

Iniciació a la bromatologia (pràctiques)	Protocols d'anàlisi	Ref: 22.1
ÀCIDS GRASSOS PER CG		

OBJECTE I FONAMENTS

Els èsters metàlics dels àcids grassos poden ésser separats i quantificats per cromatografia de gasos.

La separació i quantificació dels àcids grassos constitueix un mètode fiable i ràpid per la tipificació i classificació d'un greix.

La metilació té lloc en dues fases; una primera fase amb la interacció del metilat de sodi com agent saponificant en medi metanòlic (agent esterificant) i una segona fase mitjançant l'acció del metanol acidificat amb àcid clorhídric.

MATERIAL

Balança analítica.

Balança granatària.

Baló de 250 ml, esmerilat.

Columna de les característiques indicades a la metodologia.

Cromatògraf de gasos proveït amb registrador-integrador, equipament complementari i detector d'ionització de flama.

Cronòmetre.

Fluxòmetre de bombolla.

Matràs aforat de 100 ml.

Microxeringa per C.G., graduada, de 10 μ l.

Pipetes aforades de 25 ml.

Placa calefactora.

Refrigerant de reflux.

Tubs d'assaig de 10 ml, amb tap roscat.

REACTIUS

Àcid clorhídric 1'25N en alcohol metàlic (Obtenir àcid clorhídric gasós i anhidre fent caure àcid sulfúric gota a gota sobre àcid clorhídric concentrat, segons mostra l'esquema adjunt. Cal treballar en vitrina de gasos i tenir cura d'evitar succions, observant contínuament el procés. La quantitat absorbida de HCl es determina per pesades successives, fins arribar a una concentració lleugerament superior a la desitjada. S'admet una certa tolerància, per la qual cosa podem utilitzar una balança granatària).

Aire sintètic qualitat cromatogràfica.

Dissolució saturada de NaCl (dissoldre NaCl pa en aigua destil·lada fins saturació).

Hexà pa.

Hidrogen qualitat cromatogràfica

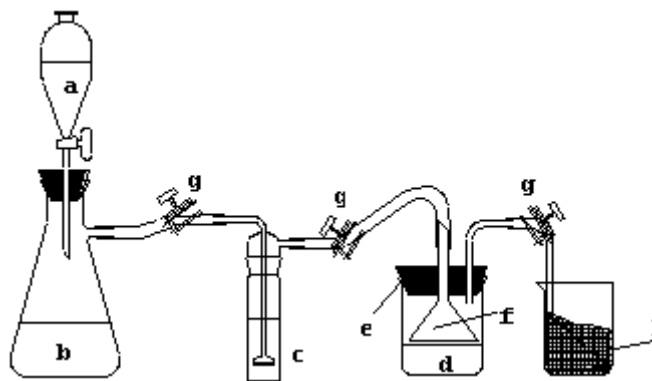
Metilat de sodi 0'2N (dissoldre 1'102 grams de metilat de sodi ps fins a 1 litre en alcohol metàlic pa).

Nitrogen qualitat cromatogràfica.

Trioleat de glicerina pa.

Esquema muntatge per preparar HCl en metanol:

- a) Àcid sulfúric concentrat. b) Àcid clorhídric concentrat (35 %). c) Torre de dessecació
 d) Metanol
 e) Tap. f) Embut. g) Pincetes de Hoffman. h) Gel de sílice.

**METODOLOGIA**

- 1.- Pesat al voltant de 1 gram de greix perfectament homogeneïtzat en el baló de 250 ml.
- 2.- Afegir 25 ml de dissolució de metilat de sodi 0'2N, connectar el refrigerant de reflux i portar a ebullició, mantenint-la com a mínim durant 5 minuts.
- 3.- Interrompre la calefacció i afegir 25 ml de la dissolució metanòlica d'àcid clorhídric; connectar de nou el refrigerant de reflux i portar a ebullició un mínim de 5 minuts més.
- 4.- Refredar, però sense arribar a baixar massa la temperatura (el baló a de quedar francament tebi) i transferir a un recipient de coll llarg i estret (pot servir un matràs aforat de 100 ml), esbandint amb 10 ml d'hexà, que es transferiran també al matràs aforat.
- 5.- Sacsejar imprimint moviments suaus de rotació durant 1 o 2 minuts.
- 6.- Afegir dissolució saturada de clorur de sodi, fins que la fase hexànica ocupi la zona del coll del matràs. Deixar sedimentar fins que quedi ben clarificada la dissolució hexànica (es pot ajudar imprimint rotacions molt suaus al matràs, en posició vertical, i reposant el cul del matràs sobre la taula de treball).
- 7.- Prendre amb microxeringa, prèviament netejada amb hexà, uns 2 μ l de la fase hexànica i injectar en el cromatògraf de gasos (si no s'injecta al moment, poden guardar-se 4 o 5 ml de fase hexànica en tubs de 10 ml amb tap roscat, durant uns quants dies).

Paràmetres cromatogràfics :

Gas portador = nitrogen

Flux gas portador = 50 ml/mn.

Columna = 15% etilenglicolsuccinat sobre pols refractari de 40/60 malles. 2 m X 4 mm diam int. Condicionada de 15 a 24 hores a 220°C (sense connectar al detector) a un flux de gas portador de 20 ml/mn.

Detector = Ionització de flama (DIF), amb flama d'hidrogen-aire.

Temperatura de columna = 200 °C

Temperatura injecció = 250 °C.

Temperatura detector = 250 °C.

Atenuació de sensibilitat = entre 1.000 i 2.000.

Velocitat registre = 5 mm/mn.

El flux de gas portador es verifica amb un fluxòmetre de bombolla i un cronòmetre a la sortida de la columna. El valor que aquí és dona és únicament orientatiu. El valor òptim es determina experimentalment de manera que el metiloleat (preparat a partir d'un patró de trioleat de glicerina) presenti un temps de retenció de al voltant de 14 o 15 minuts. Un cop establert el flux òptim, l'utilitzarem en totes les determinacions fins que la columna comenci a envellir.

CÀLCULS

Expressarem el resultat com composició relativa dels àcids grassos en %, referits al total d'àcids grassos. Considerem que la quantitat de cada component es proporcional a l'àrea del pic corresponent (aquesta aproximació no és exacta del tot, però és suficientment satisfactòria pel que fa als àcids grassos).

El percentatge d'un determinat àcid gras serà:

$$p(\%) = \frac{A_i}{A_T} \cdot 100$$

essent A_i l'àrea corresponent del pic de l'àcid gras i A_T la suma de les àrees de tots els pics de tots els àcids grassos.

OBSERVACIONS

Abans de realitzar aquesta pràctica caldrà efectuar un estudi previ i unes quantes pràctiques senzilles per familiaritzar a l'estudiant amb l'ús del cromatògraf de gasos, si és el cas de que no es té experiència prèvia.

Per un càlcul més exacte caldria tenir en compte els factors de resposta dels diferents àcids grassos, determinats teòricament considerant l'estructura dels èsters metílics i la resposta relativa del DIF per cada configuració química, o, millor encara, experimentalment utilitzant patrons dels diferents àcids grassos; però, tanmateix, el càlcul sense tenir en compte aquests factors, són, en general suficientment aproximats per fer una caracterització i classificació del greix analitzat.

Si es tracta d'àcids grassos lliures o d'oleïnes industrials d'acidesa superior al 80 %, pot ometres la metanolisi alcalina.

El mètode no és apte per greixos amb un contingut d'insaponificable superior al 2 % (la majoria de greixos no superen aquest valor).

Qüestionari 22.1.- Àcids grassos per CG

1.- Per què la temperatura de condicionament de la columna és superior a la temperatura de treball?

2.- Com es detecta l'envelliment de la columna?

- 3.- Deduir raonadament les fórmules utilitzades en els càlculs.
- 4.- Fer l'esquema gràfic del procediment analític.
- 5.- Confeccionar el corresponent "butlletí d'anàlisi".
- 6.- Per què pot ometir-se la metanolisi alcalina en els àcids grassos lliures?
- 7.- Com serien els càlculs si tinguéssim en compte els factors de resposta?
- 8.- Idear l'esquema d'un protocol d'anàlisi per calcular els factors de resposta, treballant amb patrons purs d'àcids grassos.