 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50100.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v rostlinných olejích a tucích metodou GC	Vydání	1
		Revize	1

## STANOVENÍ OBSAHU MASTNÝCH KYSELIN V ROSTLINNÝCH OLEJÍCH A TUCÍCH METODOU GC

### 1 Účel a rozsah

Postup je určen pro kvantitativní stanovení mastných kyselin ve vzorcích rostlinných tuků a olejů.

### 2 Princip

Mastné kyseliny se převedou na methylestery a stanoví se metodou kapilární plynové chromatografie za použití plamenově-ionizačního detektoru (FID). Jednotlivé mastné kyseliny se identifikují pomocí referenčního vzorku o známém složení a pro kvantifikaci se použije metoda vnitřní normalizace.


### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Destilovaná nebo deionizovaná voda.
- 2 Petrolether.
- 3 Síran sodný, bezvodý.
- 4 Methanol, pro chromatografii.
- 5 Hydroxid sodný, methanolický roztok,  $c(\text{NaOH}) \approx 0,5 \text{ mol/l}$ .

Příprava: V asi 80 ml methanolu (4) se rozpustí 2 g hydroxidu sodného. Po vytemperování se ve 100ml odměrné baňce doplní methanolem (4) po značku. Je-li roztok skladován po delší dobu, může se vytvořit malé množství bílé sraženiny uhličitanu sodného, které však nemá vliv na přípravu methylesterů.

- 6 Fluorid boritý, methanolický roztok, 12% až 15% (m/m). Používá se komerčně dodávaný roztok.
- 7 Chlorid sodný, nasycený vodný roztok.  
Příprava: V 1000 ml vody (1) se rozpustí 400 g chloridu sodného.
- 8 Dusík, čistota min. 4.8.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50100.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v rostlinných olejích a tucích metodou GC	Vydání	1
		Revize	1

9 Hydroxid draselný, methanolický roztok,  $c(\text{KOH}) \approx 2 \text{ mol/l}$ .

Příprava: V asi 80 ml methanolu (4) se rozpustí 13,1 g hydroxidu draselného. Po vytemperování se ve 100ml odměrné baňce doplní methanolem (4) po značku. K vysušení roztoku se přidá asi 1 g bezvodého síranu sodného (3), po 30 min se roztok přefiltruje. Je-li roztok skladován po delší dobu, může se vytvořit malé množství bílé sraženiny uhličitanu sodného, které nemá vliv na přípravu methylesterů, pokud se použije čistý supernatant.

10 Isooktan (2,2,4-trimethylpentan), pro GC.

11 Hydrogensíran sodný, monohydrát.

12 Směsné standardy methylesterů mastných kyselin, např.:

FAME Mix Rapeseed Oil,

Supelco 37 Component FAME Mix,

případně jiné standardy FAMEs, zvolené s ohledem na typ analyzovaného vzorku.

#### 4 Přístroje a pomůcky

1 Plynový chromatograf s detektorem FID.

2 Laboratorní třepačka.

3 Topné hnízdo vhodné pro 100ml a 250ml baňky.

4 Extrakční přístroj podle Twisselmana.

5 Baňka extrakční se zábrusem, 250 ml.

6 Baňka kapkovitá se zábrusem, 50 ml.

7 Zpětný chladič s účinnou délkou (20 – 30) cm, se zábrusem pro připojení baňky.

8 Skleněné varné kuličky.


9 Automatické pipety s nastavitelným objemem, špičky.

10 Zkumavka, 15 ml, se skleněnou zábrusovou zátkou.

11 Vialka, 2 ml, se šroubovacím uzávěrem.

12 Filtrační papír střední hustoty.

13 Analytické váhy s přesností nejméně 0,001 g.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50100.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v rostlinných olejích a tucích metodou GC	Vydání	1
		Revize	1

## 5 Postup

### 5.1 Příprava zkušebního vzorku

#### 5.1.1 Semena olejnin

Laboratorní vzorek se podle typu semene pomele. Podrobný postup mletí je popsán v JPP Úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu, kap. 5.7, postup 60130.1 Úprava vzorků olejnin.

Olej se z rozemletých semen získává za studena, extrakcí petroletherem. Extrakční baňka se naplní do poloviny rozemletým vzorkem (40 g – 50 g), přidá se petrolether tak, aby hladina byla alespoň 1 cm nad vrstvou vzorku. Baňka se uzavře zátkou a extrahuje se 1 h na laboratorní třepačce. Poté se obsah baňky přefiltruje přes suchý papírový filtr a petrolether se opatrně odpaří na extrakčním přístroji. U semen s vyšší vlhkostí (především slunečnice) je vhodné přidat ještě před filtrací k obsahu baňky bezvodý síran sodný (3). Získaný olej se před dalším zpracováním uchovává v lednici.

#### Poznámky

1 Pro mletí semen olejnin se osvědčil kuchyňský nožový kávomlýnek.

#### 5.1.2 Vzorky rostlinných olejů a tuků

Pokud se jedná o vzorek rostlinného tuku nebo oleje, lze jej přímo použít k navážce zkušebního vzorku. Pouze v případě, že není zcela tekutý, zahřeje se na teplotu nejvýše o 10 °C vyšší než je jeho bod tání.

### 5.2 Příprava methylesterů mastných kyselin


Pro přípravu methylesterů mastných kyselin lze použít následující postupy:

- obecná metoda s fluoridem boritým – je vhodná pro většinu olejů a tuků včetně těch, jež obsahují volné mastné kyseliny. Je nevhodná pro stanovení kyseliny máselné (mléčné tuky) a tuků obsahujících mastné kyseliny se specifickými skupinami (keto, epoxy, hydroxy, cyklopropyl, cyklopropenyl atd.),
- trans-esterifikační metoda – je použitelná pro jedlé tuky a oleje obsahující mastné kyseliny počínaje kyselinou máselnou. Podmínkou je, že obsah volných mastných kyselin ve vzorku musí být menší než 2 %.

#### 5.2.1 Obecná metoda s fluoridem boritým

Triacylglyceroly se zmýdelní methanolickým roztokem hydroxidu sodného. Mýdla se převedou na methylestery reakcí s bortrifluorid-methanolvým komplexem.

Do kapkovité baňky se zábrusem se naváží (150 – 200) mg zkušebního vzorku. Přidají se 4 ml methanolického roztoku hydroxidu sodného (5) a varný kamínek. Pokud analyzovaný vzorek

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50100.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v rostlinných olejích a tucích metodou GC	Vydání	1
		Revize	1

obsahuje mastné kyseliny s více než dvěma dvojnými vazbami, je nutné odstranit vzduch z methanolického roztoku a z baňky ještě před nasazením zpětného chladiče probubláváním dusíkem po dobu 5 min. Pak se baňka vloží do topného hnízda a připojí se zpětný chladič.

Obsah baňky se vaří pod zpětným chladičem do vymizení kapiček tuku a baňkou se jemně míchá každých 30 s až 1 min, aby se zamezilo vytvoření tuhého kroužku hydroxidu sodného na její stěně. Vzorky rostlinných olejů se vaří 10 min. Poté se přidá 5 ml methanolického roztoku fluoridu boritého (6) přes vrchní část chladiče. Pokračuje se ve varu po dobu 3 min a poté se do vroucí směsi přidají vrchní částí chladiče 3 ml isooktanu (10). Baňka se vyjme z topného hnízda a odstraní se i zpětný chladič. Okamžitě, aniž se baňka chladí, se přidá 20 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (7). Baňka se zazátkuje a intenzivně se protřepe po dobu nejméně 15 s. Do baňky se přidá další nasycený roztok chloridu sodného (7) tak, aby se hladina kapaliny dostala k hrdlu baňky. Nechá se rozdělit na dvě fáze.

Horní isooktanová vrstva se převede do zkumavky se zábrusem, přidá se malé množství bezvodého síranu sodného (3), aby se odstranily stopy vlhkosti. Naředí se přídatkem 6 ml isooktanu (10) a promíchá se. Po převedení do 2ml vialky se analyzuje na GC.


V případě použití jiné navážky zkušební vzorku je třeba se u přídatku dalších činidel řídit tabulkou č. 1.

**Tabulka č. 1. Množství činidel potřebné k methylesterifikaci příslušné hmotnosti zkušební vzorku.**

Hmotnost zkušeb. vzorku (mg)	Objem baňky (ml)	Roztok NaOH (5) (ml)	Roztok BF <sub>3</sub> (6) (ml)	Isooktan (10) (ml)
100 – 250	50	4	5	1 – 3
250 – 500	50	6	7	2 – 5

### Poznámky

- 2 *Fluorid boritý je toxický. Je proto nezbytné provádět všechny výše uvedené úkony v digestoři. Skleněné nádoby je nutné po použití ihned umýt.*
- 3 *Methanolický roztok fluoridu boritého může obzvláště během dlouhého skladování vytvářet komponenty, které interferují v oblasti kyselin C20 až C22. Proto se každá nová dávka činidla kontroluje tak, že se připraví methylestery čisté kyseliny olejové a provede se analýza na GC. Pokud se objeví cizí píky, činidlo musí být z použití vyřazeno.*

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50100.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v rostlinných olejích a tucích metodou GC	Vydání	1
		Revize	1

### 5.2.2 Metoda trans-esterifikační

Triacylglyceroly 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 zmydelňování methylesterů.

Do zkumavky se zábrusem se naváží (50 – 70) mg zkušební vzorku. Pipetou se přidají 4 ml isooktanu (10), zkumavka se uzavře a protřepe se, čímž se vzorek rozpustí. Pokud je to nezbytné, mírně se zahřívá. Pak se přidá 200 µl methanolického roztoku hydroxidu draselného (9) a zkumavka se uzavře. Směs se intenzivně třepě 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 znovu se intenzivně protřepe po dobu 15 s, aby se zneutralizoval hydroxid draselný. Po usazení soli se do 2ml vialky odebere horní isooktanová vrstva. Ta obsahuje asi 15 mg/ml methylesterů mastných kyselin a může se přímo použít k analýze na GC.

### Poznámky

- V případě nutnosti vyjádřit obsah mastných kyselin v g/kg tuku je nutné použít metodu vnitřního standardu. Zkušební vzorek oleje (tuku) se pak navažuje s přesností na 0,1 mg a ke vzorku se přidává vhodný vnitřní standard, obvykle kyselina margarová (C17) nebo kyselina valerová (C5), pokud je potřeba stanovit především kyseliny s krátkým řetězcem.*
- Připravené methylestery by se měly analyzovat na GC co nejdříve. Je-li to nezbytné, mohou se roztoky methylesterů mastných kyselin skladovat pod inertním plynem při teplotě přibližně 4 °C. Při dlouhodobějším skladování se doporučuje přidat antioxidant v koncentraci, která neovlivní chromatografické stanovení, např. 0,05 g/l BHT (2,6-di-t-butyl-4-methylfenol).*

### 5.3 Stanovení plynovou chromatografií

Methylestery mastných kyselin se rozdělí pomocí kapilární plynové chromatografie za použití plamenově-ionizačního detektoru (FID). K základnímu rozdělení methylesterů mastných kyselin se používají kolony s mírně polární polyethylenglykolovou fází. Pro nástřik vzorku se používá technika split, s nástřikem 1 µl vzorku. Teplotní program se volí v závislosti na složení mastných kyselin tak, aby se docílilo účinného rozlišení v co nejkratším čase. U vzorků olejů obsahujících mastné kyseliny s počtem uhlíků od C14 (kyselina myristová) lze nastavit teplotní program s počáteční teplotou 200 °C. U vzorků, kde je potřeba stanovit i kyselinu kaprinovou C10, začíná teplotní program na teplotě 160 °C. V tabulce č. 2 je uveden příklad nastavení chromatografických podmínek.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50100.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v rostlinných olejích a tucích metodou GC	Vydání	1
		Revize	1

## Poznámky

- 6 *Je-li potřeba rozdělit cis/trans isomery, případně polohové isomery mastných kyselin, používá se kolona s vysoce polární stacionární fází – kyanopropyl polysiloxanového typu (např. kapilární kolona SP-2560 (100 m × 0,25 mm, film 0,2 μm). V tomto případě je vhodné provést i analýzu na koloně s mírně polární fází, aby byla ověřena nepřítomnost maskovaných píků.*

## Tabulka č. 2. Příklad nastavení chromatografických podmínek.

Plynový chromatograf	GC Agilent Technologies 7890A
Kapilární kolona	DB-WAXETR (30 m × 0,32 mm, film 0,5 μm)
Nosný plyn	Helium
Průtok nosného plynu	1,5 ml/min
Teplota injektoru	250 °C
Teplota detektoru	270 °C
Teplotní program	200 °C → 20 °C/min → 240 °C (22 min)
Objem nástřiku, dávkování	1 μl, split 1 : 40

## 6 Výpočet a vyjádření výsledků


### 6.1 Kvalitativní analýza

Kvalitativní vyhodnocení se provádí na základě analýzy referenční standardní směsi (12) provedené za stejných operačních podmínek, které byly použity při analýze reálného zkušební vzorku. Píky methylesterů ve zkušebním vzorku se identifikují na základě jejich retenčních časů, porovnáním s retenčními časy píků známých mastných kyselin v referenčním standardu.

### 6.2 Kvantitativní analýza

Až na výjimečné případy se kvantitativní vyhodnocení provádí metodou vnitřní normalizace, tzn. za předpokladu, že všechny složky vzorku jsou zaznamenány na chromatogramu, představuje celková plocha píků 100 %.

Obsah jednotlivé mastné kyseliny *i* vyjádřený v hmotnostních procentech se vypočítá podle vztahu

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50100.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v rostlinných olejích a tucích metodou GC	Vydání	1
		Revize	1

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

kde  $A_i$  je plocha píku odpovídající složce  $i$ ,

$\sum A$  je součet ploch všech píků.

Uvedený výpočet je založen na předpokladu, že plocha píku představuje hmotnostní procenta. V případech, že toto neplatí, použijí se korekční faktory.

### Použití korekčních faktorů

V určitých případech, zvláště za přítomnosti mastných kyselin s méně než 8 uhlíkovými atomy, nebo požaduje-li se zvláště vysoká přesnost, použijí se korekční faktory k převedení plochy píku vyjádřené v procentech na hmotnostní procenta složek.

Určení korekčních faktorů za pomoci chromatogramu referenční směsi methylesterů známého složení se provádí za stejných pracovních podmínek, jaké byly použity při analýze vzorku. Korekční faktory  $K_i$  se pro jednotlivé složky směsi vypočítají podle vztahu

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

kde  $A_i$  je plocha píku odpovídající složce  $i$ ,

$\sum A$  součet ploch všech píků,

$m_i$  hmotnost složky  $i$  v referenční směsi,


$\sum m$  celková hmotnost všech složek v referenční směsi.

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

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

Obsah každé složky  $i$  v hmotnostních procentech methylesteru se ve vzorku vyjádří dle vztahu

$$x_i = \frac{K'_i \times A_i}{\sum (K'_i \times A_i)} \times 100$$

	Národní referenční laboratoř	Strana	8
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50100.1 – Stanovení obsahu mastných kyselin v rostlinných olejích a tucích metodou GC	Vydání	1
		Revize	1

kde  $A_i$  je plocha píku odpovídající složce  $i$ ,

$K_i^f$  relativní korekční faktor složky  $i$ .

Výsledky stanovení jednotlivých mastných kyselin se získávají jako průměr ze dvou paralelních stanovení za předpokladu, že je splněn požadavek na mez opakovatelnosti. Uvádí se v % a jsou vyjádřeny na dvě desetinná místa.

## 7 Literatura

- 1 ČSN EN ISO 12966-1 Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin – Část 1: Směrnice pro moderní plynovou chromatografii methylesterů mastných kyselin.
- 2 ČSN EN ISO 12966-2 Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin – Část 2: Příprava methylesterů mastných kyselin.
3. ČSN EN ISO 12966-4 Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Stanovení methylesterů mastných kyselin plynovou chromatografií – Část 4: Metoda kapilární plynové chromatografie.