CH 12.17. Stanovenie zloženia mastných kyselín v tukoch metódou GC/FID

1. Pôvod metódy
STN ISO 5508 Živočíšne tuky a oleje. Analýza metylesterov mastných kyselín plynovou chromatografiou.
STN 58 8764 Živočíšne a rastlinné tuky a oleje. Stanovenie obsahu kyseliny erukovej v olejoch a tukoch na ľudskú výživu a v potravinách s prídavkom olejov a tukov.

2. Princíp metódy
Mastné kyseliny, ktoré sa nachádzajú v tukoch vo forme triglyceridov sa reesterifikáciou prevedú na metylestery mastných kyselín a následne sa analyzujú priamo plynovou chroamtografiou.

3. Použité prístroje
Plynový chromatograf s detektorom FID
kapilárna kolónou typu HP-23

4. Použité chemikálie
KOH
metanol
n-heptán
zmes štandardov metylesterov mastných kyselín C 9:0, C 11:0, C 13:0, C 15:0, C 16:0, C 17:0, C 18:0, C 18:1, C 19:0, C 22:1

5. Príprava štandardov a pracovných roztokov
<u>Príprava saponifikačného a reesterifikačného činidla:</u>
Ako saponifikačné a reesterifikačné činidlo sa používa 2M roztok KOH v metanole.

<u>Príprava štandardnej zmesi metylesterov mastných kyselín (C9-C22):</u>
Navážia sa jednotlivé metylestery mastných kyselín. Rozpustia sa v n-heptáne a doplnia na objem 50 ml.

6. Príprava vzoriek
Do zábrusovej skúmavky sa naváži vzorka tuku resp. oleja. Pridá sa n-heptán, skúmavka sa uzavrie a tuk sa nechá rozpustiť. Do tohto roztoku sa pridá reesterifikačné činidlo. Skúmavka sa uzavrie a jej obsah sa dôkladne premieša. Potom sa skúmavka nechá cca 10 min. stáť pričom sa jej obsah rozdelí na dve vrstvy. Horná vrstva t.j. n-heptánová obsahuje metylestery mastných kyselín, zatiaľ čo v spodnej vrstve sa nachádza hlavne reesterifikáciou uvoľnený glycerol. N-heptánová vrstva sa oddelí do čistej banky a použije na stanovenie zloženia mastných kyselín plynovou chromatografiou.

7. Podmienky stanovenia

Kolóna:	sklenená kapilárna kolóna HP-5
Nosný plyn:	He
Prietok:	20 ml/min
Tepelný program:	initial: 105 ^{o}C (1 min), I. nárast teploty rýchlosťou 20 ^{o}C/min na 220 ^{o}C (2 min), II. Nárast teploty rýchlosťou 3 ^{o}C/min na 290 ^{o}C (5 min)
Detektor:	FID, teplota 300 ^{o}C

8. Meranie

Reesterifikáciou pripravený roztok mastných kyselín v n-heptáne sa injekuje do injektora plynového chromatografu čím sa dostáva v prúde nosného plynu na kolónu, v ktorej dochádza k postupnému deleniu na jednotlivé metylestery mastných kyselín.

9. Kalibrácia a vyhodnotenie

Z chromatografického záznamu delenia štandardnej zmesi metylesterov mastných kyselín sa určia retenčné časy pre každý metylester prítomný v analyzovanej zmesi. Zostrojí sa grafická závislosť retenčných časov na počte uhlíkov v reťazci mastnej kyseliny. Neznámemu chromatografickému píku sa na základe jeho retenčného času z vyššie uvedenej grafickej závislosti priradí počet uhlíkov v reťazci mastnej kyseliny. Týmto spôsobom sa môžu priradiť počty uhlíkov ku každému chromatografickému píku v analyzovaných vzorkávh tukov.

CH 12.17. Stanovenie pomerného zastúpenia metylesterov vyšších mastných kyselín metódou GC

1. Určenie metódy

Metóda je určená na stanovenie pomerného zastúpenia metylesterov vyšších mastných kyselín (FAMEs) v rastlinných olejoch a živočíšnych tukoch.

Touto metódou môžeme stanoviť obsah týchto mastných kyselín:

kyselina myristová (C 14:0),
kyselina myristoolejová (C 14:1),
kyselina pentadekánová (C 15:0),
kyselina pentadecénová (C 15:1),
kyselina palmitová (C 16:0),
kyselina palmitoolejová (C 16:1),
kyselina heptadekánová (C17:0),
kyselina heptadecénová (C17:1),
kyselina stearová (C 18:0),
kyselina elaidová (C 18:1n9t),
kyselina olejová (C 18:1n9c),
kyselina linoleaidová (C18:2n6t),
kyselina linolová (C 18:2n6c),
kyselina linolénová (C 18:3n3),
kyselina γ-linolénová (C 18:3n6),
kyselina arachová (C 20:0),
kyselina eikosénová (C 20:1),
kyselina eikosadiénová (C 20:2c),
kyselina behenová (C 22:0),
kyselina eikosatriénová (C 20:3n6),
kyselina eruková (C 22:1),
kyselina eikosatriénová (C 20:3n3),
kyselina arachidónová (C 20:4n6),
kyselina trikosánová (C 23:0),
kyselina dokosadiénová (C 22:2),
kyselina stearidónová (C 18:4),
kyselina lignocerová (C 24:0),
kyselina eikosapentaénová (EPA, C20:5n3),
kyselina nervónová (C 24:1),
kyselina dokosahexaénová (DHA, C 22:6n3).

2. Princíp metódy

Metóda je založená na derivatizácii triacylglycerolov mastných kyselín na metylestery a následnom kvantitatívnom stanovení metódou GC-FID.

3. Pomôcky

3.1 Prístroje a zariadenia

- plynový chromatograf, termostat, laboratórne váhy

3.2 Chemikálie a roztoky

- metanolický roztok hydroxidu draselného s c (KOH) = 2 mol.l^{-1}
- n-hexán Suprasolv
- kyselina chlorovodíková s c (HCl) = 1 mol.l^{-1}

4. Pracovný postup

V skúmavke s 5 ml n-hexánu rozpustíme 0,2 g vzorky oleja. K roztoku pipetou pridáme 1 ml metanolického roztoku KOH s c = 2 $mol.l^{-1}$, skúmavku dôkladne pretrepeme a na 30s umiestnime do vodného kúpeľa vytemperovaného na teplotu 60 °C. Skúmavku znova dôkladne pretrepeme a necháme stáť 1 min. Potom pridáme 2 ml roztoku HCl s c = 1 $mol.l^{-1}$. Po opätovnom pretrepaní necháme obsah skúmavky vyčíriť. Z vrchnej hexánovej vrstvy odoberieme časť a prenesieme do vialky.

4.2 Podmienky merania

- nosný plyn helium He čistoty 6.0, prietok 40 ml/min
- make up dusík N_2 čistoty 5.5 ECD, prietok 45 ml/min
- technický vzduch, prietok 450 ml/min

- parametre kolóny:
  - polárna kapilárna kolóna HP-88, dĺžka 100 m, vnútorný priemer 0,15 mm, hrúbka filmu polárnej fázy 0,25 μm, teplotné maximum 250 °C
- teplotné parametre:
  - teplota injektora 250 °C
  - teplota detektora FID 250 °C

5. Literatúra

Referencie: STN ISO 5508

Interná smernica pre štatistické vyhodnotenie výsledkov vzhľadom na ich opakovateľnosť č. SL/02/02 platná od 01. 09. 2002

CH 12.17.
Stanovenie mastných kyselín metódou GC/FID

1 PRINCÍP METÓDY

Tuk vyextrahovaný zo vzoriek tukových potravín sa saponifikuje hydroxidom draselným v metanole a nezmydliteľná časť sa extrahuje heptánom. Dochádza k transformácii mastných kyselín na metylestery mastných kyselín, ktoré sa analyzujú sa metódou GC/FID.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie kvalitatívneho a kvantitatívneho zloženia mastných kyselín v olejoch a tukových potravinách.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 Redestilovaná voda
3.1.2 Síran sodný –Na_2SO_4 bezvodý, p.a
3.1.3 Metanol gradient grade p.a.
3.1.4 Hydroxid draselný p.a.
3.1.5 Heptán p.a.
3.1.6 FAME štandard

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 roztok KOH v metanole

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Pracovný roztok štandardu FAME mix
Z referenčného štandardu mix FAME (3.1.6) odobrať 50µl a doplniť do 200µl heptánom (3.1.5). Roztok uchovávať v mrazničke.

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 analytické váhy
4.2 rotačná vákuová odparka (RVO)
4.3 plynový chromatograf SHIMADZU GC-17A s FID detektorom
4.4 chromatografická kapilárna kolóna SP^{TM}-2560, ID 0,20µm, 100m x 0,25mm
4.5 laboratórne sklo
4.6 vodík 5.0
4.7 syntetický vzduch – KW frei
4.8 hélium 6.0
4.9 dusík 3.0

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Predpríprava vzoriek

Vzorku ohriať vo vodnom kúpeli na teplotu 50 až 55°C, premiešať a ochladiť. Do extrakčnej banky navážiť 10g s presnosťou 0,1g vzorky, pridať 2ml 25% roztoku amoniaku a premiešať. Pridať 10ml etanolu a premiešať. Pridať 15ml dietyléteru a opatrne premiešať.
Pridať 25ml petroléteru, banku uzavrieť a opatrne miešať kývavým pohybom po dobu 30s.
30 min nechať postáť, vrstvy sa oddelia. Opatrne vybrať zátku a opláchnuť hrdlo dietyléterom. Extrahovaný tuk previesť do vysušenej banky. Previesť druhú extrakciu. Odpariť na RVO a dofúkať N_2.

5.2 Príprava vzorky k analýze

Do varnej banky s okrúhlym dnom navážiť 200mg vyextrahovaného tuku s presnosťou 0,1mg a zmydeľňovať 40ml metanolu a 1ml metanolického roztolu KOH. Ochladiť a previesť s 10ml heptánu do deliaceho lievika. Pridať 50ml vody, pretrepať a nechať rozdeliť fázy. Vodnú fázu znova extrahovať 10ml heptánu. Roztok extraktov prefiltrovať a vysušiť. Zahustiť na RVO a doplniť do odmernej banky heptánom.

5.3 Chromatografická analýza

GC podmienky:
Plynový chromatograf SHIMADZU GC-17A s FID detektorom uvedieme do chodu podľa návodu na obsluhu.
chromatografická kapilárna kolóna**:** SP^{TM}-2560, ID 0,20μm, 100m x 0,25mm

Tlaky plynov: vodík – 50kPa
hélium – 50kPa
vzduch – 50kPa
Teplota detektora - 260°C
Teplota injektora - 260°C
Teplota kolóny – 140°C 5min, 4°C/min do 240°C držať 11 min
Nástrek – 1 μl

6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

<u>Kvantifikácia – metóda vnútornej normalizácie.</u>

X_i – látkový zlomok zložky

$$Xi = \frac{Ai}{\sum_{j=1}^{n} Aj} 100(\%)$$

7 ZOZNAM SKRATIEK

GC – plynová chromatografia
FID – plameňovoionizačný detektor
RVO – vákuová rotačná odparka

8 POUŽITÁ LITERATÚRA

8.1 EN ISO 5509: Živočíšne a rastlinné tuky a oleje, príprava metylesterov mastných kyselín

8.2 EN ISO 5508: Animal and vegetable fats and oils – Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids

8.3 B.Loupancová, E.Vítová, H.Štoudková, M.Fišera: Využití plynové chromatografie k analýze mastných kyselín

8.4 Separation Science Application Note: Determination of fatty acid methyl esters by GCxGC TOFMS, 12/05