



evropský  
sociální  
fond v ČR



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**Aktivita 2340/1-2**

## **NÁVOD NA PRAKTICKÉ CVIČENÍ**

### **Stanovení mastných kyselin metodou GC**

*Metoda je určena pro výuku 4. ročníku magisterského studijního programu v rámci předmětu **Chemie potravin***

#### **PRINCIP**

Lipidy a složky rozpustné v mléčném tuku jsou z mléka izolovány metodou dvojí centrifugace. Triacylglyceroly získaného mléčného tuku jsou po zmýdelnění reesterifikovány methanolem na methylestery mastných kyselin a následně stanoveny metodou plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí.

#### **CHEMIKÁLIE**

hydroxid draselný, p.a.  $M_r = 56,11 \text{ g.mol}^{-1}$  (Penta, ČR)

methanol LiChrosolv (Merck, Německo)

methyloranž  $M_r = 327,24 \text{ g.mol}^{-1}$  (Lachema, ČR)

kyselina sírová, p.a. 96%,  $M_r = 98,08$  (Penta, ČR)

n-hexan pro kapalinovou chromatografii (Merk, Německo)

vyžíhaný síran sodný 99%,  $M_r = 142,04 \text{ g.mol}^{-1}$  (Sigma-Aldrich, Německo)

směs methylesterů mastných kyselin Supelco™ 37 Component FAME Mix (Supelco, USA)

hydromatrix PSE – Spe-ed PSE Matrix (Applied Separations, USA)

petrolether bod varu 40–60 °C pro organické stopové analýzy UniSolv (Merck, Německo)

isopropylalkohol p.a. (Penta, Česká republika)

aceton LiChrosolv (Merck, Německo)

ethanol (lihovar Kojetín, Česká republika)

mořský písek praný (PENTA, ČR)

voda deionizovaná

dusík 5.0 (LINDE, ČR)

vodík 3.0 (LINDE, ČR)

vzduch syntetický (LINDE, ČR)

#### **ROZTOKY**

*Extrakční rozpouštědlo* petrolether, izopropylalkohol a aceton v poměru (3 : 2 : 1)

*0,5 g.mol<sup>-1</sup> methanolický roztoku KOH* (3 g pevného hydroxidu draselného se rozpustí v 5 ml deionizované vody, doplní methanolem na konečný objem 100 ml) - *čerstvý*

*Ethanolický roztok methyloranže* (100 mg methyloranže se rozpustí v malém množství deionizované vody a poté doplní ethanolem na konečný objem 100 ml)

*FAME Mix o koncentraci 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>* (0,5 ml FAME Mix o koncentraci 10 mg.ml<sup>-1</sup> doplnit hexanem na celkový objem 10 ml)

#### **SKLO A POMŮCKY**

zkumavky centrifugační, mikrozkuhavky Eppendorf (1,5 ml), varné baňky s rovným dnem a zábrusem (100 ml), odměrné baňky (100 ml), odměrné válce (25 ml), pipety (2, 10 ml),

### INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

zpětné chladiče, skleněné kuličky, dělicí nálevky (250 ml), gumičky, filtrační papír KA2, stojan + kruhy na filtraci, vialky (2 ml), stojan na vialky, třecí misky s tloučky, patrony PSE

### PŘÍSTROJE, VYBAVENÍ A PROGRAMY

vodní lázeň, analytické váhy, odstředivka na zkumavky a mikrozkušavky, varná deska, magnetická míchačka, třepačka, vortex, vakuová rotační odparka, *one* PSE extraktor, plynový chromatograf, plamenově ionizační detektor, kapilární kolona VB-WAX, software Clarity

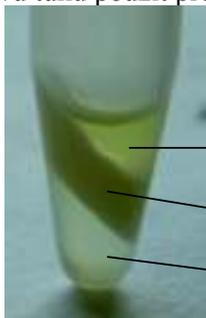
### PRACOVNÍ POSTUP

#### Izolace tuku

##### Mléko

Vzorek mléka vytemperovat ve vodní lázni na 40 °C, promíchat, rychle ochladit na 20 °C a znovu důkladně promíchat. Poté odměřit asi 10 ml zhomogenizovaného mléka do centrifugační zkumavky a odstředit při 3000 otáčkách.min<sup>-1</sup> po dobu 10 minut. Získanou tukovou vrstvu přenést do 1,5 ml mikrozkušavek a odstředit při pokojové teplotě, 13 000 otáčkách.min<sup>-1</sup> po dobu 20 minut.

Výsledkem poslední centrifugace je rozdělení vzorku do tří vrstev viz *obrázek č. 1*. Horní vrstvu tuku použít pro následnou přípravu esterů mastných kyselin.



tuk

bílkoviny, tuk a ve vodě nerozpustné pevné látky

voda

*Obr. 1*

##### Sýry

Do třecí misky dát 4 g sýru. Přidat 4 – 5 lžic hydromatrixu PSE, aby směs byla sypká. Přidat malou lžičku skleněných kuliček pro extrakci vzorku. Směs kvantitativně převést do patrony PSE a přidat dle potřeby mořský písek viz *obrázek č. 2*.



frita

filtrační papír  
uzavírací šroub

*Obr. 2*



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Extrakce na přístroji *one* PSE extraktor (Applied Separations, Inc., USA) s extrakčním rozpouštědlem za podmínek (na panelu zvolte metodu č. 20):

- 100 °C
- 100 bar
- čas 1 minuta
- 3 cykly

Po extrakci vzorek přefiltrovat přes vyžiháný bezvodý síran sodný a filtr K2 do baňky se zábrusem o objemu 250 ml a odpařit na vakuové rotační odparce právě do sucha.

### Příprava methylesterů mastných kyselin

Do 100 ml varné baňky se zábrusem navážit asi 100 mg vzorku tuku, přidat 15 ml 0,5 mol.l<sup>-1</sup> methanolickeho roztoku hydroxidu draselného a skleněné kuličky. Vzorek zmýdelňovat při teplotě 130 – 150 °C (na varné desce nastavit na č. 12) po dobu 30 minut pod zpětným chladičem. Po ochlazení směs zneutralizovat koncentrovanou kyselinou sírovou na methyloranž do růžového zbarvení. Přidat jednu kapku kyseliny navíc a směs poté při zahřívání reesterifikovat dalších 30 minut. Po ochlazení směs převést do 250 ml dělicí nálevky, přidat 15 ml hexanu a vytřepávat po dobu 15 minut. Po oddělení fází přefiltrovat horní organickou vrstvu přes filtr K2 a bezvodý síran sodný. Získaný čistý supernatant napipetovat do vialky.

### Chromatografické stanovení

Získané vzorky ve vialkách proměřit na plynovém chromatografu 6820 GC System (Agilent, USA) s automatickým dávkovačem vzorků a plamenově ionizační detekcí.

Řízení plynového chromatografu i autosampleru, sběr a zpracování dat se provádí pomocí počítače s chromatografickým softwarem Clarity (DataApex, ČR). Validační parametry byly stanoveny pomocí softwaru Effi Validation 3.0.

### Postup analýzy a zpracování dat

Do autosampleru umístíte vialky s hexanem, kalibračním roztokem a vzorky. Identifikace a kvantifikace mastných kyselin bude provedena na základě srovnání se standardem 37 mastných kyselin FAME MIX 37 (Supelco).

Při kvalitativní analýze se identifikace provádí srovnáním retenčních časů analytu a standardu. Kvantitativní analýza je založena na měření plochy píku nad základní linií, která je úměrná množství dané látky. Vyhodnocení se provádí metodou kalibrační křivky.

Ve výpočtu konečného množství jednotlivých methylesterů mastných kyselin je nutné zohlednit celkový objem použitého hexanu.

Výpočet multiplikačního koeficientu (multiplier): hexan (ml) / navážka vzorku (g) \* 1 g tuku

### Literatura

1. ČSN EN ISO 5509. *Animal and vegetable fats and oils – preparing of methyl esters of fatty acids*. Praha: Český normalizační institut, 2001, 40 s.
2. FENG, S., LOCK, AL., GARNSWORTHY, PC. A rapid lipid separation method for determining fatty acid composition of milk. *Journal of Dairy Science*, 2004, vol. 87, no. 11, p. 3785-3788.
3. *one* PSE Opereční manuál. Applied Separations, Inc. [www.appliedseparations.com](http://www.appliedseparations.com).
4. RICHARDSON, RK. Determination of fat in dairy products using pressurized solvent extraction. *Journal of AOAC International*, 2001, vol. 8, no. 5, p. 1522-1533.