



Pracownia studencka
Katedry Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 4

**ANALIZA KWASÓW TŁUSZCZOWYCH
W SMALCU
METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ**

Analiza żywności

Gdańsk, 2008

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Wprowadzenie

Lipidy to obszerna grupa organicznych związków naturalnych występujących we wszystkich organizmach żywych. Są to substancje o bardzo złożonej i różnorodnej budowie, ulegające wielu przemianom. Z uwagi na funkcje, jakie pełnią w ustroju ich obecność w diecie człowieka jest absolutnie niezbędna do zapewnienia prawidłowego rozwoju. *Tłuszcze* z kolei są wieloskładnikową mieszaniną różnych lipidów. Możemy je spotkać w naszym życiu codziennym. Większe ilości tłuszczów występują bowiem w tkankach zwierzęcych (smalec, tran, itp.) a także w nasionach roślin (oleje, masło kakaowe, itp.).

2. Klasyfikacja lipidów

Z uwagi na pewne podobieństwa strukturalne, lipidy podzielono na trzy zasadnicze grupy:

I. *lipidy proste* (estry kwasów tłuszczowych i alkoholi):

- *tłuszcze właściwe* - estry kwasów tłuszczowych i glicerolu. Kwasy tłuszczowe wchodzące w skład tych lipidów można podzielić na nasycone (palmitynowy, stearynowy) i nienasycone (arachidowy, oleinowy). Występują tu także kwasy polienowe (zawierające więcej niż jedno wiązanie podwójne) jak np. kwas linolowy – przedstawiciel tzw. - niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT).
- *woski* – estry wyższych kwasów tłuszczowych i wyższych alkoholi jednowodorotlenowych (innych niż glicerol);

II. *lipidy złożone* (związki zawierające w strukturze chemicznej oprócz kwasów tłuszczowych i alkoholi również inne składniki):

- *fosfolipidy* – lipidy zawierające kwas fosforowy jako mono- lub diester np. glicerofosfolipidy i sfingofosfolipidy,
- *glikolipidy* – związki zawierające przynajmniej jedną resztę cukrową połączoną wiązaniem glikozydowym z częścią lipidową np. glikoglicerolipidy i glikosfingolipidy,
- *inne lipidy złożone* – np. sulfolipidy;

III. *lipidy wtórne* (pochodne lipidów prostych i złożonych, powstałe głównie w wyniku ich hydrolizy, zachowujące ogólne właściwości lipidów):

- *kwasy tłuszczowe*,
- *alkohole lipidowe* – sterole, barwniki,
- *węglowodory*.

3. Tłuszcze jadalne i ich znaczenie

Tłuszcze obecne w surowcach i produktach żywnościowych są wieloskładnikową mieszaniną różnych lipidów. Ich podstawowym, choć nie jedynym, składnikiem są triacyloglicerole (TAG). Wszystkie pozostałe lipidy znajdujące się w tłuszczach naturalnych potocznie nazywa się *substancjami wspomagającymi*, a są to m.in.: fosfolipidy, sterole, węglowodory, alkohole alifatyczne oraz witaminy rozpuszczalne w tłuszczach (A, D, E i K). Zawartość poszczególnych składników zależy od rodzaju i pochodzenia tłuszczu, a także od stanu jego świeżości i procesów, jakim był poddany przed i po wydzieleniu z surowca.

Produkty spożywcze, takie jak: masło, smalec, margaryna lub oleje roślinne określa się nazwą *tłuszcze widoczne*. Stanowią one ok. 45 % spożywanego tłuszczu. Natomiast tłuszcze, które są naturalnymi składnikami różnych produktów żywnościowych – mięsa, ryb czy mleka - są nazywane *tłuszczami niewidocznymi* i stanowią ok. 55 % spożywanego tłuszczu. Tłuszcze widoczne zawierają w swym składzie głównie triacyloglicerole oraz ok. 1 % tzw. substancji niezmydlającej, którą w większości stanowią witaminy rozpuszczalne w tłuszczach (A, D, E). Mogą tu również występować substancje obce, celowo dodane w celu podniesienia jakości i trwałości produktu. Są to: witaminy (D, A), konserwanty (kwas benzoesowy), przeciwutleniacze (tokoferol), emulgatory (lecytyna) lub barwniki (karoten).

Tłuszcze jadalne, ze względu na występowanie w przyrodzie, podzielono na *roślinne* i *zwierzęce*. Pierwsze są płynne, ponieważ obfitują w wielonienasycone kwasy tłuszczowe, a w ich składzie znaczny procent stanowią NNKT. Tłuszcze zwierzęce z kolei, w temperaturze pokojowej są stałe, co wiąże się z przewagą ilości występujących w nich nasyconych kwasów tłuszczowych.

Zawartość tłuszczu w produktach spożywczych waha się w szerokim zakresie. W grupie produktów zaliczanych do tłuszczów jadalnych (oleje, smalec, masło) stanowi on 75–100% masy. Tłuszcze stołowe o obniżonej kaloryczności, np. margaryny niskokaloryczne, zawierają od 40 do 55 % związków tłuszczowych. Zawartość tłuszczu w niektórych artykułach spożywczych przedstawia Tabela 1.

Tabela 1 Zawartość tłuszczu w wybranych surowcach i produktach spożywczych, w g/100 g części jadalnych.

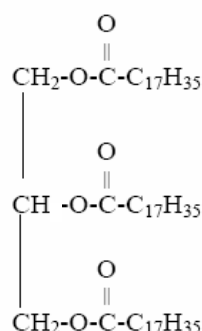
Produkt	Zawartość tłuszczu w g/100 g produktu
Kefir, jogurty, chudy twaróg, zwykłe pieczywo	0-3
Mięso indyka	3-8
Mięso kurcząt	7-4
Jaja	12-14
Ser żółty, parówki, wafle nadziewane	25-30
Chipsy ziemniaczane	20-40
Pączki	20-25

Lipidy są składnikiem żywności niezbędnym do zapewnienia prawidłowego rozwoju naszego organizmu. Pełnią bardzo istotne funkcje. Przede wszystkim są głównym i najbardziej skoncentrowanym źródłem energii. Pod względem wartości energetycznej przewyższają wszystkie inne składniki pokarmowe. Przykładowo, z jednego grama tłuszczu uzyskać można ok. 37,7 kJ, a więc w przybliżeniu dwa razy więcej energii niż z podobnej ilości białka i sacharydów. Ponadto związki te pełnią w ustroju człowieka ważną rolę strukturalną. Triacyloglicerole, fosfolipidy oraz cholesterol i jego estry stanowią część składową komórek ustrojowych, m.in.: błon i organelli komórkowych. Dodatkowo, triacyloglicerole są też głównym składnikiem zapasowej tkanki tłuszczowej. Z racji tego, że tłuszcze są słabymi przewodnikami ciepła są doskonałymi izolatorami termicznymi. Ponadto pełnią funkcję ochronną dla organów wewnętrznych. Istotnym jest także fakt, że tłuszcze zawarte w diecie dostarczają niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT). Jest to o tyle ważne, gdyż kwasy te warunkują prawidłowy rozwój organizmu człowieka, a nie są endogennie syntetyzowane. Oprócz tego tłuszcze odgrywają w organizmie rolę rozpuszczalników wielu substancji, głównie witamin oraz karotenoidów, ułatwiając w ten sposób ich wchłanianie.

Spełniają one również wiele istotnych funkcji w technologii żywności. Stosuje się je jako czynnik kontrolowanego przenoszenia ciepła (np. tłuszcze smaźnicze). Ponadto mają duże znaczenie w kształtowaniu cech organoleptycznych produktów tłuszczowych. Wpływają bowiem korzystnie na takie cechy jak: wygląd, tekstura, konsystencja, zapach, smak czy mazistość. Ważną rolę w technologii żywności spełniają także poszczególne składniki tłuszczów lub różne pochodne lipidów. Przykładowo mono- i diacyloglicerole oraz lecytyna są powszechnie stosowane jako emulgatory.

4. Tłuszcze – budowa i właściwości chemiczne

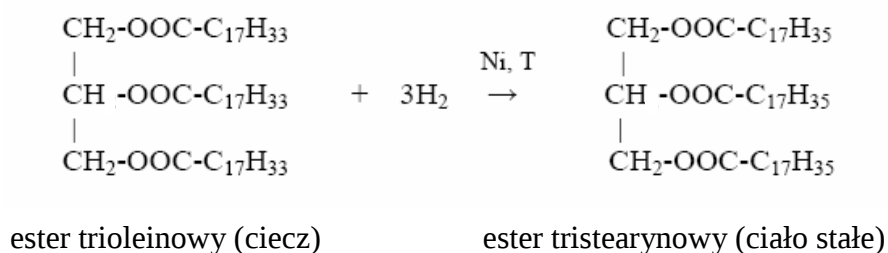
Tłuszcze pod względem chemicznym to estry gliceryny i wyższych kwasów tłuszczowych, zwane ogólnie *glicerydami*. Glicerol, jako alkohol trihydroksylowy, tworzy estry z trzema cząsteczkami kwasów. Mogą to być pochodne różnych kwasów nasyconych (np. stearynowy $C_{17}H_{35}COOH$, palmitynowy $C_{15}H_{31}COOH$) lub kwasów nienasyconych (np. oleinowy $C_{17}H_{33}COOH$, oraz linolowy $C_{17}H_{31}COOH$). Poniżej przedstawiono wzór przykładowej cząsteczki tłuszczu.



Tłuszcze są związkami o niskiej polarności, dlatego nie rozpuszczają się w wodzie, zaś dobrze rozpuszczają się w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych, takich jak: eter etylowy, eter naftowy, chloroform, heksan, benzen, tetrachlorek węgla i in. Ponieważ tłuszcze “pływają” po powierzchni wody, oznacza to, że mają od niej mniejszą gęstość. Jako mieszaniny nie mają ściśle określonej temperatury topnienia.

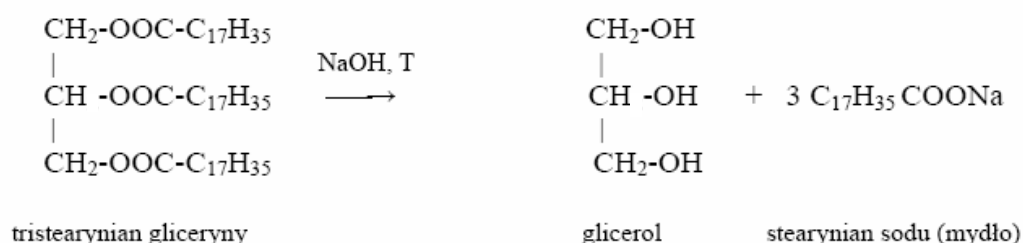
Triacyloglicerole w stanie stałym wykazują zjawisko tzw. *polimorfizmu*, co oznacza, że mogą występować w kilku formach krystalicznych. Przemiany polimorficzne z kolei bardzo silnie wpływają na właściwości reologiczne (konsystencję, plastyczność) i inne cechy fizyczne wielu produktów tłuszczowych. Z punktu widzenia zastosowań przemysłowych jest to więc zjawisko niepożądane. Przekształcenie jednej formy w drugą zachodzi wskutek np. ogrzewania, chłodzenia lub też jako wynik krystalizacji z różnych rozpuszczalników. Do badania tego zjawiska wykorzystuje się różne metody, m.in. kalorymetrię, dylatometrię, spektroskopię w podczerwieni oraz dyfrakcję promieni rentgenowskich.

Z uwagi na obecność nienasyconych kwasów tłuszczowych w cząsteczce tłuszczu związki te ulegają reakcjom **addycji** (przyłączania) (np. reakcja uwodornienia). Przykład takiej reakcji podano poniżej.



W podanym wyżej równaniu reakcji wodór przyłączył się do wiązań podwójnych, w efekcie czego cała cząsteczka uległa nasyceniu. Dodatkowo tłuszcz zmienił stan skupienia z ciekłego na stały. Reakcja uwodornienia stosowana jest powszechnie w przemyśle spożywczym podczas produkcji margaryny i nosi nazwę utwardzania tłuszczu.

Kolejną, charakterystyczną reakcją, jakiej ulegają tłuszcze, jest **hydroliza zasadowa**, zwana inaczej reakcją zmydlania lub saponifikacji tłuszczów. Jest ona bardzo powszechnie wykorzystywana w przemyśle do otrzymywania mydła. Hydroliza tłuszczów zachodzi także w organizmach człowieka i zwierząt, ale jedynie w obecności specjalnych enzymów, zwanych lipazami. Poniżej przedstawiono równanie reakcji hydrolizy tristearynianu gliceryny.



Jak obrazuje powyższe równanie, hydroliza tłuszczu wodnym roztworem NaOH daje cząsteczkę gliceryny i trzy cząsteczki soli sodowej kwasu tłuszczowego, czyli pospolite mydło. Niekiedy określenie „zmydlanie tłuszczu” stosuje się także i do tych przypadków hydrolizy, w których mydło nie powstaje, a produktami są: glicerol oraz wolne kwasy tłuszczowe (np. uczucie śliskości skóry po kontakcie z alkaliem to właśnie wynik tej reakcji). Otrzymane w ten sposób kwasy tłuszczowe są w zasadzie nierozgałęzione i zawierają parzystą liczbę atomów węgla od 12 do 20. Jeżeli w cząsteczce obecne są wiązania podwójne, przyjmują one zwykle geometrię *cis*. Ponieważ najwięcej uwagi w analizie lipidów poświęca się kwasom tłuszczowym, zostaną one szczegółowo omówione w następnym podrozdziale.

5. Charakterystyka kwasów tłuszczowych

Większość kwasów tłuszczowych, nasyconych i nienasyconych, należy do związków o prostym łańcuchu i parzystej liczbie atomów węgla w cząsteczce. Kwasy tłuszczowe o łańcuchach rozgałęzionych lub o nieparzystej liczbie atomów węgla występują na ogół rzadko i w niewielkich ilościach. W przyrodzie istnieje ok. 40 różnych kwasów tłuszczowych (od C_2 do ponad C_{80}) przy czym najczęściej spotykane są kwasy C_{16} , C_{18} , C_{20} i C_{22} . Z kolei w tłuszczach naturalnych występują wyłącznie kwasy zawierające od 4 do 24 atomów C w cząsteczce.

Kwasy tłuszczowe są cieciami lub ciałami stałymi. Ich temperatury topnienia rosną wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej. Obecność w łańcuchu podwójnego wiązania powoduje z kolei obniżenie temperatury topnienia. Na temperaturę topnienia wpływają także inne czynniki np. konfiguracja przestrzenna wiązań podwójnych, ich położenie w łańcuchu węglowodorowym, a także czy kwas jest parzysto - czy nieparzystowęglowy.

W porównaniu z węglowodorami, kwasy tłuszczowe o podobnej długości podstawników alkilowych mają wyjątkowo wysokie temperatury wrzenia. Dzieje się tak ze względu na dodatkową obecność grup karboksylowych, pomiędzy którymi dochodzi do tworzenia się bardzo silnych wiązań wodorowych, w efekcie których następuje dimeryzacja kwasów.

Rozpuszczalność kwasów tłuszczowych w wodzie maleje w miarę wzrostu liczby atomów węgla w łańcuchu (do 4 at. C - rozpuszczalne, od 4 do 12 at. C - słabo rozpuszczalne, powyżej 12 at C - praktycznie nierozpuszczalne). Znacznie lepiej związki te rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak: benzen, etanol, benzyna, izopropanol.

W tłuszczach występują dwa główne rodzaje kwasów tłuszczowych:

- **Nasycone kwasy tłuszczowe** – nie mają wiązań podwójnych; najbardziej rozpowszechnione w tej grupie są: kwas palmitynowy – $C_{15}H_{31}COOH$ – znajduje się między innymi w oleju bawełnianym, mleku, rybach oraz kwas stearynowy – $C_{17}H_{35}COOH$ – obecny głównie w tłuszczach zapasowych przeżuwaczy i maśle kakaowym.
- **Nienasycone kwasy tłuszczowe** – to kwasy, które w swojej cząsteczce posiadają przynajmniej jedno wiązanie podwójne; wyróżnić tu można:
 - *monoenowe kwasy tłuszczowe* – mające tylko jedno wiązanie podwójne najczęściej w konfiguracji *cis* (kwasy o konfiguracji *trans* w naturze występują sporadycznie; duże ilości *trans*-izomerów w tłuszczach żywnościowych są wynikiem procesów modyfikacyjnych, np. katalicznego uwodornienia). Przedstawicielem w tej grupie jest kwas oleinowy – $C_{17}H_{33}COOH$ – przyjmuje się, że stanowi on aż 40 % wszystkich kwasów tłuszczowych.

o *polienowe kwasy tłuszczowe w skrócie PUFA* – naturalnie występujące kwasy polienowe zawierają od 2 do 6 wiązań podwójnych przeważnie o konfiguracji *cis* ułożonych zazwyczaj w następujący sposób $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$. Najpopularniejsze w tej grupie kwasów są kwas linolowy (*cis, cis*-9,12-oktadekadienowy) – obecny prawie we wszystkich tłuszczach, głównie jednak w olejach roślinnych np. słonecznikowym; oraz kwas linolenowy (*cis, cis, cis*-9,12,15-oktadekatrienowy) – obecny w oleju lnianym, sojowym i rzepakowym. Niektóre spośród kwasów polienowych są niezbędne do prawidłowego rozwoju i normalnego funkcjonowania organizmu. Kwasy te określa się mianem niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT). Mają one szczególne znaczenie w żywieniu człowieka. Odgrywają ważną rolę w zapobieganiu i leczeniu miażdżycy oraz innych stanów chorobowych prowadzących do zaburzeń gospodarki lipidów w ustroju. Ponadto powodują obniżenie poziomu cholesterolu w surowicy krwi, poprawiają pracę serca i przepływ krwi przez naczynia wieńcowe.

W Tabeli 2 przedstawiono przybliżony skład tłuszczów i olejów z różnych źródeł.

Tabela 2. Przybliżony skład niektórych tłuszczów i olejów

Źródło	Nasycone kwasy tłuszczowe [%]				Nienasycone kwasy tłuszczowe [%]		
	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈	C ₁₈	C ₁₈	C ₁₈
	laurynowy	mirystylowy	palmitynowy	stearynowy	oleinowy	rycynoleinowy	linolowy
Tłuszcze zwierzęce							
smalec	-	1	25	15	50	-	6
masło	2	10	25	10	25	-	5
tłuszcz ludzki	1	3	25	8	46	-	10
tłuszcz wielorybi	-	8	12	3	35	-	10
Oleje roślinne							
kokosowy	50	18	18	2	6	-	1
kukurydziany	-	1	10	4	35	-	45
z oliwek	-	1	5	5	80	-	7
arachidowy	-	-	7	5	60	-	20
lniany	-	-	5	3	20	-	20
rycynowy	-	-	-	1	8	85	4
rzepakowy wysokoerukowy	n.d.	n.d.	3,2	1,4	13,1	n.d.	15,5
rzepakowy zeroerukowy	n.d.	n.d.	5,2	1,9	58,4	n.d.	22,4

n.d. – brak danych

6. Metody oznaczania zawartości tłuszczu

Oznaczanie zawartości tłuszczu należy do rutynowych analiz przeprowadzanych w celu ustalenia podstawowego składu chemicznego produktów spożywczych. Pozwala ono również wnioskować o wartości odżywczej produktu oraz kontrolować przebieg procesów technologicznych, np. w przetwórstwie mięsnym czy mleczarskim.

W analityce produktów żywnościowych terminem **tłuszcz** określa się sumę substancji, które dają się wyekstrahować bezwodnym eterem etylowym i nie ulatniają się podczas suszenia w temperaturze 105 °C w czasie jednej godziny.

Metody oznaczania tłuszczu opierają się głównie na jego ekstrakcji przy pomocy rozpuszczalników organicznych. Taki tłuszcz (wydzielony z produktu metodami ekstrakcyjnymi) określa się zwykle terminem **tłuszcz surowy**. W skład tłuszczu surowego, obok dominującej frakcji tłuszczów właściwych, mogą wchodzić lipidy złożone (głównie fosfolipidy), wolne kwasy tłuszczowe, sterole, witaminy, barwniki i ewentualnie zanieczyszczenia pochodzące z rozpuszczalnika lub ekstrahowanego materiału.

6.1. Metody ekstrakcyjne

Polegają na wydzieleniu tłuszczu bezpośrednio przy użyciu odpowiedniego rozpuszczalnika albo po wstępnej hydrolizie poprzez traktowanie próby roztworem kwasu lub zasady. Oznaczanie ilości wyekstrahowanego tłuszczu przeprowadza się wagowo, refraktometrycznie lub densymetrycznie.

6.1.1. Metody ekstrakcyjno-wagowe – polegają na wydzieleniu tłuszczu z produktu na drodze ekstrakcji przy użyciu rozpuszczalnika organicznego (eteru etylowego, eteru naftowego, heksanu, chloroformu i in.), odparowaniu rozpuszczalnika i zważeniu pozostałości określonej jako tłuszcz surowy. Metody te należą do metod czasochłonnych, jednak uznawane są za najdokładniejsze. Ekstrakcję tłuszczu z produktu można przeprowadzić różnymi metodami:

- o na drodze ekstrakcji ciągłej np. Soxhleta, Weibulla-Stoldta
- o przez wymywanie porcjami rozpuszczalnika np. Roese-Gottlieba lub Schmidta-Bondzyńskiego-Ratzlaffa.
- **Metoda Soxhleta** - w tej metodzie prowadzi się ciągłą ekstrakcję tłuszczu z wysuszonego i rozdrobnionego materiału, a następnie odparowuje się rozpuszczalnik, suszy i waży pozostałość. Oznaczenie wykonuje się w aparacie ekstrakcyjnym (Soxhleta). Dokładność oznaczenia zawartości tłuszczu tą metodą zależy m. in. od:

stopnia rozdrobnienia próby, zawartości wody w próbce, szybkości ekstrakcji, sposobu suszenia itp. Ważne jest, aby eter etylowy stosowany do ekstrakcji był wolny od nadtlenu, odwodniony i przedestylowany. Metoda Soxhleta jest stosowana głównie do oznaczania tłuszczu w nasionach oleistych, mięsie i przetworach mięsnych, produktach piekarskich. Nie nadaje się z kolei do oznaczania tłuszczu w mleku i przetworach mleczarskich, ponieważ występujące tam kuleczki tłuszczu otoczone substancjami białkowymi utrudniają przenikanie rozpuszczalnika.

- **Weibulla-Stoldta** – polega na przeprowadzeniu hydrolizy produktu za pomocą kwasu solnego w celu uwolnienia substancji tłuszczowych obecnych w analizowanej próbce, a dalej oddzieleniu ich od hydrolizatu, wysuszeniu na sączku i ekstrakcji tłuszczu w aparacie Soxhleta. Ta metoda jest zalecana do produktów, w których tłuszcz występuje w postaci zemulgowanej lub w połączeniu z białkami (mleko, sery, pieczywo).
- **Roese-Gottlieba** – polega na traktowaniu badanego produktu kolejno: roztworem amoniaku (rozpuszcza białka, powoduje rozerwanie wiązań białkowo-tłuszczowych), alkoholem etylowym (ma działanie odwadniające, ułatwia rozpuszczanie fosfolipidów), eterem etylowym i eterem naftowym (etery rozpuszczają tłuszcz, fosfolipidy i inne substancje znajdujące się w fazie tłuszczowej). Następnie cały wyciąg eterowy lub jego część przenosi się do uprzednio zważonej kolbki, odparowuje rozpuszczalniki, a pozostałość suszy i waży.

6.1.2. Metody ekstrakcyjno-refraktometryczne – polegają na ekstrakcji tłuszczu z badanej próby za pomocą określonej ilości odpowiedniego rozpuszczalnika o ustalonym współczynniku załamania światła i następnie refraktometrycznym pomiarze współczynnika załamania światła otrzymanego ekstraktu. Podstawą wyznaczenia zawartości tłuszczu jest różnica między współczynnikami refrakcji rozpuszczalnika i badanego ekstraktu. Zawartość tłuszczu odczytuje się z tablic bądź oblicza za pomocą specjalnych wzorów.

6.2. Metody objętościowe (butyrometryczne)

Polegają one na rozpuszczeniu znajdującego się w próbce białka najczęściej kwasem siarkowym(VI) z dodatkiem niewielkiej ilości alkoholu izoamylowego, a następnie wydzieleniu tłuszczu za pomocą rozpuszczalnika organicznego. Proces ten przeprowadza się w specjalnych przyrządach zwanych tłuszczomierzami lub butyrometrami. Metody objętościowe stosuje się głównie do oznaczenia zawartości w mleku i produktach mleczarskich, w przetworach mięsnych oraz gotowych posiłkach. Ich zaletą jest prostota,

szybkość wykonania, nieskomplikowana aparatura i tanie odczynniki. Spośród tych metod oznaczania zawartości tłuszczu najczęściej stosowana jest tzw. metoda Gerbera.

6.3. Metody instrumentalne (pośrednie)

Wykorzystuje się specyficzne właściwości lipidów a analizy przeprowadza się przy pomocy np. magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), techniki odbiciowej w bliskiej podczerwieni (NIR) i in. Z jednej strony metody te są proste, szybkie i wygodne, ale z drugiej w większości przypadków wymagają uprzedniego sporządzenia wykresu krzywej zależności mierzonego parametru od zawartości tłuszczu w próbce oznaczanej z zastosowaniem klasycznych metod ekstrakcyjnych. Dodatkową ich wadą jest również konieczność dysponowania odpowiednią i drogą aparaturą. Metody te znalazły zastosowanie głównie do oznaczania zawartości tłuszczu w nasionach, margarynie, mięsie, produktach mleczarskich, czekoladzie i in.

7. Parametry jakości tłuszczu

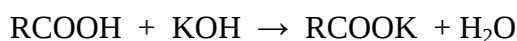
Podczas przechowywania tłuszczów zachodzi wiele niekorzystnych zmian pod wpływem czynników zewnętrznych (temperatura, światło, powietrze) i wewnętrznych (enzymy tkankowe), w efekcie czego następuje psucie się produktu. Wymienić tu można:

- o *Zmiany hydrolityczne* – powodowane działaniem warunków zewnętrznych, mikroorganizmów i enzymów tkankowych; prowadzą do uwalniania z glicerydów wolnych kwasów tłuszczowych, jak również rozpad tych kwasów na kwasy o krótszym łańcuchu węglowym.
- o *Zmiany spowodowane działaniem tlenu na nienasycone wiązania przy udziale światła i katalizatorów*, np. jonów żelaza; w efekcie dochodzi do powstania nadtlenków, a następnie aldehydów i ketonów.

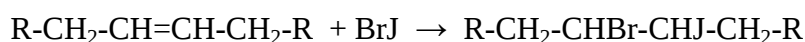
W celu określenia niekorzystnych zmian zachodzących w tłuszczu podczas jego przechowywania wprowadzono tzw. *liczby tłuszczowe*. Do podstawowych liczb tłuszczowych należą:

- o **Liczba kwasowa (LK)** – określa ilość wolnych kwasów tłuszczowych; wyraża się ją jako liczba miligramów wodorotlenku potasu potrzebną do zobojętnienia kwasów tłuszczowych (RCOOH) zawartych w 1 g badanego tłuszczu. Liczba kwasowa jest miarą zawartości wolnych kwasów tłuszczowych, czyli inaczej efektem hydrolizy glicerydów; nie jest wartością stałą dla danego gatunku

tłuszczu.



- o **Liczba zmydlenia (LZ)** – parametr ten pozwala na określenie średniej masy cząsteczkowej kwasów tłuszczowych; jest to liczba miligramów wodorotlenku potasu potrzebna do zobojętnienia wolnych kwasów tłuszczowych i zmydlenia acylogliceroli zawartych w 1 g badanego tłuszczu.
- o **Liczba estrowa (LE)** – świadczy o długości łańcuchów kwasów tłuszczowych wchodzących w skład glicerydów danego tłuszczu; jest tym wyższa, im łańcuchy są krótsze; wyraża się ją jako liczba miligramów wodorotlenku potasu potrzebną do zmydlenia i zestryfikowania kwasów tłuszczowych zawartych w 1 g badanego tłuszczu.
- o **Liczba jodowa (LJ)** – jest to liczba gramów chlorowca, w przeliczeniu na jod, która przyłącza się w określonych warunkach do podwójnych wiązań kwasów tłuszczowych znajdujących się w 100 g badanego produktu. Liczba jodowa jest miernikiem zawartości w tłuszczu nienasyconych kwasów tłuszczowych.



- o **Liczba nadtlenkowa (LOO)** – jest to liczba cm^3 mianowanego roztworu tiosiarczanu sodu potrzebna do zmiareczkowania jodu wydzielonego z roztworu jodku potasu w wyniku działania nadtlenków zawartych w 1 g tłuszczu. Parametr ten jest traktowany jako wskaźnik stopnia zjełczenia tłuszczu.

8. Strategia analiz kwasów tłuszczowych

Niewątpliwie najwięcej uwagi w analizie lipidów poświęca się badaniom kwasów tłuszczowych. Kwasy pochodzące z naturalnych źródeł wykazują bardzo duże zróżnicowanie. Wiąże się to przede wszystkim z ich specyficzną budową: długością łańcucha węglowodorowego, stopniem nienasycenia oraz obecnością różnych grup funkcyjnych. Największym jednak ograniczeniem w analizie tej grupy związków jest ich mała lotność. Pierwszą czynnością w postępowaniu analitycznym jest więc uzyskanie odpowiednich pochodnych kwasów tłuszczowych - najczęściej są to estry metylowe. Metoda ich otrzymywania zależy głównie od charakteru analizowanej substancji. Jeżeli próbka zawiera wyłącznie wolne kwasy tłuszczowe, to powinien być użyty kwaśny reagent (np. MeOH-HCl). W przypadku kwasów związanych z glicerolem (tłuszczy) preferowana jest alkaliczna metanoliza, natomiast do analiz krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych musi być

zastosowana specjalna procedura (aby uniemożliwić ich straty podczas analizy). Po otrzymaniu metylowych pochodnych kwasów tłuszczowych poddaje się je następnie analizie ilościowej głównie za pomocą chromatografii gazowej.

9. Chromatografia gazowa – technika analizy kwasów tłuszczowych

Chromatografia jest fizykochemiczną metodą rozdzielania, w której składniki rozdzielane są pomiędzy dwie fazy: jedna jest nieruchoma (faza stacjonarna), a druga (faza ruchoma) porusza się w określonym kierunku. Jeżeli fazą ruchomą jest gaz, to mamy do czynienia z *chromatografią gazową* (GC – *gas chromatography*). W zależności od rodzaju fazy stacjonarnej wyróżnić można dwa typy chromatografii gazowej:

- o *chromatografię adsorpcyjną* (GSC – *gas-solid chromatography*), gdzie fazą stacjonarną jest ciało stałe.
- o *chromatografię podziałową* (GLC – *gas-liquid chromatography*), gdzie fazą stacjonarną jest ciecz osadzona na stałym nośniku w postaci jednorodnego filmu (warstwy).

Faza ruchoma porusza się wewnątrz kolumny, natomiast faza stacjonarna jest osadzona na wewnętrznych ściankach kolumny. Związki chemiczne z większym powinowactwem do fazy stacjonarnej są przez nią selektywnie zatrzymywane i poruszają się wzdłuż kolumny znacznie wolniej. Związki z mniejszym powinowactwem do fazy stacjonarnej poruszają się z kolei szybciej i tym samym opuszczają kolumnę, czyli *eluuje* z kolumny, jako pierwsze. Równowaga podziału pomiędzy fazy ma charakter dynamiczny, co oznacza, że cząsteczki substancji nieustannie przechodzą od fazy ruchomej do stacjonarnej i z powrotem.

9.1. Podstawowe parametry chromatograficzne

Podstawowym parametrem określającym podział substancji X pomiędzy dwie fazy jest stała podziału K_c , którą można wyrazić równaniem Nernsta.

$$K_c = \frac{c_s}{c_m}$$

gdzie: c_s – oznacza stężenie substancji X w fazie stacjonarnej,

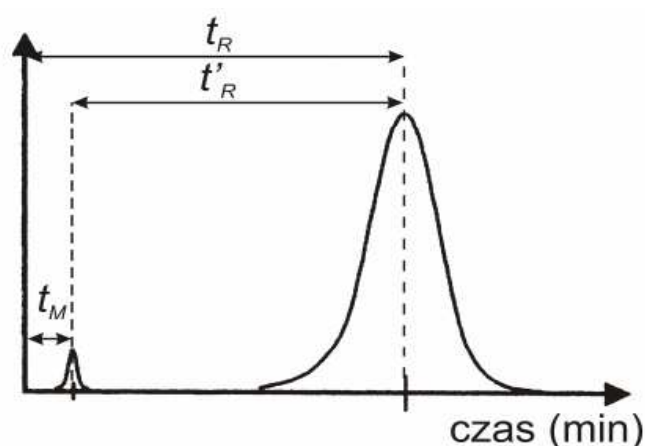
c_m – oznacza stężenie substancji X w fazie ruchomej.

Innym ważnym parametrem jest współczynnik retencji k , który wyraża się jako stosunek czasu, w jakim substancja X przebywa w fazie stacjonarnej do czasu, w którym

$$k = \frac{\text{liczba moli substancji X w fazie stacjonarnej}}{\text{liczba moli substancji X w fazie ruchomej}}$$

przebywa ona w fazie ruchomej. Określa on, ile razy dłużej dana substancja jest zatrzymywana przez fazę stacjonarną, niż potrzebowałaby na przejście przez kolumnę z prędkością poruszania się fazy ruchomej. Tylko związki chemiczne charakteryzujące się różnymi współczynnikami retencji mogą zostać rozdzielone na kolumnie chromatograficznej.

Efekt rozdziału chromatograficznego jest wykreślany w postaci *chromatogramu*. Przedstawia on wykres wskazań sygnału uzyskanego w detektorze w funkcji czasu lub w funkcji objętości fazy ruchomej. Zapis stężenia pojedynczej substancji w funkcji czasu ma postać krzywej Gaussa i nosi nazwę *piku* (ang. *peak* czyli szczyt). Typowy chromatogram przedstawiony jest na poniższym rysunku.



Rys. 1. Chromatogram i sposób pomiaru typowych wielkości chromatograficznych.

Na podstawie obrazu chromatograficznego możemy określić:

- **czas retencji t_R** – czas mierzony od momentu wprowadzenia próbki na kolumnę do momentu pojawienia się na wyjściu z kolumny maksimum stężenia danego związku chemicznego czyli maksimum piku.

$$t_R = \frac{L}{u} \times (1 + k)$$

gdzie: L – długość kolumny chromatograficznej,

u – średnia, liniowa prędkość przepływu gazu nośnego,

k – współczynnik retencji.

- **zerowy czas retencji t_M (czas „martwy”)** – czas przebywania w kolumnie substancji, która nie ma powinowactwa do fazy stacjonarnej np. metanu; czas zerowy jest równy czasowi przepływu fazy ruchomej przez kolumnę,

- **zredukowany czas retencji t'_R** – to różnica pomiędzy czasem retencji a zerowym czasem retencji

$$t'_R = t_R - t_M$$

- **współczynnik retencji k**

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

- **szerokość pików** w mierzoną u podstawy pików lub szerokość pików mierzoną na określonej wysokości pików np. w połowie wysokości - $w_{1/2h}$.

9.2. Wybór parametrów analizy

Analizując próbkę metodą chromatografii gazowej, należy dobrać wszystkie parametry analizy odpowiednio do tej konkretnej próbki. Najważniejsze parametry pracy układu chromatograficznego to:

- rodzaj fazy stacjonarnej,
- wymiary kolumny,
- temperatura pieca chromatograficznego,
- rodzaj detektora i dozownika,
- temperatura detektora i dozownika,
- prędkość przepływu gazu nośnego,
- wielkość dozowanej próbki.

Wybór fazy stacjonarnej do analizy nie jest sprawą łatwą i ciągle jeszcze bywa dokonywany eksperymentalnie. Najważniejszą cechą faz stacjonarnych decydującą o oddziaływaniu z cząsteczkami związków chromatografowanych jest ich polarność. Ogólne zasady wyboru ciekłych faz stacjonarnych (GLC) są następujące:

- o do rozdziału substancji niepolarnych stosuje się fazę stacjonarną niepolarną,
- o do rozdziału substancji polarnych stosuje się fazę stacjonarną polarną,
- o związki niepolarne są rozdzielane na niepolarnej fazie stacjonarnej zgodnie z uszeregowaniem ich według temperatur wrzenia (lotności),
- o związki niepolarne są eluowane przed związkami polarnymi o tej samej temperaturze wrzenia, jeżeli faza stacjonarna jest polarna,
- o związki polarne są eluowane przed związkami niepolarnymi o tej samej

temperaturze wrzenia, jeżeli faza stacjonarna jest niepolarna.

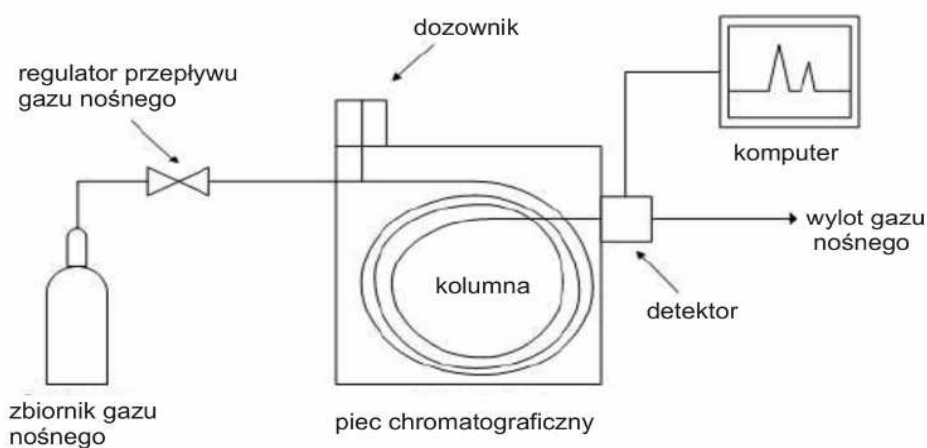
Wpływ długości kolumny na analizę jest następujący: im dłuższa kolumna tym czasy retencji są większe i tym wyraźniejsze są różnice między czasami retencji dwóch substancji. Jednak dłuższy czas analizy powoduje, że piki są bardziej rozmyte.

Temperatura kolumny ma ogromny wpływ na analizę. Proces chromatograficzny można prowadzić w stałej temperaturze (tzw. *analiza izotermiczna*) lub metodą programowanej temperatury (*analiza z programowaną temperaturą*). Tę drugą opcję stosujemy wtedy, gdy składniki mieszaniny różnią się znacząco temperaturami wrzenia, np. węglowodory z ropy naftowej lub szereg homologiczny alkoholi.

Dozowana próbka powinna być bardzo mała, ponieważ wówczas strefa startowa jest bardzo wąska. Próbka wprowadzona do kolumny nie może być większa od pojemności sorpcyjnej kolumny, ponieważ przeładowanie kolumny prowadzi do złego rozdzielenia składników próbki i powstawania niesymetrycznych, szerokich pików.

9.3. Aparatura w chromatografii gazowej

Analizy w chromatografii gazowej przeprowadza się za pomocą chromatografu gazowego. Schemat takiego urządzenia przedstawiono poniżej na Rys.2.



Rys. 2. Schemat chromatografu gazowego

Zasada pracy tego urządzenia jest następująca: gaz nośny (faza ruchoma) doprowadzony z butli płynie przez regulator przepływu do dozownika, a następnie przez kolumnę i detektor, skąd jest usuwany na zewnątrz do atmosfery. Kolumna umieszczona jest w termostacie. Temperatura dozownika, detektora i kolumny jest odpowiednio regulowana. Przy pomocy dozownika analizowaną substancję wprowadza się w strumień gazu nośnego,

który to następnie przenosi ją do kolumny. Tam właśnie następuje rozdział chromatograficzny składników próbki. Po rozdzieleniu poszczególne składniki próbki kierowane są do detektora, a ten wykrywa je i reaguje sygnałem elektrycznym. Sygnały po wzmocnieniu zostają rejestrowane w komputerze bądź w rejestratorze w postaci chromatogramu.

W chromatografii gazowej fazę ruchomą stanowią gazy o małej gęstości, niskiej lepkości, w których współczynniki dyfuzji są duże. Najczęściej jest to: wodór, azot, argon lub hel. Rodzaj gazu nośnego ma niewielki wpływ na wynik rozdziału chromatograficznego. Zadaniem gazu jest transportowanie próbki przez dozownik, kolumnę i detektor. Przy wyborze gazu nośnego należy się kierować przede wszystkim rodzajem wybranego detektora oraz ceną, dostępnością i czystością gazu. Wymagana czystość gazów wynosi >99,999%.

Dozownik jest elementem umożliwiającym wprowadzenie próbki w strumień gazu nośnego. Stosując chromatografię gazową, można analizować substancje, które w warunkach chromatografowania mają postać gazów lub par. Klasyczne dozowanie próbki do typowej kolumny kapilarnej polega na wprowadzeniu cieczy (0,1 – 5 μ l) za pomocą strzykawki do dozownika. W dozowniku następuje gwałtowne odparowanie próbki i po zmieszaniu z gazem nośnym próbka jest wprowadzana na kolumnę. Dla większości kolumn kapilarnych dopuszczalna objętość próbki wynosi 0,01 do 0,001 μ l cieczy. Jest to poważne ograniczenie i dlatego właśnie w chromatografii kapilarnej stosuje się często *dozowniki z dzieleniem* strumienia gazu nośnego. Taki dzielnik dozuje do kolumny tylko część próbki np. 1/100 – 1/300, zaś pozostała część jest usuwana na zewnątrz i tracona.

Niewątpliwie najważniejszą częścią składową każdego chromatografu gazowego jest kolumna. To tam bowiem zachodzi właściwy proces rozdziału chromatograficznego. W celu uzyskania jak najlepszych rozdziałów istotne jest zatem, aby odpowiednio dobrać rodzaj kolumny. Rozróżnia się następujące rodzaje kolumn:

- o pakowane (kolumny z wypełnieniem): analityczne, mikropakowane i preparatywne,
- o kolumny o przekroju otwartym – kapilarne.

Kolumny pakowane napełnione są fazą stacjonarną w całej swojej objętości. Ten rodzaj kolumn jest najczęściej stosowany do preparatywnego otrzymywania niewielkich ilości czystych związków chemicznych.

Kolumny kapilarne pozwalają na osiągnięcie dużo wyższych sprawności niż kolumny pakowane i obecnie większość analiz chromatograficznych wykonuje się przy zastosowaniu tych właśnie kolumn. Fazy stacjonarne w kolumnach kapilarnych mogą być zarówno adsorbentami, jak i cieczami i mogą być osadzone na ściankach kapilar w różny sposób. Wyróżnia się następujące rodzaje kolumn kapilarnych:

- o WCOT (*wall-coated open tubular*) – kapilary ze ściankami wewnętrznymi pokrytymi nielotną ciekłą fazą stacjonarną; jest to najbardziej popularny typ kolumn,
- o PLOT (*porous layer open tubular*) – kapilary ze ściankami pokrytymi warstwą ziaren adsorbenta,
- o SCOT (*support-coated open tubular*) – ziarna wypełnienia pokryte są fazą ciekłą.

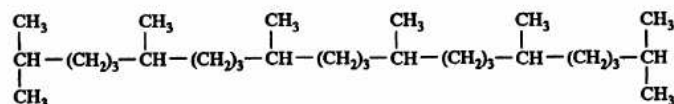
Kolumny kapilarne do GC są najczęściej wykonane ze stopionego kwarcu czyli ditlenku krzemu. Stopiony kwarc jest łatwy do formowania, elastyczny i dużo bardziej wytrzymały niż inne szkła, co powoduje, że można wyprodukować kapilary o średnicy wewnętrznej od 0,1 do 1 mm i długości od 10 do 30 m. Kolumny kapilarne przechowuje się w postaci zwoju w uchwytach chroniących je przed uszkodzeniem.

Adsorbenty stosowane w chromatografii gazowej to adsorbenty węglowe, żele krzemionkowe, sita molekularne, polimery porowate. Adsorbenty stosuje się do analiz gazów i węglowodorów o niskich masach cząsteczkowych.

Ciekle fazy stacjonarne w chromatografii gazowej to najczęściej:

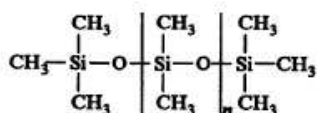
- o fazy niepolarne: węglowodory będące dobrymi rozpuszczalnikami substancji niepolarnych (np. skwalan).

skwalan
2,6,10,14,18,22-heksametylotetrakozan

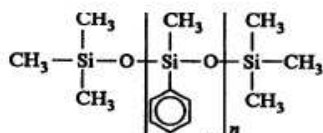


- o fazy średniopolarne: silikony, są to siloksany o różnej masie cząsteczkowej. Najczęściej stosujemy: polidimetylosiloksan, polimetylofenylosiloksan, policycjanoalkilosiloksan.

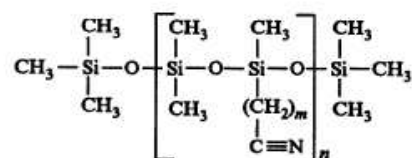
dimetylopolisiloksan



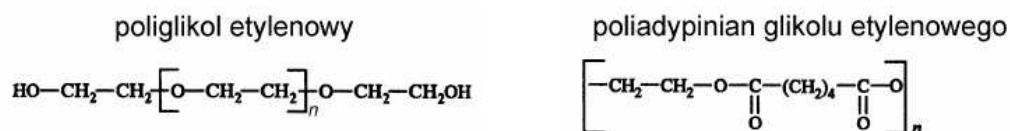
fenylopolimetylopolisiloksan



cyjanometylopolisiloksan



- o fazy polarne: glikole polietylenowe (np. Carbowax) oraz estry.

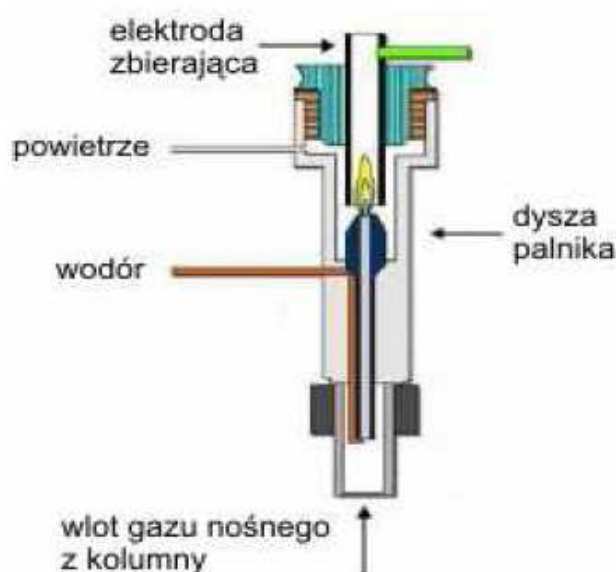


- o fazy polarne oparte o kopolimery styrenu i diwinylobenzenu (np. PoraPLOT Q).

Substancje rozdzielane w kolumnie chromatograficznej są wykrywane przez detektor w miarę, jak eluują z kolumny. Detektor reaguje sygnałem elektrycznym na obecność chromatografowanego związku w gazie nośnym opuszczającym kolumnę. Detektory można podzielić na:

- o nieselektywne – detektory uniwersalne, reagują na wszystkie składniki próbki,
- o selektywne – reagują na pewną grupę związków, które mają podobne właściwości chemiczne lub fizyczne,
- o specyficzne – reagują na pojedynczy związek chemiczny.

Najczęściej używanym detektorem w chromatografii gazowej jest *detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID)* (Rys.3). Jest to detektor uniwersalny, czyli taki, który jest czuły na prawie wszystkie związki organiczne. Detektor FID nie wykrywa obecności związków nieorganicznych oraz niektórych związków węgla: CO, CO₂, CS₂, HCOOH, COCl₂. Działanie tego urządzenia opiera się na spalaniu wodoru w tlenie. Do detektora doprowadzone są z butli dwa gazy: wodór i powietrze. Gaz nośny wypływający z kolumny jest mieszany z wodorem i kierowany przez dyszę do komory, przez którą przepływa powietrze. Wodór spala się, tworząc płomień wodorowy. Składniki próbki doprowadzane wraz z gazem nośnym do płomienia ulegają również spalaniu. Niewielka część (około 0,001%) atomów węgla w trakcie spalania ulega jonizacji. W komorze znajdują się dwie elektrody: jedną jest dysza palnika, drugą (zbierającą) stanowi pierścień umieszczony w odpowiedniej odległości od dyszy. Powstający prąd jonowy jest wzmacniany i rejestrowany przez potencjometr. Sygnał z detektora jest proporcjonalny do liczby atomów węgla niezwiązanych z tlenem, co oznacza, że w przybliżeniu jest on również proporcjonalny do masy substancji.



Rys. 3. Detektor płomieniowo-jonizacyjny FID (J. K. Hardy, Chemical Separations, 2005).

9.4. Analiza jakościowa i ilościowa w GC

Chromatografia gazowa jest nieocenioną techniką w chemii instrumentalnej głównie dlatego, iż przy jej pomocy można przeprowadzać zarówno analizy jakościowe, jak i ilościowe.

Analiza jakościowa dotyczy identyfikacji pików odpowiadających poszczególnym składnikom próbki i opiera się na wielkościach retencyjnych. Porównuje się czas retencji pików identyfikowanej substancji z czasem retencji pików wzorca (chromatografowanych w jednakowych warunkach). Istnieją również inne sposoby identyfikacji związków w chromatografii gazowej, a mianowicie zastosowanie odpowiedniego detektora jakościowego. W tym przypadku najczęściej wykorzystuje się połączenie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC/MS). Oprócz parametrów retencji układ ten rejestruje również widma mas i tym samym umożliwia przeprowadzenie kompletnej identyfikacji.

Analizy ilościowe w chromatografii gazowej, podobnie jak analizy jakościowe, można także przeprowadzać na kilka sposobów. Spośród różnych metod oceny ilościowej metoda normalizacji wewnętrznej jest jedną z najprostszych. Wyznacza się tu procentowy udział wszystkich składników w próbce w oparciu o obraz chromatograficzny uzyskany z analizy. Podstawowym warunkiem jest to, aby na chromatogramie znajdowały się piki wszystkich substancji obecnych w próbce. Zasada tej metody polega na pomiarze powierzchni wszystkich sygnałów i sumowaniu ich. Suma wszystkich powierzchni stanowi 100 %, zaś powierzchnia każdego pików w stosunku do powierzchni sumy wszystkich pików odpowiada

zawartości procentowej analizowanych substancji w próbce. Do obliczeń wykorzystuje się poniższy wzór:

$$\%i = \frac{A_i}{\sum A} \cdot 100$$

Tak byłoby w przypadku, gdyby wskazania detektora dla wszystkich składników były równe. Wiadomo jednak, że różne detektory reagują różnym sygnałem na obecność określonych substancji. Przykładowo wartość sygnału z detektora płomieniowo-jonizacyjnego zależy od składu chemicznego analizowanego związku organicznego, gdyż od tego z kolei uzależniona jest liczba tworzących się w płomieniu wodorowym termojonów węgla. Zatem wzajemne stosunki powierzchni poszczególnych pików nie będą odpowiadać wzajemnym stosunkom ilościowym związków znajdujących się w chromatografowanej próbce. W związku z powyższym wprowadza się pewne poprawki, które pozwalają na wzajemne porównanie powierzchni pików zanalizowanych mieszanin. Są to tzw. współczynniki korekcyjne. Współczynnik korekcyjny substancji *i* jest liczbą, którą należy pomnożyć powierzchnię pików, aby otrzymać skorygowaną wartość wprost proporcjonalną do masy substancji *i*. Jako substancję porównawczą przyjmuje się główny składnik danej próbki, a jej współczynnik korekcyjny przyjmuje się równy 1,000. Sporządzając mieszaninę wzorcową złożoną z równych mas wszystkich składników analizowanej próbki, można wyznaczyć współczynniki korekcyjne *f_i* dla poszczególnych związków wg. wzoru:

$$f_i = \frac{A_{wz}}{A_i}$$

A_{wz} - powierzchnia pików wzorca (główny składnik w próbce)

A_i - powierzchnia pików substancji *i*, dla której wyznaczamy współczynnik korekcyjny.

II. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest przeprowadzenie triacylogliceroli obecnych w próbce smalcu w estry metylowe kwasów tłuszczowych metodą przeestryfikowania (zgodnie z normą europejską EN ISO 5509) a w dalszej kolejności dokonanie analizy ilościowej tych estrów techniką chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym GC-FID z zastosowaniem metody normalizacji wewnętrznej.

2. Odczynniki

- ° Wodorotlenek potasu – roztwór metanolowy o stężeniu około 2 mol/dm³
- o Izooktan
- o Kwaśny siarczan(VI) sodu
- o Roztwór smalcu w izooktanie (6.4 g/25 cm³)

3. Aparatura

- o Probówki miarowe z korkiem (10 cm³)
- ° Pipety poj. 0,2 cm³ oraz 5 cm³
- o Pipetka Pasteura
- o Chromatograf gazowy Perkin Elmer
- o Rejestrator

4. Przygotowanie próbki do analiz

Do probówki z podziałką (10 cm³) wprowadzić przy użyciu pipetki Pasteura 1 cm³ próbki smalcu, następnie dodać pipetą 3 ml izooktanu i wytrząsać. Wprowadzić przy użyciu strzykawki 200 µl metanolowego roztworu wodorotlenku potasu (ostrożnie otworzyć zatopioną ampulkę z odczynnikiem). Całość energicznie wytrząsać przez 30 sekund. Po początkowym zmętnieniu nastąpi wydzielenie się glicerolu, a mieszanina reakcyjna stanie się klarowna. Następnie celem zneutralizowania wodorotlenku potasu dodać do roztworu ok.1 g kwaśnego siarczanu(VI) sodu – energicznie wytrząsać. Po opadnięciu soli zebrać pipetką Pasteura górną warstwę zawierającą estry metylowe i przenieść do czystej fiolki. Przygotowaną w ten sposób próbkę analizować techniką chromatografii gazowej.

5. Analiza właściwa estrów metylowych kwasów tłuszczowych

Wydzieloną frakcję estrów metylowych analizować techniką chromatografii gazowej.

Warunki rozdziału:

- o chromatograf gazowy Perkin Elmer
- o kolumna kapilarna RTX 1; 20 m; 0,18 mm średnica wewnętrzna; 0,2 μ m grubość filmu fazy ciekłej;
- o początkowa temp. kolumny 120°C, narost 2°C/min do 220°C;
- o temperatura dozownika 300°C;
- o temperatura detektora 300°C;
- o gaz nośny Ar, 90 kPa.

6. Obsługa chromatografu gazowego

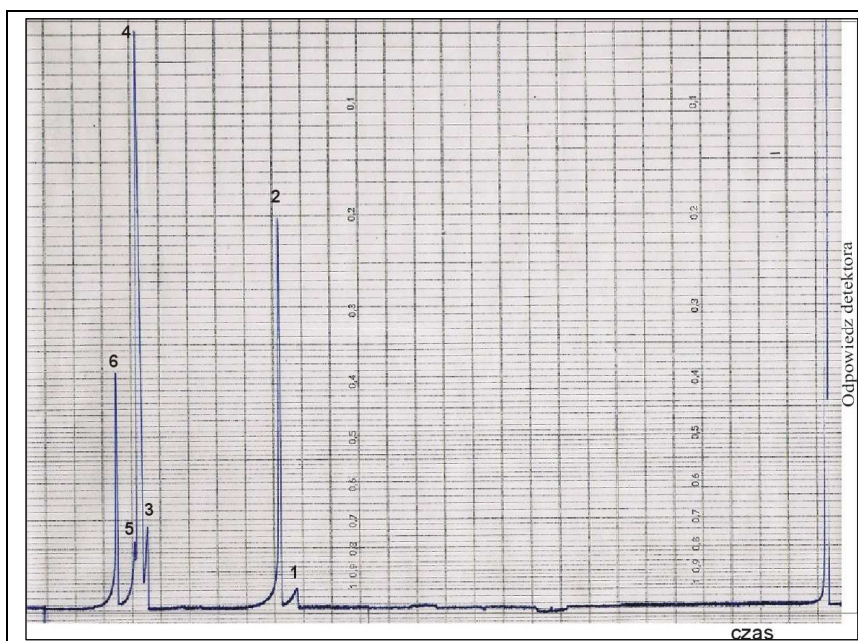
1. Włączyć przepływ gazów (argonu, powietrza, wodoru) poprzez odkręcenie zaworów na butlach znajdujących się w wiacie na zewnątrz
2. Włączyć zasilanie chromatografu i przełączyć przycisk na pozycję „ON”
3. Począkać na pojawienie się obrazu na monitorze (ok 0.5 - 1 h)
4. Wprowadzić do komputera podane wyżej parametry rozdziału i poczekać na ustabilizowanie się warunków.
5. Zapalić zapalką płomień detektora FID (przycisk HYDROGEN powinien być przełączony na pozycję „ON”)

Punkty 1 - 5 wykonać przy ścisłej kontroli prowadzącego

6. Włączyć zasilanie rejestratora (ustawić: chart-ON, line pen-ON, speed-0,25, range-1 mV)
7. Wykonać pierwszą analizę. W tym celu należy nabrać do strzykawki o pojemności 10 μ l określoną przez prowadzącego objętość badanej próbki (ok. 3 μ l.) i wprowadzić ją do dozownika. Analizować tę samą próbkę 3 razy.
8. Po skończonych analizach należy schłodzić dozownik i detektor do temperatury pokojowej (0.5-1 h) i dopiero wtedy można wyłączyć przepływ wszystkich gazów poprzez zakręcenie zaworu na butlach.
9. Wyłączyć zasilanie chromatografu i rejestratora.

7. Opracowanie wyników

W wyniku przeprowadzanych analiz otrzymujemy następujący obraz:



Na przedstawionym powyżej chromatogramie cyframi 1, 2, 3, 4, 5, 6, oznaczono estry metylowe następujących kwasów tłuszczowych:

1- 16:1

2- 16:0

3- 18:1

4- 18:1

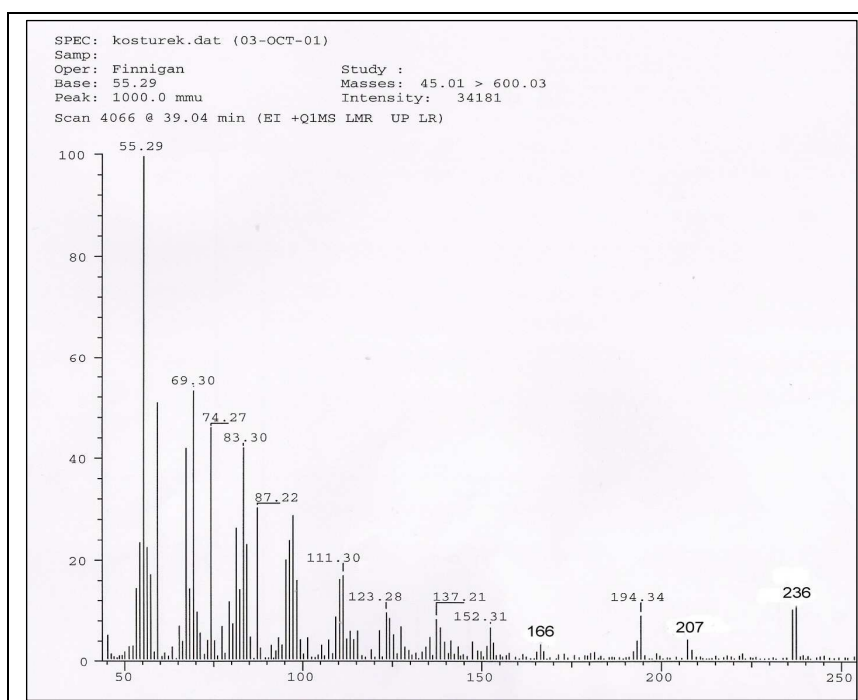
5- 18:1

6- 18:0

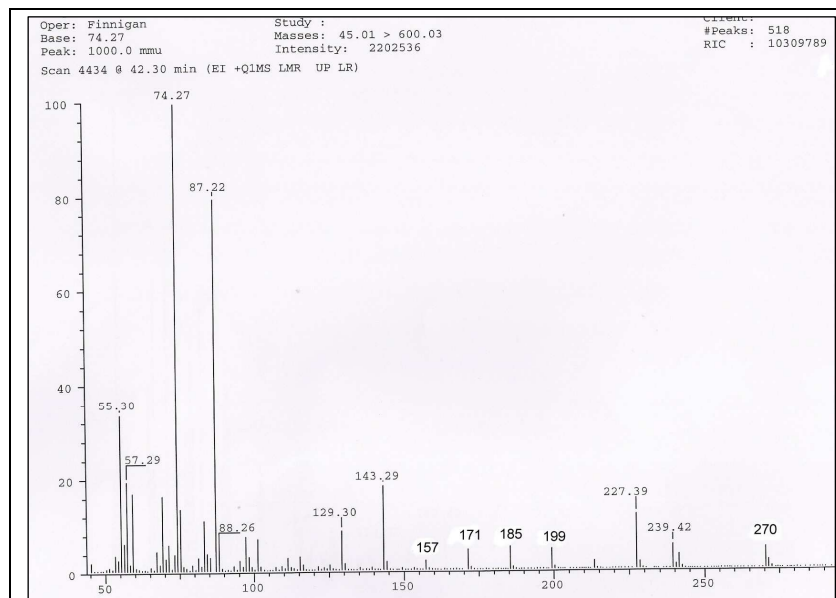
wiązanie podwójne usytuowane przy różnych at. C

Identyfikacji dokonano metodą GC-MS, porównując otrzymane eksperymentalnie widma mas z widmami literaturowymi (www.lipidlibrary.co.uk). Poprawność identyfikacji udokumentowano poprzez załączenie widm mas uzyskanych w wyniku jonizacji substancji wiązką elektronów o energii 70 eV (EI).

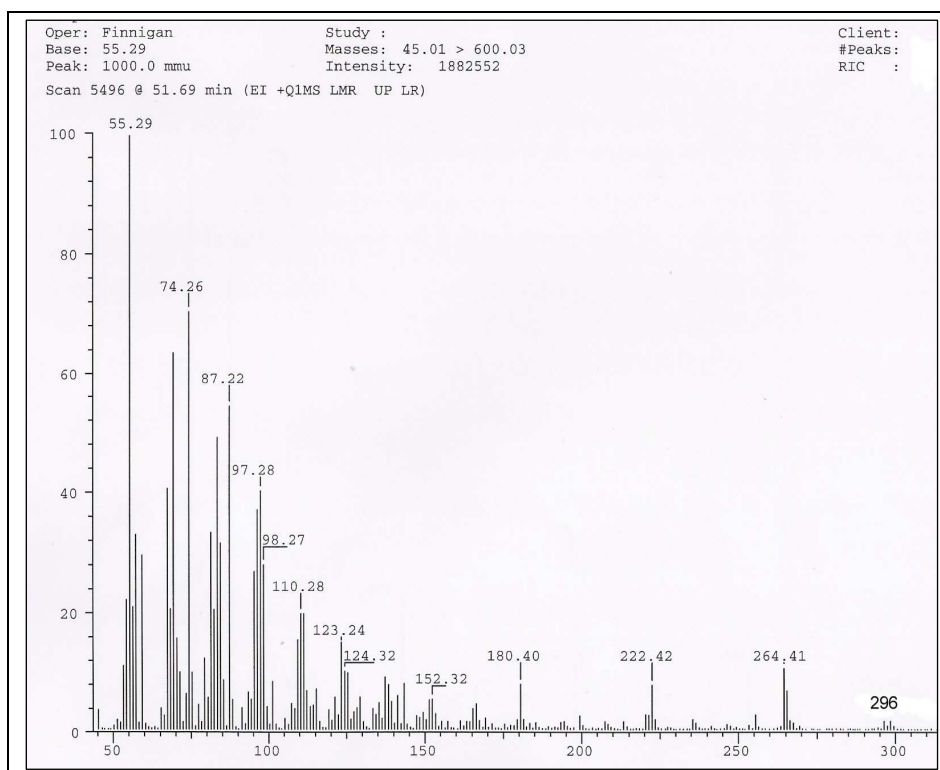
o Widmo mas EI estru metylowego kwasu 1-heksadekenowego (16:1)



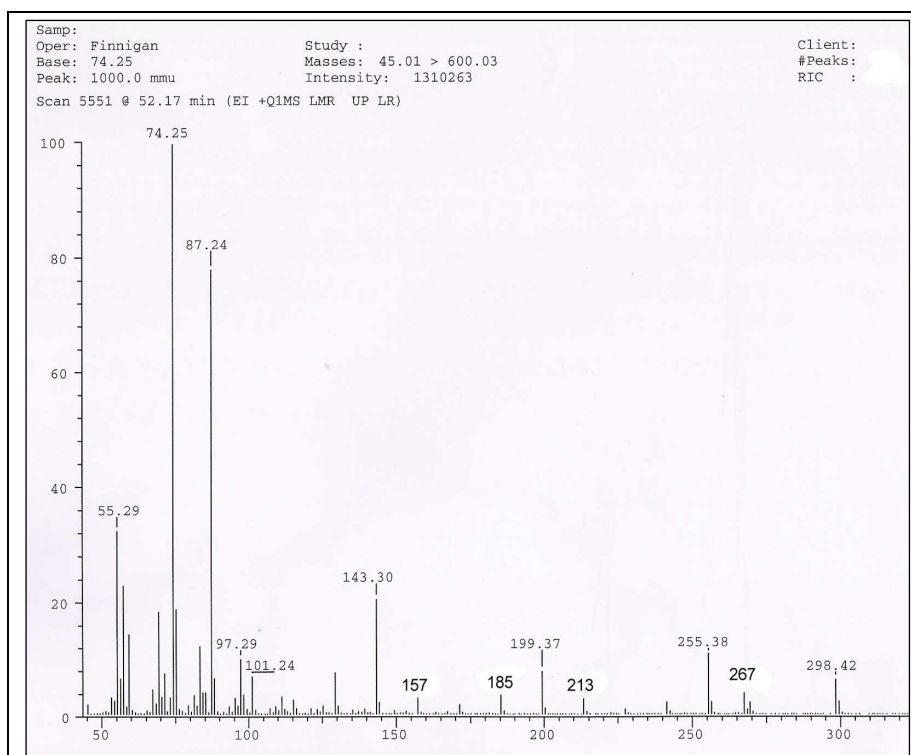
o Widmo mas EI estru metylowego kwasu heksadekanowego (16:0)



o Widmo mas EI estru metylowego kwasu 1-oktadekenowego (18:1)



o Widmo mas EI estru metylowego kwasu oktadekanowego (18:0)



Na podstawie chromatogramów uzyskanych z analizy próbek smalcu należy określić metodą normalizacji wewnętrznej procentowy udział wszystkich składników (wynik podać jako wartość średnią z trzech prób). Z racji tego, iż nie dysponujemy odpowiednimi wzorcami estrów metylowych kwasów tłuszczowych, w obliczeniach nie należy uwzględniać współczynników korekcyjnych. W opracowaniu należy podać wszystkie obliczenia oraz dołączyć opracowane chromatogramy.

8. Literatura

- M. Małecka, *Wybrane metody analizy żywności. Oznaczanie podstawowych składników, substancji dodatkowych i zanieczyszczeń*. Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Poznań 2003.
- M. Klepacka, *Analiza żywności dla Studentów Wydziału Technologii Żywności cz. I*. Fundacja Rozwoju SGGN, Warszawa 2005.
- Z. E. Sikorski, *Chemia żywności – skład, przemiany, i właściwości*, Wyd. Nauk.-Tech. Warszawa, 2002.
- J. McMurry, *Chemia organiczna cz. 2*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
- R. Kocjan, *Chemia analityczna. Podręcznik dla studentów. Tom 2*. PZWL, Warszawa, 2000.
- W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, Warszawa, 1996.
- Z. Witkiewicz, *Podstawy chromatografii*, WNT, Warszawa, 2000.