

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Laboratoriotekniikka

2012

Irene Jaakkola

# RASVAHAPPOJEN KVANTITATIIVINEN MÄÄRITYS



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Laboratoriotekniikka

2012 | 58 sivua

Ohjaajat Taina Hovinen, Päivi Laakso

Irene Jaakkola

## RASVAHAPPOJEN KVANTITATIIVINEN MÄÄRITYS

Työn tarkoituksena oli selvittää kolmen eri menetelmän soveltuvuutta kvantitatiiviseen rasvahappomäärittelyyn sekä arvioida laboratorion rasvahappoanalyysin luotettavuutta osallistamalla kansainväliseen vertailunäytetutkimukseen. Ensimmäinen menetelmä oli IUPAC 2.301 standardimenetelmä, toinen Bannon *et al.* (1982) esittämä pikamenetelmä ja kolmas testattava menetelmä oli GOED:n (Global Organization for EPA and DHA Omega-3's) voluntary monograph v.3 -menetelmä. Menetelmistä IUPAC:n ja GOED:n menetelmät perustuvat hydrolysoitun rasvan happokatalyyttiseen esterointiin ja Bannonin esittämä menetelmä alkaliseen vaihtoesterointiin.

Testattaviksi näytteiksi valittiin koostumukseltaan hyvin tunnettu rypsiöljy ja kaksi erilaista GOED:n kalaöljyvertailunäytettä. Sisäisenä standardina käytettiin alkutestauksessa rasvahapon 21:0 metyyliesteriä ja myöhemmin 23:0 metyyliesteriä.

Näytteet analysoitiin kahdella eri kaasukromatografilla, joissa oli erilaiset kolonnit. Toisella kolonnilla saatiin erotelluksi *cis*- ja *trans*-rasvahapot, kun taas toinen kolonni erotteli rasvahapot hiiliketjun pituuden sekä kaksoissidosten lukumäärän ja sijainnin mukaan.

Työssä määritettiin lopuksi rasvahapot kvantitatiivisesti kolmesta GOED:n vertailunäytteestä. Näitä tuloksia voitiin vertailla muiden vertailulaboratorioiden saamiin tuloksiin. Lisäksi laboratorion tulostason oikeellisuutta arvioitiin analysoimalla kahta eri FAPAS:n vertailunäytettä, joille oli määritetty hyväksyttävät raja-arvot.

GOED:n menetelmän todettiin toimivan vertailluista menetelmistä parhaiten ja lisäksi se oli työturvallisuuden kannalta paras vaihtoehto. Menetelmä tarvitsee kuitenkin jatkotestausta erilaisilla näytematriiseilla ennen käyttöönottoa.

ASIASANAT:

(rasvahappo, metyyliesteri, kvantitatiivinen analyysi, kaasukromatografia)

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Laboratory Technology

2012 | 58 pages

Taina Hovinen, Senior Lecturer; Päivi Laakso, Ph. D.

Irene Jaakkola

## QUANTITATIVE ANALYSIS OF FATTY ACIDS

The aim of the thesis was to test the suitability of three different methods for quantitative fatty acid analysis and to evaluate the reliability of the laboratory's fatty acid analysis by participating in an international proficiency test. The first tested method was based on the IUPAC 2.301 standard method while the second was a quick test method by Bannon et al. (1982) and the third method applied was the voluntary monograph v.3 method by the GOED (Global Organization for EPA and DHA Omega-3's). The IUPAC and GOED methods were based on acid-catalysed esterification of hydrolyzed fat and the method presented by Bannon was based on alkaline transesterification.

Rapeseed oil with its well known fatty acid composition is well known and two marine oil samples from GOED were selected as the samples for the method testing. The internal standard used for quantification in preliminary testing was a 21:0 methyl ester and later on a 23:0 methyl ester.

The samples were analyzed with two different gas chromatographs using two different columns. One of the columns separated *cis*- and *trans*-fatty acids and the other column was used to separate the fatty acids based on the length of their carbon chains and the number and position of double bonds.

The final stage in the thesis project was a quantitative determination of fatty acid composition from three marine oil samples from GOED. These results were compared with results obtained by other laboratories participating in the proficiency test. In addition, the reliability of the fatty acid analyses was evaluated by using two different FAPAS quality control test materials with determined satisfactory ranges for fatty acids.

The comparison of the methods showed that the GOED method was the most useful method for the quantitative analysis of fatty acids. Also the GOED method was found to be the safest considering the risk factors in the laboratory environment. However, the method requires further testing with different sample matrices.

KEYWORDS:

(fatty acids, methyl ester, quantitative analysis, gas chromatography)

# SISÄLTÖ

<b>SANASTO</b>	<b>7</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>8</b>
<b>2 RASVAT</b>	<b>9</b>
2.1 Triasyyliglyserolit	9
2.2 Diasyyliglyserolit	10
2.3 Monoasyyliglyserolit	11
2.4 Sterolit	11
2.5 Fosfolipidit	13
2.6 Glykolipidit	13
2.7 Sfingolipidit	14
2.8 Muut rasvat	14
<b>3 RASVAHAPOT</b>	<b>16</b>
3.1 Rasvahappojen nimeäminen	16
3.2 <i>Cis</i> - ja <i>trans</i> -rasvahapot	19
3.3 Rasvahapposarjat	19
3.4 Välttämättömät rasvahapot	21
3.5 Ravinnon rasvahapot	21
3.6 Rasvahappojen metabolia	22
3.7 Välttämättömien rasvahappojen tehtävät	23
<b>4 RASVAHAPPOJEN KAASUKROMATOGRAFINEN MÄÄRITYS</b>	<b>26</b>
4.1 Rasvahappojen erottaminen kaasukromatografisesti	27
4.2 Rasvahappojen tunnistus	28
<b>5 KOKEELLINEN OSUUS</b>	<b>29</b>
5.1 IUPAC -menetelmä	30
5.2 Bannonin <i>et al.</i> -menetelmä	31
5.3 GOED -menetelmä	31
5.4 Rypsiöljy	34
5.5 GOED-vertailunäytteet Marine oil 2 ja 3	40
5.6 GOED-vertailunäytteet Marine oil 4, 5 ja 6	44

5.7 FAPAS-laadunvarmistusnäytteet	48
-----------------------------------	----

<b>6 YHTEENVETO</b>	<b>51</b>
---------------------	-----------

<b>LÄHTEET</b>	<b>53</b>
----------------	-----------

## LIITTEET

Liite 1. Ruoka-aineiden rasvahappokoostumuksia.

Liite 2. AOCS/GOED vertailututkimuksen tulokset.

## KUVAT

Kuva 1: Triasyyliglyseroli ja sen rakenneosat. Kuvassa R tarkoittaa hiilivetyketjua.	10
Kuva 2: Diasyyliglyseroli.	10
Kuva 3. Monoasyyliglyserolin 2-isomeeri.	11
Kuva 4: Kolesteroli.	12
Kuva 5. Kasvisteroleita.	13
Kuva 6: Fosfolipidi lesitiini.	13
Kuva 7. Galaktolipidi.	14
Kuva 8. Sfingolipidi	14
Kuva 9. Vaha.	15
Kuva 10. Rasvahappojen nimeäminen.	17
Kuva 11. Rasvahapon <i>cis</i> - ja <i>trans</i> -konfiguraatio.	19
Kuva 12. Välttämättömien rasvahappojen aineenvaihdunta (3).	23
Kuva 13. Alkalinen vaihtoesteröinti (19).	29
Kuva 14. Hapon katalysoima esteröinti (19).	29
Kuva 15. Rypsiöljy, kolonni J/W 122-7032E DB-WaX	37
Kuva 16. Rypsiöljy, kolonni Varian CP 7489 CP-Sil 88	37
Kuva 17. Marine oil 2, kolonni J/W 122-7032E DB-WaX	42
Kuva 18. Marine oil 3, kolonni Varian CP 7489 CP-Sil 88	43

## TAULUKOT

Taulukko 1. Yleisimmät kasvi- ja eläinperäiset rasvahapot.	18
Taulukko 2. Erilaiset rasvahapposarjat.	20
Taulukko 3. N-6- ja n-3-rasvahappojen biokemiallisia tehtäviä.(3)	26
Taulukko 4. Menetelmien vertailu, kolonni J/W 122-7032E DB-WaX	34
Taulukko 5. GOED-menetelmän haavoittuvuus, kolonni J/W 122-7032E DB-WaX	35

Taulukko 6. GOED-menetelmän toistettavuus, kolonni J/W 122-7032E DB-WaX	35
Taulukko 7. Kolonnin vaikutus tulostasoon, GOED-menetelmä.	36
Taulukko 8. IUPAC-menetelmällä rypsiöljystä saadut tulokset.	36
Taulukko 9. Bannon et al.-menetelmällä rypsiöljystä saadut tulokset.	38
Taulukko 10. GOED-menetelmällä rypsiöljystä saadut tulokset.	38
Taulukko 11. Marine oil 2 ja 3 tulokset, GOED-menetelmä, kolonni Varian CP-Sil 88.	41
Taulukko 12. Marine oil 4 tulokset, GOED-menetelmä, kolonni Varian CP-Sil 88.	45
Taulukko 13. Marine oil 5 tulokset, GOED-menetelmä, kolonni Varian CP-Sil 88.	46
Taulukko 14. Marine oil 6 tulokset, GOED-menetelmä, kolonni Varian CP-Sil 88.	47
Taulukko 15. FAPAS T14100QC tulokset, GOED-menetelmä.	49
Taulukko 16. FAPAS T14104QC tulokset, GOED-menetelmä.	50

## SANASTO

Lyhenne	Lyhenteen selitys
AA	Arakidonihappo (20:4 n-6)
ALA	Alfalinoleenihappo (18:3 n-3)
AOCS	American Oil Chemists' Society
DGLA	Dihomogammalinoleenihappo (20:3 n-6)
DHA	Dokosaheksaeenihappo (22:6 n-3)
EFSA	European Food and Safety Authority
EPA	Eikosapentaeenihappo (20:5 n-3)
E %	Osuus %:na kokonaisenergiasta
FA	Fatty acid, rasvahappo
FAPAS	Food Analysis Performance Assessment Scheme
FERA	Food and Environment Research Agency
FID	Flame Ionization Detector, liekki-ionisaatiodekettori
GOED	Global Organization for EPA and DHA Omega-3
IUPAC	International Union Of Pure and Applied chemistry
LA	Linolihappo (18:2 n-6)
MUFA	Monounsaturated fatty acid, kertatydyttymätön rasvahappo
NNR	Nordic Nutrition Recommendations
PUFA	Polyunsaturated fatty acid, monitydyttymätön rasvahappo
RH	Rasvahappo
SAFA	Saturated fatty acid, tyydyttynyt rasvahappo

# 1 JOHDANTO

Ravinnosta saatavan rasvan laatuun kiinnitetään nykyään entistä enemmän huomiota. Hyvälaatuisen rasvan yhteys terveyteen on jo pitkään ollut tiedossa. Mitä enemmän rasvan ja rasvahappojen vaikutuksista elimistössä tiedetään sitä paremmin voidaan määrittää ravitsemussuositukset.

Suomessa noudatetaan Nordic Nutrition Recommendations (NNR) mukaisia ravitsemussuosituksia. Tällä hetkellä voimassa oleva versio on NNR4, joka on julkaistu vuonna 2004. Uusi versio NNR5 julkaistaan kuitenkin jo tänä vuonna 2012, ja tämän työn ravitsemussuositukset pohjautuvat tähän uuteen versioon (1).

Ravinnosta saatavan rasvan laatua voidaan tutkia erilaisin kemiallisin menetelmin kuten määrittämällä rasvahappokoostumus, rasvan hapettumisaste, vapaiden rasvahappojen määrä, kosteus, maku ja haju. Tässä työssä keskityttiin rasvan sisältämien rasvahappojen määrittämiseen kaasukromatografisesti.

Rasvahappoja voidaan määrittää kvalitatiivisesti, jolloin saadaan tietoa rasvan sisältämien rasvahappojen laadusta tai kvantitatiivisesti, jolloin saadaan tietää myös eri rasvahappojen määrä näytteessä. Tämän työn tarkoituksena oli selvittää kolmen eri rasvahappoanalyysimenetelmän soveltuvuutta kvantitatiiviseen rasvahappomääritykseen sekä arvioida laboratorion rasvahappoanalyysin oikeellisuus osallistumalla kansainväliseen vertailututkimukseen.

## 2 RASVAT

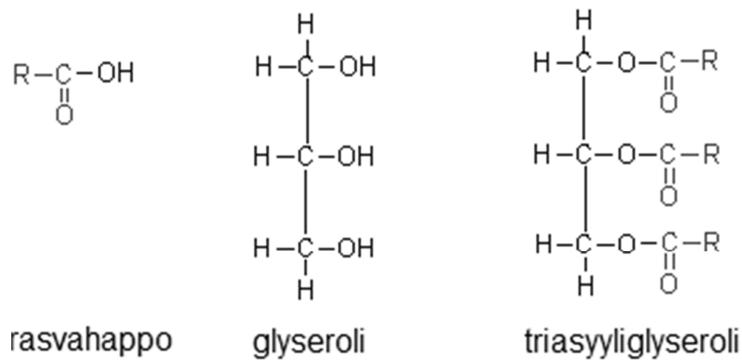
Rasvoiksi luokitellaan laaja kokoelma yhdisteitä, joille ei ole olemassa tarkkaa kansainvälisesti hyväksyttyä standardimääritelmää (4). Erään määritelmän mukaan rasva on biologisesta lähteestä saatava materiaali, joka liukenee orgaaniseen liuottimeen (2).

Rasvat voidaan jakaa kahteen ryhmään niiden fysikaalisten ominaisuuksien perusteella: polaarisiin ja polaarittomiin rasvoihin. Polaariset rasvat reagoivat veden kanssa ja voivat muodostaa vesipitoisen faasin. Polaarittomat eivät muodosta vesipitoista faasia. (5.)

Tämän lisäksi rasvat voidaan jakaa rakenteensa mukaan erilaisiin ryhmiin, joko vaihtelee lähteestä riippuen. Alla on esitetty yksi tapa jakaa rasvat erilaisiin ryhmiin. Poolittomat rasvat: triasyyliglyserolit, diasyyliglyserolit, sterolit ja pooliset rasvat: monoasyyliglyserolit, fosfolipidit, glykolipidit, sfingolipidit sekä muut rasvat. (5.)

### 2.1 Triasyyliglyserolit

Triasyyliglyserolit tunnetaan myös nimellä triglyceridit. Kasvi- ja eläinperäiset öljyt ja rasvat kuuluvat lähes pääsääntöisesti triasyyliglyseroleihin. Triasyyliglyserolit koostuvat glyserolirungosta, jonka kaikki kolme hydroksyyli ryhmää ovat sitoutuneet esterisidoksella rasvahappoon. (4.) Esimerkki triasyyliglyserolimolekyylistä on esitetty kuvassa 1.

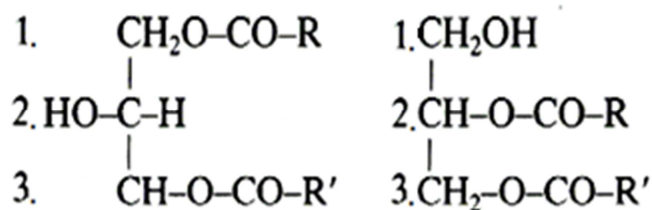


Kuva 1. Triasyyliglyseroli ja sen rakenneosat. Kuvassa R tarkoittaa hiilivetyketjua.

Glyseroliosaan liittyneet rasvahapot voivat olla joko tyydyttyneitä, kerta- tai monitydyttymättömiä ja niiden välinen suhde määrää rasvan olomuodon (3).

## 2.2 Diasyyliglyserolit

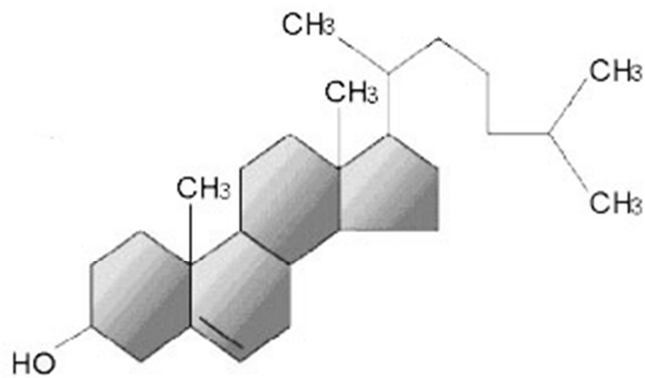
Diasyyliglyseroli muodostuu kahdesta rasvahaposta, jotka voivat olla eri tavoin liittyneet glyserolirunkoon. Sama diasyyliglyseroli voi esiintyä kahtena eri isomeerinä riippuen rasvahappojen sitoutumisesta glyserolirunkoon 1,3-, tai 2,3-asetelmaan. Asyyliiryhmän siirtyminen tapahtuu luonnossa helposti, joten yhdisteen seos sisältää yleensä yhtä suuren määrän kahta eri isomeeriä. (4)(5.) Esimerkki triasyyliglyserolin isomeriasta esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Diasyyliglyseroli.

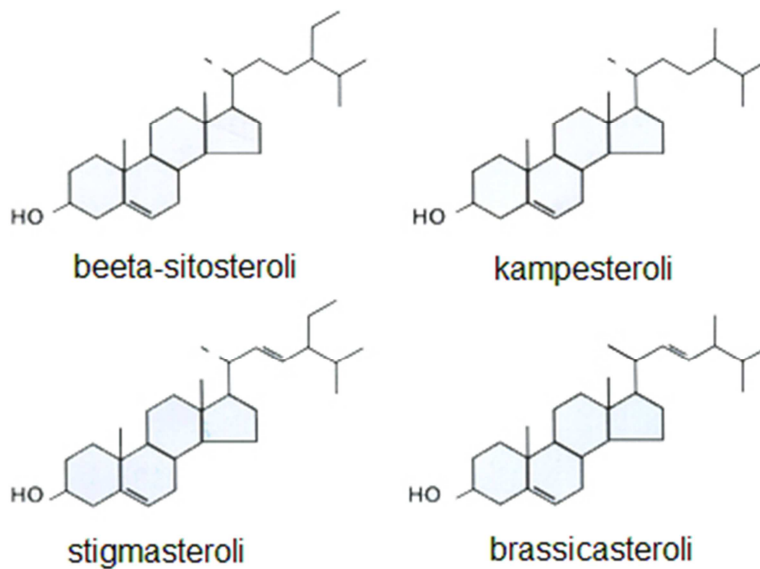
Luonnossa eläin- ja kasvisoluissa diasyyliglyserolia esiintyy vain pieniä määriä. Diasyyliglyseroleilla on kuitenkin tärkeä rooli triasyyliglyserolien ja muiden rasvojen välivaiheena sekä solun viestinnässä. (4.)





Kuva 4. Kolesteroli.

Elimistössä muodostuu luontaisesti kolesterolia. Ruokavaliassa kolesterolia saadaan ainoastaan eläinkunnan tuotteista. (3.) Kolesteroli on elimistössä tarpeellinen aineosa solukalvon muodostuksessa (5). Kasvikunnan tuotteet sisältävät kasvisteroleita ja –stanoleita (3), jotka muistuttavat rakenteeltaan läheisesti kolesterolia (5). Kasvisterolien ja –stanolien on todistettu alentavan veren kolesterolipitoisuutta ja vähentävän sepelvaltimotaudinriskiä (6). Esimerkkejä erilaisista kasvisteroleista on esitetty kuvassa 5.

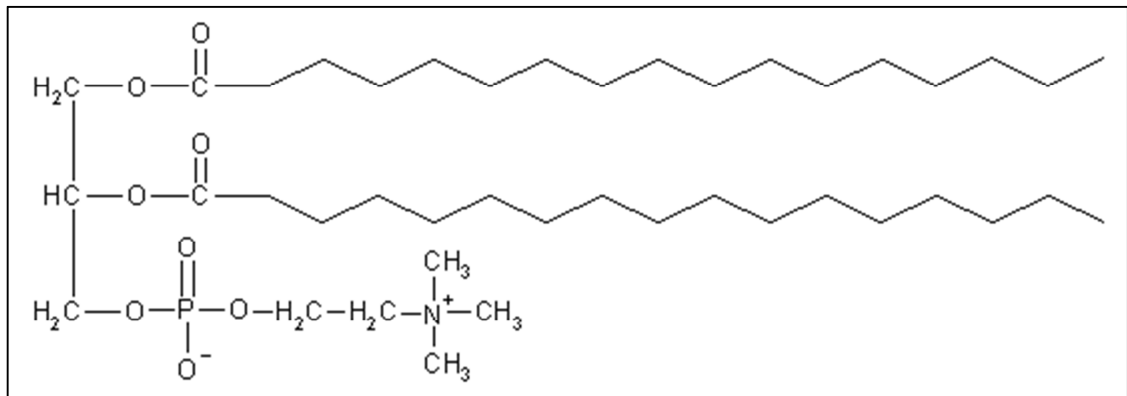


Kuva 5. Kasvisteroleita.

## 2.5 Fosfolipidit

Fosfolipidin rakenne muistuttaa triasyyliglyserolin rakennetta, mutta erona triasyyliglykoliin yhteen glyserolirungon hydroksyyli-ryhmistä on sitoutunut fosfaattiryhmä rasvahapon sijaan. Fosfolipidi muodostuu hydrofobisesta rasvahapposasta ja hydrofiilisestä fosfaatti-osasta. Tähän vesi- ja rasvaliukoisen kerroksen muodustukseen perustuu fosfolipidien toiminta elimistössä solukalvon rakennusaineina. (5.)

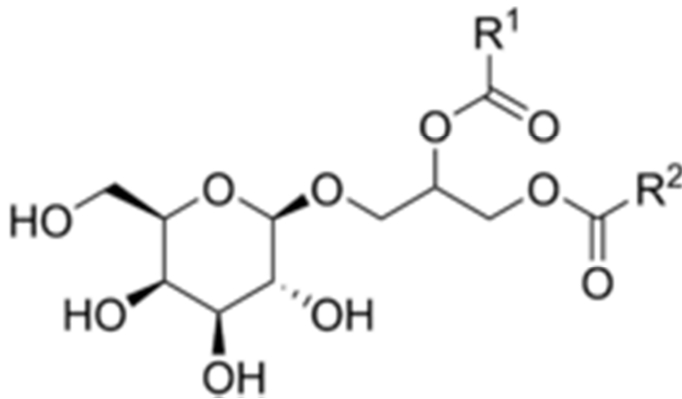
Yleisin luonnossa esiintyvä fosfolipidi on lesitiini (4). Esimerkki fosfolipidin rakenteesta on esitetty kuvassa 6.



Kuva 6: Fosfolipidi lesitiini.

## 2.6 Glykolipidit

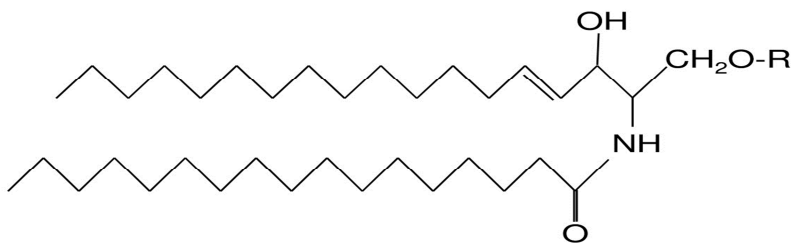
Glykolipideissä yhteen tai useampaan glyserolirungon hiilistä on kiinnittynyt hiilihydraatti, yleisimmin yksi tai kaksi hiilihydraattia, rasvahapon sijaan. Galaktolipideissä glyserolirunkoon liittynyt hiilihydraatti on galaktoosi. (4.) Galaktolipidejä esiintyy enimmäkseen kasvin soluissa, joissa myös fotosynteesi tapahtuu. Siten niillä on luonnossa tärkeä rooli ja ne ovat myös yleisimmin luonnossa esiintyviä rasvoja. (5.) Esimerkki glykolipidin rakenteesta on esitetty kuvassa 7.



Kuva 7. Galaktolipidi.

## 2.7 Sfingolipidit

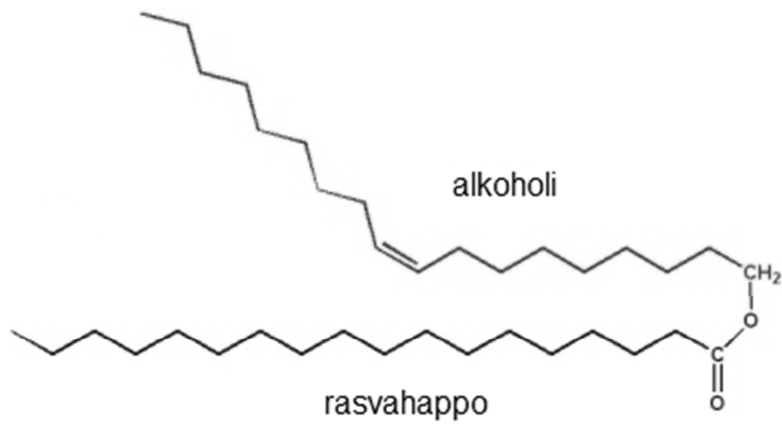
Sfingolipideissä alkoholina toimii glyserolin sijaan pitkäketjuinen amiini, kuten sfingosini, johon rasvahappo voi liittyä amidi-sidoksen avulla muodostaen keramidin. (5.) Sfingolipidin vapaaseen hydroksyyli-ryhmään voi liittyä vielä fosfaatti-ryhmä tai hiilihyaatti (4). Esimerkki sfingolipidin rakenteesta esitetty kuvassa 8.



Kuva 8. Sfingolipidi.

## 2.8 Muut rasvat

Rasvoin luetaan mukaan kuuluviksi myös vahat, jotka yleisimmin ovat suhteellisen samanpituisen pitkäketjuisen rasvahapon ja alkoholin esteri (4). Esimerkki vahan rakenteesta esitetty kuvassa 9.



Kuva 9. Vaha.

Myös rasvaliukoiset vitamiinit A, D, E ja K katsotaan kuuluvan rasvoihin. Tämä määritelmä perustuu rasvaliukoisten vitamiinien liukoisuuteen triasyyliglyseroleihin ja fosfolipideihin. (5.)

### 3 RASVAHAPOT

Rasvahappojen ajatellaan olevan rasvojen päärakennusaineita (4) ja ne muodostavat rasvojen hydrofobisen osa (5). Rasvahapot jaotellaan hiiliketjun pituuden mukaan, lyhyet rasvahapot sisältävät 2-4 hiiliatomia, keskipitkät rasvahapot 6-10 hiiliatomia ja pitkät rasvahapot 12-26 hiiliatomia (3).

Rasvahapot jaetaan rakenteensa mukaan lisäksi tyydyttyneisiin ja tyydyttymättömiin rasvahappoihin (3). Tyydyttyneiden rasvahappojen (SAFA) hiiliketju on pääasiassa haaroittumaton ja siinä ei ole kaksoissidoksia. Tyydyttyneen rasvahapon sulamispiste on korkeampi kuin vastaavan hiiliketjun pituuden omaavalla tyydyttymättömällä rasvahapolla. Kaksoissidoksen lisääminen rasvahapon hiiliketjuun alentaa sulamispistettä. (5.)

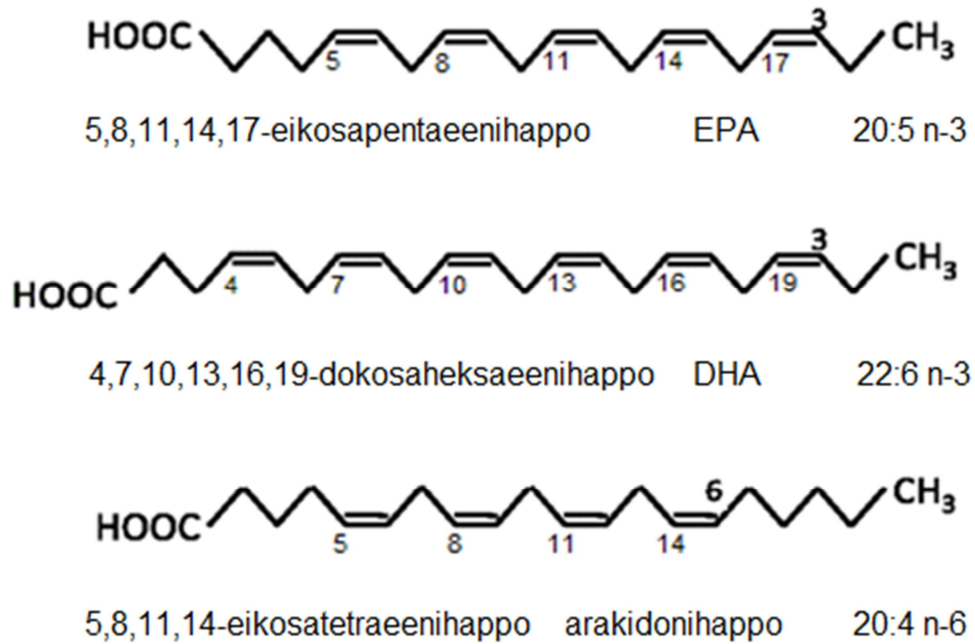
Kertatyydyttymättömissä rasvahapoissa (MUFA) on yksi kaksoissidos ja monityydyttymättömässä rasvahapossa (PUFA) kaksoissidoksia on kaksi tai enemmän (2). Kaksoissidosten määrä, sijainti ja konfiguraatio määrittelevät rasvahapon fysikaaliset ominaisuudet. Rasvahapon *cis*-isomeerillä on *trans*-isomeeriä alhaisempi sulamispiste, riippumatta kaksoissidoksen sijainnista hiiliketjussa. Kaksoissidoksen sijainti parittomassa hiilessä parillisen sijaan, sekä mahdollisimman keskeinen sijainti hiiliketjussa alentavat sulamispistettä entisestään. (5.)

#### 3.1 Rasvahappojen nimeäminen

Rasvahapot voidaan nimetä kolmella eri tavalla. On olemassa rasvahapon triviaalinimi esim. öljyhappo, IUPAC:n määrittelemä systemaattinen nimi tässä tapauksessa oktadekeenihappo ja lyhenne 18:1. Lyhenteen alku kertoo hiiliatomien lukumäärän hiiliketjussa ja kaksoispisteen jälkeinen numero kaksoissidosten määrän hiilivetyketjussa. (2.)

Tyydyttymättömät rasvahapot voidaan lisäksi nimetä delta- ja omega-systeemin mukaisesti. Delta-systeemissä numeroiminen aloitetaan hiilirungon karboksyyli-ryhmän hiilestä ja omega-systeemissä metyyli-ryhmän hiilestä. (9.) Delta-systeemin numerointi voidaan laittaa rasvahapon systemaattisen nimen eteen.

Näin edellisen kappaleen esimerkin kohdalla rasvahapon nimi olisi 9-oktadekeenihappo. Omega-systeemin numerointi taas merkitään usein lyhenteen perään kuten 18:1 n-9. (2.) Kuvassa 10 on esitetty nimeämisesimerkkejä muutamista rasvahapoista.



Kuva 10. Rasvahappojen nimeäminen.

Taulukossa 1 on lueteltu yleisimmät kasvi- ja eläinperäiset rasvahapot, niiden systemaattinen ja triviaalinimi sekä lyhenne.

Taulukko 1. Yleisimmät kasvi- ja eläinperäiset rasvahapot (7)(8).

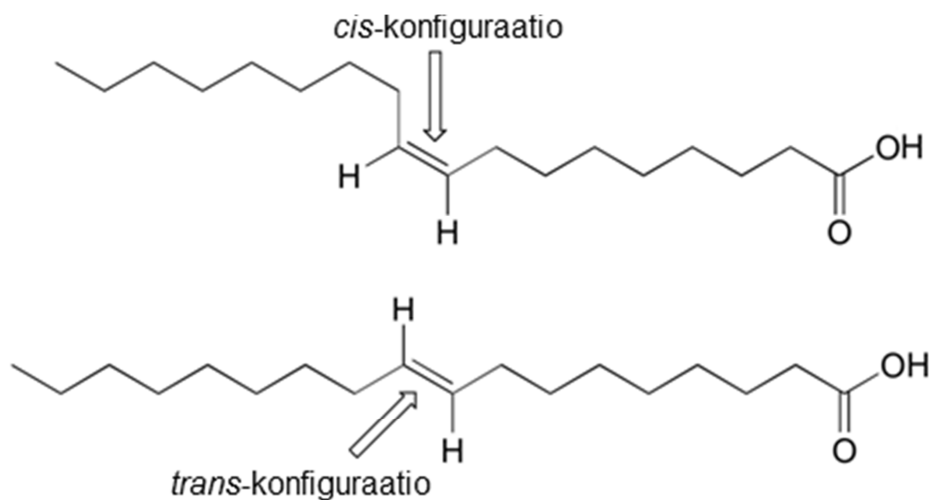
Systemaattinen nimi:	Triviaalinimi:	lyhenne:
<i>Tyydyttyneet rasvahapot</i>		
dekaanihappo	kapriinihappo	10:0
dodekaanihappo	lauriinihappo	12:0
tetradekaanihappo	myristiinihappo	14:0
heksadekaanihappo	palmitiinihappo	16:0
oktadekaanihappo	steariinihappo	18:0
eikosaanihappo	arakidiinihappo	20:0
dokosaanihappo	beheeni happo	22:0
tetrakosaanihappo	lignoseriinihappo	24:0
<i>Kertatyydyttymättömät rasvahapot*</i>		
9-heksadekeeni happo	palmitoleiinihappo	16:1 n-7
9-oktadekeeni happo	öljyhappo	18:1 n-9
11-oktadekeeni happo	vakseenihappo	18:1 n-7
11-eikoseeni happo	gadoleiinihappo	20:1 n-9
13-dokoseeni happo	erukahappo	22:1 n-9
15-tetrakoseeni happo	nervonihappo	24:1 n-9
<i>Monityydyttymättömät rasvahapot*</i>		
9,12-oktadekadieeni happo	linoli happo	18:2 n-6
6,9,12-oktadekatrieeni happo	gammalinoleeni happo	18:3 n-6
9,12,15- oktadekatrieeni happo	alfalinoleeni happo	18:3 n-3
11,14-eikosadieeni happo		20:2 n-6
8,11,14-eikosatrieeni happo	DGLA	20:3 n-6
5,8,11-eikosatrieeni happo	meadi n happo	20:3 n-9
5,8,11,14-eikosatetraeeni happo	arakidonihappo	20:4 n-6
5,8,11,14,17-eikosapentaeeeni happo	EPA	20:5 n-3
7,10,13,16,19-dokosapentaeeeni happo		22:5 n-3
4,7,10,13,16-dokosapentaeeeni happo	DPA	22:5 n-6
4,7,10,13,16,19-dokosaheksaeeeni happo	DHA	22:6 n-3

\* kaikki kaksoissidokset ovat *cis*-konfiguraatiossa

### 3.2 *Cis*- ja *trans*-rasvahapot

*Cis*-rasvahapossa kaksoissidoksen hiiliatomien vedyt ovat hiiliketjun samalla puolella. Suurin osa luonnossa esiintyvistä rasvahapoista esiintyy *cis*-muodossa. *Cis*-rasvahapoista voi syntyä *trans*-rasvahappoja esimerkiksi öljyn hydrolyysin yhteydessä. (2.) Tällöin kaksoissidoksen hiileen liittyvistä vetyatomeista toinen siirtyy eri puolelle hiiliketjua (3).

*Trans*-rasvahapon vaikutukset elimistössä esimerkiksi rasva-aineenvaihduntaan ovat samantyyppiset kuin tyydyttyneessä muodossa olevan rasvahapon (3). *Trans*-rasvahappoja esiintyy luonnossa pieniä määriä mm. maidossa ja lehmän pötsissä (2). Kuvassa 11 on esimerkki rasvahapon *cis*- ja *trans*-muodoista.



Kuva 11. Rasvahapon *cis*- ja *trans*-konfiguraatio.

### 3.3 Rasvahapposarjat

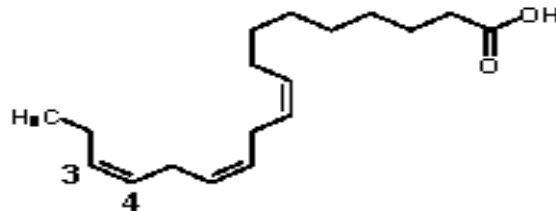
Rasvahapot voidaan jakaa neljään erilaiseen tyydyttymättömien rasvahappojen sarjaan. Rasvahapot on eroteltu sarjoihin omega-systeemin määritelmän mukaan metyyliiryhmästä laskettaessa ensimmäisen kaksoissidoksen sijainnin perusteella. (2.) Taulukossa 2 on esitetty erilaiset rasvahapposarjat ja ensimmäisen kaksoissidoksen sijainti (3).

Taulukko 2. Erilaiset rasvahapposarjat (3).

SarjaEnsimmäisen kaksoissidoksen paikka

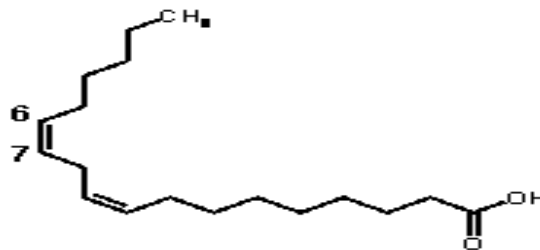
n-3 eli omega-3

3.-4. hiilen välissä esim. alfa-linoleenihappo (18:3 n-3)



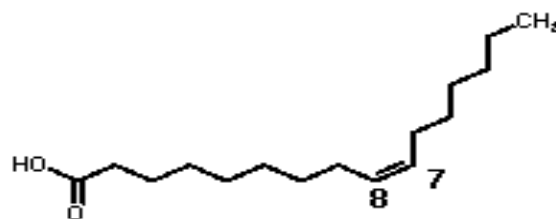
n-6 eli omega-6

6.-7. hiilen välissä esim. linolihappo (18:2 n-6)



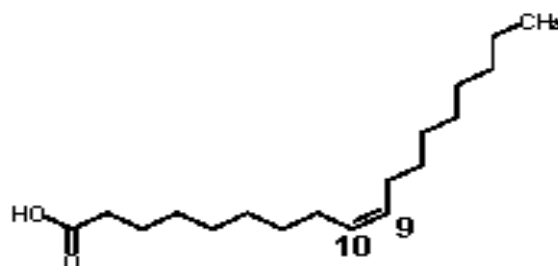
n-7 eli omega-7

7.-8. hiilen välissä esim. palmitoleiinihappo (16:1 n-7)



n-9 eli omega-9

9.-10. hiilen välissä esim. öljyhappo (18:1 n-9)



### 3.4 Välttämättömät rasvahapot

Välttämättömiksi rasvahapoiksi kutsutaan niitä rasvahappoja, joita elimistö tarvitsee, mutta joita ihmisen elimistö ei tuota, jolloin ne on saatava ravinnosta (10). Näitä välttämättömiä rasvahappoja ovat linolihappo 18:2 n-6 ja alfa-linoleenihappo 18:3 n-3. Hyviä välttämättömien rasvahappojen lähteitä ovat kasviöljyt. (3.)

Elimistö pystyy helposti muuttamaan linolihapon n-6-sarjan pitkäketjuiseksi arakidonihapoksi 20:4 n-6, mutta vastaavasti alfa-linoleenihapon muuttuminen n-3-sarjan pitkäketjuiseksi eikosapentaeenihapoksi (EPA) 20:5 n-3 ja dokosaheksaeenihapoksi (DHA) 22:6 n-3 on vähäistä. Tämän vuoksi myös n-3-sarjan pitkäketjuisia rasvahappoja pidetään välttämättöminä rasvahappoina. Hyviä EPA:n ja DHA:n ravintolähteitä ovat kalaöljyt ja rasvaiset kalat kuten makrilli sekä lohi. (10.)

### 3.5 Ravinnon rasvahapot

Nykyisten ravitsemussuositusten mukaan ravinnon suositellaan sisältävän maksimissaan noin 10 E% (eli 10% ravinnon sisältämästä kokonaisenergiasta) tyydyttyneitä tai *trans*-rasvahappoja, kuitenkin mahdollisimman vähän *trans*-rasvahappoja. Tämän lisäksi tyydyttyneiden ja *trans*-rasvahappojen osuus kokonaisrasvasta ei saisi ylittää 1/3-osaa. (1.)

Lisäksi on suositeltavaa, että rasva sisältäisi ainakin 10-20 E% *cis*-kertatyydyttymättömiä rasvahappoja ja 5-10 E% *cis*-monityydyttymättömiä rasvahappoja. Kokonaisuudessaan rasvan osuus kokonaisenergiasta suositellaan olevan 25-35 E%. (1.)

Ravinnossa esiintyy pääasiassa noin 20 erilaista rasvahappoa, vaikka rasvahappoja onkin olemassa yli tuhat (3). Ravinnosta saatavista rasvahapoista yli 95 % on pitkäketjuisia rasvahappoja (11). Ravinnosta saatavien n-6- ja n-3-sarjan rasvahappojen välinen suhde on myös tärkeä. (3.)

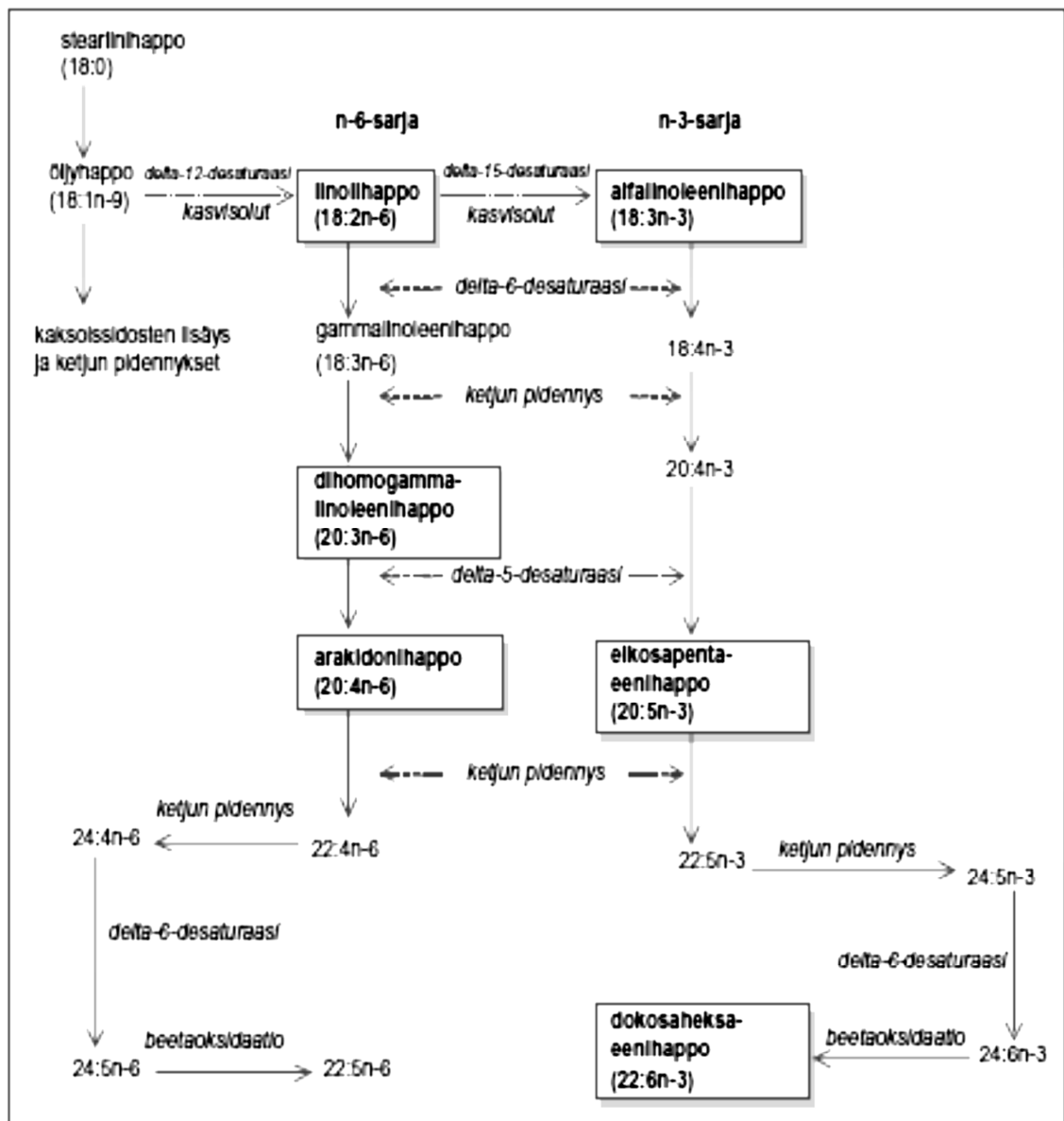
Välttämättömien rasvahappojen puute elimistössä on havaittavissa kudosten rasvahappopitoisuuksien muutoksina. Tietyn rasvahapon puutostila vähentää myös kudosten rasvahapon ja sen pitkäketjuisten johdannaisten pitoisuuksia. Molempien välttämättömien rasvahappojen puute elimistössä voidaan havaita eikosatrieenihapon 20:3 n-9 pitoisuuden nousuna kudoksessa. Liitteessä 1 on esitetty laajemmin eri ruoka-aineiden rasvahappokoostumuksia. (3.)

### 3.6 Rasvahappojen metabolia

Elimistö pystyy lisäämään rasvahapon hiiliketjuun kaksoissidoksia desaturaatio-reaktion avulla. Elimistöstä luontaisesti löytyvät desaturaasientsyymit katalysoivat kaksoissidoksen muodostusta rasvahapon hiiliketjun 9. tai 7. hiileen metyyliipäästä lukien. Elimistö ei tuota luonnostaan välttämättömien rasvahappojen muodostukseen tarvittavia desaturaasientsyymejä, joten kaksoissidoksen lisääminen rasvahapon hiiliketjun 3. tai 6. hiileen metyyliipäästä lukien ei ole mahdollista. (3.)

Luonnossa välttämättömien rasvahappojen muodostusta katalysoivia entsyymejä löytyy kasvisoluissa. Elimistö pystyy muodostamaan välttämättömistä rasvahapoista saman sarjan rasvahappoja pidentämällä hiiliketjua tai lisäämällä hiiliketjuun kaksoissidoksia. (3.)

N-6- ja n-3-sarjan pitkäketjuisten rasvahappojen muodostus tapahtuu elimistössä samojen entsyymien avulla. Siten linolihapon määrä elimistössä suhteessa alfa-linoleenihapon määrään vaikuttaa myös rasvahappojen pitkäketjuisen johdannaisten muodostumiseen. Jos elimistössä on suhteessa n-3-sarjan alfa-linoleenihappoon runsaasti n-6-sarjan linolihappoa saattaa pitkäketjuisten n-3-sarjan rasvahappojen muodostus jopa estyä. Kuvassa 12 on kuvattu tarkemmin välttämättömien rasvahappojen aineenvaihduntaa. (3.)



Kuva 12. Välttämättömien rasvahappojen aineenvaihdunta (3).

### 3.7 Välttämättömien rasvahappojen tehtävät

Linolihappo toimii elimistössä lähtöaineena lipideille, jotka muodostavat ihon vettä läpäisemättömän suojakerroksen sekä pitkäketjuisten n-6-sarjan rasvahappojen muodostukselle. Alfa-linoleenihappo toimii elimistössä pitkäketjuisten n-3-sarjan rasvahappojen lähtöaineena. Pitkäketjuiset n-6- ja n-3-sarjan rasvahapot toimivat eikosanoidien lähtöaineena sekä solukalvon fosfolipidien rakennusaineena. (3.)

Eikosanoidit ovat paikallisesti vaikuttavia välittäjäaineita, joiden tärkein esiaste elimistössä on 20 hiiltä sisältävä monitydyttymätön arakidonihappo 20:4 n-6, joka saadaan ravinnosta tai syntetisoidaan linolihaposta. Eikosanoidit nimitys johtuu siitä, että ne muodostuvat monitydyttymättömistä eikosa-alkuisista rasvahapoista 8,11,14-eikosatrieenihappo 20:3 n-6, 5,8,11,14-eikosatetraeenihappo 20:4 n-6 ja 5,8,11,14,17-eikosapentaeenihappo 20:5 n-3. (14.)

Eikosanoidit säätelevät monia fysiologisia ja patofysiologisia toimintoja, mm. immuunivastetta, sileän lihaksen tonusta, veren hyytymistä, sisäeritystoimintaa, lisääntymistoimintoja ja synnytystä (13)(14).

Euroopan komission julkaiseman asetuksen n:o 432/2012 mukaan seuraaville rasvahapoille on voimassa terveystväittämät: alfa-linoleenihappo ja linolihappo edistävät veren kolesterolitasojen pysymistä normaalina, dokosaheksaeenihappo (DHA) edistää aivotoiminnan ja näön pysymistä normaalina sekä eikosapentaeenihappo ja dokosaheksaeenihappo (EPA/DHA) edistävät sydämen normaalia toimintaa. Yleisesti tyydyttyneiden rasvojen korvaaminen tyydyttymättömillä rasvoilla ruokavaliossa edistää veren kolesterolitasojen pysymistä normaalina. (27.) Taulukkoon 3 on koottu n-6- ja n-3-sarjan rasvahappojen tehtäviä (3).

Taulukko 3. N-6- ja n-3-rasvahappojen biokemiallisia tehtäviä (3).

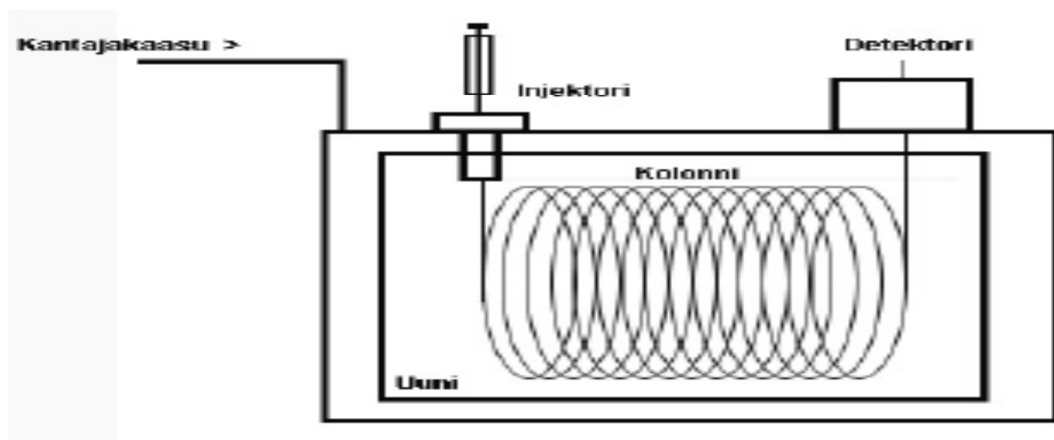
Sarja	Rasvahappo	Symboli	Tehtävä
n-6	Linolihappo (LA)	C18:2 n-6	Lähtöaine lipideille, jotka muodostavat ihon vettä läpäisemättömän suojakerroksen. Pitkäketjuisten n-6-sarjan rasvahappojen lähtöaineena.
	Dihomogammalinoleenihappo (HGGLA)*	C20:3 n-6	Eikosanoidien lähtöaine.
	Arakidonihappo (AA)*	C20:4 n-6	Solukalvon fosfolipidien rakennusaine sekä eikosanoidien lähtöaine. Näkökyky.
n-3	Alfalinoleenihappo (ALA)	C18:3 n-3	Pitkäketjuisten n-3-sarjan rasvahappojen lähtöaine. Mahdollisesti myös muita vaikutuksia.
	Eikosapentaeenihappo (EPA)**	C20:5 n-3	Eikosanoidien lähtöaine. AA:n rakenteellinen analogi ja kilpailija biokemiallisissa reaktioissa.
	Dokosaheksaeenihappo (DHA)**	C22:6 n-3	Solukalvon fosfolipidien rakennusaine erityisesti hermostossa ja verkkokalvolla. Solukalvon fosfolipidien aineenvaihdunta. Muuttaa solukalvon proteiinien rakennetta.

\* elimistö pystyy muodostamaan linolihaposta

\*\* elimistö pystyy muodostamaan alfalinoleenihaposta

## 4 RASVAHAPPOJEN KAASUKROMATOGRAFINEN MÄÄRITYS

Kaasukromatografia on analyysimenetelmä, jolla voidaan erottaa, tunnistaa sekä määrittää kvantitatiivisesti haihtuvia yhdisteitä. Liikkuvana faasina toimii inertti kaasu (helium, vety, typpi), jonka avulla tutkittavat yhdisteet kulkeutuvat kolonnin läpi. Yksinkertaistettu kaasukromatografilaitteisto on esitetty kuvassa 13. (15)(16.)

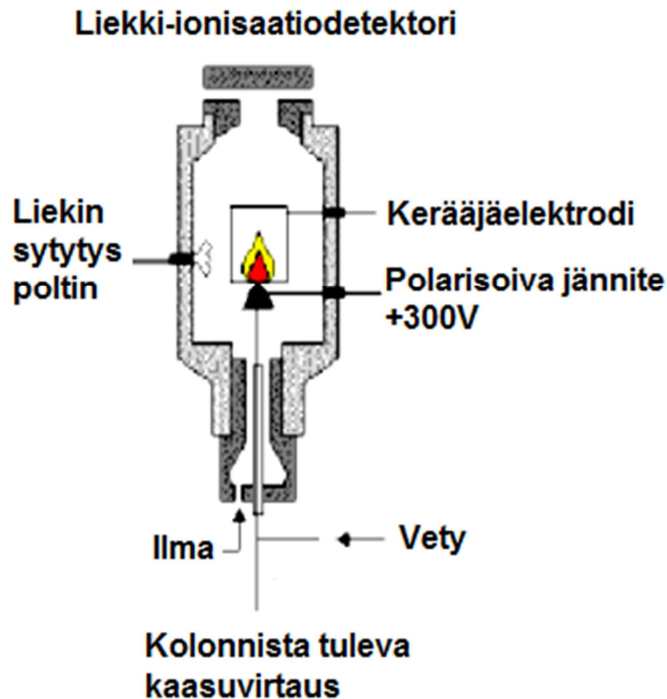


Kuva 13. Kaaviokuva kaasukromatografista.

Kantajakaasu johdetaan injektioporttiin, jonne myös näyte syötetään. Ajo-ohjelma voi isoterminen eli tasalämpöinen tai lämpötilaohjelmoitu. Kantajakaasu kuljettaa näytteen uunissa olevaan kolonniin. Kolonnissa näytedyhdisteiden erilaiset vuorovaikutukset kolonnin stationäärifaasin kanssa aiheuttavat yhdisteiden erottumisen toisistaan. Kolonnista yhdisteet kulkeutuvat detektorille, jossa ne saavat aikaan sähkösignaalin, joka muutetaan käsiteltäväksi kromatogrammiksi. (15)(16.)

Kaasukromatografiassa käytetään poolitonta tai poolista stationäärifaasia riippuen käyttötarkoituksesta. Stationäärifaasit ovat yleisimmin tehty nestemäisistä polymeereistä, jolloin niillä on hyvän lämpötilan sietokyky ja stabiilisuus. Stationäärifaasia valittaessa pitää ottaa huomioon analyytin ja stationäärifaasin kemiallinen luonne. (15)(16.)

Kaasukromatografiassa yleisimmin käytetty detektori on liekki-ionisaatiotektori (FID), joka soveltuu detektoriksi useammille orgaanisille yhdisteille. FID:in rakenne on esitetty kuvassa 14.



Kuva 14. Liekki-ionisaatiotektoriä kaaviokuva (15).

Kolonnista tulevaan kaasuvirtaukseen lisätään vety-ilma-seos mikä ylläpitää jatkuvaa liekkiä. Useimmat orgaaniset yhdisteet ionisoituvat liekissä, hiiliatomit tuottavat  $\text{CH}_4$  -radikaaleja, jotka vuorostaan tuottavat  $\text{CHO}^+$  -ioneja. Liekin ja kollektorielektrodin välille muodostuu orgaanisen yhdisteen määrästä riippuva virta, joka mitataan. (17.)

#### 4.1 Rasvahappojen erottaminen kaasukromatografisesti

Rasvahappojen määrittämiseksi kaasukromatografisesti rasvahapot yleensä muutetaan metyyliesterimuotoon, jotta ne saadaan haihtuvaan muotoon ja kaasukromatografinen analyysi onnistuu (18). Metyyliesterit erottuvat poolisella kolonnilla hiiliatomien ja kaksoissidosten lukumäärän sekä sijainnin perusteella. Paljon erilaisia rasvahappoja sisältävien näytteiden analyysissä rasvahapot

saattavat eluoitua samanaikaisesti, mikä tekee tällaisten näytteiden rasvahappoanalyysin haastavaksi.

#### 4.2 Rasvahappojen tunnistus

Yksittäiset rasvahapot voidaan tunnistaa kohtuullisen hyvin niiden retentioaikojen perusteella. Toisaalta on otettava huomioon, että GC-analyysi antaa vain alustavan tuloksen rasvahappokoostumuksesta ja tuntematonta näytettä käsiteltäessä pitää rasvahappokoostumus varmistaa myös yksiselitteisellä kemialliseen hajoitukseen tai spektroskopiaan perustuvalla menetelmällä. (4.)

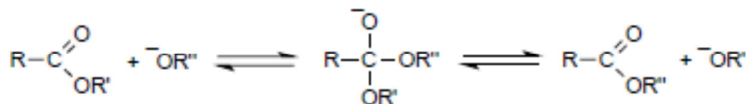
Rasvahappoja analysoitaessa voidaan huomata tietyille näytteille ominainen rasvahappoprofiili ja jos näytteen rasvahappokoostumus on ennestään tuttu, ei rasvahappojen tunnistuksessa ole ongelmia. Ongelma syntyy tunnistettaessa monimutkaisempia rasvahaponäytteitä, joiden sisältämiä pienempiä piikkejä ei enää voidakaan tunnistaa pelkän retentioajan perusteella. Tällöin tunnistuksissa pitää käyttää apuna lisäksi muita menetelmiä. (4.)

Rasvahappojen metyyliestereiden tunnistamista varten on laadittu retentioaika-  
taulukkoja eri kolonneille ja on olemassa erilaisia useita rasvahappoja sisältäviä standardeja. Mikäli kromatografisessa määrittämisessä halutaan erottaa myös tyydyttymättömien rasvahappojen *cis*- ja *trans*- isomeerit toisistaan tulee kolonnin olla hyvin poolinen.

## 5 KOKEELLINEN OSUUS

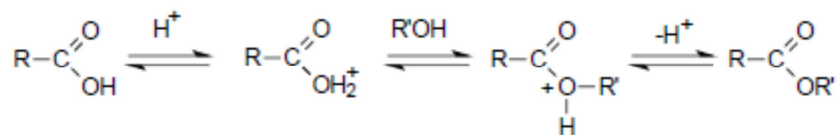
Öljystä tehtävää rasvahappoanalyysia varten rasvahapot on ensin vapautettava esterimuodostaan ja muutettava metyyliestereiksi. Alkalinen vaihtoesteröinti on nopein tapa valmistaa rasvahappojen metyyliestereitä, mutta vapaat rasvahapot ja muutamat rasvahappojohdokset eivät metyloidu tällä tavoin. (18.)

Alkalisessa vaihtoesteröinnissä esteri muodostaa alkalisissa olosuhteissa anionisen välimuodon, joka metyloituu uudelleen alkoholin kanssa muodostaen uuden esterin (19). Kuvassa 13 esitetty alkalisen vaihtoesteröinnin kemiallinen reaktio.



Kuva 13. Alkalinen vaihtoesteröinti.

Hapon katalysoima metylointi soveltuu vapaille rasvahapoille ja monimutkaisemmille rasvahappojohdoksille vaihtoesteröintiä paremmin, mutta vaatii että rasva on ensin hydrolysoitu eli rasvahapot on vapautettu johdoksistaan. Tämän jälkeen rasvahappo muodostaa happamissa olosuhteissa esterin alkoholin kanssa. Yleisin metylointireagenssi on  $\text{BF}_3$ -metanoliliuos, joka toimii happokatalyyttinä. (18.) Kuvassa 14 on esitetty hapon katalysoima esteröintireaktio.



Kuva 14. Hapon katalysoima esteröintireaktio.

Kokeellisessa osuudessa käytetyt kolme eri menetelmää, IUPAC 2.301 Preparation of the fatty acid methyl esters, Bannon et al. (1982) Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability ja GOED Voluntary Monograph

v3. perustuvat standardimenetelmiin, jotka ovat yleisesti saatavilla. Menetelmissä käytettiin sisäisenä standardina rasvahappojen 21:0 ja 23:0 metyyliestereitä.

Sisäinen standardiliuos valmistetaan punnitsemalla noin 100 mg rasvahapon metyyliesteriä 25 ml mittapulloon, standardi liuotetaan iso-oktaaniin ja mittapullo laitetaan 15 minuutiksi ulträänihauteeseen. Hauteesta poistamisen jälkeen mittapullon annetaan jäähtyä huoneenlämpöön vähintään tunnin. Tämän jälkeen mittapullo täytetään merkkiin iso-oktaaniliuoksella (sisältäen antioksidanttina 0,05 g/l butyylihydroksitolueenia).

Rasvahapon metyyliesterin puhtaus määritetään punnitsemalla standardia n. 5 mg näytepulloon ja liuottamalla 300 µl iso-oktaania. Kromatografisesta ajosta saatua standardipiikin pinta-alaa prosentteina kaikkien piikkien pinta-alasta käytetään laskukaavassa puhtausprosenttina rasvahappojen kvantitatiivista määrää laskettaessa.

### 5.1 IUPAC -menetelmä

IUPAC 2.301 Preparation of the fatty acid methyl esters -menetelmä perustuu hydrolysoidun rasvan rasvahappojen metylointiin happokatalyytilla. Menetelmä soveltuu eläin- ja kasvirasvoille, joiden rasvahappojen hiililuku on enemmän kuin kuusi. Menetelmä soveltuu myös vapaita rasvahappoja sisältäville näytteille, mutta ei sovellu näytteille, jotka sisältävät konjugoituneita monityydyttymättömiä yhdisteitä tai vahoja. (21.)

Menetelmässä punnitaan noin 50 mg rasvanäytettä keittopulloon, jonka jälkeen pipetoidaan 500 µl sisäistä standardia ja lisätään 4 ml 0,5 M natriumhydroksidimetanoliliuosta sekä kiehumakiviä. Näytettä keitetään pystyjäähdyttäjän alla vesihauhteella kunnes rasvapisarat ovat hävinneet, yleensä 10-30 minuuttia. Keittopulloon lisätään 5 ml 20% (w/w) booritrifluoridimetanoli -liuosta jäähdyttäjän kautta, jatketaan keittämistä vielä 1 minuutti, jonka jälkeen lisätään jäähdyttäjän kautta keittopulloon heptaania 5 ml ja jatketaan keittämistä vielä 1 minuutti.

Keittopullo nostetaan hauteesta ja annetaan jäähtyä ennen poistamista jäähdyttäjistä. Lisätään keittopulloon pieni määrä kylläistä natriumkloridiliuosta ja sekoitetaan. Nestepinta nostetaan kylläisellä natriumkloridiliuksella pullon kaulaan asti ja annetaan faasien erottua. Siirretään 1 ml ylempää heptaanifaasia koeputkeen, jossa on kidevedetöntä natriumsulfaattia näytteen kuivaamiseksi. Näyte laimennetaan tarvittaessa ja se on valmis kaasukromatografiseen määrittämiseen.

### 5.2 Bannonin *et al.* -menetelmä

Bannon *et al.* (1982) Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability -menetelmä perustuu alkaliseen vaihtoesteröintiin ja soveltuu rasvoille ja öljyille, joiden rasvahappojen hiiliketjun pituus on vähintään 4. Menetelmä ei sovellu vapaita rasvahappoja sisältäville näytteille. Rasva tai öljy vaihtoesteröidään natriummetoksidin kanssa, jolloin triasyyliglyserolin esteröityneistä rasvahapoista muodostuu rasvahappojen metyyliestereitä. (22.)

Rasvaa tai öljyä punnitaan 2-3 pisaraa, noin 50 mg, 25 ml koeputkeen ja lisätään pipetoimalla 500 µl sisäistä standardia. Näytteeseen lisätään 5 ml 0,25 M natriummetoksidiliuosta ja koeputkea kuumennetaan tiiviisti suljettuna 30 sekuntia lämmitetyllä vesihauteella. Kuumentamisen aikana on varottava lyhytketjuisten rasvahappojen haihtumista.

Välittömästi kuumentamisen jälkeen koeputkeen lisätään 6 ml iso-oktaania ja noin 10 ml kylläistä natriumkloridiliuosta. Tämän jälkeen ravistellaan koeputkea, annetaan faasien erottua ja kerätään ylemmästä faasista näyte kaasukromatografista määrittämistä varten.

### 5.3 GOED -menetelmä

GOED voluntary monograph -menetelmä perustuu hydrolysoidun rasvan rasvahappojen metylointiin happokatalyytillä kuten IUPAC:n menetelmä. Menetelmä sopii triasyyliglyseroleja ja etyyliestereitä sisältäville rasvoille. Analyysivaiheet

kannattaa suorittaa yhtäjaksoisesti välttämällä näytteiden turhaa seisottamista, jottei näytteet turhaan altistu valolle ja ilmalle. (23.)

Punnitaan n. 50 mg näytettä, riippuen rasvahappojen määrästä näytteessä, 16x110 mm koeputkeen ja pipetoidaan 500 µl sisäistä standardia.

Tämän jälkeen koeputkeen lisätään 1,5 ml 0,25 M NaOH-metanoliliuosta. Suljetaan kierrekorkki hyvin, sekoitetaan ja siirretään koeputket 7 minuutiksi 65 °C:n ultraäänihauteeseen. Annetaan koeputkien jäähtyä noin 5-10 minuuttia 40-50 °C lämpötilaan ja lisätään 2 ml 20% (w/w) booritrifluoridi-metanoliliuosta, sekoitetaan ja siirretään koeputket 30 minuutiksi 65 °C ultraäänihauteeseen. Tämän jälkeen annetaan putkien taas jäähtyä 5-10 minuuttia 40-50 °C lämpötilaan.

Lisätään koeputkeen 1 ml iso-oktaania, sekoitetaan vähintään 30 sekuntia, lisätään välittömästi perään 5 ml kylläistä natriumkloridiliuosta ja sekoitetaan vähintään 15 sekuntia. Kerrosten erotuttua siirretään ylempi faasi puhtaaseen koeputkeen. Lisätään alkuperäiseen koeputkeen toisen kerran 1 ml iso-oktaania ja kerätään kerrosten erotuttua jälleen ylempi faasi talteen. Tämän jälkeen lisätään talteen otettuun näytteeseen kaksi kertaa 1 ml vettä. Sekoitetaan ja poistetaan alempi vesifaasi. Lopuksi kuivataan iso-oktaanifaasi vedettömällä natriumsulfaatilla ja noin 0,5 ml kuivattua näytettä pipetoidaan näytepulloon ja laimennetaan 1:1 iso-oktaanilla.

Tämän työn kokeellinen osuus aloitettiin esteröimällä rypsiöljyn rasvahapot kolmella eri menetelmällä ja ajamalla näytteet kahdella erilaisella kaasukromatografilla, HP 6890 ja HP 6850. Laitteissa oli kolonneina Varian CP-Sil 88 ja J/W 122-7032E DB-WaX. Detektorina oli FID ja rasvahappojen eluoitumiseksi tasaisesti käytettiin lämpötilagradienttiajtoa.

Kolonnilla Varian CP 7489 CP-Sil 88 50m\*0,250mm\*0,20µm ajo-olosuhteet olivat: alkulämpötila 70 °C, 10min 70-160 °C, 3min 160-190 °C, 10min 190-240 °C ja kolonnilla J/W 122-7032E DB-WaX 30m\*0,250mm\*0,25 µm ajo-olosuhteet: alkulämpötila 70 °C, 20 min 70-175 °C, 5 min 175-205 °C, 8min 205-240 °C.

Kaasukromatografiset ajo-olosuhteet perustuivat AOCS:n menetelmäkokoelman menetelmään AOCS Official method Ce 1c-89. (25.)

Sisäisenä standardina rasvahappoanalyysissä käytettiin ensin rasvahapon 21:0 metyyliesteriä, koska kyseistä standardia oli laboratoriossa olemassa valmiina. Lopuksi käytettiin standardina paremmin kalaöljynäytteille soveltuvaa rasvahapon 23:0 metyyliesteriä.

Kvantitatiiviset tulokset laskettiin alla esitetyn laskukaavan mukaisesti:

Rasvahappo (RH) g/100g= ((STD mg\*STD puhtaus\*100\*RH pinta-ala)/(sample mg\*STD pinta-ala))\*100, jossa STD tarkoittaa sisäistä standardia

Rasvahappopiikkien pinta-aloille käytettiin korjauskertoimia, joissa rasvahapon 18:0 kerroin oli 1.0000(26). Tuloksissa total g/100g sisältää kaikkien piikkien yhteenlasketut g/100g tulokset.

#### 5.4 Rypsiöljy

Työt aloitettiin tekemällä alkutestaus kaikilla kolmella menetelmällä kahdella rinnakkaisella. Tuloksille laskettiin suhteellinen keskihajonta (RSD%). Taulukoissa muuttuja n on rinnakkaisten näytteiden lukumäärä, SAFA-sarake sisältää rasvahappojen 12:0, 14:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0, 22:0 ja 24:0 yhteenlasketun määrän. MUFA-sarake rasvahappojen 12:1, 14:1, 16:1, 17:1, 18:1, 20:1, 22:1 ja 24:1 yhteenlasketun määrän. PUFA-sarake rasvahappojen 18:2, 18:3 ja 20:2 yhteenlasketun määrän. Vertailun tulokset ovat kokonaisuudessaan nähtävissä taulukossa 4.

Taulukko 4. Menetelmien vertailu, sisäinen standardi 21:0 ME, kolonni J/W 122-7032E DB-WaX.

<b>total g/100g</b>	<b>SAFA</b>	<b>MUFA</b>	<b>PUFA</b>	<b>RSD%</b>	<b>n</b>	<b>Menetelmä</b>
<b>97,5</b>	6,8	60,7	30,0	1,0	2	GOED
<b>101,0</b>	7,1	63,0	30,9	0,3	2	IUPAC 2.301
<b>100,2</b>	7,0	62,2	31,0	0,1	2	Bannon <i>et al.</i> (1982)

Tulosten perusteella voidaan nähdä, että niin IUPAC:n kuin Bannonin menetelmät ylittää hieman teoreettisen saannon. GOED -menetelmällä saatu tulos puolestaan alitti laskennallisen saannon.

Tämän jälkeen haluttiin testata GOED:n menetelmän haavoittuvuutta muuttamalla näytteiden ultraäänihauteessa pidettävää aikaa. Ensimmäiset näytteet otettiin hauteesta 10 minuutin kuluttua, toiset 20 minuutin ja kolmannet 30 minuutin kuluttua. Ohjeen mukainen aika on 30 minuuttia. Tarkoituksena oli testata voidaanko analyysi tarvittaessa suorittaa lyhyemmässä ajassa. Taulukossa 5 on esitetty testauksen tulokset.

Taulukko 5. GOED-menetelmän haavoittuvuus, kolonni J/W 122-7032E DB-WaX.

<b>total g/100g</b>	<b>SAFA</b>	<b>MUFA</b>	<b>PUFA</b>	<b>RSD%</b>	<b>n</b>	<b>HUOM!</b>
<b>97,7</b>	6,8	60,8	29,9	1,0	2	10min
<b>96,8</b>	6,8	60,2	29,7	1,3	2	20min
<b>95,4</b>	6,7	59,4	29,3	0,3	2	30min

Tuloksista voidaan todeta ettei merkittävää vaikutusta ole havaittavissa, koska saanto on laskeva. Jos näytteiden ultraäänihauteessa viettämällä ajalla olisi vaikutusta tuloksiin, näkyisi se juuri toiseen suuntaan. Lyhyempi aika hauteessa aiheuttaisi sen, että osa rasvahapoista jäisi metyloitumatta, jolloin tulostasoa olisi alussa alhaisempi.

Seuraavaksi testattiin GOED-menetelmän toistettavuutta useamman rinnakkaisen näytteen sarjana. Tulokset nähtävillä taulukossa 6.

Taulukko 6. GOED-menetelmän toistettavuus, kolonni J/W 122-7032E DB-WaX.

<b>total g/100g</b>	<b>SAFA</b>	<b>MUFA</b>	<b>PUFA</b>	<b>RSD%</b>	<b>n</b>
<b>96,4</b>	6,8	59,8	29,6	1,1	6
<b>94,6</b>	6,7	58,9	29,0	1,6	10
<b>97,6</b>	6,9	60,7	29,9	0,5	5

Total g/100g tuloksissa voidaan nähdä laskeva trendi, joka saattaa johtua näytteiden huonosta säilyvyydestä tai haihtumisen aiheuttamasta vaihtelusta. Suurin vaikutus huomattiin 10 injisoinnin näytesarjassa, jossa rinnakkaisten tulokset laskivat 97-92 g/100g. 10 injisoinnin kaasukromatografiset ajot kestivät yhteensä yli 350 minuuttia, mukaan lukien ajoaika sekä kolonnin välijäähdytykset.

Yksi vaikuttava tekijä saattaa olla myös standardiliuoksen huono säilyvyys, taulukon viimeiset viiden rinnakkaisen tulokset määritettiin uuden standardin testaamiseksi. Standardi liuotetaan iso-oktaaniin, jolloin säilytettäessä huoneen-

lämmössä vetokaapissa iso-oktaanin haihtumista voi tapahtua. Kokeellisen osuuden aikana havaittiin standardiliuoksen säilyvän hyvänä pari päivää.

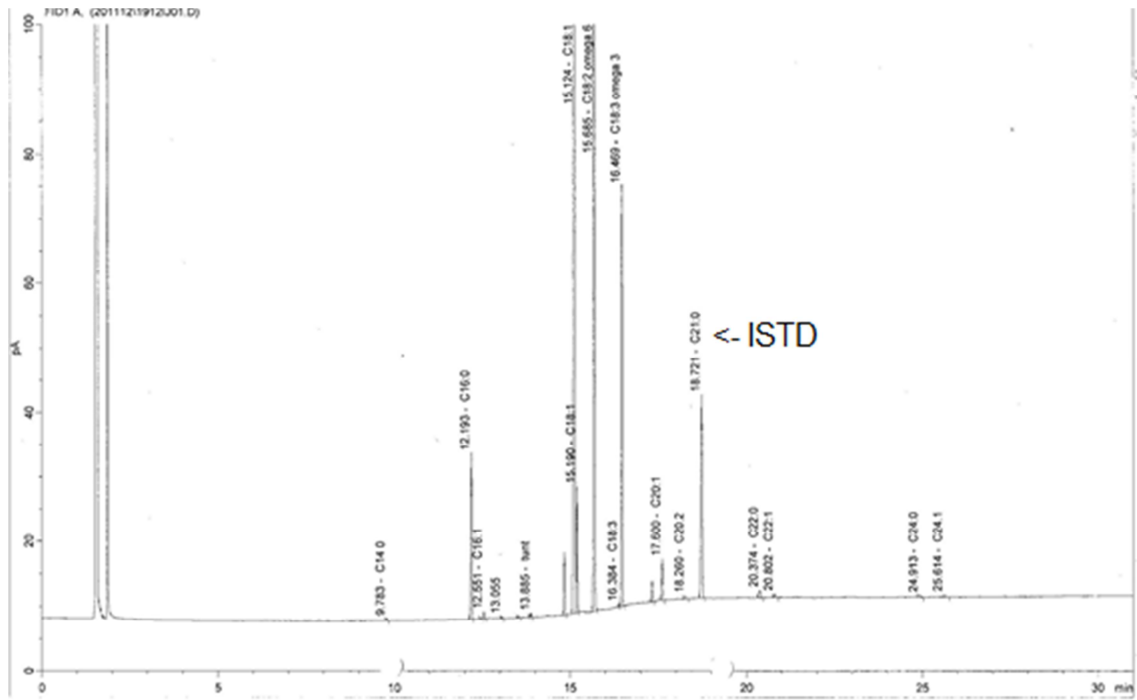
Seuraavaksi aloitettiin testaus kahden eri kolonnin välillä. Samat näytteet ajettiin samanaikaisesti kahdella eri laitteella ja kolonnilla. Testauksen tulokset on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. Kolonnin vaikutus tulostasoon, GOED-menetelmä.

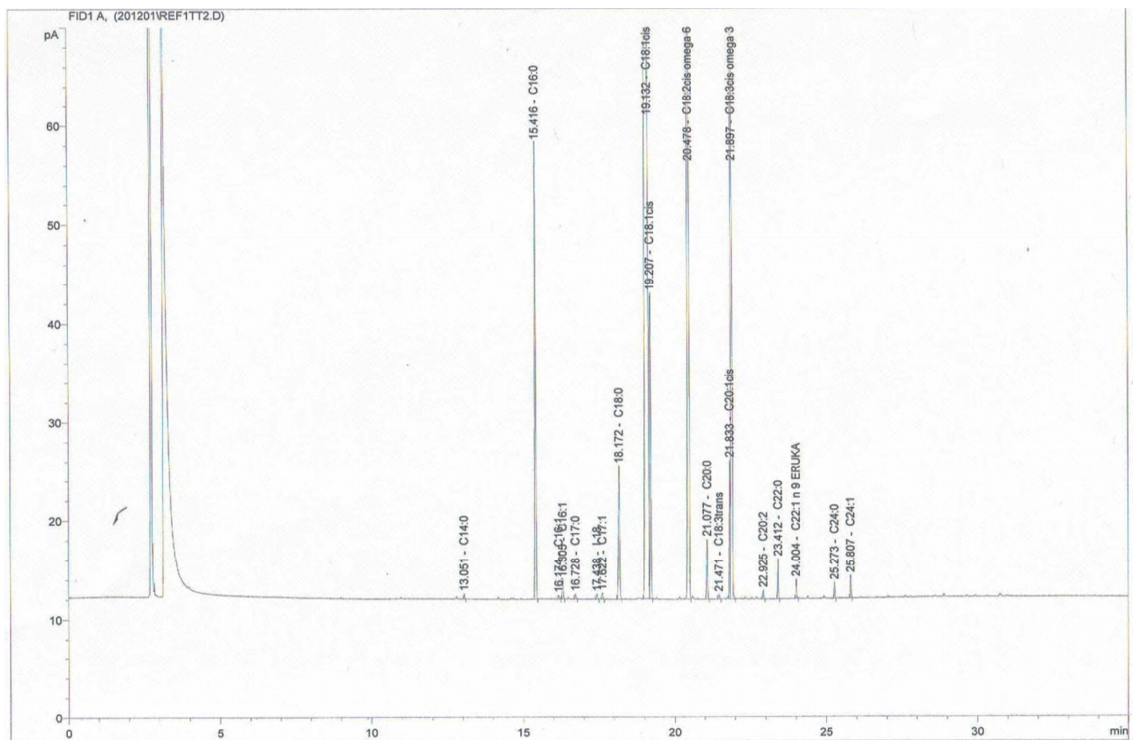
<b>total</b>						
<b>g/100g</b>	<b>SAFA</b>	<b>MUFA</b>	<b>PUFA</b>	<b>RSD%</b>	<b>n</b>	<b>Kolonne</b>
<b>97,2</b>	6,8	60,6	29,8	<b>0,7</b>	5	DB-wax
<b>97,9</b>	6,9	60,7	30,2	<b>0,3</b>	5	Varian CP-Sil 88
<b>96,0</b>	6,8	59,7	29,5	<b>0,4</b>	6	DB-wax
<b>96,0</b>	6,8	59,6	29,6	<b>0,7</b>	6	Varian CP-Sil 88

Tuloksista voidaan päätellä ettei eri kolonnilla saaduissa tuloksissa ollut merkittävää eroa.

Esimerkkikromatogrammit rypsiöljynäytteestä määritettynä kahdella eri kolonnilla, kuvassa 15 sisäisenä standardina 21:0 metyyliesteri ja kuvassa 16 ilman sisäistä standardia.



Kuva 15. Rypsiöljy, kolonni JW 122-7032E DB-WaX.



Kuva 16. Rypsiöljy, kolonni Varian CP 7489 CP-Sil 88.

Seuraavaksi kerättiin yhteen eri päivinä, eri standardiliuoksilla ja kahdella eri kolonnilla ajettut tulokset kaikille kolmelle analyysimenetelmälle. Tulokset on esitetty taulukoissa 8, 9 ja 10.

Taulukko 8. IUPAC-menetelmällä rypsiöljylle saadut tulokset.

	<b>total</b> <b>g/100g</b>	<b>SAFA</b>	<b>MUFA</b>	<b>PUFA</b>	<b>RSD%</b>	<b>n</b>	<b>Kolonne</b>
	<b>101,0</b>	7,1	63,0	30,9	<b>0,3</b>	2	DB-wax
	<b>99,5</b>	7,3	61,3	30,6	<b>1,4</b>	3	DB-wax
	<b>101,8</b>	7,4	62,3	31,2	<b>2,2</b>	3	Varian CP-Sil 88
	<b>93,0</b>	6,6	57,9	28,6	<b>0,4</b>	3	DB-wax
	<b>95,2</b>	6,6	59,0	29,4	<b>1,5</b>	3	Varian CP-Sil 88
	<b>104,8</b>	7,3	65,2	32,2	<b>1,7</b>	3	DB-wax
	<b>106,7</b>	7,5	66,2	33,0	<b>1,4</b>	3	Varian CP-Sil 88
<b>AVERAGE</b>	<b>100,3</b>	<b>7,1</b>	<b>62,1</b>	<b>30,9</b>			
<b>SD</b>	<b>4,9</b>	<b>0,4</b>	<b>3,0</b>	<b>1,5</b>			
<b>RSD</b>	<b>4,9</b>	<b>5,6</b>	<b>4,9</b>	<b>5,0</b>			

Tuloksista voidaan nähdä, että vaikkakin kaikkien määritysten yhteinen keskiarvo on hyvä niin tulokset vaihtelivat 93-107 g/100g välillä.

Taulukko 9. Bannon *et al.*-menetelmällä rypsiöljylle saadut tulokset.

	<b>total</b> <b>g/100g</b>	<b>SAFA</b>	<b>MUFA</b>	<b>PUFA</b>	<b>RSD%</b>	<b>n</b>	<b>Kolonne</b>
	<b>100,2</b>	7,0	62,2	31,0	<b>0,1</b>	2	DB-wax
	<b>96,2</b>	6,7	60,1	29,4	<b>3,0</b>	3	DB-wax
	<b>94,4</b>	6,6	58,8	29,0	<b>1,8</b>	3	Varian CP-Sil 88
	<b>95,9</b>	6,7	59,8	29,3	<b>1,6</b>	3	DB-wax
	<b>95,2</b>	6,7	59,3	29,2	<b>0,6</b>	3	Varian CP-Sil 88
	<b>120,2</b>	8,3	75,0	36,8	<b>3,9</b>	3	DB-wax
	<b>115,6</b>	8,1	71,9	35,5	<b>2,6</b>	3	Varian CP-Sil 88
	<b>104,7</b>	7,3	65,3	32,0	<b>2,1</b>	3	DB-wax
	<b>103,5</b>	7,2	64,5	31,7	<b>1,6</b>	3	Varian CP-Sil 88
	<b>118,3</b>	8,3	73,8	36,2	<b>9,3</b>	3	DB-wax
	<b>111,4</b>	7,7	69,1	34,2	<b>6,6</b>	3	Varian CP-Sil 88
<b>AVERAGE</b>	<b>105,1</b>	<b>7,3</b>	<b>65,4</b>	<b>32,2</b>			
<b>SD</b>	<b>9,8</b>	<b>0,7</b>	<b>6,1</b>	<b>3,0</b>			
<b>RSD</b>	<b>9,3</b>	<b>9,0</b>	<b>9,3</b>	<b>9,3</b>			

Bannon *et al.*-menetelmällä saadut g/100g tulokset vaihtelivat keskenään eniten eikä menetelmä testausten perusteella sovi kvantitatiivisten rasvahappojen

määrittämiseen. Syynä tulosten vaihtelulle saattaa olla rasvahappojen epätasainen haihtuminen kuumennuksen aikana. Menetelmä on laboratorioissa käytössä kvalitatiivisessa määrittämisessä öljynäytteille ja tähän tarkoitukseen menetelmä soveltuu hyvin.

Taulukko 10. GOED-menetelmällä rypsiöljystä saadut tulokset.

	<b>total</b>						
	<b>g/100g</b>	<b>SAFA</b>	<b>MUFA</b>	<b>PUFA</b>	<b>RSD%</b>	<b>n</b>	<b>Kolonne</b>
	97,5	6,8	60,7	30,0	1,0	2	DB-wax
	97,7	6,8	60,8	29,9	1,0	2	DB-wax
	96,8	6,8	60,2	29,7	1,3	2	DB-wax
	95,4	6,7	59,4	29,3	0,3	2	DB-wax
	96,4	6,8	59,8	29,6	1,1	6	DB-wax
	94,6	6,7	58,9	29,0	1,6	10	DB-wax
	97,6	6,9	60,7	29,9	0,5	5	DB-wax
	97,2	6,8	60,6	29,8	0,7	5	DB-wax
	97,9	6,9	60,7	30,2	0,3	5	Varian CP-Sil 88
	96,0	6,8	59,7	29,5	0,4	6	DB-wax
	96,0	6,8	59,6	29,6	0,7	6	Varian CP-Sil 88
	91,7	6,4	57,5	27,7	3,7	3	DB-wax
	92,8	6,6	57,9	28,2	3,7	3	Varian CP-Sil 88
	98,0	6,8	61,0	30,1	0,5	3	DB-wax
	98,9	6,9	61,4	30,5	1,3	3	Varian CP-Sil 88
	98,4	6,9	61,4	30,0	0,4	3	DB-wax
	99,0	6,9	61,5	30,3	0,4	3	Varian CP-Sil 88
	95,7	6,7	59,9	29,1	0,7	3	DB-wax
	97,8	6,9	60,9	29,9	1,4	3	Varian CP-Sil 88
	99,5	7,0	61,8	30,5	0,4	2	Varian CP-Sil 88
	99,5	7,1	61,8	30,5	0,7	2	Varian CP-Sil 88
	98,7	7,1	61,4	30,3	0,2	2	Varian CP-Sil 88
<b>AVERAGE</b>	<b>97,0</b>	<b>6,8</b>	<b>60,3</b>	<b>29,7</b>			
<b>SD</b>	<b>2,7</b>	<b>0,2</b>	<b>1,5</b>	<b>1,0</b>			
<b>RSD</b>	<b>2,8</b>	<b>3,1</b>	<b>2,5</b>	<b>3,3</b>			

GOED:n menetelmää testattiin eniten, mutta tulokset olivat myös toistettavimpia. Poikkeavia tuloksia ja hajontaa tuli vähiten. Tämän lisäksi menetelmä on laboratorioissa tehdyn riskinarvioinnin perusteella IUPAC:n vastaavaan periaatteen perustuvaan menetelmään verrattuna turvallisempi. Menetelmää sovellettiin koeputkimittakaavassa, jolloin myös työturvallisuusriskit ovat huomattavasti pienemmät.

### 5.5 GOED-vertailunäytteet Marine oil 2 ja 3

AOCS/GOED järjestää kahdesti vuodessa kolmen näytteen vertailututkimuksen mukaan haluavien laboratorioiden kesken. Näiden vertailututkimuksien perusteella jokainen osallistunut laboratorio voi seurata omien tulostensa sijoittumista verrattuna muiden tuloksiin.

Tässä työssä analysoitiin kahta vertailunäytettä kaikilla kolmella menetelmällä. Heti alussa huomattiin, ettei Bannon *et al.* (1982) luoma pikamenetelmä toiminnut GOED:n kalaöljynäytteille. Osa näytteessä olevista rasvahapoista jäi metyloitumatta ja tämä vääristi tulosta.

Kalaöljynäytteiden testaamista jatkettiin IUPAC:n ja GOED:n menetelmillä. GOED:n vertailunäytteiden Marine oil 2 ja 3 tulokset GOED:n omalla menetelmällä ja IUPAC:n standardimenetelmällä on esitetty seuraavassa taulukossa 11.

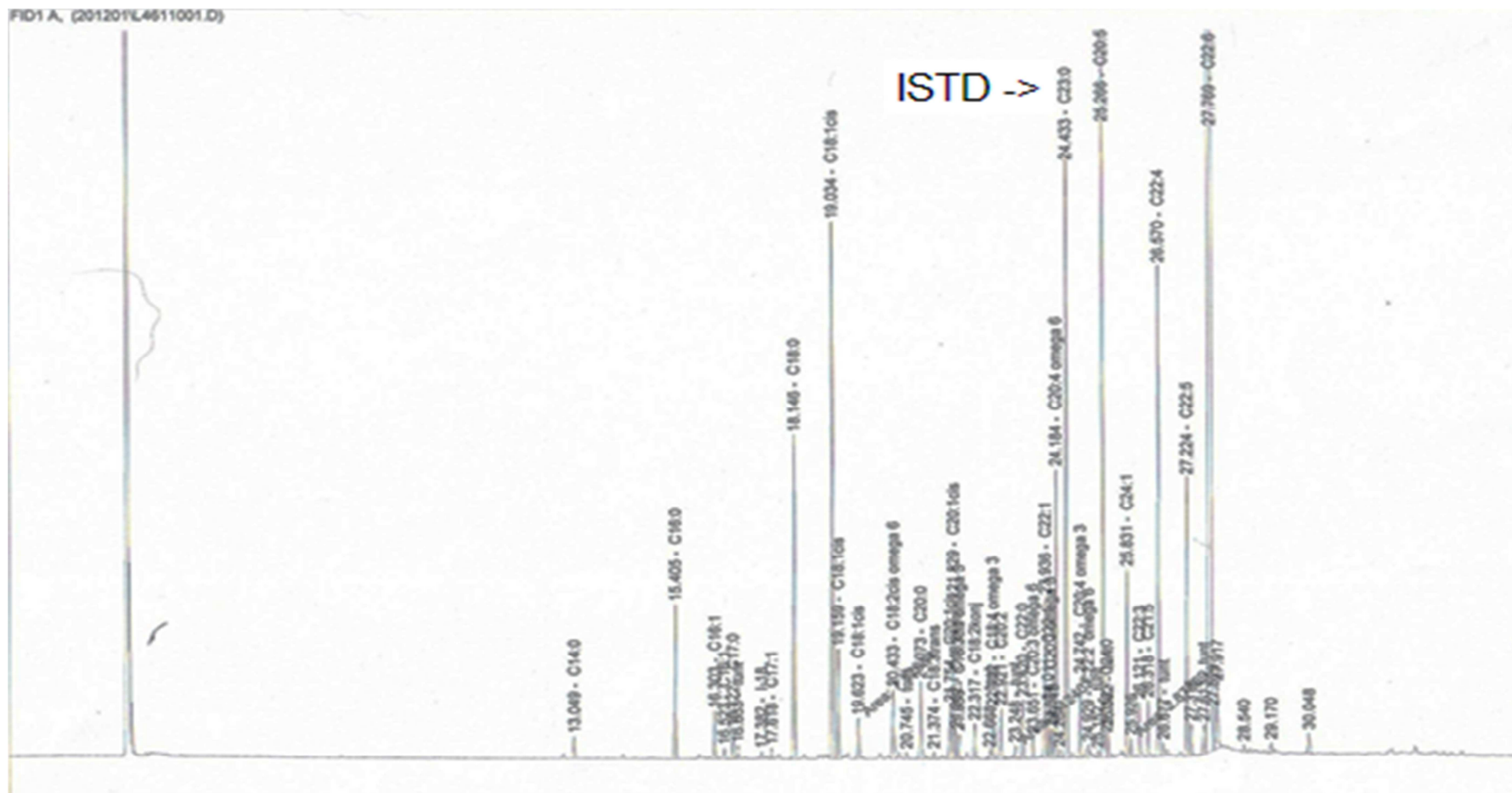
Taulukko 11. GOED Marine oil 2 ja 3 tulokset

	Marine Oil 2		Marine Oil 3				
	g/100g	RSD%	g/100g	RSD%	n	Kolonne	Menetelmä
	90,9	2,7	81,2	1,6	3	DB-wax	IUPAC 2.301
	87,9	2,3	89,6	0,6	3	Varian CP-Sil 88	IUPAC 2.301
	87,5	3,6	75,5	0,1	3	DB-wax	GOED
	92,7	3,6	81,5	1,0	3	Varian CP-Sil 88	GOED
	84,2	1,6	74,0	1,3	3	DB-wax	GOED
	87,9	2,3	79,1	0,4	3	Varian CP-Sil 88	GOED
	79,6	4,6	71,7	1,9	3	DB-wax	GOED
	83,4	5,0	76,7	1,5	3	Varian CP-Sil 88	GOED
	88,3	1,4	80,6	1,9	3	Varian CP-Sil 88	GOED
<b>AVERAGE</b>	<b>86,9</b>		<b>78,9</b>				
<b>SD</b>	<b>4,0</b>		<b>5,3</b>				
<b>RSD</b>	<b>4,6</b>		<b>6,7</b>				

Tuloksista voidaan nähdä, että hajontaa ilmeni molemmilla menetelmillä sekä tulostaso vaihteli jonkin verran eri määrittyskertojen välillä.

Esimerkkikromatogrammit Marine oil 2 ja 3 näytteistä määritettynä eri kolonneilla on esitetty kuvissa 17 ja 18.





Kuva 18. Marine oil 3, kolonni Varian CP 7489 CP-Sil 88.

## 5.6 GOED-vertailunäytteet Marine oil 4, 5 ja 6

Lopuksi kokeellisessa osuudessa määritettiin GOED:n loppuvuonna 2011 lähetämät kolme vertailunäytettä Marine oil 4, 5 ja 6 kahdella rinnakkaisella GOED:n omalla menetelmällä. Tulokset on esitetty (yksikkö GOED:n vertailututkimuksen mukainen mg/g) taulukoissa 12, 13, 14 ja 15.

Taulukko 12. GOED Marine oil 4 tulokset, GOED-menetelmä, kolonni Varian CP-Sil 88.

<b>FATTY ACID COMPOSITION</b> <b>% of total</b>	Mean %	Mean mg/g	Vertailulaboratoriot mean mg/g
14:0	0,30	2,63	
16:0	2,75	24,41	
16:1 cis	1,40	12,41	
17:0	0,20	1,82	
16:4 cis n-3	0,16	1,46	
18:0	3,85	34,24	
18:1	0,37	3,28	
18:1 cis	9,82	87,26	
18:2	0,40	3,54	
18:2 cis n-6	0,88	7,80	
20:0	0,55	4,91	
18:3	0,59	5,23	
20:1 cis	2,82	25,03	
<b>18:3 cis n-3</b>	0,58	<b>5,16</b>	<b>5,41</b>
18:2	0,54	4,78	
<b>18:4 cis n-3</b>	1,60	<b>14,17</b>	<b>13,73</b>
20:2 cis n-6	0,39	3,48	
22:0	0,24	2,14	
20:3 cis n-6	0,28	2,52	
22:1 cis	2,65	23,57	
20:3 cis n-3	0,16	1,46	
20:4 cis n-6	1,78	15,79	
<b>20:4 cis n-3</b>	1,43	<b>12,73</b>	<b>12,84</b>
22:2 cis n-6	0,2	1,61	
<b>20:5 cis n-3</b>	32,52	<b>288,92</b>	<b>292,14</b>
24:1 cis	0,52	4,59	
22:3 cis n-3	0,20	1,73	
<b>21:5 n-3</b>	1,57	<b>13,98</b>	<b>14,35</b>
22:4 n-6 tai n-3	0,82	7,32	
<b>22:5 cis n-3</b>	4,37	<b>38,79</b>	<b>40,14</b>
22:6 cis n-3	23,33	<b>207,33</b>	<b>216,83</b>
<b>TOTAL</b>	100,00	888,49	
<b>TOTAL n-3</b>	65,40	<b>581,08</b>	<b>594,68</b>

Laboratorion saamat tulokset vertailunäytteelle olivat muiden rasvahappojen paitsi 18:4 n-3 osalta hieman alle kaikkien laboratorioiden tulosten keskiarvon mutteivät merkittävästi.

Taulukko 13. GOED:n Marine oil 5 tulokset, GOED-menetelmä ja kolonni Varian CP-Sil 88.

<b>FATTY ACID COMPOSITION</b> <b>% of total</b>	Mean %	Mean mg/g	Vertailulaboratoriot mean mg/g
14:0	4,80	45,67	
15:0	0,4	3,80	
16:0	12,69	120,86	
16:1 cis	8,64	82,28	
17:0	0,24	2,25	
17:1 cis	0,33	3,17	
16:4 cis n-3	0,43	4,11	
18:0	2,10	19,96	
18:1	0,12	1,14	
18:1 cis	22,78	216,87	
18:2	0,45	4,30	
18:2 cis n-6	1,92	18,25	
18:2	0,06	0,56	
20:0	0,14	1,31	
18:3	0,21	1,97	
20:1 cis	8,55	81,39	
<b>18:3 cis n-3</b>	1,21	<b>11,50</b>	<b>10,95</b>
18:2	0,15	1,40	
<b>18:4 cis n-3</b>	1,94	<b>18,43</b>	<b>18,63</b>
20:2 cis n-6	0,35	3,37	
22:0	0,06	0,55	
20:3 cis n-6	0,08	0,78	
22:1 cis	6,72	63,99	
20:3 cis n-3	0,10	0,93	
20:4 cis n-6	0,51	4,83	
<b>20:4 cis n-3</b>	0,65	<b>6,16</b>	<b>6,42</b>
22:2 cis n-6	0,1	0,73	
<b>20:5 cis n-3</b>	8,25	<b>78,56</b>	<b>81,97</b>
24:1 cis	0,60	5,68	
22:3 cis n-3	0,10	0,95	
<b>21:5 n-3</b>	0,36	<b>3,43</b>	<b>2,71</b>
22:4 n-6 tai n-3	0,26	2,49	
<b>22:5 cis n-3</b>	1,17	<b>11,13</b>	<b>11,65</b>
<b>22:6 cis n-3</b>	9,91	<b>94,39</b>	<b>101,08</b>
<b>TOTAL</b>	100,00	952,10	
<b>TOTAL n-3</b>	23,49	<b>223,60</b>	<b>235,67</b>

Laboratorion saamat tulokset vertailunäyteille olivat muiden rasvahappojen paitsi 18:3 n-3 osalta hieman alle kaikkien laboratorioden tulosten keskiarvon mutteivät merkittävästi.

Taulukko 14. GOED Marine oil 6 tulokset, GOED-menetelmä ja kolonni Varian CP-Sil 88.

<b><u>FATTY ACID COMPOSITION</u></b> % of total	Mean %	Mean mg/g	Vertailulaboratoriot mean mg/g
14:0	0,35	3,05	
16:0	2,22	19,38	
16:1 cis	1,08	9,45	
17:0	0,18	1,58	
16:4 cis n-3	0,11	0,99	
18:0	3,64	31,84	
18:1	0,33	2,89	
18:1 cis	9,25	80,92	
18:2	0,38	3,30	
18:2 cis n-6	0,80	6,98	
20:0	0,53	4,66	
18:3	0,18	1,60	
20:1 cis	3,30	28,86	
<b>18:3 cis n-3</b>	0,53	<b>4,62</b>	<b>4,49</b>
18:2	0,18	1,56	
<b>18:4 cis n-3</b>	1,36	<b>11,90</b>	<b>11,98</b>
20:2 cis n-6	0,37	3,25	
22:0	0,34	2,96	
20:3 cis n-6	0,29	2,52	
22:1 cis	2,70	23,64	
20:3 cis n-3	0,15	1,32	
20:4 cis n-6	1,69	14,80	
<b>20:4 cis n-3</b>	1,46	<b>12,79</b>	<b>13,35</b>
22:2 cis n-6	0,2	1,83	
<b>20:5 cis n-3</b>	31,39	<b>274,50</b>	<b>292,49</b>
24:1 cis	1,30	11,39	
22:3 cis n-3	0,09	0,76	
<b>21:5 n-3</b>	1,66	<b>14,53</b>	<b>14,19</b>
22:4 n-6 tai n-3	1,03	9,01	
<b>22:5 cis n-3</b>	5,17	<b>45,21</b>	<b>48,23</b>
<b>22:6 cis n-3</b>	22,96	<b>200,79</b>	<b>220,13</b>
<b>TOTAL</b>	100,00	874,42	
<b>TOTAL n-3</b>	64,54	<b>564,33</b>	<b>601,55</b>

Laboratorion saamat tulokset vertailunäyteelle olivat muiden rasvahappojen paitsi 21:5 n-3 osalta hieman alle kaikkien laboratorioden tulosten keskiarvon mutteivät merkittävästi.

Kaikkien näytteiden tuloksia verrattaessa vertailututkimuksen tuloksiin voidaan nähdä, että laboratorion tulostaso jäi hieman vertailulaboratorioiden tulosten

keskiarvoa alhaisemmaksi, mutta huomattavaa eroa ei ollut havaittavissa. Mikäli vertailulaboratoriot ovat määrittäneet lukumääräisesti vähemmän rasvahappoja, se on saattanut vaikuttaa tähän lopputulokseen.

Laboratorion voidaan todeta vertailututkimuksen perusteella tuottavan luotettavia tuloksia kvantitatiivisen rasvahappoanalyysin osalta. Vertailututkimuksen tulokset ovat nähtävissä kokonaisuudessaan liitteessä 2.

### 5.7 FAPAS-laadunvarmistusnäytteet

FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) on FERA:n (Food and Environment Research Agency) elintarvikekemian vertailututkimus. FAPAS vertailumateriaalit on testattu yli 2000 vertailulaboratoriossa ja tulosten perusteella on määritetty tietyille rasvahapoille hyväksyttävä vaihteluväli rasvahappojen GC-analyysistä.

Laboratorioon hankittiin tulevaa kvantitatiivisen rasvahappokoostumuksen analysointia ajatellen kaksi laadunvarmistusnäytettä, FAPAS T14100QC ja FAPAS T14104QC, joita analysoidaan säännöllisesti oikean tulostason takaamiseksi. Näytteet ovat koostumukseltaan tässä työssä käytettyjen rypsiöljyn ja kalaöljyn kaltaisia.(23)(24)

Analysoin kyseisiä näytteitä kerran kahdella rinnakkaisella näytteellä lopputyöni päätteeksi. Näytteet ajettiin kahdella eri kolonnilla, koska molempia käytetään normaalissa laboratoriotöinnässä erilaisiin rasvahappojen määrittämiin. Tulokset ja rajat nähtävissä taulukoissa 15, ja 16.

Taulukko 15. FAPAS T14100QC tulokset, GOED-menetelmä

Sample:	FAPAS T14100		Satisfactory range
	<u>Varian CP-Sil 88</u>	<u>DB-wax</u>	
FA	Mean g/100g	Mean g/100g	
12:0	0,13	0,13	
14:0	1,26	1,28	
15:0	0,18	0,19	
16:0	31,49	32,16	
16:1 cis	1,54	1,13	
17:0	0,28	0,27	
17:1 cis	0,12	0,14	
18:0	4,65	4,73	
18:1 cis	33,77	34,29	
18:2	0,20		
<b>18:2 cis n-6</b>	<b>8,13</b>	<b>8,28</b>	<b>7,59-9,27</b>
20:0	0,41	0,41	
18:3 cis n-6	0,27	0,35	
18:3	0,02		
20:1 cis	0,33	0,41	
18:3 other	0,00	0,07	
<b>18:3 cis n-3</b>	<b>0,23</b>	<b>0,26</b>	<b>0,20-0,31</b>
18:4 cis	0,13	0,20	
20:2 cis n-6	0,11	0,11	
20:3 cis n-6	0,33	0,36	
<b>20:4 cis n-6</b>	<b>4,05</b>	<b>3,99</b>	<b>3,78-4,62</b>
20:5 cis n-3	1,26	1,05	
22:4 cis n-3	0,31	0,31	
22:5 cis n-3	0,28	0,27	
<b>22:6 cis n-3</b>	<b>3,92</b>	<b>3,57</b>	<b>3,77-4,61</b>
<b>TOTAL</b>	<b>94,30</b>	<b>94,88</b>	
<b>PUFA</b>	<b>19,32</b>	<b>18,78</b>	<b>17,19-21,01</b>
<b>MUFA</b>	<b>35,96</b>	<b>35,99</b>	<b>33,71-38,01</b>
<b>SAFA</b>	<b>39,02</b>	<b>39,91</b>	<b>36,57-41,24</b>

Tuloksista voidaan huomata, että rasvahapon 22:6 arvo 3,57 jää 0,2 g/100g alle hyväksyttävän alarajan 3,77 g/100g. Tämä saattaa johtua rasvahapon pitkistä eluoitusajasta ja sitä kautta absorboitumisesta kolonniin. DB-wax kolonni on laboratoriossa käytössä kvantitatiivisissa rasvahappoanalyyseissä vain piikkien tunnistusten tukena. Muutoin tulokset olivat hyvin FAPAS:n näytteelle laatimissa rajoissa.

Taulukko 16. FAPAS T14104QC tulokset, GOED-menetelmä

Sample:	FAPAS T14104		Satisfactory range
	<u>Varian CP-Sil 88</u>	<u>DB-wax</u>	
FA	Mean g/100g	Mean g/100g	
16:0	4,23	4,40	
16:1 cis	0,27	0,30	
17:1 cis	0,11	0,16	
18:0	1,43	1,47	
18:1 cis	57,55	59,15	
<b>18:2 cis n-6</b>	<b>18,71</b>	<b>19,17</b>	<b>17,26-21,09</b>
20:0	0,50	0,52	
18:3	0,13	0,00	
20:1 cis	1,08	1,29	
18:3 other	0,00	0,16	
<b>18:3 cis n-3</b>	<b>8,49</b>	<b>8,61</b>	<b>7,75-9,47</b>
20:2 cis n-6	0,06	0,07	
22:0	0,29	0,29	
22:1 cis	0,11	0,13	
24:0	0,12	0,12	
24:1 cis	0,14	0,15	
<b>TOTAL</b>	<b>93,45</b>	<b>96,14</b>	
<b>PUFA</b>	<b>27,45</b>	<b>28,00</b>	<b>24,94-30,48</b>
<b>MUFA</b>	<b>59,27</b>	<b>61,19</b>	<b>59,79-64,03</b>
<b>SAFA</b>	<b>6,73</b>	<b>6,96</b>	<b>6,08-7,43</b>

Tuloksista voidaan todeta, että MUFA eli kertatydyttymättömien rasvahappojen määrä 59,27 g/100g jää toisella kolonnilla alle suositellun alarajan 59,79 g/100g. Uskoisin ongelman johtuvan piikkien 18:3 ja 20:1 eluoitumisesta päällekkäin. Yksi mahdollisuus olisi loiventaa lämpötilagradienttiajoa kyseisten piikkien eluoitumisen kohdalla. Tämä pidentäisi ajoaikaa, mutta olisi tarvittaessa käytettävissä oleva vaihtoehto. Muutoin tulokset olivat hyvin FAPAS:n näytteelle laatimissa rajoissa.

## 6 YHTEENVETO

Rasvahappojen määrän selvittämiseksi näytteestä on tehtävä kvantitatiivinen määrittys. Työn tarkoituksena oli vertailla kolmea rasvahappojen analysointimenetelmää ja arvioida laboratorion luotettavuutta rasvahappoanalyyseissä.

Ensimmäinen vertailluista menetelmistä Bannon *et al.* (1982) Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. Menetelmä soveltuu hyvin rasvahappojen analyysimenetelmäksi öljyille esim. laadunvalvonnan tarpeita varten. Tulokset testatulle rypsiöljylle vaihtelivat välillä 94-120 g/100g, RSD 9,3%. Menetelmä ei sovellu kvantitatiiviseen määrittämiseen.

IUPAC:n 2.301 Preparation of the fatty acid methyl esters menetelmä soveltuu monimutkaisemmille näytteille, mutta on työläämpi ja työturvallisuuden kannalta vaarallisempi. IUPAC:n menetelmä antoi tulokseksi rypsiöljylle 93-107 g/100g välillä, RSD 4,9%. Verrattaessa tuloksia rypsiöljyn teoreettiseen saantoon voitiin todeta, että osa tuloksista oli liian korkeita tai matalia tuloksia syistä, jotka jäivät epäselväksi.

GOED:n Voluntary Monograph menetelmä osoittautui parhaaksi vaihtoehdoksi toistettavuuden ja luotettavuuden sekä työturvallisuuden puolesta. Tulokset rypsiöljylle vaihtelivat 92-100 g/100g, RSD 2,8%. Menetelmä sovellettiin koeputkimittakaavassa, joka oli työturvallisuuden kannalta hyvä asia käsiteltäessä happoja ja emäksiä. Menetelmä on kuitenkin herkkä ja vaatii vielä lisää testausta erilaisista näytematriiseista eristetyillä rasvoilla.

Työn tulosten perusteella laboratoriossa muutettiin yleistä ohjeistusta rasvahappojen analysoinnissa siten, että poolisemmalla kolonnilla tehtävän rasvahappomäärityksen lisäksi näytteet ajetaan rasvahappojen tunnistusten varmistamiseksi myös toisella kolonnilla.

Laboratorion GOED:n vertailututkimuksen tulosten perusteella voitiin todeta, että laboratorion tulostaso jäi vain hieman tutkimukseen osallistuneiden vertailulaboratorioiden tulosten keskiarvoa alhaisemmaksi, mutta huomattavaa eroa ei

ollut havaittavissa. Laboratorion voitiin todeta tuottavan luotettavia tuloksia kvantitatiivisen rasvahappoanalyysin osalta.

## LÄHTEET

- 1) Nordic Nutrition Recommendations <http://www.nnr5.org> viitattu 28.6.2012
- 2) Owusu-Apenten, R., Introduction to food chemistry, (2005) s. 61-77
- 3) Margariiniedotus ja Ravitsemusterapeuttien yhdistys r.y., Ravinnon rasvat II, Ravinnon välttämättömät rasvahapot, viitattu 4.4.2012, <http://loader.eurorscg.fi/partner/margariini/documents/valttamattomat-rasvahapot.pdf>
- 4) Harwood, J.L., Weselake, R.J. ja Christie, W.W., The AOCS lipid library, [www.lipidlibrary.aocs.org](http://www.lipidlibrary.aocs.org) viitattu 28.6.2012
- 5) Larsson, K., Quinn, P., Sato, K. ja Tiberg, F., Lipids: Structure, physical properties and functionality (2006) s.1-63
- 6) Scientific substantiation of a health claim related to plant sterols and lower/reduced blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006 The EFSA Journal (2008) 781, 1-12 <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/781.pdf>
- 7) Conklin, A. ja Stilwell, T., World Food production and use, (2007) s.60
- 8) Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, Composition of dietary fat, <http://www.fao.org/docrep/V4700E/V4700E07.htm> viitattu 28.6.2012
- 9) Brody, T., Nutritional biochemistry, (1999) s.638-639
- 10) Cockbain, A.J., Toogood, G. J. ja Hull, M.A., Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the prevention and treatment of colorectal cancer, An international journal of gastroenterology and hepatology (2012) vol. 61, s.135-149
- 11) Aro, A., Mutanen, M. ja Uusitupa, M., Ravitsemustiede, Duodecim (1999) s.111-113
- 12) Simopoulos, A.P., Omega-6/omega-3 Essential fatty acid ratio: The scientific evidence, World review of nutrition and dietetics vol 92, (2003)
- 13) Curtis-Prior, P., The eicosanoids, The new England Journal of Medicine (2005); 352:1162-1163
- 14) Moilanen, E., Kankaanranta, H. ja Martio, J., Eikosanoidit ja tulehduskipulääkkeet, Farmakologia ja toksikologia (2012), viitattu 1.7.2012, <http://www.medicina.fi/fato/19.pdf>
- 15) Hautala, S., Kaasukromatografian ja FID-, TC- ja EC -detektorien toiminta, viitattu 15.5.2012, <http://www.cs.helsinki.fi/u/sshautal/gc.pdf>
- 16) Riekkola, M-L. ja Hyötyläinen, T., Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat, (2002)
- 17) Harris, Quantitative chemical analysis, 6. painos (2003)
- 18) Cert, A., Moreda, W. ja Pérez-Camino, M.C., Methods of preparation of fatty acid methyl esters (FAME). Statistical assessment of the precision characteristics from a collaborative trial, Grasas y Aceitas vol. 51 Fasc. 6 (2000), 447-456

- 19) Christie, W.W., Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis, *Advances in Lipid Methodology – Two*, (1993) s. 69-111
- 20) IUPAC 2.301 Preparation of the fatty acid methyl esters, *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives 7th Edition*
- 21) Bannon, C.D., Craske, J.D., Trong Hai, N.T., Harper, N.L. ja O'Rourke, K.L., Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability : II. Methylation of fats and oils with boron trifluoride-methanol, *Journal of Chromatography A* Vol. 247, Issue 1, (1982), s. 63–69
- 22) Global organization for EPA and DHA omega 3's: Voluntary monograph v.3, viitattu 5.12.2011 <http://www.goedomega3.com/images/stories/files/goedmonograph.pdf>
- 23) FAPAS test material specification sheet T14104QC, viitattu 02.01.2012  
<https://www.fapas.com/tmspecsheet.cfm?testmaterialid=16351>
- 24) FAPAS test material specification sheet T14100QC, viitattu 02.01.2012  
<https://www.fapas.com/tmspecsheet.cfm?testmaterialid=16349>
- 25) *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS* (2009), 6th Edition
- 26) Craske, J.D., ja C.D. Bannon, Letter to the editor, *Journal of the American Oil Chemists' Society* Vol. 65, Number 7 (1988), s. 1190-1191
- 27) Komission asetukset (EU) N:o 432/2012

## Liite 1. Ruoka-aineiden rasvahappokoostumuksia (3).

*Ruoka-aineiden rasvahappokoostumuksia / 100 g*

	Rasvan määrä (g)	Safa (g)	Mufa (g)	Pufa (g)	n-6 (g)	n-3 (g)	n-6/ n-3	E- vitamiini mg	lähde
<i>Tavalliset kasviöljyt</i>									
Auringonkukkaöljy	100	11	22	63	62	0,4	155:1	63	1
Maissiöljy	100	13	27	54	53	1	53:1	34	1
Oliiviöljy	100	14	68	11	10	0,5	20:1	12	1
Rypsiöljy	100	6	58	33	22	11	2:1	24	1
Soijaöljy	100	15	22	59	52	7	7:1	18	1
<i>Erikaisöljyt</i>									
Hasselpähkinäöljy	100	7	78	10	10	-	*	-	2
Maapähkinäöljy	100	17	46	32	32	-	*	13	2
Manteliöljy	100	8	70	17	17	-	*	39	2
Palmuöljy	100	49	37	9	9	0,2	45:1	22	1
Palmuydinöljy	100	82	11	2	2	-	*	8	2
Puuvillansiemenöljy	100	26	18	52	52	0,2	260:1	38	2
Saksanpähkinäöljy	100	9	23	63	53	10,4	5:1	3	2
Seesaminsienenöljy	100	14	40	42	41	0,3	137:1	4	2
Unikonsiemenöljy	100	14	20	62	62	-	*	-	2
Viinirypäleen- siemenöljy	100	10	16	70	70	0,1	700:1	-	2
<i>Muut ravintorasvat</i>									
Margariini 40	40	14	17	7	6	1	6:1	7	1
Margariini 60	60	18	26	13	9	4	2:1	12	1
Margariini 80	80	22	32	16	11	5	2:1	13	1
Rasvaseos 80	80	40	23	8	5	2	3:1	6	1
Voi	80	54	17	2	1	0,3	3:1	2	1
Kookosrasva	100	91	5	2,1	1,9	0,2	10:1	0,3	2
<i>Muita</i>									
Broileri, nahkoinen	12	3	5	2	2	0,2	10:1	0,7	1
Kirjolohi	18	2	4	3	1	2	0,5:1	1	1
Lohi	14	1	2	2,2	0,3	1,9	0,2:1	2	1
Naudanliha, keskiarvo	8	2	2	0,3	0,2	0,1	2:1	0,5	1
Porsaanliha, keskiarvo	4,5	0,5	2	0,4	0,2	0,04	5:1	0,5	1
Silakka	4,6	1	1	1,1	0,2	0,9	0,2:1	2	1
Äidinmaito	2,5	2	1	0,5	0,4	0,04	10:1	0,1	1

1) [www.ktl.fi/fineli](http://www.ktl.fi/fineli)2) [www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/)

\*) n-6-/n-3-suhdetta ei ole laskettu, sillä tiedot n-3-rasvahappopitoisuuksista puuttuvat

Liite 2. AOCS/GOED vertailututkimuksen tulokset.



Your Chemical and Oils Connection

LABORATORY PROFICIENCY PROGRAM  
GOED/AOCS NUTRACEUTICAL OILS  
2011-2012

P O Box 17190, Urbana, IL 61803-7190 USA  
phone: +1 217-359-2344; fax: +1 217-351-5091  
email: technical@aoocs.org web: www.aoocs.org

DATA ENTRY REPORT SAMPLE 4

Analyst	C18:3 (n-3)		C18:4 (n-3)		C20:4 (n-3)		C21:5 (n-3)		C22:5 (n-3)		C20:5 (n-3)		C22:6 (n-3)		Total Omega 3		Acid Number	Peroxide Value	Anisidine Value	Totox Value	
	mg	area	mg	area	mg	area	mg	area	mg	area	mg	area	mg	area	mg	area					
1432	5.68	.66	13.45	1.56	15.24	1.75	13.97	1.60	39.62	4.54	297.47	34.23	209.25	23.99	594.69	68.33	14	7.50	4.50	19.50	
1516	5.47	.60	14.01	1.54	14.79	1.83	14.61	1.62	41.99	4.64	302.28	33.74	225.65	24.75	618.75	68.51	.18	7.25	5.00	19.50	
1527	5.69*	***	***	.00	***	3.09*	***	1.57	***	4.33	***	31.88*	***	22.80*	***	64.35	***	***	***	***	***
1529	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	290.39	35.55	21.53	23.33	***	***	***	***	***	***	***
1538	5.63	***	***	1.59	***	1.61	***	***	***	4.60	294.83	33.40	217.16	24.55	600.68	68.01	.09	5.79	4.85	16.43	
1570	5.16	.62	12.43	1.59	12.19	1.42	13.05	1.60	37.28	4.56	272.35	33.39	201.23	24.81	553.69	67.99	.15	7.80	4.93	20.50	
1571	5.83	.65	14.00	1.56	13.55	1.51	14.76	1.56	40.56	4.52	299.80	33.61	222.80	24.68	611.30	68.17	.15	5.50	4.90	16.00	
1625	5.59	***	***	1.53	***	1.34	***	1.58	***	4.59	295.56	35.49	218.35	25.70	588.44	70.70	.20	7.0*	4.30	5.70*	
1634	5.52	.67	13.31	1.63	12.59	1.54	.00	.00	38.02	4.65	292.61	35.78	211.50	25.66	575.08	70.44	.25	10.20*	4.00	24.40	
1637	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	.08	9.95	2.75*	22.65	
1648	5.60	***	***	1.60	***	1.40	***	1.60	4.70	290.10	34.10	218.40	25.30	617.20	69.20	.16	7.80	3.90	19.50		
1688	5.16	.56	14.17	1.60	12.73	1.43	13.98	1.57	38.79	4.37	288.92	32.52	207.33	23.33	581.08	68.11*	.15	8.36	4.23	20.95	
1693	5.24	***	13.31	***	14.62	***	14.73	***	42.40	***	317.49*	***	228.83	***	636.62	68.32	.29*	6.83	3.82	17.48	
1698	6.30*	.72*	14.10	1.60	14.00	1.59	14.30	1.62	38.10	4.39	297.10	33.86	213.20	24.54	598.50	68.32	***	5.62	1.10*	12.34*	
1709	5.00	.62	14.00	1.59	10.00	1.28	13.00	1.55	38.00	4.75	290.00	35.85	212.00	26.08	580.00	72.00	.10	6.10	5.00	17.20	
1729	***	.60	***	1.58	***	1.40	***	1.64	***	4.59	297.16	33.85	214.74	25.17	***	68.83	.14	5.88	4.89	16.65	
1731	5.70	.61	13.59	1.45	11.82	1.27	14.21	1.53	39.70	4.19*	279.54	30.08*	212.40	22.38*	576.95	61.50*	.55*	6.30	4.20	18.80	
1743	***	.61	***	1.66	***	1.42	***	1.70	***	4.88*	290.00	34.72	222.00	25.82	593.00	70.81	.20	7.10	4.40	18.60	
1744	6.10	.64	16.26*	1.71	13.97	1.47	16.04	1.69	43.11	4.54	325.16*	35.24	249.82*	25.32	670.46*	70.61	.15	6.77	4.94	18.48	
1748	6.50	.60	14.80	1.70	12.30	1.40	15.20	1.70	42.80	4.80	309.40	35.00	231.50	25.80	631.50	71.00	.14	5.10	4.20	14.40	
1750	6.21	.60	15.70*	1.80*	13.85	1.60	14.57	1.70	41.34	4.60	304.59	34.10	230.59	25.50	625.52	69.80	.21	6.90	4.51	18.30	
1757	4.74	.55	13.53	1.56	11.48	1.39	13.02	1.57	38.26	4.48	280.59	33.90	208.07	24.38	556.67	65.28	.15	5.70	3.80	15.20	
1770	5.59	.58	13.76	1.48	9.67	1.04*	15.44	1.66	42.22	4.54	277.96	29.89*	220.04	23.66	594.51	62.85	.22	9.90	4.36	24.20	
Avg.	5.41	.61	13.73	1.58	12.84	1.47	14.35	1.63	40.14	4.57	292.14	34.35	216.83	24.87	594.68	68.58	.16	6.96	4.46	18.78	
Std. Dev.	.36	.03	.57	.07	1.65	1.43	.91	.05	2.03	1.12	9.50	.95	8.24	.86	25.25	2.34	.04	1.38	.42	2.82	



**LABORATORY PROFICIENCY PROGRAM  
GOEDIACOCS NUTRACEUTICAL OILS  
2011-2012**

P O Box 17190, Urbana, IL 61803-7190 USA  
phone: +1 217-359-2344, fax: +1 217-351-8091  
email: technical@aoocs.org web: www.aoocs.org

DATA ENTRY REPORT SAMPLE 5

Analyst	C18:3 (n-3)		C18:4 (n-3)		C20:4 (n-3)		C21:5 (n-3)		C22:5 (n-3)		C20:5 (n-3)		C22:6 (n-3)		Total Omega 3		Acid Number	Peroxide Value	Anisidine Value	Total Value	
	mg	area	mg	area	mg	area	mg	area	mg	area	mg	area	mg	area	mg	area					
1432	10.95	1.19	18.43	2.00	6.91	.75	3.41	.37	11.65	1.25	83.19	8.96	97.77	10.52	232.30	25.06	.15	4.80	9.60	19.20	
1516	10.99	1.18	18.97	2.02	6.96	.74	3.51	.39	12.15	1.30	84.50	9.12	105.65	11.17	242.73	25.92	.21	4.45	11.07	19.97	
1527	1.28	***	***	.00	***	1.17	***	***	***	1.20	***	8.69	***	***	10.03	***	***	***	***	***	***
1529	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	80.79	8.75	96.72	9.63	***	***	***	***	***	***	
1538	***	1.27	***	2.14	***	.77	***	42	***	1.33	83.90	9.33	102.22	11.21	239.88	26.46	.19	4.00	7.90	15.90	
1570	10.29	1.21	16.70	2.07	5.94	.67	2.99	.35	10.59	1.25	76.49	9.06	94.09	11.21	217.08	25.82	.13	4.50	8.89	17.90	
1571	11.58	1.22	20.03	2.11	7.02	.74	3.99	.42	11.87	1.25	85.60	9.07	108.10	11.43	249.19	28.24	.13	3.70	9.10	16.50	
1625	1.15	***	***	2.09	***	.53	***	.28	***	1.08	80.53	9.26	101.34	11.01	227.66	25.40	.20	.60	9.20	10.40	
1634	10.81	1.30	18.70	2.21	6.40	.75	.00	.00	11.39	1.34	83.07	9.80	100.07	11.80	232.59	27.48	.20	6.20	6.60	19.00	
1637	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	.09	5.66	11.42	11.41
1648	***	1.20	18.43	1.94	6.16	.65	3.43	.40	***	1.30	81.40	9.30	102.10	11.50	242.70	26.50	.14	5.20	8.50	18.90	
1689	11.50	1.21	18.43	1.94	6.16	.65	3.43	.36	11.13	1.17	78.56	8.25	94.39	9.91	223.60	22.36	.14	5.15	7.41	17.72	
1693	10.51	***	17.65	***	6.85	***	3.36	***	11.71	***	84.15	***	105.72	***	239.94	***	***	.29	5.00	7.89	17.89
1698	9.40	1.06	14.70	1.66	5.20	.59	.60	.07	9.90	1.12	65.70	7.44	78.70	8.91	184.10	20.85	.10	5.00	5.60	42.40	
1709	11.00	1.28	19.00	2.26	5.00	.65	.00	.00	11.00	1.34	81.00	9.87	98.00	11.92	217.00	27.00	.10	5.00	9.00	19.00	
1729	***	1.19	***	2.08	***	.68	***	.38	***	***	84.50	9.26	100.78	11.38	***	26.28	.12	4.67	7.98	17.32	
1731	11.10	1.13	18.33	1.85	5.73	.60	3.48	.37	11.27	1.17	76.98	8.16	96.88	10.10	223.76	23.38	.56	4.70	9.00	18.40	
1743	***	1.14	***	2.12	***	.68	***	.37	***	1.29	82.00	9.42	105.00	11.70	239.00	28.71	.16	4.30	8.80	17.40	
1744	12.86	1.35	22.16	2.33	6.93	.73	3.73	.39	12.42	1.30	83.26	10.15	115.70	11.78	267.06	28.03	.22	3.56	9.21	16.33	
1748	11.10	1.20	19.70	2.20	6.00	.70	4.40	.50	12.30	1.40	85.00	9.40	107.60	11.80	246.00	27.10	.13	4.90	9.40	19.20	
1750	1.20	10.80	2.00	17.86	7.60	66.66	.40	3.49	1.30	12.00	9.20	34.47	11.60	10.89	33.30	30.15	.13	3.90	8.32	16.10	
1757	10.28	1.13	18.39	2.01	5.62	.64	2.99	.34	11.41	1.26	78.91	8.96	97.75	10.77	222.36	24.77	.17	4.00	7.40	15.40	
1770	13.30	1.43	19.25	2.07	7.91	.85	4.37	.47	12.56	1.36	84.91	9.13	101.18	10.88	243.47	26.18	.19	4.70	9.01	18.40	
Avg.	10.95	1.21	18.63	2.07	6.42	.69	2.71	.37	11.65	1.27	81.97	9.16	101.08	11.11	235.67	25.94	.16	4.53	8.62	17.81	
Std. Dev.	.81	.07	.89	.15	.85	.08	1.59	.09	.59	.07	2.82	.49	4.28	.62	13.05	1.37	.04	.58	.69	1.33	



Your Global Fish and Oils Connection

**LABORATORY PROFICIENCY PROGRAM**  
**GOED/AOCS NUTRACEUTICAL OILS**  
**2011-2012**

P O Box 17190, Urbana, IL 61803-7190 USA  
 phone: +1 217-358-2344, fax: +1 217-351-8091  
 email: technical@aoocs.org, web: www.aoocs.org

DATA ENTRY REPORT SAMPLE 6

Analyst	C18:3 (n-3)		C18:4 (n-3)		C20:4 (n-3)		C21:5 (n-3)		C22:5 (n-3)		C20:5 (n-3)		C22:6 (n-3)		Total Omega 3		Acid Number	Peroxide Value	Antisense Value	Total Value
	mg	area	mg	area	mg	area	mg	area	mg	area	mg	area	mg	area	mg	area				
1432	5.06	.58	11.63	1.33	14.18	1.62	14.70	1.68	47.42	5.39	295.34	33.72	210.59	23.96	598.92	68.27	.13	3.90	18.20	26.00
1516	4.51	.50	12.48	1.37	14.77	1.60	15.37	1.67	50.60	5.48	303.78	33.27	226.12	24.62	630.61	68.52	.40*	4.35	23.09*	31.79
1527	....	.69*	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
1529	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	290.90	34.91	216.82	23.44	....	....	....	....	....	....
1538	....	.54	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
1570	4.21	.51	10.90	1.40	12.38	1.45	13.54	1.66	44.39	5.44	270.06	33.31	218.86	24.63	608.21	68.68	.10	10.57	18.39	39.53
1571	4.77	.52	12.73	1.38	13.98	1.51	16.24	1.76	49.79	5.38	307.90	33.47	236.70	26.65	644.10	69.65	.08	2.10	20.40	24.60
1625	....	.39*	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
1634	4.63	.53	12.41	1.42	13.86	1.58	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
1637	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
1648	....	.50	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
1689	4.62	.51	11.90	1.30	12.79	1.40	14.53	1.59	45.21	4.95*	274.50	30.04*	200.79	21.79*	584.33	56.43*	.09	4.76	16.57	26.10
1693	4.08	....	11.27	....	....	....	15.05	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
1698	3.80	.43	10.60	1.20*	12.80	1.45	5.10	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
1709	4.00	.51	12.00	1.51	11.00	1.38	14.00	1.76	47.00	5.71	293.00	35.84	217.00	26.14	576.00	73.00	.10	5.30	19.00	29.60
1729	....	.48	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
1731	4.67	.49	11.75	1.24	12.18	1.28	14.80	1.56	47.44	4.89*	278.13	29.28*	214.14	22.11*	583.13	60.85*	.28*	12.60*	19.60	44.80
1743	....	.50	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
1744	5.32	.56	14.70*	1.53	14.78	1.53	16.87	1.75	52.03	5.40	328.90*	35.13	263.40*	25.31	686.00*	71.21	.12	2.48	18.60	23.56
1748	4.40	.50	12.90	1.50	12.70	1.40	15.80	1.80	50.70	5.70	304.90	34.60	230.00	25.80	631.30	71.30	.10	13.90*	19.10	46.70*
1750	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
1757	3.88	.44	11.83	1.35	12.06	1.42	14.22	1.68	46.57	5.34	282.19	33.33	210.20	24.09	566.73	65.97	.17	3.90	17.83	26.60
1770	4.84	.52	13.39	1.44	15.44	1.66	2.88*	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
Avg.	4.49	.51	11.98	1.41	13.35	1.48	14.19	1.68	48.23	5.45	292.49	33.81	220.13	24.85	601.55	68.95	.12	5.43	18.07	29.56
Std. Dev.	.45	.04	.80	.08	1.26	.13	3.01	.08	2.22	.16	11.91	1.21	10.29	.96	27.53	2.42	.05	3.09	1.11	7.51