

Garantindo a adequação do sistema para a análise de FAMES *cis-trans* pela AOAC 2012.13 no GC Agilent 8890 com travamento do tempo de retenção

Autor

Rachael Ciotti
Agilent Technologies, Inc.

Resumo

O método AOAC 2012.13 determina o teor de ácidos graxos em produtos lácteos e na fórmula infantil por cromatografia gasosa capilar com detecção de ionização de chama. Esse método foi implementado em um sistema de GC Agilent 8890 com uma coluna CP-Sil 88 de 100 m e, além de uma matriz comum de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos, foi testada uma eficiência de separação mais detalhada dos ácidos oleico, linoleico e linolênico usando 19 isômeros *cis-trans* mono- e poliinsaturados da família C18. A resolução entre os principais pares críticos de FAMES *cis-* e *trans-* foi avaliada usando um padrão qualitativo. Por fim, também foi implementado o travamento do tempo de retenção (RTL) para evitar a necessidade de realinhamento após a manutenção da coluna.

Introdução

As gorduras lácteas e vegetais contêm triglicerídeos, que são ésteres de glicerol acoplados a três cadeias de ácidos graxos. Os ácidos graxos consistem em um grupo carboxila terminal conectado a uma cadeia de hidrocarbonetos que pode ser curta ou longa, linear ou ramificada e saturada, mono- ou poli-insaturada. A configuração e localização da ligação dupla em gorduras insaturadas resulta em vários isômeros posicionais e *cis-trans*. A identificação adequada dos isômeros é fundamental para uma rotulagem nutricional precisa.

A separação e a identificação de homólogos e isômeros de ácidos graxos de uma matriz complexa é um desafio. Após a esterificação, os correspondentes ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) podem ser analisados de forma reprodutível por cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama. A ordem de eluição do isômero e a eficiência da separação são altamente dependentes do tipo e comprimento da fase estacionária da coluna. Embora nenhuma coluna possa resolver completamente o conjunto diversificado de isômeros FAMES *cis-trans*, uma coluna capilar de 100 metros revestida com fase estacionária de cianopropil altamente polar, como o CP-Sil 88, permite uma separação confiável e detalhada da maioria dos isômeros FAME *cis* e *trans*. Diferentemente das colunas wax tradicionais, os isômeros *trans* são eluídos antes dos isômeros *cis* na fase estacionária de cianopropil altamente polar.

Parte experimental

Um cromatógrafo gasoso Agilent 8890 configurado com um capilar split/splitless (SSL), um detector de ionização de chama (FID) e um amostrador automático de líquidos Agilent 7693A (ALS) foi usado para gerar os dados.

Produtos químicos

Padrões analíticos foram adquiridos para avaliar o desempenho dos FAMES:

- Uma mistura de FAMES de 37 componentes (47885-U) contendo FAMES de C4 a C24 na faixa de concentração de 100 a 600 µg/mL
- Uma mistura total de quatro componentes, 10 mg/mL de éster metílico de ácido *cis-trans* linoleico (CRM47791)

- Uma mistura de isômeros de éster metílico do ácido linolênico de oito componentes (L6031) contendo % em peso para cada componente na faixa de 3 a 30%
- Uma mistura de desempenho da coluna *cis-trans* FAMES (40495-U) contendo vários FAMES a 2,5 mg/mL

Todas as misturas acima foram adquiridas da MilliporeSigma (St. Louis, MO). Uma mistura FAMES *cis-trans* de oito componentes (35079) foi adquirida da Restek (Bellefonte, PA).

Tabela 1. Condições do instrumento.

Condições do GC Agilent 8890 – Método oficial AOAC 2012.13	
Injeção	
Tamanho da seringa	10 µL, p/n G4513-80204
Volume de injeção	1 µL
Injetor	SSL, modo split
Temperatura	250 °C
Razão de split	10:1
Fluxo de purga do septo	3 mL/min
Coluna	Agilent CP-Sil 88, p/n CP7489
Dimensões	100 m × 0,25 mm, 0,20 µm
Gás de arraste	He, 0,8 mL/min em fluxo constante
Forno	
Temperatura inicial	60 °C
Espera inicial	5 minutos
Rampa	15 °C/min até 165 °C, manter por 1 minuto 2 °C/min até 225 °C, manter por 20 minutos
Detector	
Tipo	FID
Temperatura	250 °C
Fluxo de ar	400 mL/min
Fluxo de combustível H ₂	40 mL/min
Fluxo make-up N ₂	25 mL/min

Resultados e discussão

Para avaliar a separação em toda a faixa (Figura 1), uma mistura de 37 FAMES de C4:0 a C24:0 em solvente diclorometano foi injetada. O ponto de ajuste inicial da temperatura do forno a 60 °C e o tempo de espera garantem a separação de C4:0, um importante indicador da qualidade do leite, da frente do solvente. O programa de temperatura do forno em rampa permite uma separação eficiente dos isômeros *cis-trans* e dos FAMES poliinsaturados de cadeia longa, além da coeluição entre os picos C23:0 e C20:4n6 em aproximadamente 48 minutos. No entanto, C23:0 não é comumente encontrado em produtos lácteos; consequentemente, isso é de pouca preocupação.

Uma separação detalhada dos isômeros *cis-trans* foi realizada usando misturas padrão de referência disponíveis comercialmente. A mistura FAMES *cis-trans* de oito componentes em diclorometano da Restek foi diluída 20x em diclorometano e injetada no GC. O método é adequado para a resolução dos seis isômeros FAMES *cis-trans* C18:1 (Figura 2).

Embora exista uma pequena coeluição entre os isômeros *trans*, o grupo está bem separado dos isômeros monoinsaturados *cis*-C18, o que é necessário, pois os ácidos graxos *trans* são relatados como um grupo no Método Oficial da AOAC 2012.13.

Para caracterizar a separação dos isômeros C18:2, uma mistura de FAMES de éster metílico do ácido linoleico em diclorometano (MilliporeSigma CRM47791) foi diluída para uma concentração final de 500 mg/L. A Figura 3 mostra que cada um dos isômeros linoleicos de FAMES está bem resolvido.

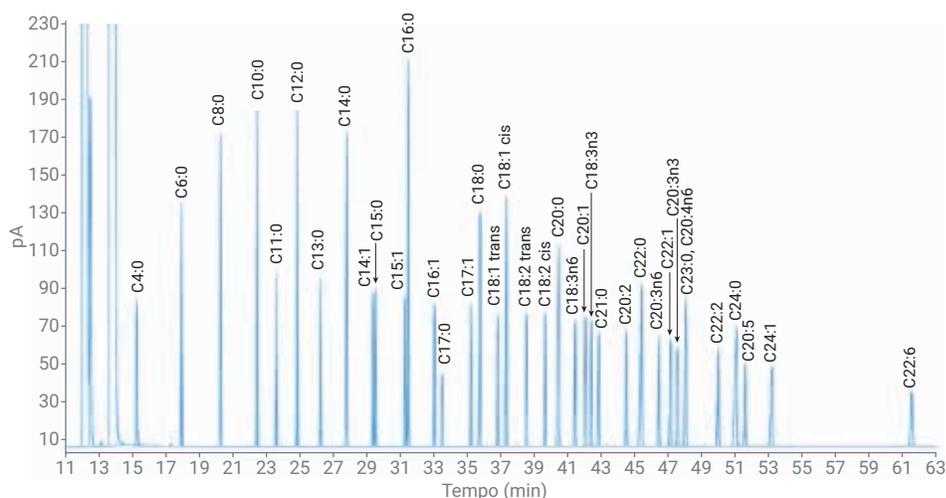


Figura 1. Cromatograma de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos.

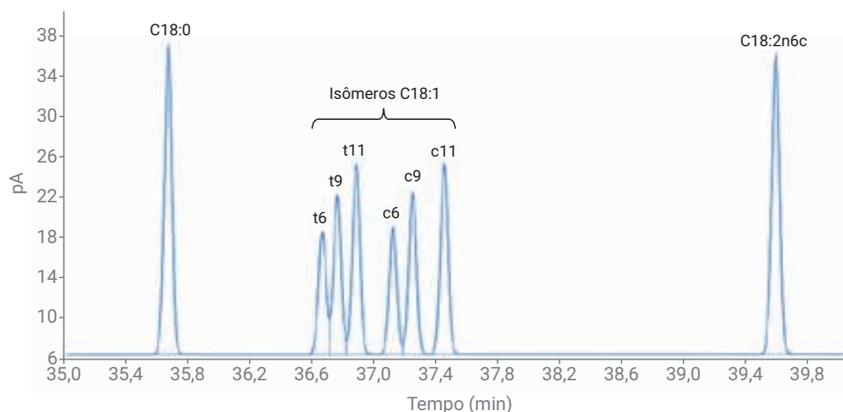


Figura 2. Cromatograma aumentado dos isômeros C18:1 por AOAC 2012.13.

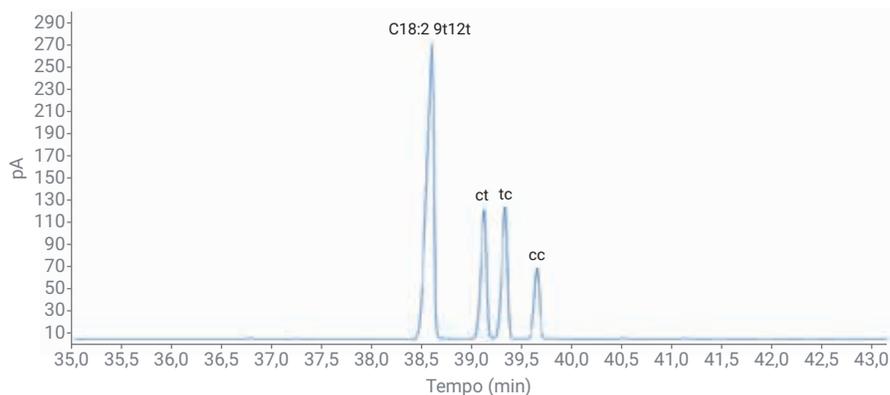


Figura 3. Cromatograma aumentado dos isômeros C18:2 pelo método AOAC 2012.13.

Finalmente, o desempenho do método para os isômeros C18:3 foi examinado injetando uma mistura de éster metílico do ácido linolênico (MilliporeSigma L6031), diluída para 2,5 mg/mL em diclorometano (Figura 4). Nenhuma coluna pode resolver completamente os isômeros do ácido linolênico; no entanto, para fins de relatório nutricional, os isômeros *trans*- são bem separados do éster metílico do ácido *alfa*-linolênico.

O método AOAC 2012.13 requer uma verificação de avaliação de desempenho antes da calibração.

A resolução é determinada entre o *trans*-C18:1n13t/C18:1n14t e o pico *cis*-C18:1n9c/C18:1n10c (Figura 5, inserção). Usando a Equação 1, a resolução aceitável é alcançada quando o valor R calculado é equivalente ou superior a 1,00. Cinco replicatas de uma mistura qualitativa de desempenho da coluna *cis-trans* FAME (MilliporeSigma 40495-U) foram injetadas para avaliar a resolução e a repetibilidade da área/tempo de retenção.

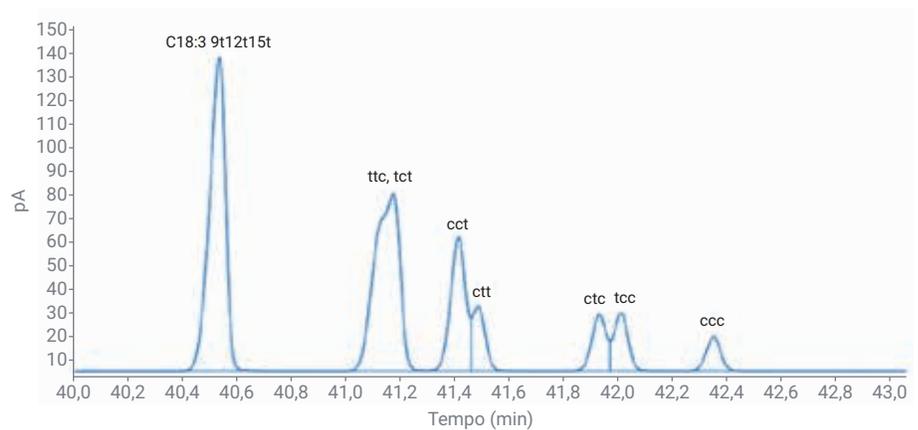


Figura 4. Cromatograma ampliado mostrando a resolução dos isômeros C18:3 pelo método AOAC 2012.13.

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

Equação 1. Resolução de picos a meia altura.

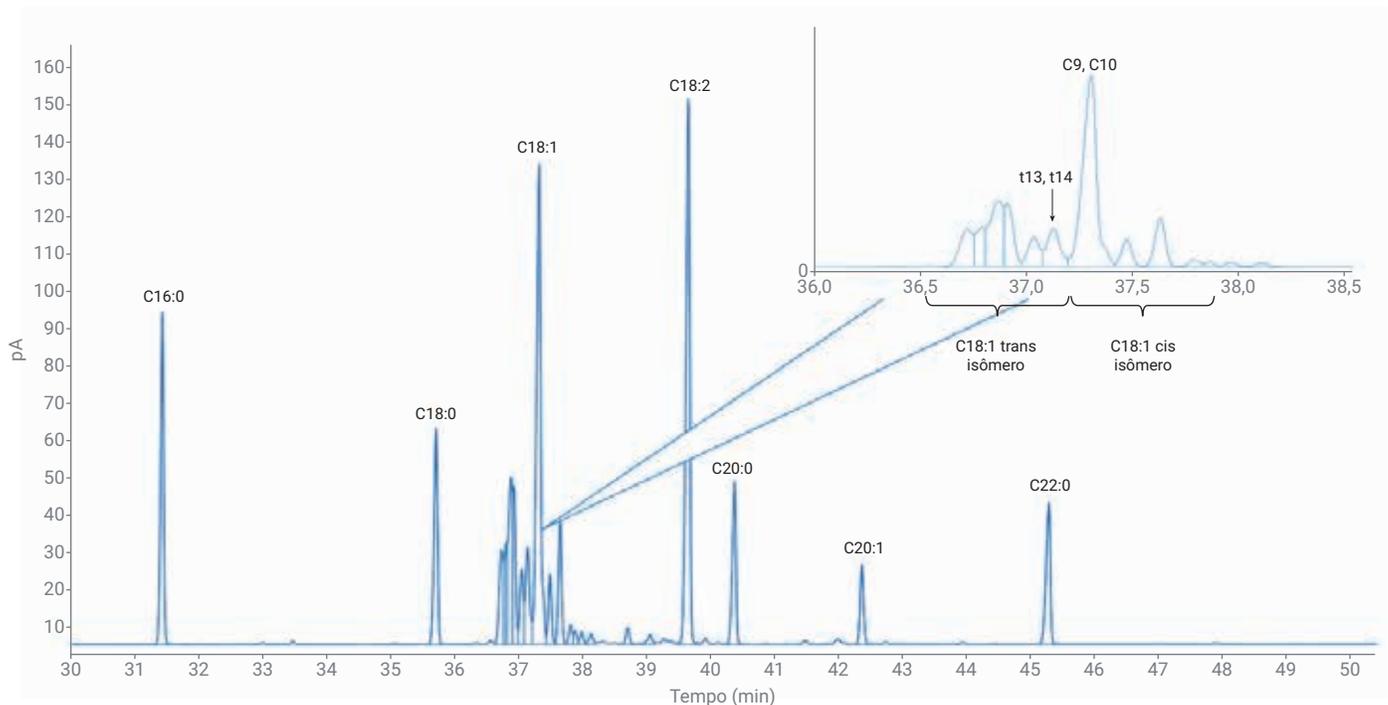


Figura 5. Cromatograma ampliado do padrão qualitativo de desempenho da coluna.

A Tabela 2 resume os resultados para o par crítico usado na verificação da resolução: a repetibilidade do tempo de retenção para os dois isômeros é excelente, com 0,007% de desvio padrão relativo (RSD). A precisão da área do pico é inferior a 2,5% de RSD para cada isômero. A resolução média de picos na meia altura de 1,494 excede o requisito mínimo de resolução do método.

Travamento do tempo de retenção

A matriz de FAMES determinada pela AOAC 2012.13 requer temperatura e precisão de fluxo para identificação adequada; conseqüentemente, é um excelente candidato para RTL. O recurso RTL Agilent fornece repetibilidade a longo prazo em um determinado instrumento e elimina a necessidade de ajustar os tempos de retenção após a manutenção da coluna. Ele pode manter os mesmos tempos de retenção após mover o método para um GC diferente, facilitando a transferência mais fácil de métodos e simplificando as comparações interlaboratoriais. A RTL corresponde e trava corretamente os tempos de retenção de um composto especificado, estudando o relacionamento entre os parâmetros do injetor e do tempo de retenção durante uma série de corridas de referência, calibrando o sistema usando os resultados e armazenando esta relação no arquivo de método.

O Agilent OpenLab CDS 2 Acquisition possui um assistente de RTL para orientar o operador no processo, selecionando um método de aquisição para travamento, juntamente com um composto-alvo escolhido a partir de um arquivo de dados adquirido anteriormente. O assistente de RTL configura uma série de corridas de calibração de pressão com base nos parâmetros especificados pelo método de aquisição designado. Uma corrida é feita usando o ponto de ajuste de pressão original e duas corridas são feitas desviando a pressão em 15% acima/abaixo, respectivamente, do

ponto de ajuste do método. O desvio nos pontos de ajuste de pressão simula alterações no comprimento da coluna comumente encontradas após a manutenção, como, por exemplo, após o corte da coluna. Os métodos travados não requerem realinhamento do tempo de retenção após a manutenção ou substituição da coluna; em vez disso, os tempos de retenção

do instrumento original podem ser comparados por meio de um simples padrão de retravamento. Se o padrão de retravamento também servir como padrão de avaliação de desempenho da coluna, os usuários poderão atender aos requisitos de avaliação de desempenho especificados pelo Método AOAC 2012.13 em uma única etapa.

Tabela 2. Resultados de cinco injeções em replicata de uma mistura padrão de FAMES de desempenho qualitativo da coluna.

Valor	Descrição	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5	RSD
t_{R1}	Tempo de retenção em min, pico t13/t14	37,124	37,125	37,128	37,128	37,13	0,007%
t_{R2}	Retenção 2 em min, pico c9/c10	37,304	37,305	37,308	37,308	37,31	0,007%
	Área t pico13/t14	115,605	113,463	117,747	115,944	120,812	2,356%
	Área pico c9/c10	599,259	588,91	610,828	602,276	628,644	2,458%
$W_{0.5h1}$	Largura a meia altura, pico t13/t14	0,073	0,072	0,073	0,073	0,074	0,969%
$W_{0.5h2}$	Largura a meia altura, pico c9/c10	0,069	0,069	0,069	0,069	0,07	0,646%
R	Resolução de picos a meia altura	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 Injektor - 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.

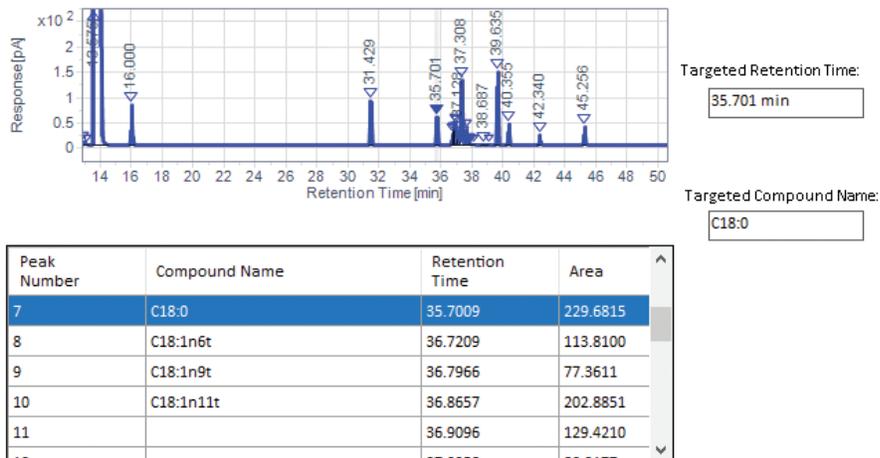


Figura 6. Tela de configuração do assistente de travamento do tempo de retenção.

A mistura padrão de FAMES *cis-trans* para desempenho da coluna foi usada para travar o método. Um método de aquisição, um método de processamento e um arquivo de resultados processados de uma injeção adquirida anteriormente da mistura padrão de desempenho foram selecionados. C18:0 foi escolhido como o composto-alvo para RTL. Conforme mostrado na Figura 6, o Assistente de RTL orientou o processo de calibração de pressão usando o pico C18:0 com um tempo de retenção de 35,701 minutos. A curva de calibração da pressão obtida a partir da série de três corridas programadas automaticamente pelo assistente de RTL demonstrou uma excelente correlação (Figura 7). O método analítico foi então travado à pressão indicada de 25,498 psi. Posteriormente, a manutenção da coluna foi realizada aparando aproximadamente 0,5 m da cabeça da coluna CP-Sil 88 100 m.

Para avaliar a extensão da perda de retenção devido à alteração no comprimento da coluna, a mistura padrão de FAMES *cis-trans* para desempenho da coluna foi reanalisada após a manutenção;

o tempo de retenção do pico alvo C18:0 avançou aproximadamente 0,232 minutos. Se o sistema não tivesse a retenção travada, o operador teria que analisar um padrão contendo o conjunto completo de FAMES desejados e inserir novamente manualmente os tempos de retenção de analito no método de processamento de dados.

Em vez de reinserir manualmente os novos tempos de retenção de analito, o método analítico foi novamente travado usando o assistente RTL e um novo ponto de ajuste de pressão de 25,253 psi foi implementado. Esse novo ponto de ajuste de pressão acomoda a alteração no comprimento da coluna para verificar os tempos de retenção esperados, possibilitando assim rapidez da prontidão

do sistema. A mistura padrão de FAMES *cis-trans* para desempenho da coluna foi injetada novamente para verificar se os novos pontos de ajuste de pressão resultaram nos tempos de retenção esperados. A Figura 8 mostra um resumo dos resultados, juntamente com uma sobreposição cromatográfica. Os tempos de retenção após corte da pós-coluna e retravamento coincidiram com os tempos de retenção originais pré-corte, com alterações nos tempos de retenção que variam de 0,000 a 0,009 minutos para cada um dos analitos alvo na coluna de 100 m. Observe o tempo de retenção real do C18:0 de 35,700 versus o tempo de retenção inicialmente planejado de 35,701 minutos, uma diferença percentual relativa de 0,0028%.



Figura 7. Resultados da calibração da pressão de travamento do tempo de retenção.

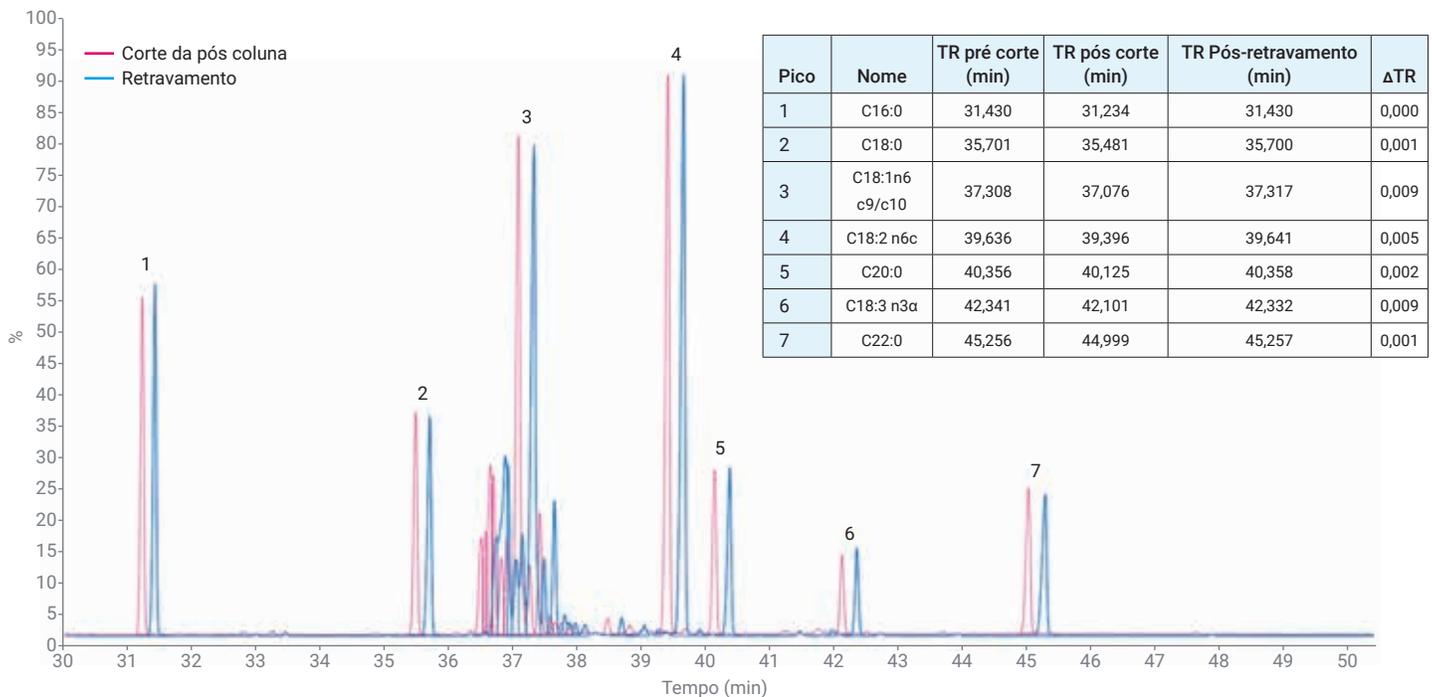


Figura 8. Resultados e sobreposição cromatográfica ampliada do padrão de desempenho da coluna antes e depois do retravamento.

Conclusão

A separação dos isômeros de FAMES usando uma coluna Agilent CP-Sil 88 de 100 m em um sistema de GC Agilent 8890 permite uma resolução confiável que excede os requisitos mínimos de avaliação de desempenho especificados pelo método AOAC 2012.13. Foi obtida excelente repetibilidade da injeção de um padrão de FAMES para desempenho da coluna especializado, com RSD do tempo de retenção de 0,007% para dois isômeros C18 principais. Por fim, o uso de um padrão de desempenho da coluna em conjunto com o recurso RTL exclusivo da Agilent permite a identificação correta e consistente de isômeros FAMES, maior tempo em atividade após a manutenção do instrumento e comparações mais fáceis de laboratório para laboratório.

Referências

1. Official Methods of Analysis AOAC International, Método 2012.13, **2012**.
2. David, F.; Sandra, P.; Vickers, A. K. Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters. *Nota de aplicação Agilent Technologies*, número de publicação 5989-3760EN, **2005**.
3. Zou, Y.; Wu, H. Improving the Analysis of 37 Fatty Acid Methyl Esters. *Nota de aplicação Agilent Technologies*, número de publicação 5991-8706EN, **2018**.

www.agilent.com/chem

Estas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Impresso nos EUA, 15 de novembro de 2019
5994-1184PTBR

