

Анализ метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) с помощью газового хроматографа Agilent 8890 и его приложение к реальным образцам

Автор

Че Чанг (Jie Zhang)
Agilent Technologies, Inc.
Шанхай, КНР

Аннотация

В данных методических рекомендациях рассматривается применение методик GB5009.168-2016¹ и 5009.257-2016² для анализа МЭЖК с помощью длинной полярной колонки на ГХ Agilent 8890. В ходе работы методика ГХ была оптимизирована для разделения 37 метиловых эфиров распространенных жирных кислот и 21 метилового эфира распространенных *транс*-жирных кислот за 80 минут. Затем в работе были проанализированы воспроизводимость времен удерживания и площадей пиков, а также линейность системы, и проанализированы смеси МЭЖК, приготовленные из реальных образцов растительных масел.

Введение

Жиры в основном состоят из сложных эфиров жирных кислот и глицерина, обычно называемых триглицеридами.

При указании пищевой ценности продуктов питания жиры определяются как сумма жирных кислот, содержащихся в продукте, независимо от их источника, выраженная в виде эквивалентного количества триглицеридов.

В зависимости от степени насыщенности жирные кислоты разделяются на несколько классов: насыщенные, мононенасыщенные и полиненасыщенные. Трансжирные кислоты — это жирные кислоты, содержащие как минимум одну несопряженную двойную связь в трансконфигурации.

Диетология всегда обращала пристальное внимание на содержание жиров в пище. Многие потребители, которые пытаются питаться здоровой или полноценной пищей, похудеть и не только, интересуются содержанием жиров в своей пище.

Для определения количества жиров в продуктах питания был разработан ряд методик, таких как методики GB 5009.168-2016¹ и GB 5009.257-2016². Эти две методики описывают экстракцию жиров из продуктов питания различного состава, переэтерификацию жирных кислот в метиловые эфиры (МЭЖК) и рекомендуют газохроматографические методики для разделения полученных смесей МЭЖК и анализа полученных данных. Методика 168 в основном фокусируется на определении 37 наиболее распространенных жирных кислот, в то время как методика 257 предназначена для определения транс-жирных кислот.

Оборудование и реактивы

Оборудование

- Газовый хроматограф Agilent 8890 с испарителем с делением потока и без деления потока и пламенно-ионизационным детектором.
- Жидкостный автосамплер Agilent 7693A (кат. № G4567A).

Реактивы

- Смесь 37 МЭЖК (CDAА-252795-MIX-1 мл), содержащая МЭЖК с длиной цепи в диапазоне C4–C24 в концентрациях 200–400 нг/мкл, была приобретена в компании ANPEL Laboratory Technologies Inc. (Шанхай).

- Смесь 13 транс-МЭЖК (CDAА-2527,15–100 мг) и смесь восьми метиловых эфиров цис/транс-октадекатриеновых кислот (CDAB-CRM47792) были приобретены в компании ANPEL Laboratory Technologies Inc. (Шанхай). Массовая доля каждого из компонентов в этих двух смесях находилась в диапазоне 3–30%.

Пробы

Образцы соевого, арахисового и сезамового масла для исследования были предоставлены и подготовлены Шанхайским институтом контроля качества и технических исследований по методике GB 5009.168-2016.

Условия проведения эксперимента

Таблица 1. Условия проведения эксперимента

Система ГХ	ГХ Agilent 8890A
Испаритель с делением потока и без деления потока	250 °С, коэффициент деления потока 100:1
Лайнер	С делением потока, Ultra Inert, набитый стекловатой (кат. № 5190–2295)
Температурная программа термостата	100 °С (13 мин), 10 °С/мин до 180 °С (6 мин), 1 °С/мин до 200 °С (20 мин), 4 °С/мин до 230 °С (7 мин)
Газ-носитель	Азот, 40 psi, режим постоянного давления
Колонка	Agilent HP-88, 100 м × 0,25 мм, 0,20 мкм (кат. № 112-88A7)

Результаты и их обсуждение

Температурная программа термостата использовалась в соответствии с рекомендациями методики GB 5009.168-2016. Использовался режим постоянного давления. В результате оптимизации было установлено, что достаточное разделение с минимальным разрешением 1,3 для близких пар, таких как C20:0/C20:3n6, что превосходит рекомендованное методикой разрешение 1,25, достигается при давлении 2,76 бар.

Стандартная смесь 37 МЭЖК разбавлялась до содержания каждого из компонентов в диапазоне 50–100 нг/мл и применялась для проверки воспроизводимости системы. Стандарт был выбран в соответствии с требованиями методики GB и для того, чтобы как можно лучше соответствовать составу жирных кислот различных продуктов питания. Программа термостата была довольно продолжительной; как видно из рис. 1, все 37 МЭЖК разделялись за 81 минуту. Все компоненты смеси были разрешены. При наложении хроматограмм шести последовательных экспериментов очевидна отличная воспроизводимость времен удерживания и площадей пиков (см. рис. 1). В табл. 2 перечислены времена удерживания, площади пиков и точность для каждого

из компонентов. Площадь пиков воспроизводилась с точностью 1,1–3,4% (см. рис. 2), и только для одного компонента ОСО площади пика достигло 4,0%. Так как пробы готовились в виде раствора в гексане, а продолжительность одного анализа превышала 80 минут, испарение пробы (в особенности растворителя) в ходе разделения вносило некоторую неточность в результаты определения содержания компонентов.

Каждый из компонентов смеси вводился в колонку в количестве 0,5–1 нг. Такое малое количество исследуемого соединения в сочетании с эффектами испарения растворителя привело к тому, что ОСО площади пиков немного превысило 2%, что, однако, не выходило за пределы требований методики к количественному определению.

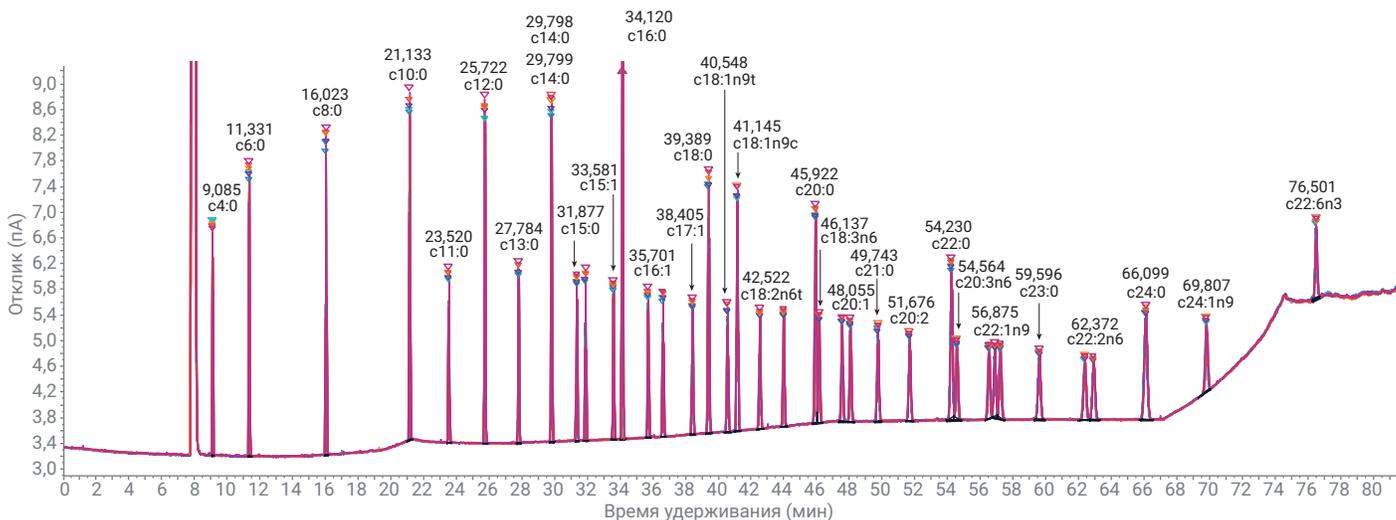


Рис. 1. Наложённые друг на друга хроматограммы шести экспериментов по анализу смеси 37 МЭЖК на ГХ модели 8890

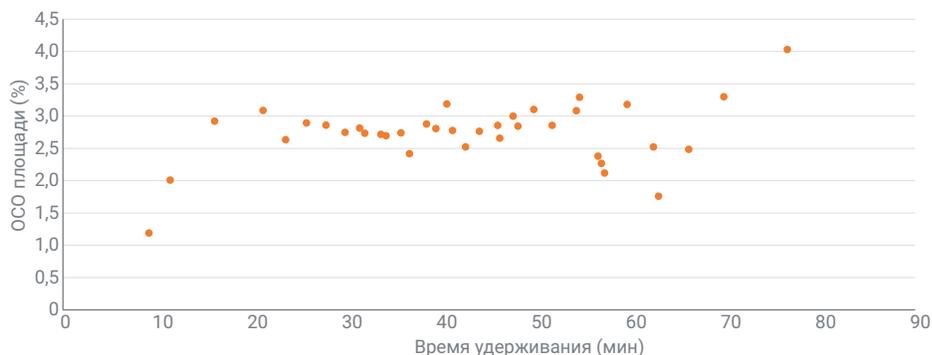


Рис. 2. Воспроизводимость площадей пиков 37 МЭЖК в шести экспериментах

Воспроизводимость времен удерживания находилась в диапазоне 0,01–0,03% (см. рис. 3). Хотя в таком продолжительном эксперименте нелегко достигнуть отличной воспроизводимости системы, газовый хроматограф модели 8890А продемонстрировал свою способность точно, стабильно и воспроизводимо контролировать температуру термостата, давление на входе испарителя и расход газа на детекторе, что, в свою очередь, помогает получить хорошо воспроизводимые хроматограммы и надежно идентифицировать компоненты смеси.

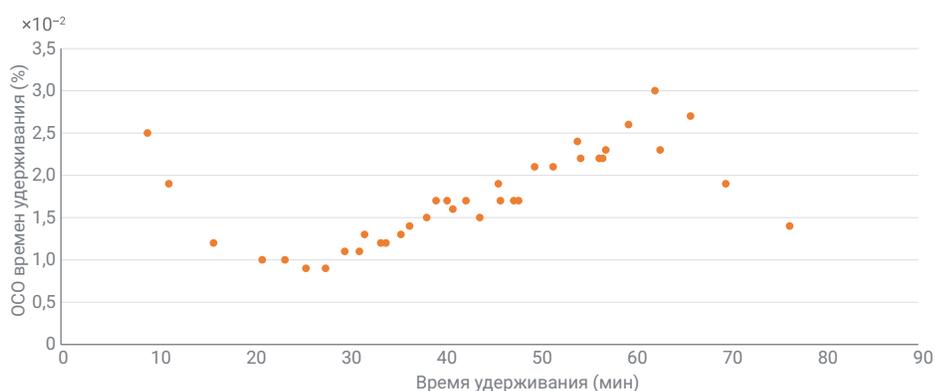


Рис. 3. Воспроизводимость времен удерживания 37 МЭЖК в шести экспериментах

Таблица 2. Времена удерживания, площади пиков и их воспроизводимость для 37 соединений в шести экспериментах

Соединение	Среднее ВУ (мин)	ОСО ВУ (%)	Средняя площадь	ОСО площади (%)
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

Соединение	Среднее ВУ (мин)	ОСО ВУ (%)	Средняя площадь	ОСО площади (%)
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

Линейность системы оценивалась по результатам расчета относительного стандартного отклонения (ОСО) коэффициента отклика для метиловых эфиров олеиновой и линолевой кислот в пяти разведениях. Из табл. 3 можно увидеть, что для двух из тестовых соединений ОСО коэффициента отклика достигает всего лишь 4%, что демонстрирует великолепную линейность системы в отношении площадей пиков. Некоторые лаборатории используют для количественного анализа методику с внешним стандартом. Хорошая линейность детектора в широком диапазоне концентраций позволяет добиться достаточной точности количественного анализа даже при использовании одной точки для построения калибровочной кривой.

На рис. 4 приведена хроматограмма разделения смеси 13 метиловых эфиров *транс*-жирных -кислот и восьми метиловых эфиров изомеров октадекатриеновой кислоты. Полученные результаты соответствуют требованиям методики GB 5009.257-2016. Программа термостата была идентичной программе для анализа смеси 37 МЭЖК. Восемь метиловых эфиров изомерных *транс*-C18:3 кислот разделить особенно трудно, особенно принимая во внимание то, что в этом же эксперименте должны быть разделены другие присутствующие в смеси МЭЖК. Однако на увеличенном участке хроматограммы на рис. 5

видно, что колонка НР-88 длиной 100 м позволила выделить все восемь пиков восьми изомерных метиловых эфиров октадекатриеновой кислоты. Хотя пики разделены далеко не до базовой линии, однако сравнение и с эталонной хроматограммой из методики GB 5009.257-2016 показывает, что полученное разделение находится в приемлемых пределах. Кроме того, методика позволила надежно отделить метиловый эфир (9Z,12Z,15Z)-октадекатриеновой кислоты от остальных семи *транс*-изомеров. Это важное достижение, учитывая тенденции к маркировке природы *транс*-жирных кислот на упаковке продуктов питания.

Таблица 3. Линейность площадей пиков для *цис*-C18:1 и *цис*-C18:2

Компонент	Содержание	Площадь пика (РА*S)	Коэффициент отклика (интенсивность отклика на единицу вещества)	ОСО коэфф. отклика
<i>цис</i> -C18:1	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	
	17 000 ppm	3065,390	0,180	
<i>цис</i> -C18:2	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	

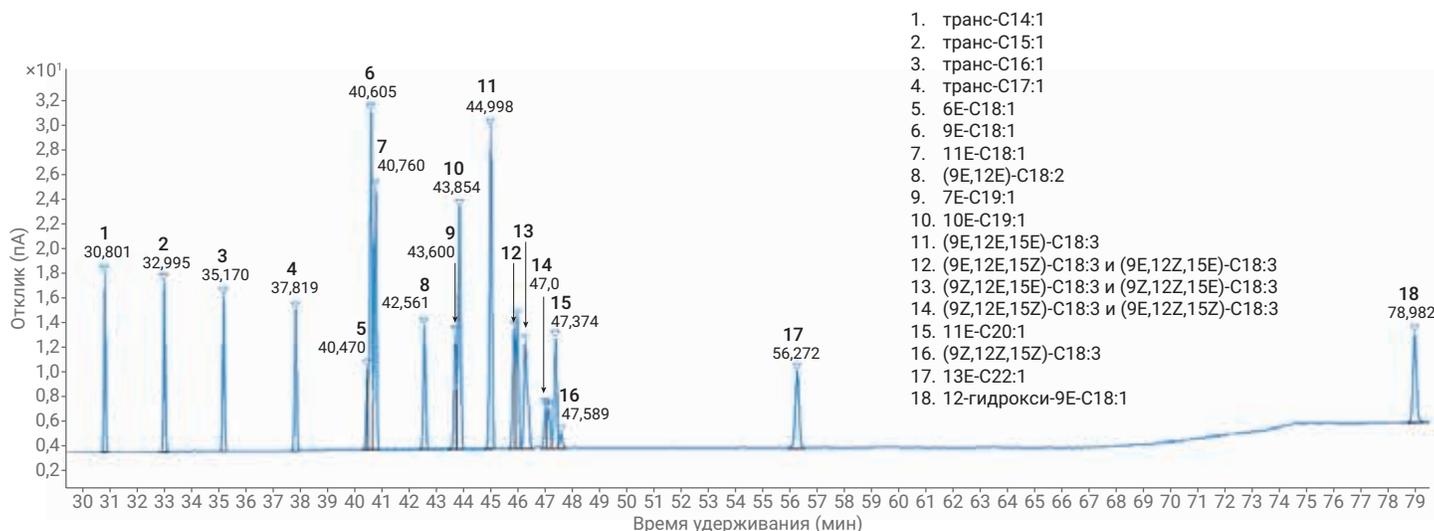


Рис. 4. Хроматограмма анализа смеси 21 *транс*-МЭЖК на колонке НР-88

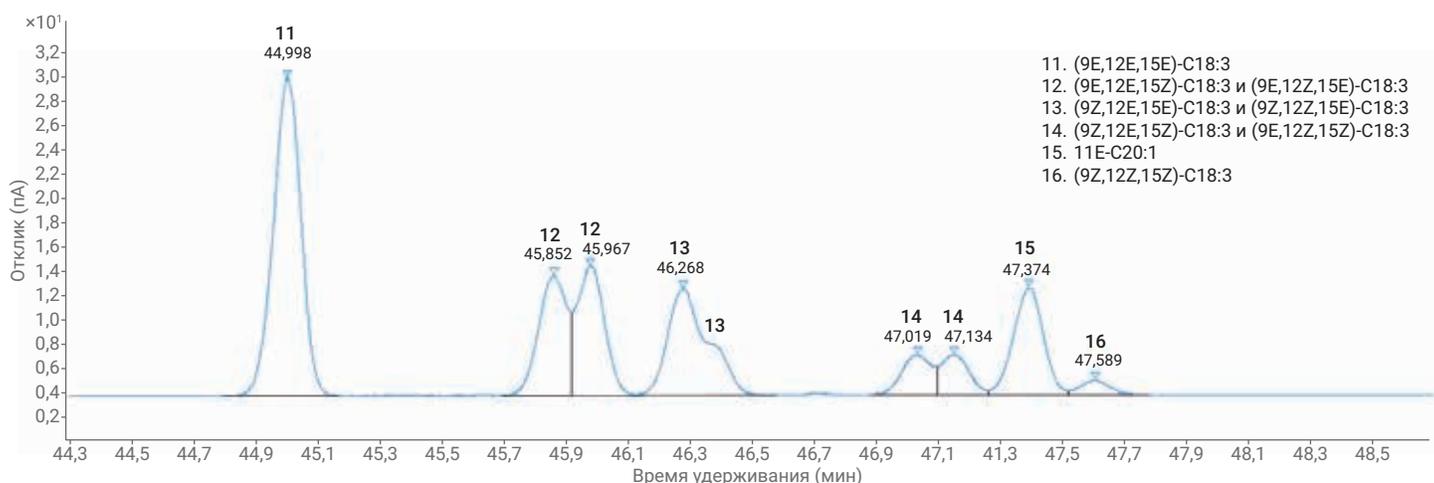


Рис. 5. Увеличенный участок хроматограммы с пиками метиловых эфиров изомеров октадекатриеновой кислоты

Реальные образцы растительных масел, включающие в себя соевое, арахисовое и сезамовое масло, экстрагировались, дериватизировались и анализировались на газовом хроматографе модели 8890 по методике GB 5009.168-2016. Полученные хроматограммы приведены на рис. 6А, 6В и 6С. Основными жирными кислотами, найденными во всех трех образцах масел, были C16:0, C18:0, C18:1n9c, C18:2n6c, C18:3n3 и C20:1 (красным

шрифтом на рисунках выделены пики соединений, перечисленных в калибровочной таблице методики, однако не найденных в реальном образце).

Существует методика анализа смесей МЭЖК, которая позволяет разделить смесь из 37 распространенных МЭЖК на короткой полицианопротилсилоксановой колонке всего за 10 минут³. Однако эта ускоренная методика имеет некоторые ограничения

при разделении *цис*- и *транс*-изомеров МЭЖК. В свою очередь, эксперимент продолжительностью 60–80 минут на длинной полярной колонке предназначен для разделения смесей, содержащих сложные жирные *цис*- и *транс*кислоты и другие сложные для разделения изомеры. В некоторых случаях, как, например, при испытании качества нерафинированного оливкового масла, хорошее разделение изомерных *цис*- и *транс*-МЭЖК важнее, чем продолжительность анализа.

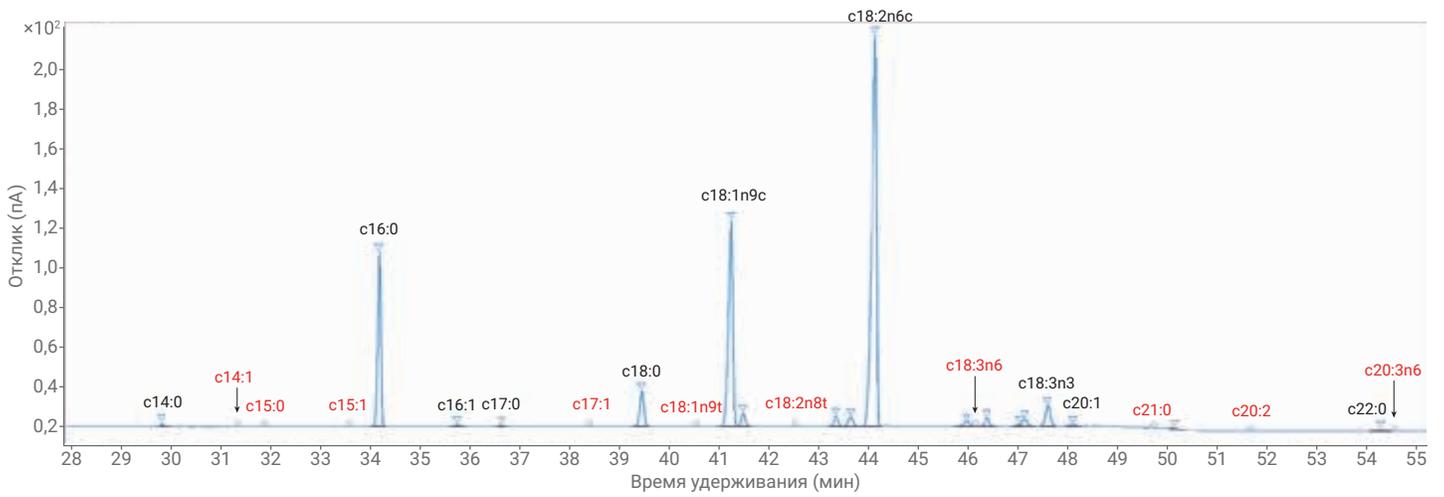


Рис. 6А. Хроматограмма сезамового масла

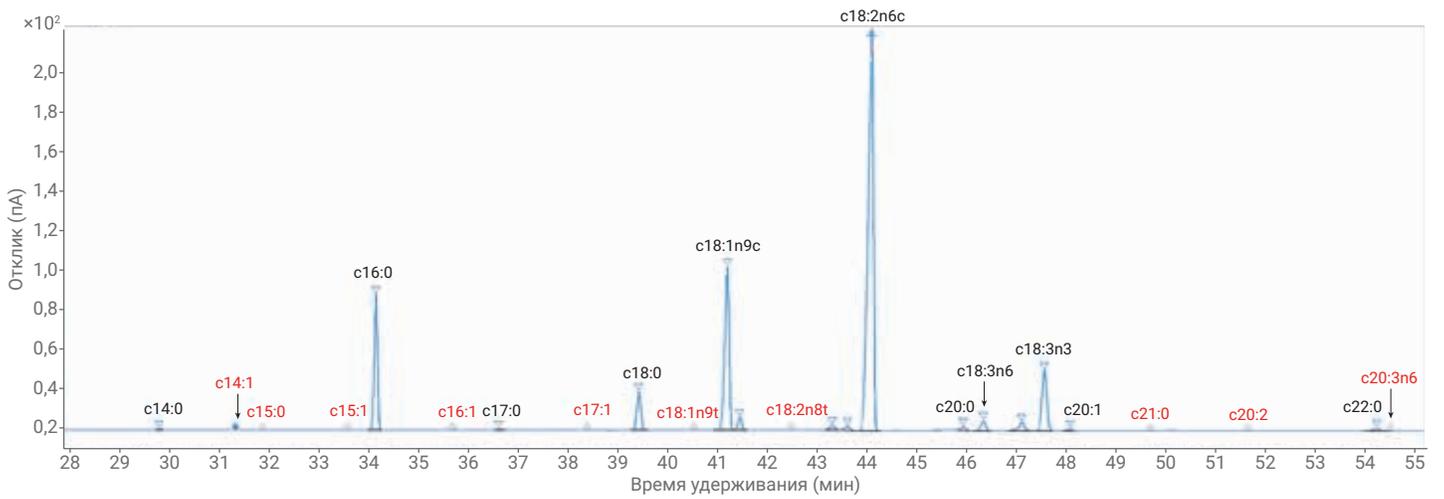


Рис. 6В. Хроматограмма соевого масла

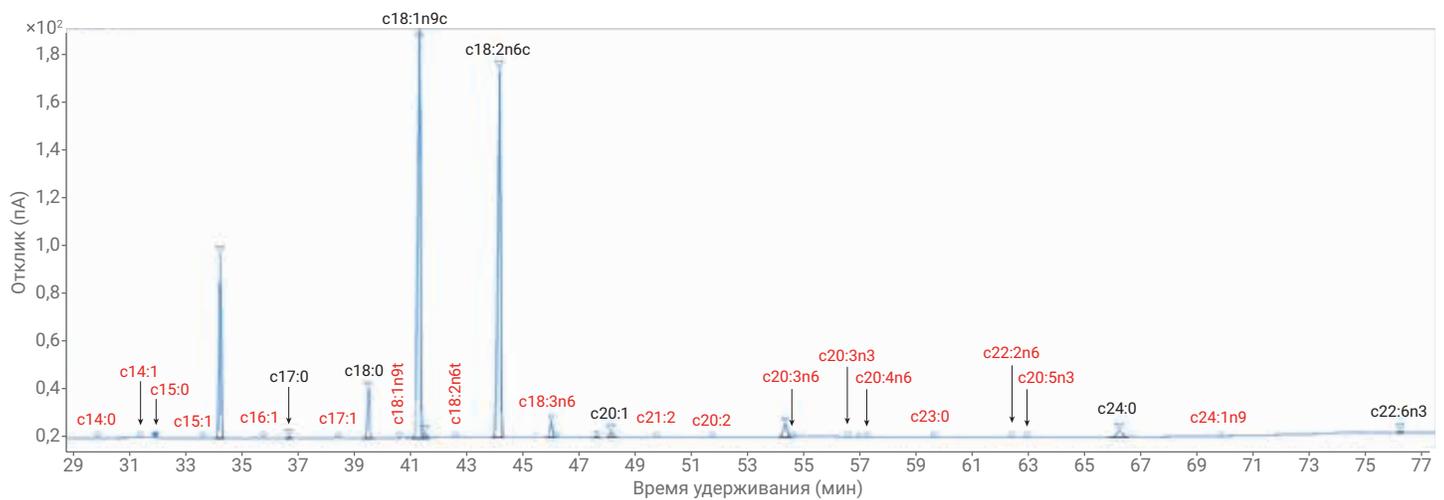


Рис 6С. Хроматограмма арахисового масла

Выводы

Газовый хроматограф модели 8890A с колонкой HP-88 позволяет добиться хорошего разделения как при анализе смеси 37 распространенных МЭЖК, так и при анализе смеси 21 *транс*-МЭЖК. Эксперимент продемонстрировал разделение критических пар не хуже, чем требуемое по методикам GB 5009.168-2016 и GB 5009.257-2016. Великолепная воспроизводимость времен удерживания и площадей пиков, а также большой линейный диапазон ПИД делает газовый хроматограф модели 8890A отличным выбором для надежного определения МЭЖК.

Литература

1. Determination of fatty acids in food, методика GB5009.168-2016.
2. Determination of *trans* fatty acids in food, методика GB5009.257-2016.
3. A fast analysis of FAME by Intuvo 9000 GC, *методические рекомендации Agilent Technologies*, номер публикации 5991-9482EN.

www.agilent.com/chem

Информация в этом документе может быть изменена без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2019.
Напечатано в США 2 января 2019 г.
5994-0549RU