	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10040.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v olejích a tucích metodou GC	Revize	2

STANOVENÍ OBSAHU MASTNÝCH KYSELIN V OLEJÍCH A TUCÍCH METODOU GC

1 Rozsah a účel

Metoda je určena pro kvantitativní a kvalitativní určení složení směsi methylesterů mastných kyselin (MK) ve vzorcích živočišných a rostlinných tuků, olejů a směsí mastných kyselin a dále pro tukové extrakty krmiv a krmných surovin.

Metoda není použitelná pro polymerizované tuky.

2 Princip

Metoda popisuje přípravu analytického vzorku z laboratorního vzorku živočišných nebo rostlinných tuků a olejů a jejich další zpracování za použití různých postupů do formy methylesterů mastných kyselin.

Pro kvantitativní i kvalitativní určení složení této směsi methylesterů se použije metoda plynové chromatografie (GC) s použitím kapilárních kolon.

Píky na chromatogramu se identifikují pomocí referenčního vzorku o známém složení a pro jejich kvantifikaci se využije metoda vnitřního standardu nebo vnitřní normalizace.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.


- 1 Síran sodný, bezvodý.
- 2 Voda čistá (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 3 Hydroxid sodný, methanolický roztok, přibližně 0,5 mol/l.

Příprava: Rozpustí se 2 g hydroxidu sodného ve 100 ml methanolu, který neobsahuje více než 0,5 % (m/m) vody. Jestliže musí být roztok skladován po delší dobu, může se vytvořit malé množství bílé sraženiny uhličitanu sodného, které však nemá vliv na přípravu methylesterů.


- 4 Hydroxid draselný, methanolický roztok, přibližně 2 mol/l.

Příprava: Protože hydroxid draselný v praxi obsahuje asi 15 % vlhkosti, pokračuje se takto. Za mírného ohřívání se rozpustí 13,1 g KOH ve 100 ml absolutního methanolu. Přidá se větší množství bezvodého síranu sodného k vysušení roztoku, pak se přefiltruje. Jestliže roztok musí být uložen delší dobu, může se vytvořit malé množství bílé sraženiny uhličitanu sodného, které však nemá vliv na přípravu methylesterů.

- 5 Bortrifluorid BF₃, methanolický roztok, 12% až 15% (m/m). Může se použít roztok dodávaný komerčně.
- 6 Isooktan, 2, 2, 4–trimethylpentan, čistoty pro chromatografii (pozn. 5 a 6).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10040.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v olejích a tučích metodou GC	Revize	2

- 7 Chlorid sodný, nasycený roztok.
- 8 Dusík, obsah kyslíku menší než 5 mg/kg.
- 9 t-butyl methyl ether.
- 10 Trimethylsulfonium hydroxid (TMSH), methanolický roztok, 0,2 mol/l.
Při skladování v malé uzavřené nádobě při teplotě 4 °C je roztok stabilní nejméně 2 měsíce.
- 11 Hydrogensíran sodný, monohydrát.
- 12 Zásobní roztok vnitřního standardu, pro stanovení kyseliny máselné a/nebo kapronové.
Příprava: Do 50ml odměrné baňky se naváží asi 250 mg methylesteru kyseliny valerové s přesností 0,1 mg. K rozpuštění se použije isooktan (6) nebo n-hexan (15) a doplní se jím po značku.
- 13 Referenční roztok vnitřního standardu pro stanovení kyseliny máselné a/nebo kapronové.
Příprava: Do 100ml odměrné baňky se pipetuje 10 ml zásobního roztoku vnitřního standardu (12) a doplní se isooktanem (6) nebo n-hexanem (15) po značku. Vypočítá se koncentrace tohoto referenčního roztoku (pozn. 7).
- 14 Petrolether.
- 15 n-hexan nebo n-heptan, čistota pro chromatografii.
- 16 Methanol, bezvodý.
Příprava: Do baňky s 250 ml methanolu se přidá 5 g bezvodého síranu sodného (1) a po uzavření zátkou se důkladně protřepe. Roztok se zfiltruje přes papírový filtr do kónické baňky a důkladně uzavře.
- 17 Nosný plyn, inertní plyn – dusík, helium, argon, atd., dokonale vysušený, obsah kyslíku < 10 mg/kg, minimální čistota 99,95 %-3.5.
- 18 Pomocné plyny.
Vodík, minimální čistota > 99,5%-2.5., bez obsahu organických nečistot.
Vzduch nebo kyslík, minimální čistota > 99,5%-2.5., bez obsahu organických nečistot.
- 19 Referenční standard.
Vzorek tuku nebo oleje o přesně známém složení mastných kyselin nebo směs referenčních methylesterů mastných kyselin nebo referenční materiál mastných kyselin. Pozornost by měla být věnována ochraně polynenasycených mastných kyselin před oxidací.
Pokud se pro esterifikaci použije BF₃ metoda, nemůže být pro kalibraci nebo stanovení korekčního faktoru pro mastné kyseliny o délce řetězce delší než 10 uhlíkových atomů použita směs methylesterů mastných kyselin, vzhledem k možné rozpustnosti jejich methylesterů ve vodné fázi.
- 20 n-pentan, čistoty pro chromatografii.
- 21 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná.


	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10040.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v olejích a tucích metodou GC	Revize	2

Poznámky

- 1 *Místo hydroxidu sodného se může použít hydroxid draselný se stejnou koncentrací nebo se může rozpustit 1,15 g kovového sodíku ve 100 ml methanolu.*
- 2 *Bortrifluorid je jedovatý. Proto se s ním manipuluje výhradně v digestoři. V laboratoři se nedoporučuje příprava methanolického roztoku BF₃ přímo z methanolu a BF₃. Všechno skleněné nádobí se ihned po použití umyje.*
- 3 *Při plynové chromatografii může docházet ke zvětšování píků vlivem některých chemikálií. Zejména roztok BF₃ může mít pík v oblasti methylesterů MK s 20-22 atomy uhlíku. Doporučuje se kontrolovat čistotu činidel přípravou methylesteru kyseliny olejové a následnou GC analýzou. Činidla nesmějí poskytovat píky, které by rušily plynovou chromatografii methylesterů MK.*
- 4 *Činidla a rozpouštědla by neměla poskytovat píky, které interferují s píky methylesterů mastných mastných kyselin během GLC. Během GLC analýzy methylesterů mohou určitá činidla poskytovat nahodilé píky v chromatogramu. Obzvláště během dlouhého skladování vytváří methanolický roztok BF₃ komponenty, které interferují v oblasti kyselin C₂₀ a C₂₂. Proto každá nová dávka činidla nebo rozpouštědla by měla být kontrolována tak, že se připraví methylestery čisté kyseliny olejové a provede se chromatografie jaká. Pokud se objeví cizí píky, mělo by být činidlo vyřazeno.*
- 5 *Isooktan je hořlavina, zápalný limit je 1,1 % až 6 % (objemové frakce) ve vzduchu. Je toxický při požití a vdechování. S tímto rozpouštědlem se pracuje v digestoři.*
- 6 *Jestliže se mají mastné kyseliny stanovit kvantitativně pomocí GLC a s užitím vnitřního standardu, je nezbytné navážit zkušební vzorek s přesností 0,1 mg. Výsledky potom budou vyjádřeny jako procenta množství mastných kyselin obsažených v tuku nebo oleji. Ty se neshodují s výsledky získanými vnitřní normalizací.*

4 Přístroje

- 1 Elektrická sušárna s možností regulace teploty.
- 2 Baňka s kulatým dnem a se zábrusem o obsahu 50 ml nebo na 100 ml.
- 3 Varné kaménky, neobsahující tuk.
- 4 Zpětný chladič se zábrusem pro připojení baňky, účinná délka (20 – 30) cm.
- 5 Dělená pipeta, objem nejméně 10 ml nebo automatická pipeta.
- 6 Vialky, objem okolo 4 ml, se šroubovacím uzávěrem.
- 7 Analytické váhy s přesností nejméně 0,001 g.
- 8 Rotační vakuová odparka.
- 9 Dělicí nálevka na 250 ml, pouze na suché methylestery.
- 10 Zkumavky o objemu 2 ml a 5 ml, se skleněnou zábrusovou zátkou (vialky do autosampleru).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10040.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v olejích a tučích metodou GC	Vydání	1
		Revize	2

- 11 Nastavitelné dávkovací pipety, objem 1000 µl.
- 12 Odměrné baňky, 50 ml a 100 ml.
- 13 Dávkovací pipeta nebo dispenser o objemu 4 ml nebo odměrná pipeta o objemu 4 ml.
- 14 Pipeta nebo automatická pipeta, objem 200 µl.
- 15 Mikropipeta, nastavitelná, s objemem min. 100 µl a s mechanismem umožňujícím přesné pipetování viskózních kapalin.
- 16 Plynový chromatograf s kapilární kolonou, detektorem typu FID a zařízením na vyhodnocení signálu.

Poznámky

- 7 *Pokud nejsou přítomny mastné kyseliny s méně než 16 uhlíkovými atomy, může se použít vstříkovací zařízení s pohyblivou jehlou.*
- 8 *Jestliže jsou analyzovány polyenové kyseliny s více než třemi dvojnými vazbami, může na koloně z korozivzdorné oceli docházet k jejich rozložení.*
- 9 *Při použití polárních polysiloxanů je nebezpečí obtížné identifikace a separace kyseliny linolenové a kyselin C20.*

5 Postup

5.1 Příprava vzorku

5.1.1 Kapalné vzorky, čiré bez sedimentu


Laboratorní vzorek se protřepáním v uzavřené nádobě dokonale zhomogenizuje.

5.1.2 Kapalné vzorky zakalené nebo obsahující sediment

Nádoba s laboratorním vzorkem se umístí do sušárny nastavené na 50 °C. Ponechá se v sušárně, dokud vzorek nedosáhne této teploty a potom se postupuje jako v 5.1.1. Není-li vzorek po zahřátí a promíchání úplně čirý, zfiltruje se olej v sušárně nastavené na 50 °C. Vzorek se nechává v sušárně jen na nezbytně dlouhou dobu, aby se zabránilo modifikaci tukových složek oxidací nebo polymerací, filtrát musí být úplně čirý.

5.1.3 Pevný vzorek

Laboratorní vzorek se roztaví v sušárně nastavené na teplotu nejméně 10 °C nad bodem tání tuku nebo oleje. Jestliže je vzorek po zahřátí úplně čirý, postupuje se jako v 5.1.1. Je-li zakalený nebo obsahuje-li sediment, zfiltruje se při vybrané teplotě v sušárně, filtrát musí být zcela čirý.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10040.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v olejích a tučích metodou GC	Revize	2

5.1.4 Krmné suroviny a krmné směsi

Tuk pro stanovení mastných kyselin v krmných surovinách nebo krmných směsích se extrahuje podle ÚKZÚZ, JPP ZK, postup 10059.1.

5.1.4.1 Vzorky kategorie A

Extrahuje se podle postupu A metody Stanovení obsahu tuku (ÚKZÚZ, JPP ZK, postup 10059.1). Rozpouštědlo se odpaří na rotační odparce při teplotě, která nepřesáhne 40 °C. Odparek se suší 2 h v sušárně při (40 ± 2) °C.

5.1.4.2 Vzorky kategorie B

Tuk se extrahuje ve dvou stupních. Při prvním se postupuje podle postupu A metody Stanovení obsahu tuku.

Tukový extrakt se shromáždí v suché baňce. Rozpouštědlo se od extrakčního zbytku odpaří na vzduchu.

Ve druhém stupni se postupuje podle postupu B metody Stanovení obsahu tuku. Zbytek po první extrakci se hydrolyzuje za horka roztokem kyseliny chlorovodíkové. Směs se vychladí a zfiltruje. Zbytek na filtru se promyje a vysuší 60 min v sušárně při (40 ± 2) °C a znovu se extrahuje podle postupu A.

Oba extrakty se spojí, rozpouštědlo se odpaří na rotační vakuové odparce při teplotě, která nepřesáhne 40 °C. Odparek se suší 2 h v sušárně při (40 ± 2) °C.

5.1.5 Olejnatá semena

Pro zkoušku se použije zhomogenizovaný a neupravený zkušební vzorek tak, jak byl získán.

5.1.5.1 V případě semene kopry se zkušební vzorek upravuje mechanickým struhadlem celý nebo ručním struhadlem v takovém množství, aby byl co nejvíce reprezentativní. Délka částic může být větší než 2 mm, ale nemá být větší než 5 mm. Částice je nutno promíchat a zkoušku provést bez prodlení.


Olej pro zkoušku se získá extrakcí podle 5.1.4.

5.1.5.2 Semena střední velikosti (podzemnice, sója apod.), kromě bavlníku s přilehlými vlákny, se vzorek šrotuje v mechanickém mlýnku, který byl před použitím dobře vyčištěn, tak dlouho, dokud hlavní rozměr částic neklesne pod 2 mm. Větší částice (přibližně jedna dvacatina vzorku) se vyřadí, zbytek se pečlivě promíchá a stanovení se provede bez prodlení.

Olej pro zkoušku se získá extrakcí podle 5.1.4.

5.1.5.3 Bavlníková semena s přilehlými vlákny

Do vysoušecí misky se naváží přibližně 60 g vzorku s přesností 1 mg tak, jak byl získán. Miska se semeny se vloží do sušárny, předem vyhřáté na (130 ± 2) °C a vzorek se nechá při této teplotě sušit 2 h. Poté se miska vyjme ze sušárny a nechá se vychladnout na vzduchu asi 30 min. Vysušená semena se přenesou do porézní keramické nádoby, jejíž vnitřní stěny byly předem pomocí pipety

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10040.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v olejích a tučích metodou GC	Vydání	1
		Revize	2

zvlhčeny 1,5 ml kyseliny chlorovodíkové (21). Je třeba dbát na to, aby se kyselina úplně vstřebala a nevytvořila na stěnách ulpívající kapky. Potom se nádoba přikryje hodinovým sklem a vloží do sušárny a zahřeje se během 30 min na teplotu 115 °C a při této se udržuje dalších 30 min. Poté se keramická nádoba vyjme ze sušárny a nechá zchladit na vzduchu 1 h.

Semena se zváží s přesností 1 mg, rozemelou se na mechanickém mlýnku jako v odstavci 5.1.5.2 a získá se z nich olej pro zkoušku podle postupu 5.1.

4

5.1.5.4 Vzorky malých semen (len, řepka, konopí, čočka apod.) se navažují přímo z neupraveného zkušební vzorku bez předchozího mletí (v původním stavu). Navážka malých semen se nejprve rozdrtí v mechanickém mikrodrtiči nebo v mlýnku, přičemž je třeba dát pozor, aby byla rozdrčena všechna semena, která se kvantitativně přenesou do extrakční patrony. Nejvhodnější způsob je pomocí špachtle a vatového tamponu, namočeného do použitého extrakčního činidla, tímto tamponem se také vytrže miska mikrodrtiče nebo mlýnku. Pro získání oleje extrakcí se dále postupuje podle odstavce 5.1.4.

5.2 Skladování vzorků

Laboratorní vzorky se skladují v inertním a vzduchotěsném obalu, v chladničce (při teplotě maximálně 10 °C) a musejí být chráněny před světlem. Takto se mohou skladovat po dobu 3 měsíců.

5.3 Příprava methylesterů

5.3.1 Obecná metoda s bortrifluoridem

Princip a oblast použití

Glyceridy se zmýdelní methanolickým NaOH. Mýdla se převedou na methylestery reakcí s bortrifluorid-methanolovým komplexem. Pro analýzu volných mastných kyselin a mýdel zmýdelnění s NaOH není nutné a estery se mohou připravit přímo reakcí s BF₃.

Tato metoda se použije pro většinu olejů, tuků, volných mastných kyselin a derivátů (mastné kyseliny, mýdla) s 6 a více atomy C s výjimkou mléčného tuku a tuků, které obsahují mastné kyseliny se specifickými skupinami.


Sloučeniny s obsahem následujících skupin mohou být během esterifikace zcela nebo částečně rozloženy

- keto, epoxy, hydroxy, hydroxyperoxy,
- cyklopropyl a cyklopropenyl skupiny,
- acetylenické mastné kyseliny (obsahující trojnou vazbu)

Jestliže vzorek obsahuje takové složky ve velmi malém množství (např. bavlníkový olej), lze danou metodu použít. V ostatních případech se využijí metody popsané v kapitole 5.3.2 a 5.3.3.

Pro plynovou chromatografii se optimální výtěžnosti methylesterů docílí použitím isooktanu. Avšak výtěžek methyl kapronátu bude pouze okolo 75 %. Alternativně lze použít i n-hexan (15).

Pracovní postup

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10040.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v olejích a tučích metodou GC	Vydání	1
		Revize	2

Zkušební vzorek musí být tekutý, suchý a čistý. Podle tabulky č. 1 se vybere vhodná baňka, správné množství činidel a rozpouštědla, potřebné k methylesterifikaci daného množství vzorku.

Tabulka č. 1.

Hmotnost zkuš. vzorku	Baňka	Roztok NaOH (3)	Roztok BF ₃ (5)	Rozpouštědlo (6) nebo (15)
mg	ml	ml	ml	ml
100 až 250	50	4	5	1 až 3
250 až 500	50	6	7	2 až 5

Zmýdelnění – tuky a oleje

Zkušební vzorek se vloží do vhodné baňky. Přidá se příslušné množství (tab. 1) methanolického roztoku NaOH a varný kamínek. K baňce se připojí zpětný chladič.

Jestliže mastné kyseliny obsahují více než dvě dvojně vazby, doporučuje se odstranit vzduch z methanolického roztoku a z baňky probubláváním dusíkem před nasazením zpětného chladiče po dobu několika minut.

Obsah baňky se vaří pod zpětným chladičem do vymizení kapiček tuku, jemně se míchá baňkou každých 30 s až 1 min, aby se zamezilo vytvoření tukového kroužku NaOH na stěnách baňky. Toto obvykle trvá 5 min až 10 min, ale v některých výjimečných případech i déle (pozn. 11 a 12). Potom se přidá příslušné množství (tab. 1) methanolického roztoku BF₃ (5) přes vrchní konec chladiče. Dále se postupuje podle kapitoly Příprava methylesterů v roztoku isooktanu – viz. níže.

Zmýdelnění – mastné kyseliny a mýdla


Zkušební vzorek se vloží do vhodné baňky. Přidá se příslušné množství (tab.1) methanolického roztoku BF₃ (5) do baňky. Na baňku se připojí zpětný chladič. Dále se postupuje podle kapitoly Příprava methylesterů v roztoku isooktanu – viz.níže

Příprava methylesterů

Pokračuje se ve varu po dobu 3 min. V případě mastných kyselin s dlouhými řetězci jako např. u rybích olejů se pokračuje ve varu 30 min. Přidá se příslušné množství (tab. 1) isooktanu (6) nebo n-hexanu (15) vrchní částí chladiče do vroucí směsi. Baňka se odstraní ze zdroje tepla a odstraní se i zpětný chladič. Okamžitě, aniž se baňka chladí, se přidá 20 ml nasyceného roztoku NaCl (7). Baňka se zazátkuje a silně se protřepe po dobu minimálně 15 s. Do baňky se přidá další nasycený roztok NaCl (7) tak, aby se hladina kapaliny dostala k hrdlu baňky. Nechá se rozdělit na dvě fáze. Asi 1 ml až 2 ml vrchní vrstvy se převede do 4ml vialky a přidá se malé množství bezvodého síranu sodného (1) tak, aby se odstranily stopy vlhkosti.

Takto získaný roztok se může dávkovat

- a) po vhodném naředění isooktanem (6) nebo heptanem (15) do systému s kapilární kolonou,

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	8
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10040.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v olejích a tučích metodou GC	Vydání	1
		Revize	2

- b) po naředění rozpouštědlem s nižším bodem varu jako je hexan (15) nebo pentan (20) se ve speciálních případech provádí nástřik on-column na kapilární kolonu.

Poznámky

- 10 *V metodě se používají nebezpečná činidla. Při práci se musejí chránit oči a pracovat opatrně (nebezpečí poleptání).*
- 11 *V případě olejů (např. ricinový olej), které jsou rozpustné v methanolu, žádné kapky oleje nebudou pozorovány. Vyčerení proto není kritériem ukončení reakce.*
- 12 *Nezmýdelnitelné látky nejsou odstraňovány a jsou-li obsaženy ve značném množství, mohou interferovat při následné analýze. V tomto případě je nutné doplnit popsanou metodu o následující postup: Roztok získaný po zmydelnění se naředí vodou a nezmýdelnitelné látky se extrahují diethyletherem, hexanem nebo petroletherem. Vodný roztok se okyselí a mastné kyseliny se oddělí isooktanem nebo hexanem. Z nich se pak připraví methylestery podle 5.3.1 nebo 5.3.2.*

5.3.2 Trimethylsulfonium hydroxidová (TMSH) metoda

Princip a oblast použití


Analyzovaný vzorek se rozpustí v t-butyl methyl etheru a methylestery se připraví transesterifikací s TMSH. Nástřikují se přímo do plynového chromatografu při teplotě injektoru nad 250 °C. V přítomnosti mastných kyselin s krátkými řetězci (4 až 8 uhlíkových atomů) se doporučuje použít jako vnitřní standard kyselinu valerovou.

Tato rychlá metoda je vhodná pouze pro přípravu methylesterů pro GLC. Je použitelná pro všechny tuky a oleje, včetně mléčných tuků a směsí obsahujících mléčný tuk. Isomerace nenasycených mastných kyselin nebyla zaznamenána.

Tuky obsahující hydroxy- skupiny jsou částečně převedeny na odpovídající O-methyl ether deriváty, které mohou při GLC separaci interferovat s methylestery mastných kyselin. Proto se TMSH derivatizační metoda nedoporučuje pro tuky obsahující hydroxy- skupiny bez omezení. Na druhou stranu však mohou být takové tuky analyzovány na GC s MS detektorem.

TMSH metoda se nemůže být použita, pokud se použije u GLC analýzy studený on-column nástřik. Kromě toho se nedoporučuje používat polární stacionární fáze (kyanopropylsiloxany).

Pro stanovení mastných kyselin s krátkými řetězci (C4 až C8) se doporučuje použít jako vnitřní standard methylester kyseliny valerové za předpokladu, že vzorek kyselinu valerovou neobsahuje.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	9
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10040.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v olejích a tučích metodou GC	Revize	2

Pracovní postup

Zkušební vzorek musí být tekutý, suchý a čistý.

Do zkumavky se naváží 10 mg \pm 2 mg zkušební vzorku. V případě vzorků s vyšším obsahem vody se navážka zvýší.

Vzorky obsahující vodu se rozpustí v petroletheru (14) a suší se po dobu 30 min přidavkem bezvodého síranu sodného (1). Poté se prefiltrují přes filtrační papír a sedlina se pečlivě promyje petroletherem. Rozpouštědlo se odstraní pomocí rotační odparky.

Příprava methylesterů

Dávkovací pipetou se přidá 500 μ l t-butyl methyl etheru (9) a vzorek se rozpustí, jestliže je to nezbytné, mírně se zahřívá.

Pro stanovení máselné a/nebo kapronové kyseliny se přidá místo 500 μ l t-butyl methyl etheru 500 μ l referenčního roztoku vnitřního standardu (13).

Do tohoto roztoku se pomocí dávkovací pipety přidá 250 μ l roztoku TMSH (10) a silně se třepe po dobu asi 30 s (pozn. 14).

Získaný roztok je vhodný pro dávkování do plynového chromatografu. Protože methylestery volných mastných kyselin jsou stále pouze během dávkování, je nutné mít vyhřátý injektor na teplotu nejméně 250 °C. Jestliže je třeba ředit roztok před nástřikem, použije se směs t-butyl methyl etheru (9) a methanolu (16) v poměru (9 : 1), která zabrání vysrážení TMSH.

Poznámky

- 13 *V popisované metodě se používají potenciálně nebezpečná činidla. Při práci se musejí chránit oči a pracovat opatrně (nebezpečí poleptání). Trimethylsulfonium hydroxid je potencioálně jedovatý.*
- 14 *Volné mastné kyseliny reagují s TMSH za tvorby příslušných solí, které jsou transformovány na methylestery a dimethylsulfidy v injektoru. K prevenci proti ucpání by měla mít kapilára splitového ventilu široký vnitřní průměr. Měla by být čištěna zahřátím nebo mytím v rozpouštědle.*


5.3.3 Trans-esterifikační metoda

Princip a oblast použití

Glyceridy se rozpustí v isooktanu a převedou se na methylestery trans-esterifikací s hydroxidem draselným. Po ukončení reakce se hydroxid draselný neutralizuje hydrogensíranem sodným, aby se zamezilo zmýdelňování methylesterů.

Tato rychlá metoda je použitelná pro jedlé tuky a oleje obsahující mastné kyseliny počínaje C4 a s obsahem volných mastných kyselin (VMK) do 2 %. Pro stanovení kyseliny máselné (C4) nebo kapronové (C6) metodou GLC bude použit vnitřní standard. Metodu lze též použít pro směsi volných mastných kyselin s méně jak 10 C.

Pro vzorky s vyšším obsahem VMK by mělo být použito větší množství hydroxidu draselného,

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	10
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10040.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v olejích a tučích metodou GC	Vydání	1
		Revize	2

protože VMK a mýdla nejsou esterifikovány hydroxidem draselným a metoda proto může být použita k získávání methylesterů pouze glyceridové části vzorku. Metoda může být použita u směsí obsahujících chemické uspořádání uvedené v kapitole 5.3.1 – Princip a oblast použití. Není avšak známo, zda-li proběhne úplná konverze na methylestery.

Pracovní postup

Zkušební vzorek musí být tekutý, suchý a čistý.

Do zkumavky se naváží asi 60 mg zkušební vzorku. Pro stanovení kyseliny máselné a kapronové se navažuje zkušební vzorek s přesností 0,1 mg. K navážení lze použít i vhodnou mikropipetu. Pipetovaný objem zkušební vzorku nastavený na mikropipetě musí odpovídat požadované navážce.

Příprava methylesterů

Pomocí pipety nebo dispenseru se přidá 4 ml isooktanu (6) nebo n-hexanu (15) a vzorek se rozpustí. Pokud je to nezbytné, mírně se zahřívá. Pro stanovení kyseliny máselné nebo kapronové se použije odměrná pipeta (13) a přidá se 4 ml referenčního roztoku vnitřního standardu (13) místo isooktanu.


Pipetou (14) se přidá 200 µl roztoku hydroxidu draselného – methanolický roztok (4) a zkumavka se uzavře. Směsí se silně třepe po dobu asi 30 s. Po počátečním zákalu způsobeném oddělením glycerolu se reakční směs postupně vyčeří. Do roztoku se přidá asi 1 g hydrogensíranu sodného (11) a intenzivně se protřepe, aby se zneutralizoval hydroxid draselný. Po usazení soli se odlije horní vrstva obsahující methylestery do 4ml vialky.

Získaný roztok bude obsahovat asi 15 mg/ml methylesterů a může se dávkovat takto

- b) po vhodném naředění isooktanem (6) nebo heptanem (15) do systému s kapilární kolonou,
- c) po naředění rozpouštědlem s nižším bodem varu jako je hexan nebo pentan (20) se ve speciálních případech provádí nástřik on-column na kapilární kolonu.

Poznámky

- 15 *V popisované metodě se používají potenciálně nebezpečná činidla. Při práci se musejí chránit oči a pracovat opatrně (nebezpečí poleptání). Methanolický roztok hydroxidu draselného je jedovatý.*
- 16 *Estery by se měly analyzovat co nejdříve. Je-li to nutné, může se roztok obsahující methylestery uchovat pod inertním plynem v chladničce. Při dlouhodobém skladování se doporučuje chránit methylestery před autooxidací přidávkou antioxidantu v takové koncentraci, která by nerušila při následné analýze, např. 0,05 g/l roztoku BHT (2,6-di-*t*-butyl-4-methylfenol). Methylestery obsahující methylester kyseliny máselné se musejí být skladovány v zatavených ampulích a je nezbytné zachovat opatrnost, aby nedocházelo ke ztrátám odpařením během plnění a uzavírání ampulí.*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	11
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10040.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v olejích a tučích metodou GC	Vydání	1
		Revize	2

5.4 Skladování methylesterů

Získané roztoky methylesterů jsou vhodné pro okamžitou chromatografickou analýzu. Pokud je to nutné, mohou se roztoky skladovat několik týdnů pod inertním plynem při teplotě 4 °C až 8 °C. V případě delšího skladování se doporučuje k zabránění oxidace přidat k roztoku antioxidant v koncentraci, která neovlivní chromatografické stanovení.

5.5 Stanovení plynovou chromatografií

5.5.1 Výběr optimálních podmínek

Přístroj se optimalizuje podle pokynů výrobce. Pro konkrétní vybranou kolonu a nosný plyn se optimalizuje průtok nosného plynu podle doporučení výrobce kolony. Teplota detektoru se nastaví o 20 °C až 50 °C výše než teplota vyhřívání kolony, nejméně ale na 150 °C. Teplota injektoru se nastaví podle pokynů v manuálu přístroje.

Na kolonu chromatografu se za použití injekční stříkačky nastříkne 0,1 µl až 2 µl roztoku methylesterů připravených podle 5.3.1, 5.3.2 nebo 5.3.3. Toto lze realizovat manuálně nebo s využitím automatického dávkovacího systému – autosampleru. Pokud methylestery nejsou v roztoku, připraví se roztok přibližně 100 mg v 1 ml heptanu nebo hexanu (15) a nastříkuje se 0,1 µl až 1 µl tohoto roztoku. Jestliže jsou analyzovány složky přítomné pouze ve stopových množstvích, velikost nástřiku může být zvýšena (až desetinásobně). Při použití split dávkování se nastaví poměr mezi (1 : 30) až (1 : 100).


Při použití on-column nástřiku za studena je nutné jako rozpouštědlo použít pentan (20) pro dobrou separaci methylesterů mastných kyselin s méně než 10 atomy C.

Methylestery mastných kyselin zkušební vzorku i referenčního vzorku se rozpouští ve stejném rozpouštědle.

V tabulkách 2A, 2B a 3 jsou jako příklad uvedeny konkrétní specifikace pro kolony a podmínky chromatografického stanovení, které používá NRL.

Tabulka 2A. Příklad podmínek chromatografického stanovení – kapilární kolona Quadrex.

Parametr	Hodnota
Plynový chromatograf	Agilent 6890N
Kolona	Quadrex Carbowax/BTR (30 m × 0,32 mm; film 0,5 µm)
Nosný plyn	Dusík
Průtok nosného plynu	(0,5 – 1) ml/min.
Objem nástřiku, dávkování	1 µl, split 1 : 40
Teplota nástřiku	260 °C
Teplota kolony	240 °C
Teplota detektoru	270 °C
Detektor	FID
Doba analýzy	asi 60 min.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	12
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10040.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v olejích a tučích metodou GC	Vydání	1
		Revize	2

Tabulka 2B Příklad podmínek chromatografického stanovení – kapilární kolona HP-88.

Plynový chromatograf	Agilent 6890N
Kolona	HP-88 (100 m × 0,25 mm, film 0,2 μm)
Nosný plyn	Dusík
Průtok nosného plynu	(0,5 – 1) ml/min.
Objem nástřiku, dávkování	1 μl, split 1 : 20
Teplota nástřiku	270 °C
Teplota kolony	240 °C
Teplota detektoru	280 °C
Detektor	FID
Doba analýzy	asi 40 min.

Tabulka 3. Příklad časového průběhu analýzy – teplotní program.


Čas (min)	Teplota (°C)	Teplotní nárůst (°C/min)	Prodleva (min.)
0	140	6,5	-
4,6	170	-	0,5
5,1	170	2,75	-
21,5	215	-	10
31,5	215	40	-
cca 33	240	-	cca 17 - 27

5.5.2 Analýza

Pracovní podmínky se nastaví podle části 5.5.1. Podle složení mastných kyselin se vybere vhodný teplotní režim, který zaručí účinné rozdělení v nejkratším možném čase, přičemž je nutné vzít v úvahu kritéria uvedená v kapitole 4, bod 16.

Pokud jsou analyzovány mastné kyseliny s méně než 12 uhlíkovými atomy, lze pracovat při nižší teplotě (60 °C). Při analýzách mastných kyselin s více než 20 uhlíkovými atomy naopak při teplotě vyšší. Je také možno použít v obou těchto případech programování teploty (tab. 3). Např. při analýze vzorku, který obsahuje methylestery mastných kyselin s méně než C12 se nástřikuje vzorek při teplotě 100 °C až 140 °C (nebo 50 °C až 60 °C, je-li přítomna kyselina máselná) a okamžitě se zvyšuje teplota rychlostí (3 – 8) °C/min. V některých případech se mohou oba postupy kombinovat.

Pokud se vzorek dávkuje přímo na kolonu, naprogramuje se počáteční teplota kolony nejvýše o 10 °C vyšší než je bod varu rozpouštědla při obvyklém tlaku.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	13
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10040.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v olejích a tučích metodou GC	Vydání	1
		Revize	2

Po ukončení programu pokračuje eluce při konstantní teplotě, dokud nejsou eluovány všechny složky. Jestliže je to nutné, doporučuje se provést analýzu na dvou fázích o různé polaritě, aby byla ověřena nepřítomnost maskovaných píků např. v případě současného výskytu C18:3 a C20 nebo C18:3 a konjugovaných C18:2.

6 Vyhodnocení chromatogramů a vyjádření výsledků

6.1 Identifikace píků

Kvalitativní vyhodnocení se provádí na základě analýzy referenční standardní směsi (19) za stejných operačních podmínek, které byly použity při analýze reálného zkušební vzorku. Píky methylesterů ve zkušebním vzorku se identifikují podle retenčních časů ve srovnání s retenčními časy píků známých mastných kyselin v referenčním standardu. Píky na chromatogramu zkušební vzorku, které mají stejný retenční čas, jako píky na chromatogramu referenčního standardu se považují za píky stejné mastné kyseliny.

6.2 Kvantitativní analýza

6.2.1 Metoda vnitřní normalizace

Až na výjimečné případy lze užít metody vnitřní normalizace, tj. za předpokladu, že všechny složky vzorku jsou zaznamenány na chromatogramu, představuje celková plocha píků 100 % (celková eluce).

Poznámky

17 *V tomto obecném případě je výpočet založen na předpokladu, že plocha píku představuje hmotnostní procenta. V případech, že tento předpoklad neplatí, je nutno postupovat podle následující kapitoly.*

Použití korekčních faktorů


V určitých případech, zvláště za přítomnosti mastných kyselin s méně než 8 C nebo kyselin se sekundární skupinou v případě použití tepelně vodivostního detektoru nebo je-li požadována zvláště vysoká přesnost, by měly být použity korekční faktory k převedení plochy píků vyjádřené v procentech na hmotnostní procenta složek.

Určení korekčních faktorů za pomoci chromatogramu referenční směsi methylesterů známého složení (19) se provádí za stejných pracovních podmínek, jaké byly použity při analýze vzorku.

Pro tyto referenční směsi se obsah v hmotnostních procentech vypočte podle vztahu

$$\frac{m_i}{\sum m} \times 100$$

m_i hmotnost složky i referenční směsi,
 $\sum m$ celková hmotnost všech složek v referenční směsi.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	14
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10040.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v olejích a tučích metodou GC	Vydání	1
		Revize	2

Z chromatogramů referenční směsi se vypočte procentické zastoupení pro složku **i** podle vztahu

$$\frac{A_i}{\sum A} \times 100$$

A_i plocha píku odpovídající složce (mastné kyselině) **i**,

$\sum A$ součet ploch všech píků.

Korekční faktor se vypočte

$$K_i = \frac{m_i \times \sum A}{A_i \times \sum m}$$

Obecně se korekční faktory vyjádří ve vztahu ke K_{C16} jako relativní faktor

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{C16}}$$

Pro vzorek se vyjádří obsah každé složky **i** v hmotnostních procentech methylesteru jako

$$K_i = \frac{m_i \times \sum A}{A_i \times \sum m}$$

6.2.2 Metoda vnitřního standardu

V některých případech (např. když nejsou eluovány všechny mastné kyseliny nebo když je třeba určit absolutní množství mastných kyselin ve vzorku) by měl být použit vnitřní standard. Jako vnitřní standard se používají nejčastěji methylestery mastných kyselin s 5C, 15C a 17C a měl by pro ně být stanoven korekční faktor (viz kap. 6.2.1).

7 Literatura

- 1 ČSN P CEN ISO/TS 17764-1 Krmiva - Stanovení obsahu mastných kyselin - Část 1: Příprava methylesterů, 2014.
- 2 ČSN P CEN ISO/TS 17764-2 Krmiva - Stanovení obsahu mastných kyselin - Část 2: Metoda plynové chromatografie, 2014.