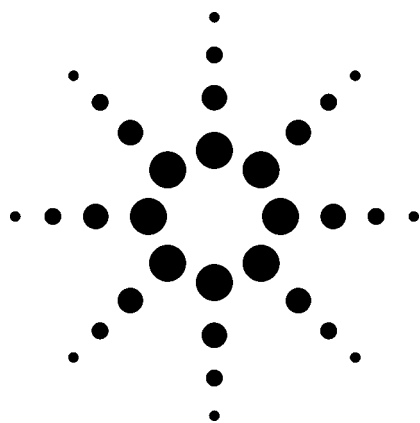


脂肪酸甲酯分析色谱柱的选择

应用报告



食品分析

作者

Frank David
Research Institute for Chromatography
President Kennedy Park 20
B-8500 Kortrijk,
Belgium

Pat Sandra
University of Gent
Krijgslaan 281 S4,
B-9000 Gent
Belgium

Allen K. Vickers
Agilent Technologies, Inc.
91 Blue Ravine Road
Folsom, CA 95630-4714
USA

摘要

食品中的脂肪酸甲酯（FAME）的分析对食品的表征过程是十分重要的，正常情况下脂肪酸甲酯的分析使用涂渍极性固定相色谱柱，例如聚乙二醇或氰丙基聚硅氧烷固定相，这种固定相可以按脂肪酸的碳数、不饱和度、顺反构象以及双键的位置对它们进行分离。

本应用报告比较三种不同固定相对脂肪酸甲酯的分离的情况。聚乙二醇柱对不太复杂的样品可以得到很好的分离；但不能分离顺-反异构体的样品。而中等极性的氰丙基聚硅氧烷柱（DB23）对复杂的 FAME 混合物可以得到很好的分离，对一些顺反异构体也可以得到分离；要使顺反异构体分离的更好，就要使用更高极性的 HP-88 氰丙基色谱柱。

前言

FAME 的分析用于食品中脂类部分含量的表征，也是食品分析中极为重要的一项内容，脂类主要包括甘油酸酯，它们是一个甘油分子和三个脂肪酸分子的酯，绝大多数食用脂肪和油主要含有的脂肪酸是从月桂酸（十二碳酸）到花生酸（二十碳酸），除直链饱和脂肪酸外，也有支链脂肪酸、单不饱和脂肪酸、双不饱和脂肪酸以及多不饱和脂肪酸。表 1 是最重要的脂肪酸及其的缩写。



Agilent Technologies

表 1. 脂肪酸、通用名称及其缩写

脂肪酸	通俗名称	缩写
丁酸	丁酸	C4:0
癸酸	癸酸	C10:0
十二烷酸	月桂酸	C12:0
十四烷酸	肉豆蔻	C14:0
十六烷酸	棕榈酸	C16:0
十六烷烯酸	棕榈油酸	C16:1
十八烷酸	硬脂酸	C18:0
顺-9-十八烯酸	油酸	C18:1- <i>cis</i> (n9)
反-9-十八烯酸	反油酸	C18:1- <i>trans</i> (n9)
全顺-9, 12-十八碳二烯酸	亚油酸	C18:2 - <i>cis</i> (n6)
全反-9, 12-十八碳二烯酸	反亚油酸	C18:2 - <i>trans</i> (n6)
全顺-9, 12, 15-十八碳三烯酸	α -亚油酸	C18:3 (n3)
全顺-6, 9, 12-十八碳三烯酸	γ -亚油酸	C18:3 (n6)
二十烷酸	花生酸	C20:0
顺-11-二十碳烯酸		C20:1 (n9)
全顺-11, 14-二十碳二烯酸		C20:2 (n6)
全顺-11, 14, 17-二十碳三烯酸		C20:3 (n3)
全顺-8, 11, 14-二十碳三烯酸	Dihomogammalinolenic acid	C20:3 (n6)
全顺-5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸	花生四烯酸	C20:4 (n6)
全顺-5, 8, 11, 14, 17-二十碳五烯酸	EPA	C20:5 (n3)
二十二碳酸	山芋酸	C22:0
顺-13-二十二碳烯酸	芥酸	C22:1 (n9)
全顺-7, 10, 13, 16-二十二碳四烯酸		C22:4 (n6)
全顺-4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳己烯酸	DHA	C22:6 (n3)
二十四烷酸	二十四酸	C24:0
顺-15-二十四碳烯酸	神经酸	C24:1 (n9)

为了表征脂类组分的含量，把甘油三酸酯水解（皂化）成为甘油和三个游离脂肪酸，虽然游离脂肪酸可以直接在极性固定相上（例如 HP-FFAP 柱）进行分析，但是如果把脂肪酸衍生化为脂肪酸甲酯就可以得到更为可靠和重复性的色谱数据。包括水解和甲酯化的衍生化有各种不同的方法 [1]，这些方法很容易使用，也不需要昂贵的试剂。典型的样品制备方法会在样品制备一节里叙述。

在脂肪酸甲酯制备好以后，脂肪酸甲酯就会按碳数（在脂肪酸链上的碳数，包括甲酯的碳数）和不饱和

度进行分离，而且，双键的位置和几何构象（顺/反）也是重要的参数，对其测定就增加了对食品中脂类组分表征的信息。

在这一应用报告中，比较了三种固定相对 FAME 分离的性能。第一个方法使用 DB-Wax，聚乙二醇色谱柱，在这一固定相上 FAME 从 C4（丁酸）到 C24（二十四酸）可以按碳数和不饱和度得到分离。在这一类色谱柱上顺，反式异构体不能分离开，并且对复杂的混合物如鱼油，某些 FAME 难以分离，但是，在聚乙二醇色谱柱上分离 FAME 得到广泛应用，并

用于表征“标准”的样品，如谷物玉米、橄榄和大豆中的植物油。而且也可以分析动物脂肪。分析牛奶脂肪中的丁酸是一项重要应用。牛奶中的丁酸浓度是它的一个重要质量指标，所以，分析牛奶、奶制品、巧克力产品中的丁酸非常重要。

为了分析复杂的样品，例如鱼油，还需要对 FAME 有额外的分离度，使用涂渍氰丙基固定相的毛细管柱，例如 DB-23，有这样的能力，在 DB-23 柱上高不饱和度的脂肪酸，例如全顺-5，8，11，14，17-二十碳戊烯酸甲酯 (EPA，C20:5 ω3)，和全顺-4，7，10，13，16，19-二十二碳己烯酸 (DHA，C22:6 ω3) 可以和其他脂肪酸甲酯分离开。这一分析在当今令人关注的 omega-3 脂肪酸分析计划中十分重要。在氰丙基柱上也可以分离顺-反异构体，由于分离顺式-异构体和氰基偶极的作用力较强，反式异构体比顺式-异构体较前洗脱出来，这样就可以测定反式脂肪酸了，但是氰丙基固定相的极性还不够，不能把复杂的顺-反异构体混合物完全分离。

为了分离含有大量的反式脂肪酸复杂的 FAME 混合物，推荐使用极性更强的 HP-88 色谱柱，在这一高极性色谱柱上，可以很好地分离不同的顺-反异构体，但是一些更高分子量的脂肪酸分离要更困难一些。

在图 1 中总结了各种色谱柱及其应用领域的概况。

实验

样品

FAME 的参考标准样品溶液来源于不同的渠道，或使用纯化合物，用于分析的标准溶液，通常溶于己烷，浓度为 0.01%–0.1% (w/v)。

为了校验色谱柱，使用一个含有 37 个组分的混合物 (Supelco #18919)，这是一个含有 100 mg 纯净物质的混合物，包含 C4–C24 的 FAME (相对浓度为 2%–4%)。使用前所有样品在 10 mL 己烷中稀释 (每种 FAME 最后的浓度 = 0.2–0.4 mg/mL)。油和脂肪样品可使用不同的方法制备 [1–5]。

样品制备方法 [5]

称取 100 mg 样品到 20 mL 试管 (带螺口盖) 或反应瓶中，使样品溶于 10 mL 己烷，加 100 μL 2 N 氢氧化钾甲醇溶液 (100 mL 甲醇中 11.2 g KOH)。把试管或反应瓶盖上，旋转摇动 30 秒，离心，把上清液转移到 2 mL 自动进样器的样品瓶中。

分析条件

在带有火焰离子化检测器 (FID) 的 Agilent 6890 GC 上进行分析，使用 Agilent 7683 自动进样器进行自动分流进样。仪器的设置和分析条件总结在表 2 (DB-Wax 柱)，表 3 (DB-23 柱) 和表 4 (HP-88 柱) 中。

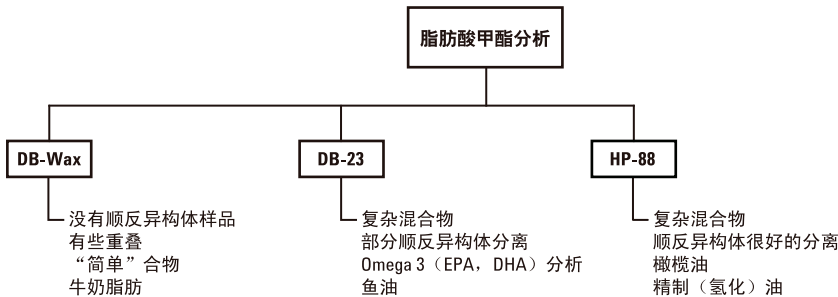


图 1. FAME 分析色谱柱选择概况

表 2. DB-Wax 柱方法 1

仪器	
色谱系统:	Agilent 6890 GC
进样口	分流/不分流
检测器	FID 或 Agilent 5973 MSD
自动进样器	Agilent 7683
衬管	分流衬管 (部件号 5183-4647)
色谱柱	30 m x 0.25 mm ID, 0.25 µm DB-Wax (J&W 122-7032)
试验条件 GC-FID	
进样口温度	250 °C
进样体积	1 µL
分流比	1/50
载气	氢气
柱头压力	53 kPa 恒压 (在 50 °C, 36 cm/s)
柱箱温度	50 °C, 1 min, 25 °C/min 到 200 °C, 3 °C/min 到 230 °C, 18 min。
检测器温度	280 °C
检测器气体	氢气: 40 mL/min; 空气 450 mL/min; 氮做尾吹气: 30 mL/min。

表 3. DB-23 柱方法 2

仪器	
色谱系统:	Agilent 6890 GC
进样口	分流/不分流
检测器	FID 或 Agilent 5973 MSD
自动进样器	Agilent 7683
衬管	分流衬管 (部件号 5183-4647)
色谱柱	60 m x 0.25 mm ID, 0.15 µm DB-23 (J&W 122-2361)
试验条件 GC-FID	
进样口温度	250 °C
进样体积	1 µL
分流比	1/50
载气	氮气
柱头压力	230 kPa 恒压 (在 50 °C, 33 cm/s)
柱箱温度	50 °C, 1 min, 25 °C/min 到 175 °C, 4 °C/min 到 230 °C, 5 min。
检测器温度	280 °C
检测器气体	氢气: 40 mL/min; 空气 450 mL/min; 氮做尾吹气: 30 mL/min。

表 4. HP-88 柱方法 3A 和 3B

仪器	
色谱系统:	Agilent 6890 GC
进样口	分流/不分流
检测器	FID 或 Agilent 5973 MSD
自动进样器	Agilent 7683
衬管	分流衬管 (部件号 5183-4647)
色谱柱 A	100 m x 0.25 mm ID, 0.2 µm HP-88 (J&W 112-88A7)
色谱柱 B	60 m x 0.25 mm ID, 0.2 µm HP-88 (J&W 122-8867)
试验条件 GC-FID	
进样口温度	250 °C
进样体积	1 µL
分流比	1/50
载气 A	氢气
载气 B	氮气
柱头压力	恒流, 2 mL/min
柱箱温度 A	120 °C, 1 min, 10 °C/min 到 175 °C, 10 min, 5 °C/min 到 210 °C, 5 min 5 °C/min 到 230 °C, 5 min
柱箱温度 B	175 °C, 10 min, 3 °C/min, 220 °C, 5 min
检测器温度	280 °C
检测器气体	氢气: 40 mL/min; 空气 450 mL/min; 氮做尾吹气: 30 mL/min。

结果

在 DB-Wax 柱上分析 37 种组分 FAME 参考标准样的典型色谱如图 2 所示。

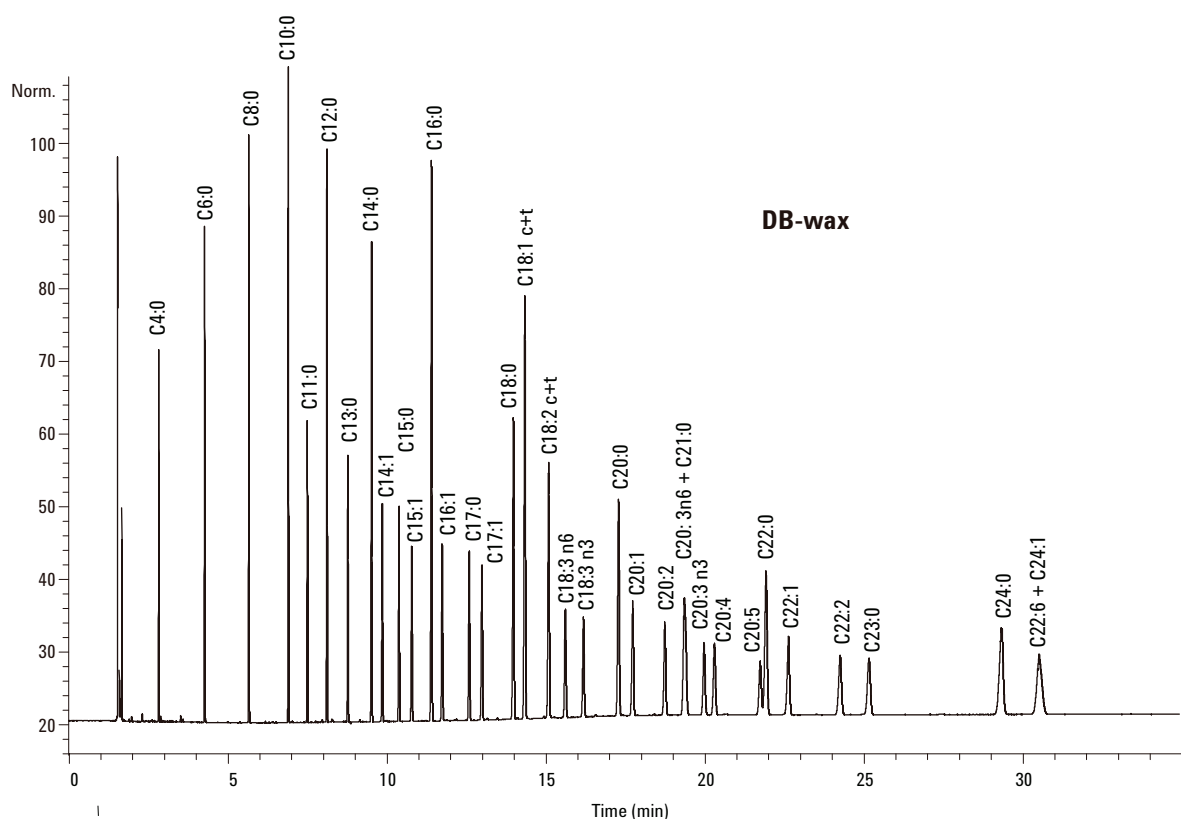


图 2. 37 种 FAME 参考标准样混合物在 30 m x 0.25 mm ID, 0.25 μ m DB-Wax 色谱柱上的 GC-FID 分析, 使用方法 1 (见表 2)

除下列化合物外, 其它化合物都能得到很好的分离: 顺-和反-C18:1 在 14.38 min 处一起洗脱出来。顺-和反-C18:2 在 15.13 min 处一起洗脱出来。C20:3 n6 和 C21:0 19.44 min 处一起洗脱出来。以及 C22:6 和 C24:1 在 30.73 min 处一起洗脱出来。但是, 这样的分离对一些经典的油和脂肪的表征方法已经足够了, 丁酸在 4.28 min 洗脱出来, 这一方法可以用于牛奶中脂肪的测定。这一点可以在图 3 中得到证明, 它是对有证牛奶脂肪标准物质 (CRM 164, [6]) 的分析。

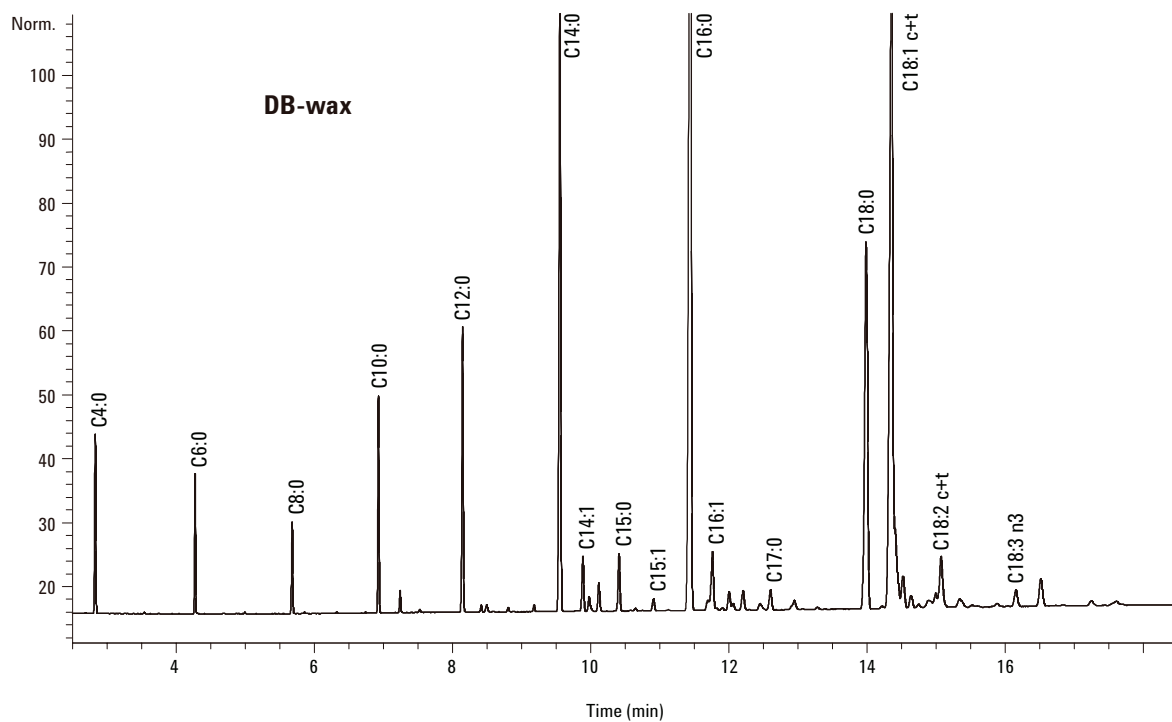


图 3. 对牛奶脂肪 CRM 164 脂肪酸在 30 m x 0.25 mm ID, 0.25 μ m DB-Wax 柱上的 GC-FID 分析 (使用表 2 中的方法 1)

在 60 m x 0.25 mm ID, 0.15 μ m DB-23 柱上分析 37 种 FAME 混合物的色谱, 如图 4 所示。

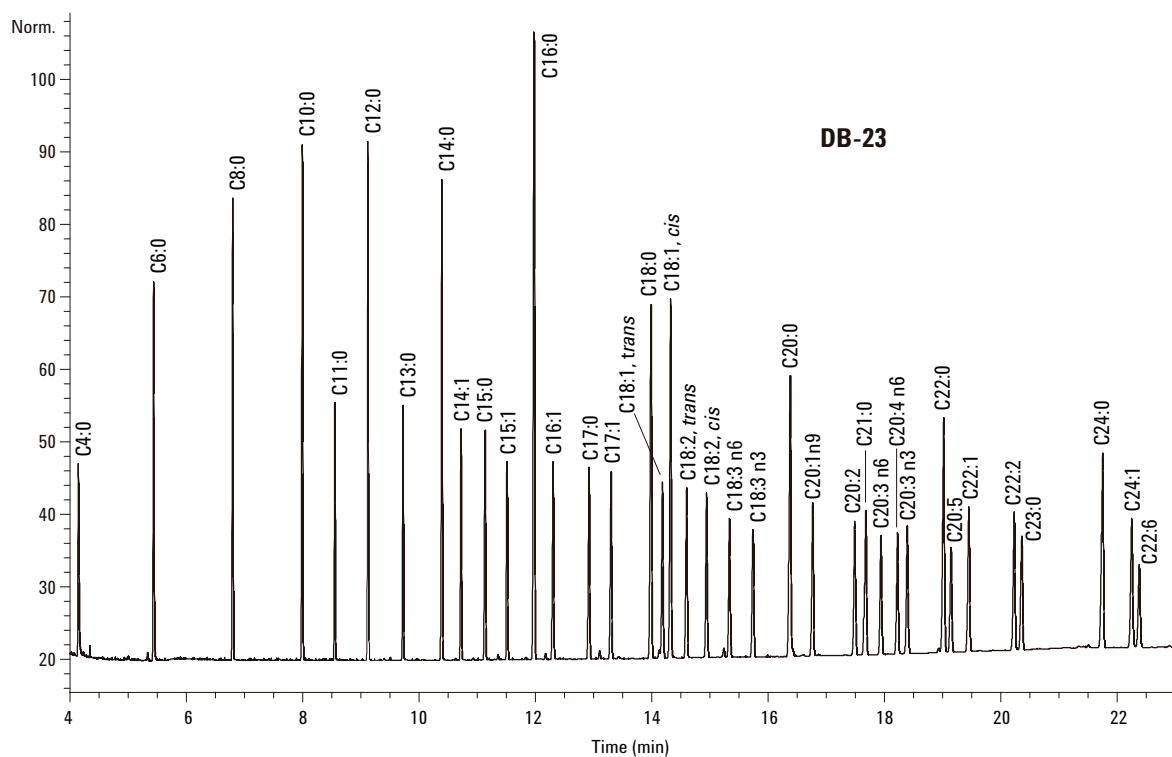


图 4. 对 FAME 标准脂肪酸混合物在 60 m x 0.25 mm ID, 0.15 μ m DB-23 柱上的 GC-FID 分析 (使用表 3 中的方法 2)

使用这些条件对标准混合物中的所有成分都可以很好地分离，顺/反异构体以及 EPA (19.15 min) 和 DHA (22.38 min) 混合物的分离也得到改善。这一方法对复杂混合物的脂肪酸分离很有用，特别是对 omega-3 脂肪酸 (如 EPA 和 DHA) 的检测有用。图 5 所示为对海产品中的多不饱和脂肪酸混合物得到很好的分离例证。对 EPA 和 DHA 能够很好的检测和定量。

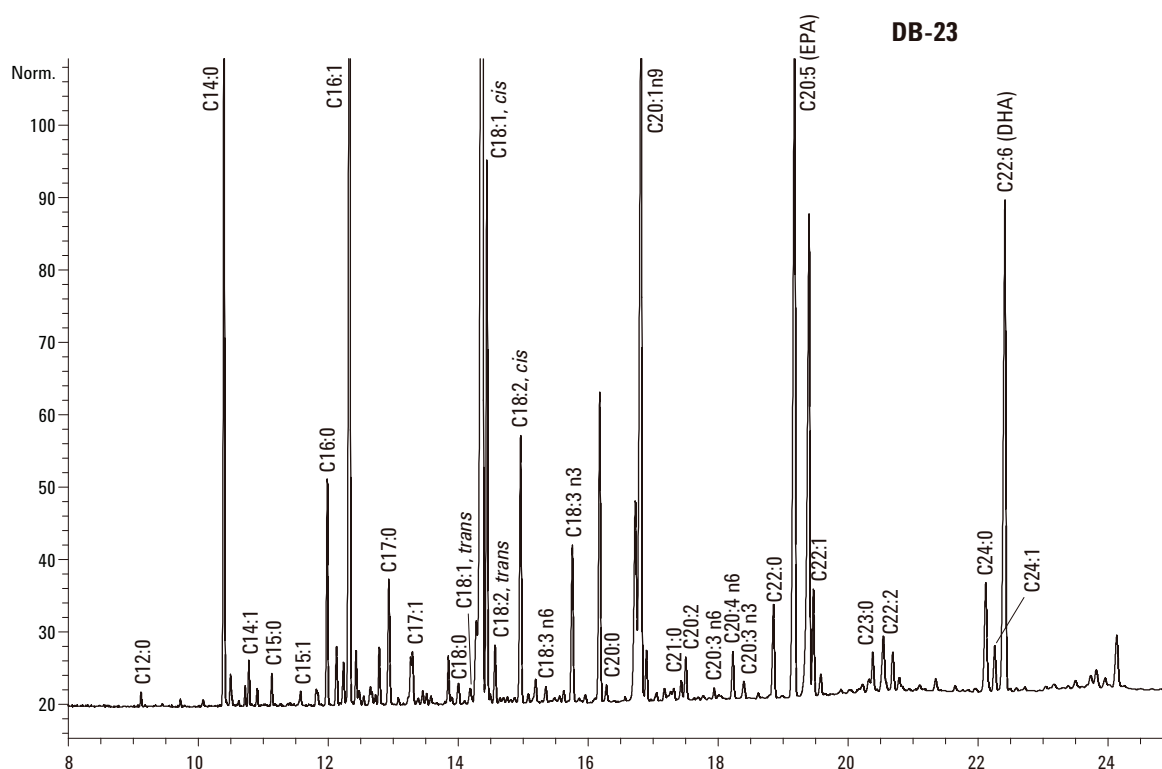


图 5. 海产品中的不饱和脂肪酸混合物在 60 m x 0.25 mm ID, 0.15 μ m DB-23 柱上的 GC-FID 分析 (使用表 3 中的方法 2)

在高极性 HP-88 柱上分析 37 种 FAME 混合物的色谱图如图 6 所示。

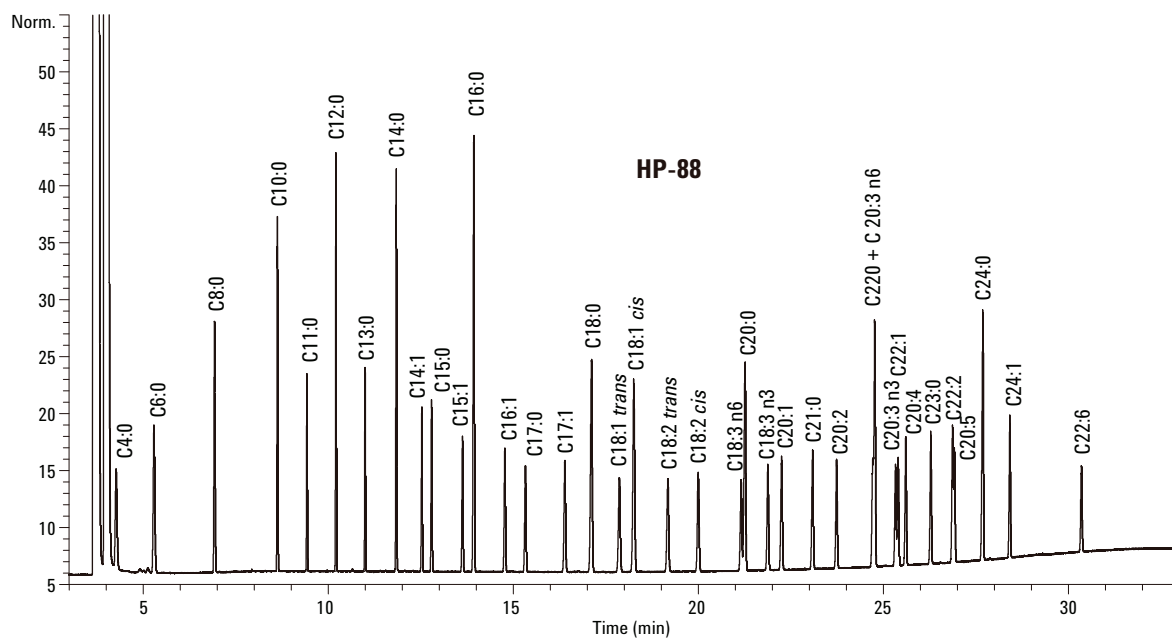


图 6. 37 种 FAME 混合物在 100 m x 0.25 mm ID, 0.2 μ m HP-88 柱上的 GC-FID 分析 (使用表 4A 中的方法 3A)

除 C22:0 和 C20:3 (n-6) 是在 24.7 min 处共洗脱出来以外, 其它都得到很好的分离。但是, 使用这一色谱柱对顺-反异构体的分离非常好。含有五个 C18:1 异构体的标准混合物分离如图 7 所示。

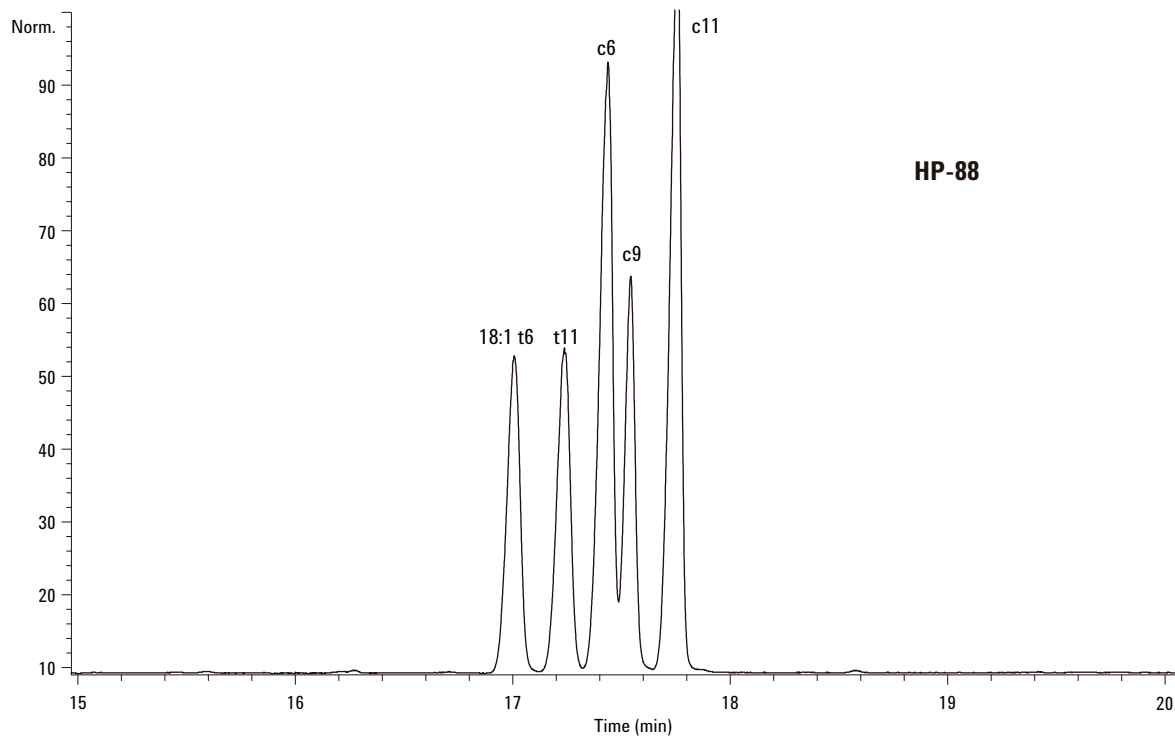


图 7. C18:1 异构体在 100 m x 0.25 mm ID, 0.2 μ m HP-88 柱上的 GC-FID 分析 (使用表 4A 中的方法 3A)

四个 C18:2 异构体（反-反，顺-反，反-顺和顺-顺）同样得到很好的分离，如图 8 所示。

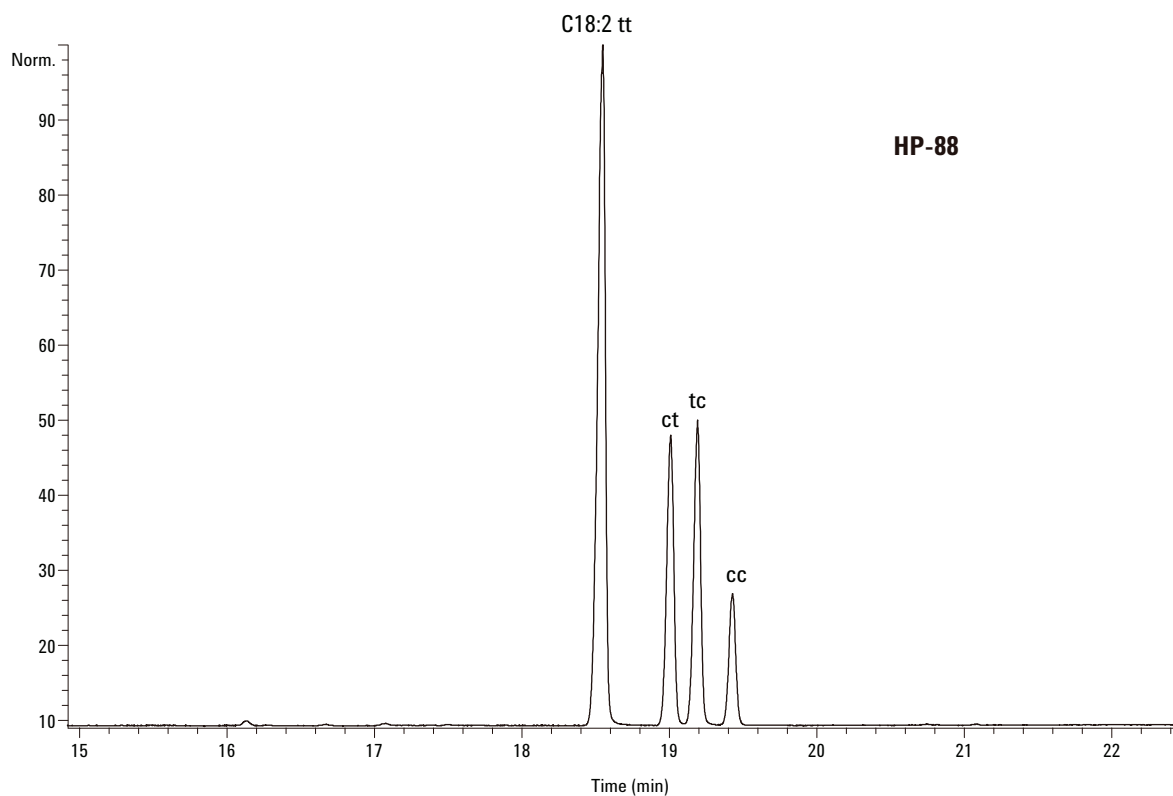


图 8. 四个 C18:2 异构体在 100 m x 0.25 mm ID, 0.2 μ m HP-88 柱上的 GC-FID 分析（使用表 4 中的方法 3A）

分离高氢化油可以比较 DB-23 和 HP-88 色谱柱之间的分离能力，由于氢化的作用会形成所有可能的位置和几何（顺-反）异构体，样品分别在 DB-23 和 HP-88 柱上于 180 °C 下进行分析，图 9 是色谱分离的比较（C18:1 的洗脱窗口有详细的分离图）。虽然图 4 表明在 37 种组分标样中的反-C18:1 (n9) 和顺-C18:1 (n9) 达到基线分离，但是图 9 证明真正的样品中含有几个 C18:1 异构体。HP-88 是分离顺-反异构体的最佳选择。

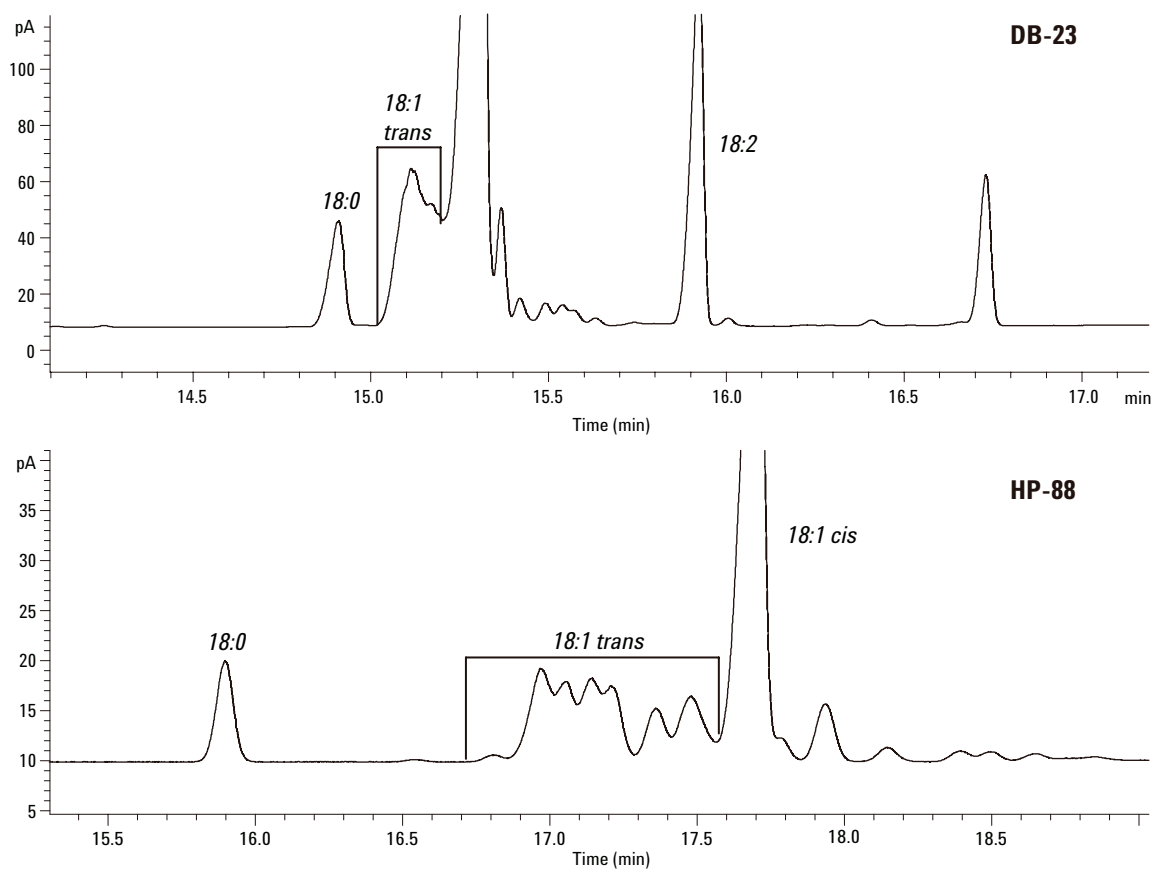


图 9. 氢化油中 C18:1 异构体在 60 m x 0.25 mm ID, 0.15 μ m DB-23 柱 (上图) 和 100 m x 0.25 mm ID, 0.2 μ m HP-88 柱上分离情况的比较, 二者都在 180 °C 下恒温分离。

部分氢化菜籽油的分离证明 HP-88 柱的的适用性。图 10 证明反式脂肪酸可以得到显著的分离, 顺-反异构体之间的峰谷很容易确定, 其他反式异构体 (C18:2 和 C18:3) 也可以检测出来。

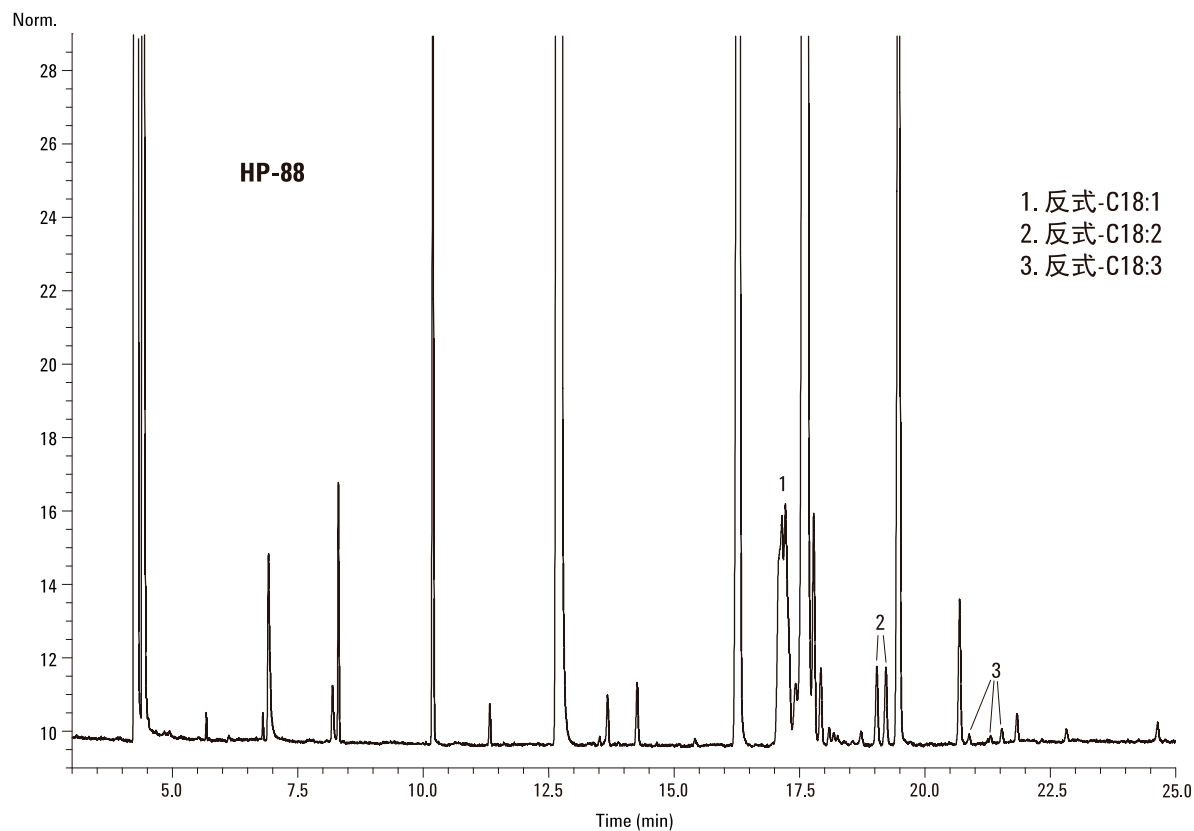


图 10. 部分氢化菜籽油在 100 m x 0.25 mm ID, 0.2 μ m HP-88 柱上的 GC-FID 分析 (使用表 4 中的方法 3A)

根据欧盟法规 2568/91 [5] 的规定, 相同的色谱柱也可以用于对橄榄油进行质量控制, 使用表 4 中所述的方法 (柱 A – 方法 A) 对 100 m 的色谱柱, 使用氢气做载气的分析时间为 35 min。对橄榄油的质量控制, 也可以使用 60 m 色谱柱 (表 4 – 柱 B)。使用氮气做载气和不同的温度程序 (即柱温 B, 表 4) 在 20 min 内可得到很好的分离, 如图 11 所示。所得到的分离与 EC 法规 [5] 完全一致。

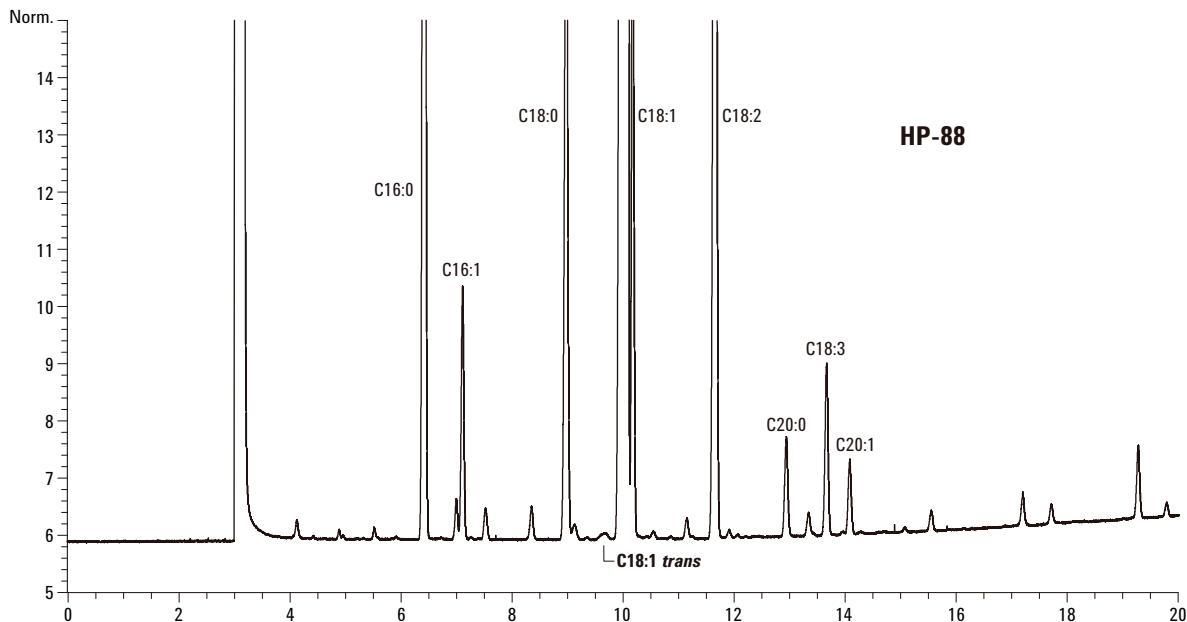


图 11. 橄榄油 FAME 在 60 m x 0.25 mm ID, 0.2 μ m HP-88 柱上 GC-FID 分析 (使用表 4 中的方法 3B)

结论

有三种固定相能用于 FAME 的分析。

1. DB-Wax 色谱柱可用于典型的食用油和脂肪的分析, 包括牛奶脂肪中的丁酸, 但是使用这一色谱柱不能分离 顺-反异构体。
2. 中等极性的 DB-23 氰基柱对复杂 FAME 混合物, 包括鱼油可以得到很好的分离, 可以适用于 ω 3 脂肪酸的测定, 例如 EPA 和 DHA。对 顺-反异构体可以得到部分的分离。
3. 对更为难分离的 顺-反异构体分离, 推荐使用 HP-88 色谱柱, 可以选择这一色谱柱进行橄榄油的 QC 分析。

参考文献

1. W. W. Christie, "Gas Chromatography and Lipids, A Practical Guide", (1989), The Oily Press, Ayr, Scotland (ISBN 0-9514171-O-X).
2. AOAC Official Methods of Analysis (2000), method Ce 2-66.

3. IUPAC, Standard methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives, Blackwell Scientific Publications, IUPAC Method 2.301.
4. International Standard ISO 15304, version 2003-05-15 (ISO 15304/2002) (can be ordered from www.iso.org)
5. EU regulation 2568/91, *Official Journal EU*, document L248, 5/9/1991.
6. EC, Bureau of Reference (BCR), Brussels, Belgium (see catalog at www.irmm.jrc.be)

更多信息

如需了解有关安捷伦的产品与服务的详细信息, 请登录我们的网站: www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦公司对本材料里可能有的错误或有关装备、性能或使用这一材料而带来的意外伤害和问题不负任何责任。

本材料中的信息、说明和指标, 如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技有限公司, 2005

中国印刷
2005 年 8 月 30 日
5989-3760CHCN



Agilent Technologies