

PRILOGA

METODA KEMIJSKE ANALIZE

I. SPLOŠNO

1. Priprava vzorca

1.1 Splošno

Masa v laboratorij dostavljenega vzorca za analizo mora biti 50 g, razen če ni zahtevana večja količina.

1.2 Priprava vzorca v laboratoriju

Pred začetkom analize se mora vzorec homogenizirati.

1.3 Posode

Tako pripravljen vzorec se mora hraniti v za zrak in vlago neprepustnih posodah (v hermetično zaprtih posodah).

2. Reagenti

2.1 Voda

2.1.1 Za raztapljanje, razredčevanje ali izpiranje se mora uporabljati destilirana ali najmanj enako čista demineralizirana voda.

2.1.2 Če reagent ni posebej določen, pomeni »raztopina« ali »razredčevanje« vodno raztopino oziroma razredčenje z vodo.

2.2 Kemikalije

Vse uporabljene kemikalije morajo biti, razen če ni določeno drugače, priznane analitske čistosti.

3. Oprema

3.1 Seznam opreme

Ta seznam vsebuje samo tisto opremo, ki je namenjena posebni uporabi in za katero obstaja specifikacija.

3.2 Analitska tehnika

»Analitska tehnika« pomeni tehniko z občutljivostjo 0,1 mg ali več.

4. Podajanje rezultatov

4.1 Rezultati

Rezultati, ki se podajajo v uradnem poročilu o analizi, morajo biti srednje vrednosti najmanj dveh določitev, katerih ponovljivost je zadovoljiva.

4.2 Izračun odstotkov

Če ni določeno drugače, se rezultati izrazijo kot % (m/m) skupnih maščobnih kislin v vzorcu, kot je bil dostavljen v laboratorij.

4.3 Število značilnih (signifikantnih) števil

Število značilnih (signifikantnih) števil je odvisno od natančnosti metode.

II. PRIPRAVA METIL ESTROV MAŠČOBNIH KISLIN

1. Splošno

Namen te metode je pretvorba olj in maščob živalskega ali rastlinskega izvora, ali maščobnih kislin kakršnegakoli izvora, v metil estre maščobnih kislin. Tako dobljeni metil estri se lahko uporabijo pri vsaki metodi, ki zahteva takšno obliko, vključno s plinsko kromatografijo, tankoplastno kromatografijo in infra-rdečo spektrofotometrijo.

2. Področje uporabe

Opisana metoda se uporablja za olja in maščobe živalskega ali rastlinskega izvora. Metoda, opisana pod 3, se uporablja za pripravo metil estrov maščobnih kislin, ki vsebujejo šest ali več ogljikovih atomov. Pri uporabi splošne metode, opisane pod 3.1, obstaja možnost napak pri rezultatih v prisotnosti:

- spojini s sekundarnimi kisikovimi skupinami (hidroksi, hidroperoksi, keto ali epoksi skupine);
- spojini s ciklopropanskimi ali ciklopropenskimi skupinami;
- konjugiranih poli nenasičenih spojin in acetilenskih spojin;
- voskov.

V takih primerih se priporoča uporaba ene izmed alternativnih metod, opisanih pod 3.2.

Fosfolipidi se lahko analizirajo po saponifikaciji in esterifikaciji maščobnih kislin.

Snovi, ki se ne saponificirajo, se ne odstranijo in, če so prisotne v kakršnikoli znatnejši količini, lahko motijo pri nadaljnji analizi (Opomba 1).

3. Priprava metil estrov maščobnih kislin s šest ali več ogljikovimi atomi

Splošna metoda priprave metil estrov z uporabo bor trifluorida, kot je opisana pod 3.1 naj bi imela prednost pred ostalimi. Če njena uporaba ni možna, se lahko uporabi alternativna metoda, opisana pod 3.2.

3.1 Splošna metoda z uporabo bor trifluorida

3.1.1 Načelo

Saponifikacija gliceridov, sprostitev in esterifikacija maščobnih kislin v prisotnosti bor trifluorida.

3.1.2 Pribor

3.1.2.1 Bučke, 50 in 100 ml, z brušenimi vratovi;

3.1.2.2 Povratni hladilnik, dolžine 20 do 30 cm, z brušenim nastavkom za bučke;

3.1.2.3 Vrelni kamenčki;

3.1.2.4 Cevke za prepihanje z dušikom;

3.1.2.5 Graduane pipete, 10 ml ali več, s pileusovo žogico, ali avtomatske pipete;

3.1.2.6 Epruvete z brušenim grlom in brušenim zamaškom;

3.1.2.7 Lij ločnik, 250 ml.

3.1.3 Reagenti

3.1.3.1 Natrijev hidroksid, metanolna raztopina, približno 0,5 N: 2 g natrijevega hidroksida raztopimo v metanolu, ki vsebuje manj kot 0,5% (m/m) vode. Če se raztopina hrani dalj časa, se pojavi v njej nekoliko natrijevega karbonata v obliki bele oborine, kar ne vpliva na pripravo metil estrov.

3.1.3.2 Bor trifluorid, metanolna raztopina 12 do 15% (m/m). (Komericalno so na voljo 14% in 50% raztopine) (Opomba 2);

Opozorilo: Bor trifluorid je strupen, zato se ne priporoča, da ga uporabnik pripravlja sam iz bor trifluorida in metanola (Opomba 3).

3.1.3.3 Heptan, za kromatografijo (Opomba 2, Opomba 4);

3.1.3.4 Petrol eter, redestiliran (vrelišče 40–60°C), z bromnim številom nižjim od 1, brez heksana, ali heksan (Opomba 2);

3.1.3.5 Natrijev sulfat, brezvodni;

3.1.3.6 Natrijev klorid, nasičena raztopina;

3.1.3.7 Metil rdeče, 0,1% (m/v) raztopina v 60% (v/v) etanolu;

3.1.3.8 Dušik, ki vsebuje manj kot 5 mg kisika/kg plina.

3.1.4 Postopek.

Glede na toksičnost bor trifluorida, se morajo vsi nadaljnji postopki analize izvajati v digestoriju. Stekljeni pribor se mora oprati takoj po uporabi.

Če olja ali maščobne kisline vsebujejo več kot dve dvojni vezi, se priporoča odstranitev zraka iz metanola in bučke z nekaj minutnim prepihanjem z dušikom. Vzorec pripravimo v skladu z I, 1.2. Točno tehtanje ni potrebno. Velikost vzorca za analizo mora biti znana le glede na pravilno izbiro bučke in količine reagentov v skladu s podatki iz tabele:

Količina vzorca	Bučka (3.1.2.1)	0,5 N NaOH (3.1.3.1)	Raztopina BF ₃ v metanolu (3.1.3.2)	Heptan (3.1.3.3)
(mg)	(ml)	(ml)	(ml)	(ml)
100–250	50	4	5	1 do 3
250–500	50	6	7	2 do 5
500–750	100	8	9	4 do 8
750–1000	100	10	12	7 do 10

Primerna količina vzorca za plinsko kromatografsko analizo metil estra je 350 mg. Če je ta količina manjša, je reprezentativnost vzorca vprašljiva (Opomba 5).

3.1.4.1 Maščobe in olja

V bučko se prenese primerno količino vzorca za analizo. Doda se pravilno izbrano količino raztopine natrijevega hidroksida in vrelni kamenčke. Bučko se spoji s povratnim hladilnikom. Segreje se do vrenja in pusti vreti, dokler ne izginejo kapljice olja ali maščobe (ta del postopka traja 5 do 10 minut, v izjemnih primerih je čas lahko tudi daljši).

Z graduirano pipeto, opremljeno s pileusovo žogico, ali z avtomatsko pipeto, se doda v vrelo raztopino z vrha povratnega hladilnika pravilno izbrano količino metanolne raztopine bor trifluorida. Nadaljuje se z vrenjem 2 minuti. V vrelo raztopino se doda z vrha povratnega hladilnika 2 do 5 ml heptana (Opomba 4); (količina heptana ne vpliva na reakcijo) in nadaljuje z vrenjem 1 minuto. Odmakne se toplotni izvor in odstrani povratni hladilnik. Doda se nekoliko ml nasičene raztopine natrijevega klorida (3.1.3.6) in s počasnim krožnim mešanjem premeša vsebino v bučki.

V bučko se dodaja nasičeno raztopino natrijevega klorida, dokler raztopina ne seže do grla bučke. Približno 1 ml zgornjega sloja (raztopina heptana) se prenese v epruveto z brušenim grlom. Doda se toliko brezvodnega natrijevega sulfata, da se odstrani sledove vode. Če je bila količina vzorca za analizo 350 mg, dobljena raztopina vsebuje približno 5 do 10% metil estrov in se lahko neposredno vbrizga v kolono plinskega kromatografa. Če to ni tako, se razredči raztopino heptana tako, da se dobi 5 do 10% koncentracijo metil estrov (Opomba 6).

Celotno količino estrov v suhi obliki se dobi tako, da se prenese raztopino soli skupaj s heptansko fazo v 250 ml lij ločnik in se raztopini ločita. Raztopino soli se ekstrahira s 50 ml petrol etra (vrelišče 40 do 60 °C) ali heksana.

Ekstrakcijo se ponovi. Heptansko fazo in ekstrakte se združijo ter spirajo s po 20 ml porcijami vode do negativne kisle reakcije (indikator metil rdeče). Osušijo se z natrijevim sulfatom in upari topilo na vodni kopeli v toku dušika (Opombi 6 in 7). Če je bila količina vzorca za analizo manjša od 500 mg, se priporoča proporcionalno zmanjšanje volumnov topila in vode.

3.2 Alternativna metoda brez uporabe bor trifluorida

3.2.1 Nevtralna olja in maščobe (kislinško število < 2)

3.2.1.1 Načelo

Metanoliza gliceridov v alkalni sredini

3.2.1.2 Oprema

3.2.1.2.1 Mešalec z veliko hitrostjo in primernim grelcem (npr. magnetni mešalec z grelcem);

3.2.1.2.2 Bučka s konusnim ali okroglim dnom, 100 ml, z brušenim grlom;

3.2.1.2.3 Cev za prepihanje z dušikom;

3.2.1.2.4 Povratni hladilnik, ki se ujema z bučko s konusnim ali okroglim dnom;

3.2.1.2.5 Vrelni kamenčki;

3.2.1.2.6 Lij ločnik, 125 ml;

3.2.1.2.7 Konusna bučka z ozkim vratom (erlenmajerica).

3.2.1.3 Reagenti

3.2.1.3.1 Metanol z manj kot 0,5% (m/m) vode;

3.2.1.3.2 Kalijev hidroksid, metanolna raztopina, približno 1 N: 5,6 g kalijevega hidroksida raztopimo v 100 ml metanola, ki vsebuje manj kot 0,5% vode;

3.2.1.3.3 Heptan, za kromatografijo (Opombi 2 in 4);

3.2.1.3.4 Natrijev sulfat, brezvodni;

3.2.1.3.5 Dušik, ki vsebuje manj kot 5 mg kisika/kg plina.

3.2.1.4 Postopek.

Če olje vsebuje kisline, ki imajo več kot dve dvojni vezi, se priporoča odstranitev zraka iz metanola in bučke s prepihanjem z dušikom.

Priprava vzorca

V 100 ml konusno bučko ali bučko z okroglim dnom se prenese približno 4 g (Opomba 4) pripravljenega olja ali maščobe.

Doda se približno 40 ml metanola (3.2.1.3.1), 0,5 ml metanolne raztopine kalijevega hidroksida (3.2.1.3.2) in vrelni kamenčke. Spoji se s povratnim hladilnikom, meša in segreje do vrenja. Raztopina mora postati bistra. Reakcija je običajno končana v 5 do 10 minutah. Pri oljih tipa ricinovo olje bistrost ni kriterij dokončanja reakcije (Opomba 8).

Ohladi se pod tekočo vodo in prenese v 125 ml lij ločnik. Konusno bučko ali bučko z okroglim dnom speremo z 20 ml heptana (Opomba 4), ki se prelije v lij ločnik.

Doda se približno 40 ml vode, pretrese in pusti, da se raztopini ločita. Estri se nahajajo v zgornjem heptanskem sloju. Vodni sloj se ponovno ekstrahira z 20 ml heptana. Oba ekstrakta se združita in dvakrat spereta s po 20 ml vode. Loči se, raztopino estrov osuši z brezvodnim natrijevim sulfatom in filtrira skozi bombažno vato v 50 ml erlenmajerico; če je potrebno, odpari se topilo do 20 ml pri temperaturi vrenja na vodni kopeli v toku dušika (Opombi 6 in 7).

3.2.2 Kisla olja in maščobe (kislinsko število > 2) ter maščobne kisline.

3.2.2.1 Načelo.

Nevtralizacija prostih maščobnih kislin, alkalna metanoliza gliceridov, ki ji v primeru kisljih olj in maščob sledi esterifikacija maščobnih kislin v kislem mediju.

3.2.2.2 Oprema

3.2.2.2.1 Mešalo z veliko hitrostjo in primernim gretjem (npr. magnetno mešalo z grelcem);

3.2.2.2.2 Konusne bučke ali bučke z okroglim dnom, 250 ml, z brušenim grlom;

3.2.2.2.3 Cevke za prepihanje z dušikom;

3.2.2.2.4 Povratni hladilnik z brušenim nastavkom, ki se ujema s konusno bučko ali bučko z okroglim dnom;

3.2.2.2.5 Vrelni kamenčki;

3.2.2.2.6 Lij ločnik, 250 ml;

3.2.2.2.7 Konusna bučka z ozkim grlom (erlenmajerica).

3.2.2.3 Reagenti.

3.2.2.3.1 Natrijev metilat, raztopina pripravljena z raztapljanjem 1g natrija v 100 ml metanola, z vsebnostjo manj kot 0,5% vode;

3.2.2.3.2 Vodikov klorid, približno 1N, brezvodna metanolna raztopina, (glej pripombo pod 3.2.2.5 (a) in (b));

3.2.2.3.3 Heptan, za kromatografijo (Opombi 2 in 4);

3.2.2.3.4 Natrijev sulfat, brezvodni;

3.2.2.3.5 Dušik z vsebnostjo kisika manj kot 5 mg/kg plina.

3.2.2.4 Postopek s kislimi olji in maščobami.

Če olja vsebujejo kisline, ki imajo več kot dve dvojni vezi, se priporoča odstranitev zraka iz metanola in bučke z nekaj minutnim prepihanjem z dušikom.

Vzorec se pripravi tako kot je opisano pod I, 1.2. 4 g (Opomba 5) pripravljenega olja ali maščobe prenesemo v 250 ml konusno bučko ali bučko z okroglim dnom.

Doda se 40 ml raztopine natrijevega metilata (3.2.2.3.1), (glej pripombo 3.2.2.5 (c)). Spoji se s povratnim hladilnikom in segreje do vrenja. Raztopina se zbistri navadno po 10 minutah.

Reakcija je praktično končana v 15 minutah.

Doda se ne manj kot 50 ml raztopine vodikovega klorida (3.2.2.3.2) in nadaljuje z vrenjem 10 minut. (glej pripombo po 3.2.2.5 (d)).

Ohladi se pod tekočo vodo, doda v bučko 100 ml vode, prenese raztopino v 250 ml lij ločnik in doda 30 ml heptana (Opomba 4). Dobro se pretrese in pusti, da se sloja popolnoma ločita. Sloj heptana se loči. Vodni sloj se ponovno ekstrahira s 30 ml heptana.

Združita se oba heptanska ekstrakta. Spira se z vodo do nevtralne reakcije. Loči se in osuši nad brezvodnim natrijevim sulfatom. Filtrira se skozi bombažno vato v 100 ml erlenmajerico in, če je potrebno, odpari topilo do 20 ml na vodni kopeli pri temperaturi vrenja v toku dušika (Opombi 6 in 7).

3.2.2.5 Pripombe

(a) V laboratoriju se lahko pripravijo majhne količine vodikovega klorida na ta način, da se ga izžene iz komercialne raztopine (1,18) s postopnim dodajanjem koncentrirane žveplove kisline (npr. 1,84). Nastali plin se osuši na enostaven način s prevajanjem skozi žveplovo kislino. Ker ima metanol veliko afiniteto do vodikovega klorida, se priporoča velika previdnost pri tej reakciji; na primer, plin se vodi skozi majhen obrnjen lijak, ki se rahlo dotika površine metanola. Priporočljivo je vnaprej pripraviti večje količine metanolne raztopine vodikovega klorida, ki je stabilen v posodah, zaprtih z brušenim zamaškom, če je hranjen v temi.

(b) Namesto metanolne raztopine vodikovega klorida se lahko uporablja približno 1N raztopina žveplove kisline, vendar pri tem esterifikacija traja najmanj 20 minut in oborjeni natrijev sulfat ovira vrenje. Poleg tega je potrebno filtriranje ali uporaba magnetnega mešalca.

(c) Lahko se pred vzorcem vlije 40 ml metanola in doda 0,4 g natrija in tako sproti pripravi natrijev metilat.

(d) Glede na relativno veliko količino natrijevega metilata se lahko v prisotnosti zelo kislih olj in maščob pojavi oborina natrijevega klorida, kar lahko povzroča neenakomerno vrenje.

Oborina se sicer lahko odfiltrira, vendar ta operacija navadno ni potrebna zaradi kratkega časa, ki je predviden za segrevanje.

4. Opombe

1. Če snovi, ki se ne saponificirajo, kasneje motijo, raztopino po saponifikaciji se razredči z vodo in se te snovi loči na običajen način z ekstrakcijo z dietil etrom, heksanom ali petroletrom.

Milnato vodno raztopino nakisamo in odfiltriramo maščobne kisline.

2. Določeni reagenti, posebno metanolna raztopina bor trifluorida, lahko pri plinsko-kromatografskem določanju metil estrov (v območju C_{20} - C_{22} iz metanolne raztopine bor trifluorida) povzročajo lažne vrhove. Zato se mora vsaka nova serija reagentov preveriti tako, da se pripravijo in kromatografirajo metil estri čiste oleinske kisline. Različni reagenti ne smejo povzročati vrhov, ki bi pri plinski kromatografiji interferirali z vrhovi metil estrov maščobnih kislin.

3. Če se metanolna raztopina bor trifluorida mora pripraviti iz bor trifluorida v plinski obliki, postopamo na sledeči način: Dvolitrsko bučko, v kateri se nahaja 1 liter metanola, se ohladi na kopeli iz ledu in vode. V bučko, ki se nahaja v kopeli v digestoriju, se uvaja skozi cekleno cev BF_3 iz jeklenke, dokler ni absorbirano 125 g plina. Da se prepreči vdor tekočine v regulator plina, tok BF_3 se v cevi vzdržuje pred potopitvijo v metanol in dokler se cevi ne izvleče iz raztopine. Plin iz bučke ne sme izginiti prehitro, tako da bi nastale bele pare. Reagent je zelo obstojen, rok uporabe je dve leti.

4. Heptan (mešanica čistih C_7 izomer, preverjenih s plinsko kromatografijo) se lahko nadomesti s heksanom, če niso prisotne maščobne kisline z 20 ali več atomi ogljika.

5. Če zahtevane količine vzorca ni na voljo, se lahko količino vzorca zmanjša na 10 mg ali manj, s tem da se zagotovi proporcionalno zmanjšanje volumnov reagentov in ustrezna velikost opreme.

6. Metil estri se morajo po možnosti analizirati čim prej je mogoče. Raztopina heptana, ki vsebuje metil estre se lahko, če je potrebno, hrani v hladilniku pod inertno atmosfero. Priporočljivo je, v primeru daljšega hranjenja, metil estre zaščititi pred avtooksidacijo z dodatkom inhibitorja, ki ne moti nadaljnje analize, npr. 0,005% (m/v) B.H.T. (di-ter.butil-2-6-metil-4-fenol). Suhi metil estri, brez topila, se lahko, če je potrebno, hranijo 24 ur v hladilniku pod inertno atmosfero, ali dalj časa v evakuirani zataljeni cevi v napravi za globoko zmrzovanje.

7. Obstaja nevarnost izgube nekaterih hlapnejših metil estrov, če je odparevanje topila predolgotrajno ali če je tok dušika premočan. Za infra-rdečo spektrofotometrijo mora biti topilo čim bolj odstranjeno. Za plinsko kromatografijo je bolje, da se topilo ne odstrani popolnoma.

8. Pri oljih tipa ricinusovo olje bistrost ni kriterij reakcije.

III. PLINSKA KROMATOGRAFIJA METIL ESTROV MAŠČOBNIH KISLIN

1. Splošno

Namen te metode je podati osnovna vodila za plinsko kromatografsko določanje kvalitativne in kvantitativne sestave mešanic metil estrov, dobljenih iz maščobnih kislin, kot je opisano pod II. S to metodo se ne morejo analizirati polimerizirane maščobne kisline. Navodila so uporabna za običajni plinski kromatograf s polnjeno kolono in plamensko-ionizacijskim detektorjem (Opomba 1).

2. Oprema

2.1 Plinski kromatograf

Primeren je vsak inštrument, katerega zmogljivost in resolucija sta taka kot je opisano pod 4.1.2.

2.1.1 Injektor

Mrtev prostor injektorja mora biti čim manjši. Razen če lastnosti materiala tega ne omejujejo, naj bi bila njegova temperatura 25 do 50 °C višja od temperature kolone.

2.1.2 Peč

Peč mora omogočati segretje kolone do temperature najmanj 220 °C in vzdrževanje te temperature znotraj 1 °C.

Če se uporabljajo programirani pogoji, je priporočljivo izbrati dvojni (twin) inštrument.

2.1.3 Kolone

2.1.3.1 Cevi

Morajo biti iz materiala, ki je odporen na analizirane maščobe in olja, npr. steklene ali, če tega ni na voljo, iz nerjavečega jekla (Opomba 2). Dolžina 1 do 3 m; relativno kratke kolone se uporabljajo v prisotnosti kislin z dolgimi verigami ($>C_{20}$).

Pri določanju C_4 in C_6 kislin je priporočljivo uporabiti 2 m kolono.
Notranji premer 2 do 4 mm.

2.1.3.2 Polnilec

Nosilec: s kislino oprana in silanizirana diatomejska zemlja ali kakršen koli inertni polnilec z ozkim razponom velikosti delcev (25 μ m med 125 in 200 μ m), pri čemer je povprečna vrednost odvisna od notranjega premera in dolžine kolone.

Stacionarna faza: polarna poliesterska faza (npr. polisukcinat dietilenglikola, butan-di-ol poliadipat itd.) ali katerakoli faza, ki je v skladu z zahtevami, določenimi v nadaljevanju (npr. cianosilikoni itd.). Stopnja impregnacije med 5 in 20%. Za nekatere separacije je uporabna nepolarna faza.

2.1.3.3 Kondicioniranje

Kolono, če je možno, ločimo od detektorja, zvišamo temperaturo peči na 10 °C nad delovno temperaturo in pri tej temperaturi sveže pripravljeno kolono spiramo najmanj 16 ur s tokom inertnega plina s hitrostjo 20 do 60 ml/min, nato pa še dve uri pri 195 °C.

2.1.4 Detektor

Detektor mora delovati pri temperaturi, ki je višja od temperature peči.

Delovna navodila v tem postopku se nanašajo na plamensko-ionizacijski detektor. (Opomba 1).

2.2 Injekcijska brizgalka

Naj ne bo večja od 10 μ l, s skalo 0,1 μ l.

2.3 Rekorder

Če se za izračunavanje sestave analizirane mešanice uporablja rekorder, mora to biti visoko točna elektronska naprava, združljiva z uporabljenimi opremo:

- hitrost odgovora (response) manj kot 1,56 sekunde ali, še boljše, 1 sekunda (hitrost odgovora je čas, ki ga pero rekorderja uporabi za pot od 0 do 90%, kadar je 100% signal dodan v trenutku);
- papir širine najmanj 25 cm;
- odvijanje papirja s hitrostjo 25 do 150 cm/h.

2.4 Integrator ali kalkulator (po posebni izbiri)

Če se uporablja elektronski integrator ali kalkulator, je izračunavanje hitro in točno. Integrator mora biti linearen, primerno občutljiv in korekcija odklona osnovne linije mora biti zadovoljiva.

3. Reagenti

3.1 Nosilni plin: Katerikoli inertni plin (dušik, helij, argon itd.), temeljito sušen, z vsebnostjo kisika manj kot 10 ppm;

3.2 Pomožni plin: vodik čistosti najmanj 99,9%, brez organskih primesi oziroma zrak ali kisik brez organskih primesi;

3.3 Snovi za standardizacijo: mešanice metil estrov ali metil estri iz olja znane sestave, podobnem, če je le mogoče, analiziranemu olju ali masti.

4. Postopek

4.1 Priprava inštrumenta

4.1.1 Določitev optimalnih delovnih pogojev

Za določitev optimalnih delovnih pogojev je potrebno upoštevati naslednje spremenljivke:

dolžina in premer kolon;
vrsta in količina stacionarne faze;
temperatura kolone;
hitrost pretoka nosilnega plina;
želena resolucija;
količina vzorca;
trajanje analize.

Količino vzorca se mora izbrati tako, da z detektojem in elektrometrom dobi linearnost. Na splošno so vrednosti, s katerimi dobimo željene rezultate, to je število teoretičnih platojev v primeru metil stearata, enako ali ne manjše od 2000 in eluiranje končano v približno 15 minutah, naslednje:

Notranji premer kolone (mm)	Hitrost pretoka nosilnega plina (ml/min)
2	15–25
3	20–40
4	40–60

Koncentracija sekundarne faze (%)	Temperatura (°C)
5	175
10	180
15	185
20	185

Če inštrument to omogoča, mora imeti injektor temperaturo blizu 200 °C, detektor pa mora imeti enako ali višjo temperaturo kot peč.

Skozi plamensko-ionizacijski detektor teče vodik s polovično hitrostjo nosilnega plina in kisik 5- do 10- krat hitreje kot vodik.

4.1.2 Določitev učinkovitosti in ločljivosti

Analizira se mešanico metil stearata in oleata v približno enakem razmerju (npr. metil ester iz kakavovega masla). Količina vzorca, temperatura kolone in hitrost pretoka nosilnega plina morajo biti izbrani tako, da se maksimum vrha metil stearata zabeleži v približno 15 minutah po vrhu topila in da je vrh, ki ga opazujemo, enak približno trem četrtinam celotne skale.

Po naslednji formuli izračunamo

n, število teoretičnih platojev (učinkovitost):

$$n = 16 \left(\frac{dR_1}{\omega_1} \right)^2$$

in R, ločljivost:

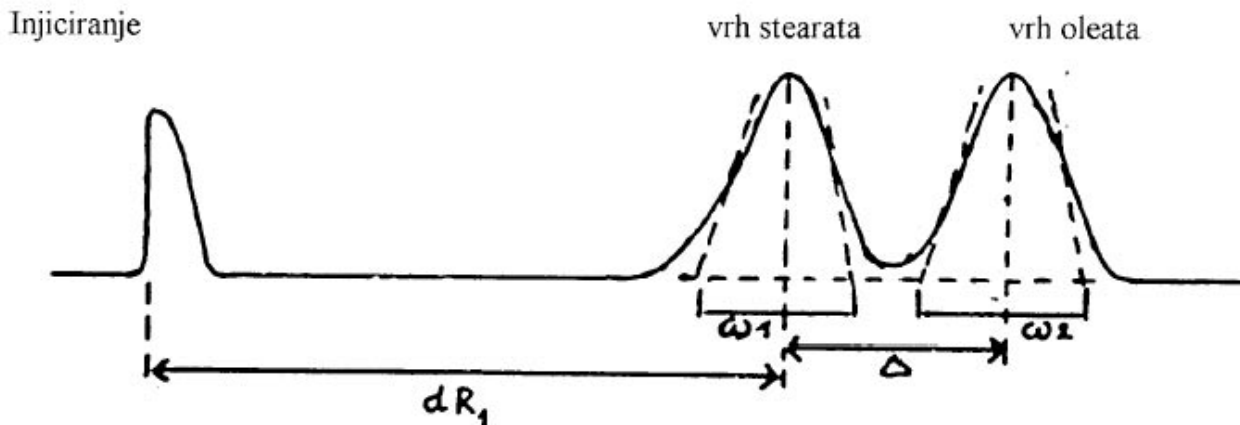
$$R = \frac{2 \Delta}{\omega_1 + \omega_2}$$

kjer je:

dR_1 retenzijska razdalja od injiciranja do relativnega maksimuma vrha metil stearata, merjena v mm

ω_1 in ω_2 sta širini vrhov metil starata in oleata, merjeni v mm med točkama, kjer tangenti na točkah prelomov krivulj sekajo osnovno črto.

Δ je razdalja med relativnima maksimuma vrhov metil starata in oleata.



Sprejeti delovni pogoji morajo biti takšni, da za metil stearat dobimo število, enako ali večje kot 2000 teoretičnih platojev in ločljivost, ki ni manjša od 1:2,5. Morajo tudi omogočiti ločevanje linolejske kisline ($C_{18:3}$) od arašidove ($C_{20:0}$) in gadoleinske kisline ($C_{20:1}$).

4.2 Analiza

Za analizo se uporabi 0,1 do 2 μ l raztopine estrov v heptanu, dobljene po postopku, opisanem pod II. Če so estri neraztopljeni, se pripravi 10% raztopino v heptanu in injiciramo 0,1 do 1 μ l te raztopine.

V nekaterih primerih se lahko za analizo uporabi tudi večjo količino vzorca (do 10-krat); pri tem se mora upoštevati pogoje za identifikacijo sestavin, prisotnih v sledovih, kot so opisani pod 4.1.1. Vendar je analizo mogoče izvajati pri nižjih temperaturah peči, kadar je potrebno določiti maščobne kisline pod C_{12} , ali pri višjih temperaturah, kadar je potrebno določiti maščobne kisline s številom ogljikovih atomov nad C_{20} .

V obeh primerih se lahko analiza izvaja s programiranimi temperaturami. Na primer, če vzorec vsebuje metil estre maščobnih kislin z manj kot 12 atomi ogljika, injiciramo vzorec pri 100 °C (ali pri 50 do 60 °C, če je prisotna maslena kislina) in takoj nato programiramo s 4 do 8 °C/min do optimalne temperature.

V nekaterih primerih je možno združiti oba procesa, to je nadaljujemo eluiranje pri stalni temperaturi po intervalu programiranja temperature, dokler niso vse sestavine eluirane. Če inštrument ne more delovati s programom za temperaturo, se analiza izvaja pri dveh izbranih temperaturah med 100 in 195 °C.

Kjer je potrebno, je zaželeno izvajati analizo na dveh določenih fazah nasprotna polarnosti, da bi se preverila odsotnost skritih vrhov, na primer pri ribjem olju ali če so istočasno prisotne konjugirane vezi $C_{18:3}$ in $C_{20:0}$ ali $C_{18:3}$ in $C_{18:2}$.

5. Izražanje rezultatov

5.1 Kvalitativna analiza

Pri identičnih pogojih kot pri izvedbi analize, se analizira referenčno mešanico in določi retenzijske razdalje (ali retenzijske čase) za maščobne kisline, ki sestavljajo mešanico.

Nariše se diagram logaritma retenzijske razdalje (ali retenzijskega časa) v odvisnosti od števila ogljikovih atomov. Diagrami, narisani pod izotermalnimi pogoji in za estre z ravnimi verigami ali določeno stopnjo nenasičenosti, morajo na semilogaritemskem papirju izgledati kot vzporedne linearne premice.

Kromatografske vrhove se identificira tako, da se jih primerja s premicami, ali če je potrebno z interpolacijo.

Nujno je, da izključno takšne pogoje izvedbe, da lahko obstajajo »maskirani vrhovi«, to je, da se dve sestavini ne moreta ločiti zaradi neprimerne ločljivosti.

5.2 Kvalitativna analiza

5.2.1 Določanje sestave

Uporablja se (razen v izjemnih primerih) metodo internega standarda, to je da se predpostavi, da so vse sestavine, prisotne v vzorcu, zbrane v kromatogramu in da je vsota površin pod vrhovi enaka 100% vsebnosti (popolno eluiranje).

Če je inštrument opremljen z integratorjem, se uporabi tako dobljene rezultate. Če ni, se določi površino pod vsakim vrhom z metodo trikotnika tako, da množimo njegovo višino s širino na polovici višine in pri tem, če je potrebno, se upošteva med beleženjem uporabljene atenuacije.

5.2.1.1 Splošni primer

Če pomembne komponente pod C_8 niso prisotne, se izračuna za vsako sestavino njeno vsebnost, kot odstotek metil estra, ki se ga določi tako, da je odstotek enak površini odgovarjajočega vrha deljeni z vsoto vseh površin vrhov:

$$\text{odstotek (m/m) spojine } i, \text{ izražene kot metil ester} = \frac{A_i}{\sum A_i} \times 100$$

kjer je:

A_i = površina vrha spojine i ;

$\sum A_i$ = vsota površin vseh vrhov.

5.2.1.2 Uporaba korekcijskih faktorjev

Včasih je za preračun odstotka površine vrha v masni odstotek sestavine potrebno uporabiti korekcijske faktorje, posebno če so prisotne kisline pod C_8 ali kisline s sekundarnimi skupinami, ali pri uporabi detektorjev s toplotno prevodnostjo (katarometri).

Korekcijske faktorje izračunamo iz kromatograma, dobljenega z referenčno mešanico metil estrov točno znane koncentracije pri identičnih pogojih.

Za referenčno mešanico:

$$\text{odstotek (m/m) spojine } i = \frac{B_i}{\sum B_i} \times 100$$

kjer je:

B_i = masa spojine i v referenčni mešanici;

$\sum B_i$ = vsota mas različnih sestavin v referenčni mešanici.

Iz kromatograma, dobljenega z referenčno mešanico, lahko izračunamo:

$$\text{odstotek (površina/površina) spojine } i = \frac{C_i}{\sum C_i} \times 100$$

kjer je:

C_i = površina vrha, ki odgovarja spojini i ;

$\sum C_i$ = vsota površin vseh vrhov.

Iz tega sledi:

$$\text{korekcijski faktor } K_i = \frac{B_i \times \sum C_i}{C_i \times \sum B_i}$$

Običajno se korekcijski faktor izrazi kot $K_{16} = 1$ in relativni faktorji postanejo:

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{16}}$$

Pri vzorcu se vsebnost vsake sestavine poda kot:

$$\text{odstotek (m/m) spojine } i = \frac{K'_i \times A_i}{\sum (K'_i \times A_i)} \times 100$$

izražene kot metil ester.

5.2.1.3 Uporaba internega standarda

V nekaterih primerih (posebno pri določanju kislin C_4 in C_6 in pri določanju kislin, pri katerih se ne eluirajo vse maščobne kisline) je potrebno uporabiti interni standard. V takem primeru se določi korekcijski faktor po formuli:

$$\text{odstotek (m/m) spojine } i = \frac{m_s \times K'_i \times A_i}{m \times K'_s \times A_s} \times 100$$

izražene kot metil ester,

kjer je:

m_s = masa internega standarda v mg;

m = masa vzorca v mg;

K'_s = korekcijski faktor internega standarda;

A_s = površina vrha internega standarda;

A_i = površina vrha spojine i .

5.2.2 Izražanje rezultatov

Rezultati se podajo na:

tri signifikantne (značilne) številke pri vsebnosti več kot 10%;

dve signifikantni številki pri vsebnosti med 1 in 10%;

eno signifikantno številko pri vsebnosti pod 1%;

pri čemer je ena številka mišljena za decimalno vejico.

5.2.3 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh določanj, izvedenih istega dne, na istem inštrumentu, z istim izvajalcem in z istim estrom, pri sestavini, prisotni z vsebnostjo nad 5%, ne sme presegati 3% relativno glede na določeno vrednost. Absolutna vrednost ne sme presegati 1%. V primeru sestavin, prisotnih pod 5%, ponovljivost s koncentracijo naglo pada.

5.2.4 Obnovljivost

Razlika med rezultatoma, dobljenima v dveh različnih laboratorijih pri sestavini, prisotni z vsebnostjo nad 5%, ne sme presegati 10% relativne vrednosti glede na določeno vrednost.

Absolutna vrednost ne sme presegati 3%. V primeru sestavin, prisotnih pod 5%, ponovljivost s koncentracijo naglo pada.

6. Opombe

1. Lahko se uporablja tudi kromatograf z detektorjem na načelu toplotne prevodnosti (katarometer). V takem primeru morajo biti opisani pogoji modificirani na sledeči način:

Kolona: dolžina dva do štiri metre, notranji premer 4 mm;

Nosilec: velikost delcev v območju od 160 do 200 μm ;

Stopnja impregnacije: 5 do 25%;

Nosilni plin: helij ali, če tega ni na voljo, vodik z najnižjo možno vsebnostjo kisika.
Nobenega pomožnega plina;

Temperatura injektorja: 40 do 60 °C višja od temperature peči;

Temperatura kolone: v območju od 180 do 200 °C;

Pretok nosilnega plina: običajno v območju 60 do 80 ml/min;

Injicirane količine: običajno v območju 0,5 do 2 µl.

Pri kvalitativni analizi se mora upoštevati korekcijske faktorje kot so opisani pod 5.2.1.2.

2. Če so prisotne sestavine z več kot tremi dvojnimi vezmi, se lahko zgodi, da cevi iz nerjavečega jekla povzročijo njihovo razgradnjo.

IV. DOLOČANJE ERUKA KISLINE PRI VSEBNOSTI NAD 5%

1. Namen in področje uporabe

S to metodo se določa vsebnost eruka kisline v:

- (i) oljih in maščobah, ki vsebujejo cetoleinsko kislino (posebna izomera cis- dokozenojske kisline, ki se pojavlja v ribjih oljih);
- (ii) hidrogeniranih oljih in maščobah, ki vsebujejo trans in cis-izomere dokozenojske kisline.

2. Definicija

Vsebnost eruka kisline je: vsebnost eruka kisline, kot je določena z opisano metodo.

3. Načelo

Metil estre maščobnih kislin iz olj ali maščob ločimo z nizkotemperaturno srebro-nitratno tankoplastno kromatografijo in se jih kvalitativno določi s plinsko-tekočinsko kromatografijo.

4. Reagenti

4.1 Dietileter, brez peroksida, sveže destiliran;

4.2 n-heksan;

4.3 Silika gel G, za tankoplastno kromatografijo;

4.4 Silika gel, za kolonsko kromatografijo;

4.5 Srebrov nitrat, raztopina 200 g/l. 24 g srebrovega nitrata se raztopi v vodi in razredči z vodo do 120 ml;

4.6 Metil erukat, raztopina 5 mg/ml. 50 g metil erukata se raztopi v nekaj ml n-heksana in razredči do 10 ml z n-heksanom;

4.7 Metil tetrakozanoat, raztopina, interni standard, 0,25 mg/ml. 25 g metil tetrakozanoata se raztopi v nekaj ml n-heksana (kot 4.6) in razredči z n-heksanom do 100 ml;

4.8 Topilo za razvijanje: toluen: n-heksan 90: 10 (v/v);

4.9 2,7 diklorofluorescein, raztopina 0,5 g/l. Med segrevanjem in mešanjem se raztopi 50 mg 2,7 diklorofluoresceina v 100 ml 50% vodnega metanola.

5. Oprema

5.1 Aparatura za tankoplastno kromatografijo, sestavljena iz:

5.1.1 Naprave za globoko zmrzovanje, ki lahko vzdržuje posodo za razvijanje in vsebino pri temperaturi –20 do –25 °C;

5.1.2 Steklene ploščice, 200 x 200 mm;

5.1.3 Svetilka z ultravijoličnim svetlobnim izvorom;

5.1.4 Steklene kolone, dolžine približno 200 mm, notranji premer približno 10 mm, s filtrom iz steklene volne ali sintranega stekla. Alternativno se lahko uporabijo majhni lijaki s filtri iz sintranega stekla;

5.1.5 Aplikator, za nanašanje raztopine v obliki ozkega pasu ali proge na ploščice za tankoplastno kromatografijo.

5.2 Plinsko-tekočinski kromatograf, z elektronskim integratorjem, kot je opisan v III, 3.1.

6. Postopek

6.1 Priprava metil estrov maščobnih kislin

Približno 400 mg oljne ali maščobne komponente vzorca za analizo se raztopi po metodi, opisani v II.3 tako, da se dobi raztopino 20 do 50 mg/ml metil estra maščobne kisline v n-heksanu.

6.2 Tankoplastna kromatografija

6.2.1 Priprava ploščic

60 g silikagela (4.3) se prenese v 500 ml bučko z okroglim dnom, doda 120 ml raztopine srebrovega nitrata (4.5) in stresa eno minuto, da se dobi popolnoma homogena suspenzija. Suspenzijo se nanese na običajen način na ploščice, debelina sloja naj bi bila približno 0,5 mm. S to količino suspenzije se lahko pripravi pet ploščic 200 x 200 mm.

Ploščice se delno posušijo na zraku (najbolje v temi približno 30 minut). Nato se jih popolnoma posuši in aktivira v sušilniku pri 100 °C dve uri in 30 minut. Ploščice se morajo po aktiviranju uporabiti čimprej, sicer pa se jih mora hraniti v temi in pred uporabo ponovno aktivirati. (Opomba: zadovoljivo aktiviranje dosežemo pri 110 °C pod pogojem, da pri tem ploščice ne potemnijo). Da se med razvijanjem prepreči učinke robov, pred uporabo se napravi na sloju zarezo, oddaljeno od stranskih robov in zgornjega roba 10 mm.

6.2.2 Nanašanje metil estrov

S pomočjo aplikatorja (5.1.5) se nanese 50 µl raztopine metil estrov (6.1), pripravljenih iz vzorca, v obliki približno 50 mm dolgega ozkega traku, na razdalji najmanj 40 mm od stranskih robov in 10 mm od spodnjega roba ploščice. Na podoben način se nanese 100 µl raztopine, pripravljene iz enakih volumskih delov raztopine metil estrov (6.1) in raztopine metil erukata (4.6). Med nanašanjem raztopin se mora biti posebno pozoren na krhko naravo sloja. (Opomba: kot pomoč pri identifikaciji traku metil erukata po razvijanju se lahko nanese na ploščico 50 µl raztopine metil erukata (4.6) – glej sliko). Po nanosu metil estrov se postavi spodnji rob ploščice v dietileter, dokler eter ne doseže višine približno 5 mm nad nanosom vzorca. S tem se metil estri koncentrirajo v obliki ozkega traku.

6.2.3 Razvijanje ploščic

V posodo za razvijanje se nalije topilo za razvijanje (4.8) do globine približno 5 mm in posodo, skupaj s pokrovom, se postavi v napravo za globoko zmrzovanje (5.1.1) v kateri je temperatura –25 °C ali čim bližja tej. (V nekaterih primerih se priporoča nihanje posode za razvijanje). Po dveh urah se previdno postavi ploščico v posodo za razvijanje in počaka, da se topilo dvigne do približno 1/2 do 2/3 višine ploščice. Ploščico se odstrani in topilo previdno upari v rahlem toku dušika. Ploščico se ponovno postavi v posodo za razvijanje in počaka, da se topilo dvigne do višine ploščice. Ploščico se odstrani in ponovno posuši v toku dušika, nato pa po njej previdno razprši raztopino 2,7 diklorfluoresceina (4.9).

Ploščico se opazuje pod ultravijolično svetlobo, lociramo trak, ki vsebuje metil erukat iz vzorca in se ga primerja z intenziviranim trakom vzorca, ki mu je bil dodan metil erukat (glej sliko).

6.2.4 Ločevanje frakcij metil estrov

Sloj metil erukata, dobljenega iz vzorca, se prenese v 50 ml čašo in pri tem pazi, da ne nastanejo izgube. Na enak način se prenese v drugo 50 ml čašo silikagel, ki se nahaja nad in pod slojem metil erukata. Ta sloj vsebuje vse frakcije ostalih metil estrov maščobnih kislin. V obe čaši se doda po 1,0 ml standardne raztopine metil tetrakozanoata (4.7) in po 10 ml dietiletra (4.1). Premeša se in prenese vsebino iz čaš v kolone ali lijake (5.1.4), v katerih se nahaja približno 1 g silikagela (4.4); metil estre eluiramo s tremi ali štirimi 10 ml porcijami dietil etra. Filtrate zbiramo v majhnih bučkah. Oba filtrata se upari do majhnega volumna v blagem toku dušika in prenese metil estre v majhne steklene epruvete s konusnim dnom.

V rahlem toku dušika se odstrani topilo tako, da se metil estri skoncentrirajo na dnu epruvet. Metil estre se raztopi v približno 25 do 30 µl n-heksana (4.2).

6.3 Plinsko-tekočinska kromatografija

6.3.1 Po postopku, opisanem v III., 4 se analizira 1 do 2 µl raztopine metil estrov, dobljenih iz (i) frakcije, ki vsebuje metil erukat in (ii) frakcije, ki vsebuje ostale metilirane maščobne kisline.

6.3.2 Iz elektronskega integratorja se dobijo naslednja območja vrhov:

(i) iz kromatograma frakcije, ki vsebuje metil erukat:

(a) metil erukat (E)

(b) interni standard (L_1)

(c) celotna območja površin vrhov metil estrov brez internega standarda (EF)

(ii) iz kromatograma frakcij, ki vsebujejo estre ostalih maščobnih kislin:

(a) celotna območja površin vrhov metil estrov brez internega standarda (RF)

(b) interni standard (L_2).

7. Podajanje rezultatov

7.1 Metoda izračuna in formula

7.1.1 Vsebnost eruka kisline v vzorcu, izražena v obliki metil estra kot odstotek glede na skupno vsebnost metil estrov, pripravljenih iz vzorca, je podana z:

$$\frac{E}{L_1 \left(\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2} \right)} \times 100$$

kjer so:

E, EF, RF, L_1 in L_2 površine vrhov iz 6.3.2, po potrebi korigirane s pomočjo kalibracijskih faktorjev.

V praksi je vrednost metil erukata, podana z zgoraj navedeno formulo, enaka vsebnosti eruka kisline, izražene kot odstotek glede na skupno vsebnost maščobnih kislin v vzorcu.

7.1.2 Če so površine vrhov dobljene v odstotkih, se vrednosti EF in RF lahko izračunajo po formuli:

$$EF = 100 - L_1$$

$$RF = 100 - L_2$$

7.1.3 Metoda izračuna (7.1.1) predpostavlja, da je vsebnost tetrakozanojske kisline v vzorcu zanemarljiva. Če se izkaže, da so v vzorcu prisotne značilne vsebnosti te kisline, se mora vrednost za tetrakozanojsko kislino (L_2), dobljena iz kromatograma frakcij, ki vsebujejo metil estre ostalih maščobnih kislin, zmanjšati na:

$$L_2 - T_2$$

kjer je:

$$T_2 = \frac{T_0 P_2}{P_0}$$

in:

T_2 = površina vrha metil tetrakozanoata, dobljenega iz vzorca, ki tvori del površine vrha, pripisane internemu standardu v kromatogramu frakcij metil estrov ostalih maščobnih kislin

P_2 = površina vrha metil palmitata, dobljenega iz kromatograma ostale frakcije

T_0 = površina vrha metil tetrakozanoata, dobljena iz kromatograma metil estrov skupnih maščobnih kislin

P_0 = površina vrha metil palmitata, dobljena iz kromatograma metil estrov maščobnih kislin, določenih po metodi iz III. 4.

7.1.4 Izpeljava formule

Delež maščobnih kislin v frakciji, ki vsebuje metil erukat, izražen kot odstotek skupnih maščobnih kislin v vzorcu, je podan z:

$$\frac{EF}{L_1} \times 100 \quad \text{ali} \quad \frac{EF}{L_1 \left(\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2} \right)} \times 100$$

Delež eruka kisline v frakciji, ki vsebuje metil erukat, je podan z:

$$\frac{E}{EF}$$

Iz tega sledi, da je vsebnost eruka kisline v vzorcu, izražena kot odstotek glede na skupno vsebnost maščobnih kislin, podana z:

$$\frac{EF}{EF \quad RF} \times \frac{E}{EF} \times 100 \quad \text{ali} \quad \frac{E}{EF \quad RF} \times 100$$

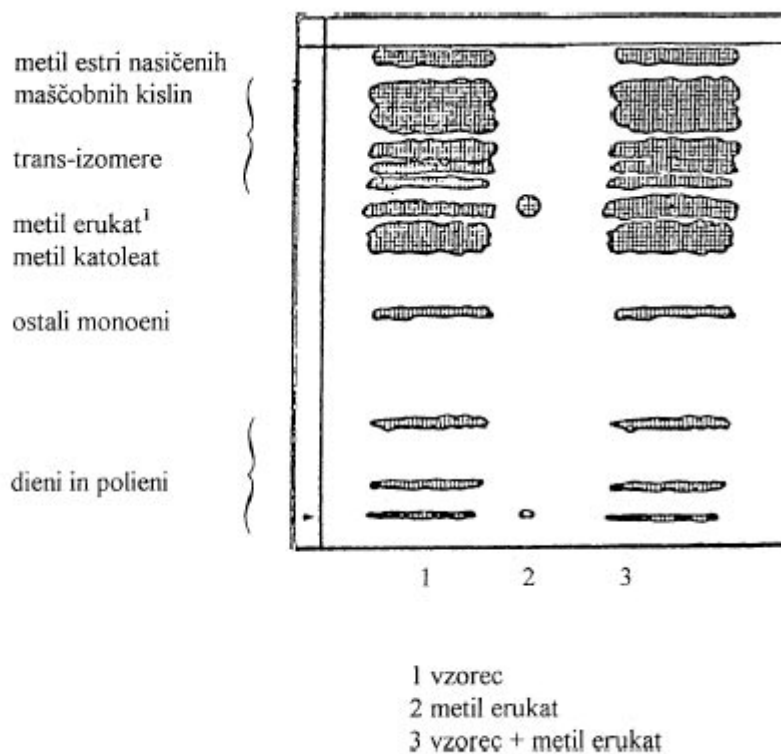
$$L_1 \quad (\quad - \quad + \quad - \quad)$$

$$L_1 \quad L_2 \quad L_1 \quad L_2$$

7.1.5 Ponovljivost

Razlika med vrednostima dveh določanj, ki se izvajata istočasno ali drugo za drugim na istem vzorcu, z istim analitikom, pod enakimi pogoji, ne sme presegati 10% rezultata ali 0,5 g na 100 g vzorca, upoštevajoč večjo vrednost.

SLIKA: Značilen tankoplastni kromatogram, ki prikazuje ločevanje metil estrov eruka kisline, katoleinske kisline in trans-izomere dokozenojske kisline



¹ Metil erukat običajno vsebuje metilne estre drugih monoenskih kislin, vendar mora biti brez metil katoleata