



Pracownia studencka  
**Zakład Analizy Środowiska**

# Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

## Ćwiczenie nr 3

### Oznaczanie witaminy E w oleju metodą HPLC

ANALIZA PRODUKTÓW POCHODZENIA NATURALNEGO

Gdańsk, 2011

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości witaminy E w oleju roślinnym metodą dodatku wzorca z wykorzystaniem zestawu HPLC. Pomysł eksperymentu został zaadaptowany z publikacji Ryynänen *et al.*, *A small-scale sample preparation method with HPLC analysis for determination of tocopherols and tocotrienols in cereals*, 2004.

*Uwaga:*

**Szko laboratoryjne** (pipety, cylindry, lejki) używane jedynie do czystych lotnych rozpuszczalników organicznych po wysuszeniu jest nadal czyste. Szko laboratoryjne używane do próbek należy po zakończeniu analiz dokładnie umyć w roztworze detergentu, dokładnie wypłukać i wysuszyć. Proszę podpisywać szkło laboratoryjne pisakiem do szkła, aby zapobiec ewentualnym pomyłkom. Nie należy suszyć rozdzielacza w suszarce – wystarczy pozostawić otwarty na statywie, aby wysechł w temp. pokojowej.

**Bloczek grzejny** należy wcześniej (na początku wykonywania ćwiczenia) ustawić oraz ustabilizować temperaturę 95 - 100 °C (ustawienie pokrętki na regulatorze mocy pomiędzy 3 a 4).

W czasie zmydiania i innych etapów izolacji **witaminy E** należy chronić próbkę przed działaniem światła i tlenu. Naczynia należy osłaniać folią aluminiową, jeśli to możliwe, czynności wykonywać bez dostępu światła. Zmydianie wykonywać w atmosferze gazu obojętnego, np. azotu.

## 1. Zmydianie oleju

Zważyć zakręcane szklane naczynko (lub próbkówkę szklaną z nakrętką plastikową) o objętości 10 ml z dokładnością do 0,1 mg. Wprowadzić do naczynka około 10 - 40 mg badanego oleju za pomocą pipety Pasteura uważając, aby próbka znalazła się w dolnej części próbkówki. W żadnym wypadku nie można zostawić próbki oleju na ściankach próbkówki powyżej 1/5 wysokości próbkówki, ponieważ nie ulegnie zmydłaniu. Pobraną próbkę należy zważyć z dokładnością do 0,1 mg i zanotować masę próbki.

Do naczynka dodać 0,03 g kwasu askorbinowego, 1,5 mL etanolu i 0,5 mL wody a następnie zawartość wymieszać przy użyciu Vortexu (1 min, pokrętko ustawione na około 3,5-4). Przedmuchać próbkówkę azotem i dodać 0,2 mL roztworu KOH za pomocą pipety automatycznej *eppendorf*.

Roztwór należy ogrzewać w bloczku grzejnym w temperaturze 95 - 100 °C w ciągu 25 min. Po 10 minutach ogrzewania zawartość wymieszać przy użyciu Vortexu (1 min; pokrętko ustawione na około 3,5-4; *uwaga:* należy założyć okulary ochronne) i wstawić ponownie do bloczka grzejnego. Po zakończeniu reakcji zmydłania próbkę należy ochłodzić.

## 2. Ekstrakcja

Do próbki dodać 0,8 mL wody i 0,8 mL etanolu. Ekstrahować witaminę E trzykrotnie za pomocą mieszaniny heksan-octan etylu (8:2) (po 3,5 ml) z fazy etanolowo-wodnej, używając pipety do ostrożnego pobrania warstwy heksanowej (górnej) **po dokładnym rozdzieleniu się warstw**. Ekstrakcję prowadzić w tym samym naczynku szklanym, w którym prowadzono zmydlanie. Należy pobrać jedynie warstwę górną, nie naruszając warstwy dolnej. Zebrane ekstrakty organiczne połączyć w rozdzielaczu, dodać 5 mL heksanu i trzykrotnie przemyć wodą (po 10 mL). Ekstrakt organiczny należy przesączyć przez sączek (zawierający około 1 łyżeczki do herbaty bezwodnego siarczanu(VI) sodu) bezpośrednio do kolbki do odparowywacza z dnem konicznym. Przemyć sączek dodatkową porcją 5 mL heksanu. Ekstrakt odparować do sucha za pomocą wyparki obrotowej w temp. nie przekraczającej 35 °C i **natychmiast** zdjąć kolbkę z wyparki. Witamina E jest nieodporna na działanie światła i tlenu, dlatego nie wolno nadmiernie długo pozostawić próbki w kolbce bez rozpuszczalnika. Do kolbki dodać 2 mL metanolu i ewentualnie przefiltrować przez filtr membranowy 0,45 µm (według wskazówek prowadzącego).

## 3. Analiza chromatograficzna HPLC

Należy wykonać następujące analizy chromatograficzne:

1. analizę roztworu wzorca witaminy E o stężeniu  $c = 0,2$  mg/ml w celu oznaczenia czasu retencji,
2. analizy próbki zmydlonego oleju.

Analiza próbki zmydlonego oleju może być wykonana metodą dodatku wzorca dwoma następującymi sposobami:

- Ekstrakt rozpuszczony w 2 mL metanolu podzielić na 2 równe próbki (*próbka 1* – bez dodatku wzorca, *próbka 2* – z dodatkiem wzorca). Do próbki 2 dodać 20 µl roztworu witaminy E o stężeniu 2,2 mg/ml. Obie próbki poddać trzykrotnej analizie HPLC.
- Ekstrakt rozpuszczony w 2 mL metanolu poddać trzykrotnie analizie HPLC (*próbka 1* – bez dodatku wzorca). Porównać wynik z wynikiem analizy HPLC roztworu wzorca witaminy E o stężeniu  $c = 0,2$  mg/ml i określić objętość roztworu wzorca witaminy E o stężeniu 2,2 mg/ml, którą należy dodać do próbki oleju, aby osiągnąć maksymalnie dwukrotny wzrost wysokości piku chromatograficznego witaminy E. Następnie do próbki dodać określoną objętość roztworu witaminy E o stężeniu 2,2 mg/ml,

wymieszać i poddać próbkę ponownej trzykrotnej analizie HPLC (próbka 2 – z dodatkiem wzorca).

*Uwaga: w obu przypadkach należy wziąć pod uwagę zmiany objętości roztworów przy analizie ilościowej metodą dodatku wzorca.*

Warunki pracy chromatografu cieczowego HPLC:

- kolumna HPLC RP-18,
- elucja izokratyczna, faza ruchoma metanol 100%,
- przepływ fazy ruchomej 0,6 ml/min,
- detektor spektrofotometryczny UV/Vis,
- długość fali  $\lambda = 292$  nm, ABS 0,002.

## 5. Opracowanie wyników analiz

Po wykonaniu analiz należy:

1. zidentyfikować witaminę E w badanej próbce,
2. określić zawartość witaminy E w przeliczeniu na masę oleju metodą dodatku wzorca,

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

### Zagadnienia do przygotowania:

1. Chromatografia cieczowa HPLC – teoria procesu chromatograficznego, sprzęt, analiza ilościowa i jakościowa.
2. Witaminy – definicja, występowanie, budowa, nomenklatura.
3. Analiza witamin.
4. Reakcje hydrolizy i zmydlania tłuszczu.
5. Procedura analizy witaminy E w oleju roślinnym.

### Literatura

1. Ryyänen, M.; Lampi, A.-M.; Salo-Väänänen, P.; Ollilainen, V.; Piironen, V. A small-scale sample preparation method with HPLC analysis for determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Food Composition and Analysis* **17** (2004) 749–765.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157503001546>

*Potrzebne szkło i odczynniki:*

roztwór KOH w wodzie (przygotowany poprzez rozpuszczenie 50 g KOH w 100 mL wody),  
roztwór heksan - octan etylu (8:2) (100 mL),  
heksan destylowany (50 mL),  
etanol (50 mL),  
bezwodny siarczan sodu,  
pipeta Pasteura,  
pompka do pipet,  
1 naczynko szklane o obj. 10 ml z nakrętką,  
cylinder o obj. 10 mL,  
zlewka o obj. 50 mL – 3 szt.,  
pipeta o obj. 5 ml (o średnicy zew. mniejszej niż średnica wew. naczynka szklanego) – 2 szt.,

metanol do mycia strzykawki chromatograficznej (25 ml),  
strzykawka chromatograficzna 100  $\mu$ l,  
roztwór wzorca witaminy E w metanolu  $c = 0,2$  mg/ml,  
roztwór wzorca witaminy E w metanolu  $c = 2,2$  mg/ml,

pipeta o obj. 1 ml (o średnicy zew. mniejszej niż średnica wew. naczynka szklanego) – 3 szt.,  
rozdzielacz o obj. 50 lub 100 mL,  
statyw pasujący do rozdzielacza,  
kolbka z dnem konicznym o obj. 50 ml z korkiem,  
reduktor do odparowywacza pasujący do kolbki,  
średni lejek pasujący do kolbki,  
sączki pasujące do lejka,  
pisak do szkła,  
łyżka metalowa,  
łopatka dentystryczna,