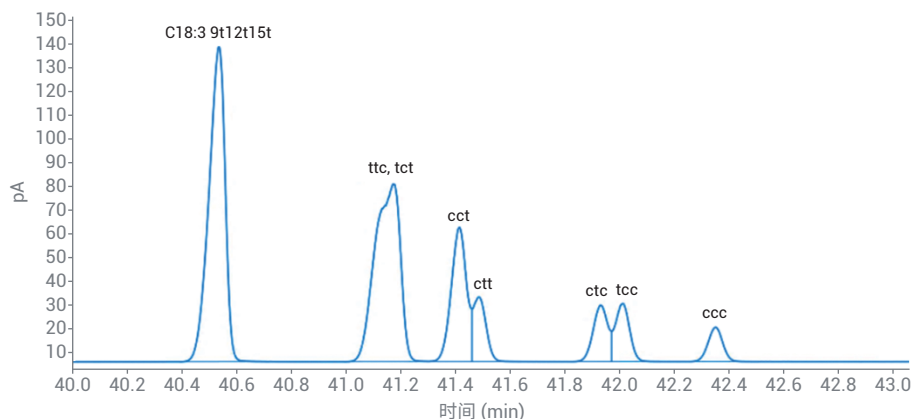


图 4. 依照 AOAC 方法 2012.13 得到的放大色谱图，显示 C18:3 异构体分离度

$$R = 1.18 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0.5h1} + W_{0.5h2}} \right)$$

公式 1. 半峰高处的峰分离度

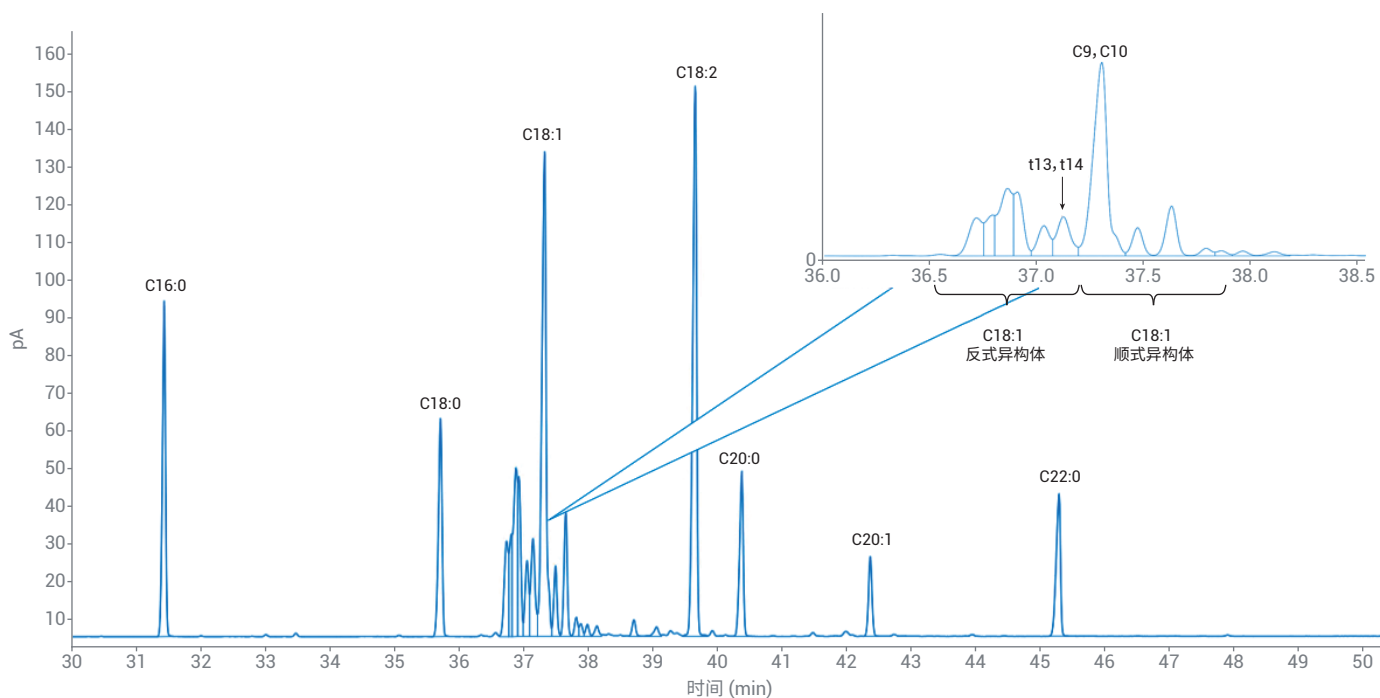


图 5. 定性色谱柱性能评估标准品的放大色谱图

表 2 汇总了分离度检查中所用关键组的结果：两种异构体的保留时间重现性非常出色，相对标准偏差 (RSD) 为 0.007%。各种异构体的峰面积精度 RSD 均小于 2.5%。半峰高处的平均峰分离度为 1.494，超出最低方法分离度要求。

保留时间锁定

按照 AOAC 2012.13 要求测定脂肪酸甲酯系列化合物时，为实现正确鉴定，对温度和流速精密度均有要求；这些化合物成为了 RTL 的绝佳候选物质。安捷伦 RTL 功能使给定仪器实现长期重现性，无需在色谱柱维护后调整保留时间。将方法转移至其他 GC 后，使用 RTL 功能可保持保留时间相同，便于方法转移和比较不同实验室的结果。通过研究一系列参比运行中进样口参数和保留时间之间的关系，使用这些结果校准系统，并将这种关系存储在方法文件中，RTL 可正确匹配并锁定指定化合物的保留时间。

Agilent OpenLab CDS 2 采集软件具有 RTL 向导功能，可帮助操作人员选择用于锁定的采集方法、从之前的采集数据文件中选择目标化合物，引导操作人员完成这一步骤。然后，RTL 向导根据指定采集方法中规定的参数，设置一系列压力校准运行。使用原始压力设定值运行一次，然后分别在压力高于/低于方法设定值 15% 的条件下各运行一次。通常会在维护（例如切割色谱柱）后发生压力设定值偏差，进而导致色谱柱长度改变。锁定方法无需在

色谱柱维护或更换后重新校准保留时间；可通过简单的重新锁定标准品匹配原始仪器保留时间。如果重新锁定标准品同时用作色谱柱性能评估标准品，则用户可一步满足 AOAC 方法 2012.13 中规定的性能评估要求。

表 2. 重复进样五次定性色谱柱性能评估脂肪酸甲酯混标得到的结果

值	描述	重复进样 1	重复进样 2	重复进样 3	重复进样 4	重复进样 5	RSD
t _{R1}	保留时间 (min), t13/t14 峰	37.124	37.125	37.128	37.128	37.13	0.007%
t _{R2}	保留时间 2 (min), c9/c10 峰	37.304	37.305	37.308	37.308	37.31	0.007%
	峰面积 t13/t14 峰	115.605	113.463	117.747	115.944	120.812	2.356%
	峰面积 c9/c10 峰	599.259	588.91	610.828	602.276	628.644	2.458%
W _{0.5h1}	半峰高处峰宽, t13/t14 峰	0.073	0.072	0.073	0.073	0.074	0.969%
W _{0.5h2}	半峰高处峰宽, c9/c10 峰	0.069	0.069	0.069	0.069	0.07	0.646%
R	半峰高处峰分离度	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.

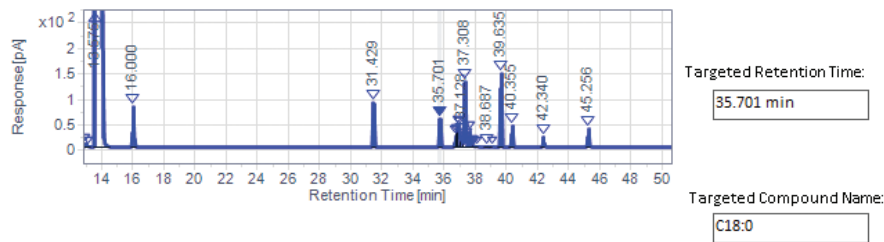


图 6. 保留时间锁定向导设置界面

利用顺-反脂肪酸甲酯色谱柱性能评估混标方法进行保留时间锁定。从之前采集的性能评估混标进样中选择采集方法、处理方法和处理结果文件。选择 C18:0 作为 RTL 的目标化合物。图 6 所示为 RTL 向导使用目标保留时间为 35.701 分钟的 C18:0 峰引导压力校准步骤。由 RTL 向导自动安排三次系列运行，所得压力校准曲线表现出优异的相关性（图 7）。将分析方法锁定在指示的压力 25.498 psi 下。随后，在 CP-Sil 88 100 m 色谱柱的柱头切割约 0.5 m，进行色谱柱维护。

维护后，重新分析顺-反脂肪酸甲酯色谱柱性能评估混标，评估柱长变化造成的保留损失程度。结果显示目标 C18:0 峰的保留时间向前偏移了约 0.232 分钟。如果系

统未经保留时间锁定，将需要由操作人员分析包含全套所需脂肪酸甲酯的标准品，并在数据处理方法中手动重新输入分析物的保留时间。

这里无需手动重新输入新的分析物保留时间，而是使用 RTL 向导重新锁定分析方法，并使用新压力设定值 25.253 psi。新的压力设定值可适应柱长的变化，确定预期保留时间，有助于更快完成系统准备工作。重新进样分析顺-反脂肪酸甲酯色谱

柱性能评估混标，确定采用新的压力设定值能否得到预期的保留时间。图 8 为结果汇总以及叠加色谱图。重新锁定的色谱柱切割后保留时间与原始的切割前保留时间非常相近，各种关键分析物在 100 m 色谱柱上的保留时间变化在 0.000-0.009 分钟范围内。例如 C18:0 实际保留时间为 35.700 分钟，而最初的目标保留时间为 35.701 分钟 — 相对百分比偏差为 0.0028%。



图 7. 保留时间锁定压力校准结果

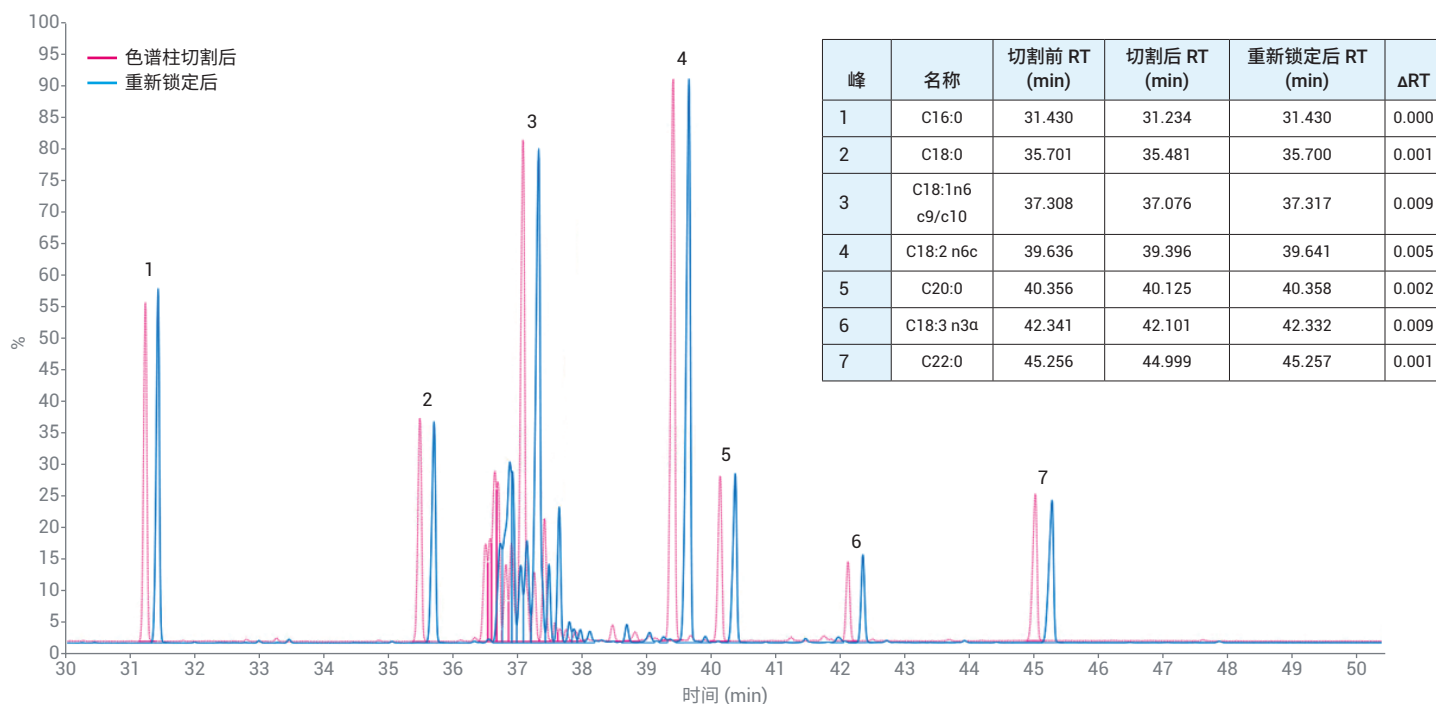


图 8. 重新锁定前后的色谱柱性能标准品结果和放大叠加色谱图

结论

在 Agilent 8890 气相色谱系统上使用 Agilent CP-Sil 88 100 m 色谱柱分离脂肪酸甲酯异构体，能够获得可靠的分离度，超出 AOAC 方法 2012.13 中规定的最低性能评估要求。本研究使用脂肪酸甲酯专用色谱柱性能评估标准品获得了优异的进样重现性，两种关键 C18 异构体的保留时间 RSD 为 0.007%。将色谱柱性能评估标准品与安捷伦独特的 RTL 功能结合使用，能够始终如一地正确鉴定脂肪酸甲酯异构体，在仪器维护后快速恢复正常运行，并轻松比较不同实验室的结果。

参考文献

1. Official Methods of Analysis AOAC International, Method 2012.13, **2012**
2. David, F.; Sandra, P.; Vickers, A. K. 脂肪酸甲酯分析色谱柱的选择, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5989-3760CHCN, **2005**
3. Zou, Y.; Wu, H. 改善对 37 种脂肪酸甲酯的分析, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-8706ZHCN, **2018**

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11月15日，中国出版
5994-1184ZHCN

