

Analýza mastných kyselin v přírodních tucích II

Úkol: Stanovit poměr mastných kyselin ve vzorku tuku.

Přístroje, chemikálie a pomůcky:

Plynový chromatograf Agilent HP 6890 s hmotnostním spektrometrem Agilent 5973 N MSD, řídicí a vyhodnocovací softwarové prostředí ChemStation.

Kolona: HP 5, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm.

Nosný plyn: Helium 4.8, průtok 0,9 ml/min

Nastavení přístroje (definováno v metodě SQUALEN.M):

Nástřik: 1 μl, dávkovací puls 140 kPa, 0,4 min, 280°C

Teplotní program: 50°C - 2 min – 10°C/min – 300°C – 15 min

MS scan: 29 - 520 m/z, solvent delay: 4 min

Hexan p.a., Methanol p.a., 0,5 M KOH v methanolu, Na₂SO₄ bezv., H₂SO₄ konc., NaCl nasycený vodný roztok, methyloranž 0,1%

Pracovní postup

- Navážíme 0,5 g vzorku do 100 ml baňky. U vzorků obsahujících vodu se voda předem odstraní filtrací přes bezvodý síran sodný. Přidáme 10 ml 0,5 M roztoku KOH v methanolu a směs zmýdelňujeme pod zpětným chladičem 45 minut na vroucí vodní lázni.
- Po ochlazení přidáme 2 kapky methyloranže a opatrně přikapáváme koncentrovanou kyselinu sírovou do zřetelně kyselé reakce (trvalé červené zbarvení). Navíc přidáme 2 kapky konc. kyseliny sírové.
- Směs znovu vaříme pod zpětným chladičem po dobu 45 minut.
- Přes chladič přidáme asi 50 ml destilované vody. Po ochlazení obsah baňky převedeme do 250 ml dělicí nálevky. Methylestery vyextrahujeme 3 x 10 ml hexanu. K lepšímu rozdělení vrstev je možno do nálevky přidat cca 5 ml nasyceného roztoku NaCl.
- Spojené hexanové extrakty promyjeme 3 x 20 ml destilované vody a vysušíme filtrací přes bezvodý síran sodný. Alikvotní podíl extraktu ředíme hexanem tak, aby koncentrace výsledného roztoku nepřekročila 1 mg/ml (vztaženo k výchozí navážce tuku). Zředěný extrakt použijeme pro GC/MS analýzu.
- Identifikaci provedeme pomocí MS spekter a pomocí standardu methylesteru kyseliny olejové. Metodou vnitřní normalizace vyhodnotíme poměr jednotlivých mastných kyselin v předloženém vzorku. Molární poměr n-kyselin lze určit vyhodnocením iontového chromatogramu rekonstruovaného pro hmotu 74 m/z.