



Pracownia studencka
Zakład Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 2

Analiza kwasów tłuszczowych z żółtka jajka
kurzego

ANALIZA PRODUKTÓW POCHODZENIA NATURALNEGO

Gdańsk, 2011

Celem ćwiczenia jest wykonanie analizy profilu kwasów tłuszczowych z żółtka jajka kurzego przy zastosowaniu dwóch metod:

1. ekstrakcja lipidów metodą Folcha i następnie zasadowa transestryfikacja,
2. bezpośrednia zasadowa transestryfikacja lipidów bez wcześniejszej ekstrakcji z próbki.

Studenci pracują w 2 grupach, z których każda wykonuje analizę profilu kwasów tłuszczowych wybraną metodą. Po wykonaniu analiz należy porównać i skomentować uzyskane wyniki.

Uwaga:

Szkoło laboratoryjne (pipety, cylindry, lejki) używane jedynie do czystych lotnych rozpuszczalników organicznych po wysuszeniu jest nadal czyste. Szkoło laboratoryjne używane do próbki lipidów należy po zakończeniu analiz dokładnie umyć w roztworze detergentu, dokładnie wypłukać i wysuszyć. Proszę podpisywać szkło laboratoryjne pisakiem do szkła, aby zapobiec ewentualnym pomyłkom.

Bloczek grzewczy należy wcześniej (na początku wykonywania ćwiczenia) ustawić oraz ustabilizować temperaturę 50 °C (ustawienie pokrętki na regulatorze mocy pomiędzy 0 a 1).

1. Ekstrakcja lipidów z żółtka jajka kurzego metodą Folcha

Odważyć około 20 mg liofilizatu żółtka z dokładnością do 0,1 mg i zanotować masę próbki. Przenieść ilościowo próbkę do próbówki szklanej o obj. 25 ml z dopasowanym korkiem.

Do próbówki odmierzyć 20 ml roztworu chloroform-metanol (2:1), następnie dodać 0,2 ml roztworu wzorca wewnętrznego - n-dokozanu o stężeniu $c = 10 \text{ mg/ml}$ i zawartość wymieszać poprzez intensywne wstrząsanie a następnie mieszanie przy użyciu Vortexu (3 min). Ekstrahować próbkę w ciągu 15 min na łaźni ultradźwiękowej w temp. pokojowej a następnie powtórnie wymieszać (3 min) i ponownie ekstrahować (15 min). Próbówkę do łaźni ultradźwiękowej należy wstawić w napełnionym wodą szklanym cylindrze.

Do próbówki odmierzyć 4 ml 0,9% roztworu NaCl, zawartość wymieszać poprzez intensywne wstrząsanie (3 min) a następnie pozostawić do całkowitego rozdzielenia się warstw. Za pomocą pipety o obj. 5 ml należy ostrożnie całkowicie usunąć warstwę wodną (górną). Dolną warstwę chloroformowo-metanolową zawierającą wyekstrahowane lipidy należy wysuszyć za pomocą bezwodnego siarczanu sodu, przesączyć i wprowadzić do kolbki. Ekstrakt należy odparować do sucha za pomocą wyparki obrotowej w temp. nieprzekraczającej 40 °C.

Potrzebne szkło i odczynniki:

roztwór chloroform-metanol (2:1) (150 ml),
0,9% wodny roztwór NaCl (250 ml),
mały słoik szklany,
bagietka szklana,
pipeta Pasteura,
pompka do pipet,
2 cylindry szklane o obj. 10 ml oraz 2 dopasowane do nich małe lejki,
próbówka szklana o obj. 25 ml zamykana plastikowym korkiem,
cylinder szklany,
pipeta o obj. 5 ml (o średnicy zew. mniejszej niż średnica wew. próbówki),
kolbka z dnem konicznym o obj. 50 ml z korkiem szklanym,
średni lejek pasujący do kolbki,
pisak do szkła,
roztwór wzorca wewnętrznego *n*-dokozanu w heksanie $c = 10$ mg/ml.

2. Transestryfikacja próbki lipidów

Uwaga:

Reakcja z użyciem roztworu metanolanu sodu wymaga bezwodnych warunków, co oznacza, że należy przechowywać go w zakręconym naczyniu i szybko pobierać idealnie suchą pipetą; również próbka lipidów musi być sucha. Należy pamiętać, że po otwarciu naczynia roztwór chłonie wilgoć z powietrza.

Próbkę wydzielonych lipidów (o masie do 50 mg), rozpuszczonych w 1 ml toluenu, należy przenieść do próbówki o obj. 15 ml zamykanej plastikowym korkiem. Do próbki dodać za pomocą suchej pipety 2 ml roztworu 0,5 M metanolanu sodu w bezwodnym metanolu. Roztwór należy ogrzewać w bloczku grzejnym w temperaturze 50 °C w ciągu 10 min. Po zakończeniu reakcji transestryfikacji próbkę należy ochłodzić, dodać 5 ml 2% wodnego roztworu kwasu octowego i intensywnie wymieszać. Po zubożeniu próbki należy wyekstrahować uzyskane estry metylowe kwasów tłuszczowych poprzez intensywną ekstrakcję heksanem (5 ml) z fazy metanolowo-wodnej używając pipety do ostrożnego wydzielenia warstwy heksanowej (górnej) po rozdzieleniu się warstw. Należy pobrać jedynie warstwę górną nie naruszając warstwy dolnej; w razie trudności można zostawić odrobinę warstwy górnej w próbówce ze względu na to, że do analizy ilościowej zastosowano wzorzec wewnętrzny dodany na początkowym etapie procedury wyodrębniania i spochadniania próbki. Ekstrakcję należy powtórzyć (5 ml heksanu). Połączone ekstrakty heksanowe należy wysuszyć za pomocą bezwodnego siarczanu sodu, przesączyć i zatężyć na wyparce obrotowej do objętości około 1 ml.

Potrzebne szkło i odczynniki:

2 próbówki szklane o obj. 15 ml zamykana plastikowym korkiem,
2 pipety o obj. 5 ml (o średnicy zew. mniejszej niż średnica wew. próbówki),
pipeta o obj. 5 ml,
pompka do pipet,
2 kolbki z dnem konicznym o obj. 50 ml z korkiem szklanym,
2 średnie lejki do przesączenia ekstraktu heksanowego pasujące do kolbki
2 cylindry szklane o obj. 10 ml oraz 2 dopasowane do nich małe lejki
łyżka,
reduktor pasujący do kolbki

0,5 M roztwór metanolanu sodu w metanolu (wykonany poprzez rozpuszczenie 1,4 g sodu w 50 ml bezwodnego metanolu)

2% wodny roztwór kwasu octowego (100 ml)

heksan destylowany (50 ml)

toluen destylowany (50 ml)

bezwodny siarczan sodu,

sączki

3. Bezpośrednia transestryfikacja lipidów

Zważyć zakręcane szklane naczynko o objętości 4 ml z dokładnością do 0,1 mg. Wprowadzić do naczynka około 20 mg żółtka. Pobraną próbkę żółtka należy zważyć z dokładnością do 0,1 mg i masę próbki zanotować.

Następnie do próbki dodać 1 ml toluenu oraz 0,2 ml roztworu wzorca wewnętrznego - n-dokozanu o stężeniu $c = 10$ mg/ml. Do próbki dodać za pomocą suchej pipety 2 ml roztworu 0,5 M metanolanu sodu w bezwodnym metanolu i intensywnie wymieszać. Roztwór należy ogrzewać w bloczku grzejmym w temperaturze 50 °C w ciągu 10 min, następnie poddać działaniu łaźni ultradźwiękowej przez 5 minut i ponownie ogrzewać w bloczku grzejmym w temperaturze 50 °C w ciągu 10 min okazjonalnie wstrząsając.

Po zakończeniu reakcji transestryfikacji próbkę należy ochłodzić i dalej należy postępować według procedury **transestryfikacji próbki lipidów** (punkt 2), z tym, że należy przenieść próbkę do próbówki o obj. 15 ml zamykanej plastikowym korkiem w celu ekstrakcji estrów metylowych.

Potrzebne szkło i odczynniki:

pipeta Pasteura,

zakręcane szklane naczynko o objętości 4 ml.

4. Analiza chromatograficzna GC-FID

Uwaga:

Chromatograf gazowy należy wcześniej (na początku wykonywania ćwiczenia) włączyć i przygotować do analiz. Analizy chromatograficzne są długotrwałe – należy dobrze rozplanować ich wykonanie.

Należy wykonać następujące analizy chromatograficzne:

1. analizę roztworu wzorca wewnętrznego o stężeniu $c = 1 \text{ mg/ml}$ w celu oznaczenia jego czasu retencji,
2. analizę wzorcowego roztworu estrów metylowych kwasów tłuszczowych w celu oznaczenia ich czasów retencji,
3. analizy przygotowanych próbek lipidów z żółtka jaja kurzego,
4. analizę roztworu wzorca cholesterolu o stężeniu $c = 1 \text{ mg/ml}$ w celu oznaczenia jego czasu retencji.

Warunki pracy chromatografu gazowego firmy **CE Instruments**:

- kolumna kapilarna RTX-5, długość 25 m, średnica wewnętrzna 0,25 mm,
- temperatura dozownika 320 °C, temperatura detektora 320 °C,
- analiza w warunkach programowanej temperatury kolumny od 170 °C do 240 °C, narost temperatury 4 °C/min, a następnie od 240 °C do 320 °C, narost temperatury 8 °C/min, izotermicznie 10 min,
- gaz nośny - argon, ciśnienie gazu nośnego 90 kPa,
- detektor płomieniowo - jonizacyjny FID,
- objętość dozowania próbki ~1 μl ,

Warunki pracy chromatografu gazowego firmy **Hewlett-Packard 5890**:

- kolumna kapilarna DB-5, długość 12,5 m, średnica wewnętrzna 0,25 mm,
- temperatura dozownika 300 °C, temperatura detektora 300 °C,
- analiza w warunkach programowanej temperatury kolumny od 140 °C do 290 °C, narost temperatury 4 °C/min,
- gaz nośny - argon,
- detektor płomieniowo - jonizacyjny FID,
- objętość dozowania próbki ~1 μl ,
- metoda rejestracji chromatogramów - Method 40.

Potrzebne szkło i odczynniki:

chlerek metylenu do mycia strzykawki chromatograficznej (25 ml),

strzykawka chromatograficzna 10 μ l oraz 100 μ l,

roztwór wzorcowy estrów metylowych kwasów tłuszczowych oznaczony „jajko I”,

roztwór wzorca wewnętrznego *n*-dokozanu w toluenie $c = 1$ mg/ml,

roztwór wzorca cholesterolu w toluenie $c = 1$ mg/ml.

5. Opracowanie wyników analiz

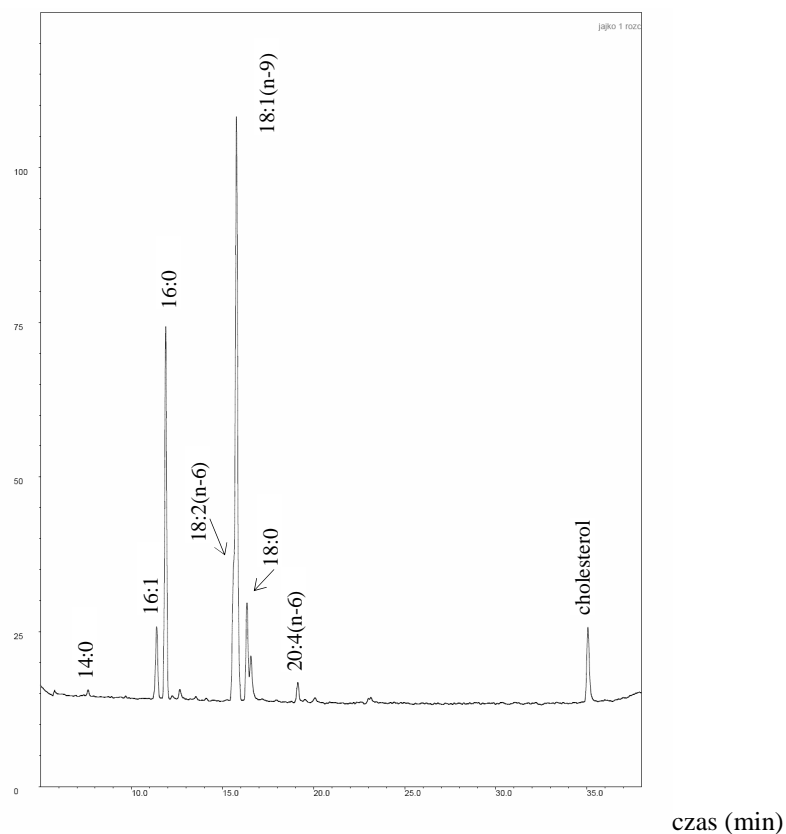
Po wykonaniu analiz należy:

1. zidentyfikować estry metylowe kwasów tłuszczowych oraz cholesterol w badanej próbce,
2. określić zawartość kwasów tłuszczowych oraz cholesterolu w przeliczeniu na masę żółtka,
3. obliczyć zawartość procentową kwasów tłuszczowych w sumie kwasów tłuszczowych,
4. porównać profile kwasów tłuszczowych z lipidów żółtka jajka kurzego oznaczone 2 różnymi metodami i przedyskutować wyniki,
5. porównać uzyskane profile kwasów tłuszczowych z chromatogramami zamieszczonymi na rys. 1 w części teoretycznej *Analiza lipidów* oraz na rys. 1 i 2 w bieżącej instrukcji; przedyskutować wpływ warunków chromatograficznych na uzyskanie rozdzielania pików chromatograficznych,

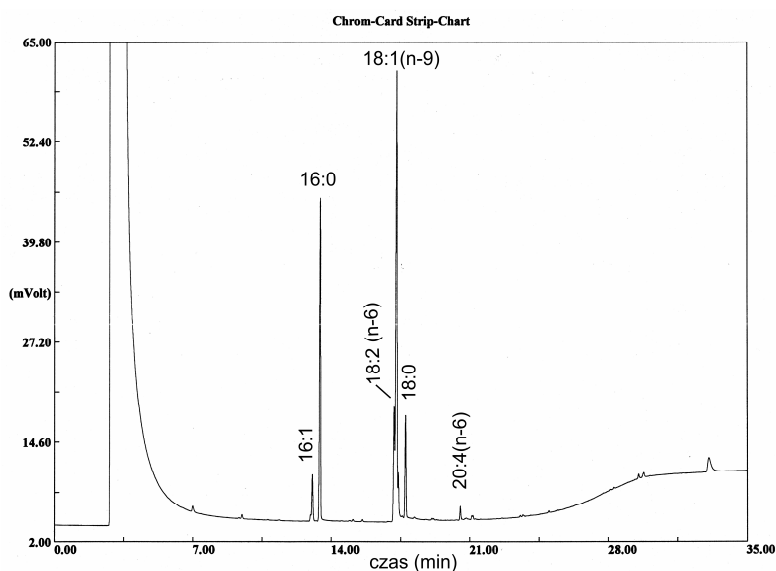
Prawidłowo wykonane sprawozdanie powinno zawierać pełną dokumentację analizy jakościowej oraz ilościowej (należy załączyć uzyskane chromatogramy wraz z odpowiednim opisem, patrz rys. 1; należy podać i porównać czasy retencji wzorców i analitów).

Zagadnienia do przygotowania:

1. Chromatografia gazowa – teoria procesu chromatograficznego, sprzęt, dobieranie warunków analizy, analiza ilościowa i jakościowa.
2. Lipidy – definicja, występowanie, budowa, nomenklatura.
3. Analiza lipidów.
4. Reakcje hydrolizy, estryfikacji i transestryfikacji.
5. Procedura analizy kwasów tłuszczowych z żółtka jajka kurzego.



Rys. 1. Przykładowy chromatogram GC-FID roztworu wzorcowego estrów metylowych kwasów tłuszczowych oraz cholesterolu. Chromatograf gazowy firmy Hewlett-Packard 5890. Kolumna kapilarna DB-5 (faza stacjonarna niepolarna), 12,5 m × 0,25 mm; 0,25 μm grubość filmu fazy stacjonarnej. Analiza w warunkach programowanej temp. od 140 °C do 290 °C, narost 4°C/min.



Rys. 2. Przykładowy chromatogram GC-FID roztworu wzorcowego estrów metylowych kwasów tłuszczowych. Chromatograf gazowy firmy CE Instruments. Kolumna kapilarna RTX-5 (faza stacjonarna niepolarna), 25 m × 0,25 mm; 0,25 μm grubość filmu fazy stacjonarnej. Analiza w warunkach programowanej temp. od 170 °C do 240 °C, narost temperatury 4 °C/min, a następnie od 240 °C do 320 °C, narost temperatury 8 °C/min, izotermicznie 10 min.