

## I. Analiza składu triglicerydów

### 1. Triglicerydy – wstęp.

Z chemicznego punktu widzenia tłuszcze roślinne i zwierzęce, zwykle nazywane są triglicerydami (choć prawidłowa nazwa brzmi tricylglicerole), są estrami kwasów tłuszczowych (kwasy karboksylowe, najczęściej C<sub>12</sub>-C<sub>24</sub>) i triwodorotlenowego alkoholu gliceryny. W organizmach żywych należą do tak zwanych lipidów, substancji o charakterze lipofilowym (obok fosfolipidów, steroidów, terpenów, prostagladyn, estrów witamin A, D, cholesterolu...).

Triglicerydy spełniają niezastąpioną rolę jako składnik pożywienia ssaków. Człowiekowi zaspakajają 30-40% zapotrzebowania energetycznego organizmu, są nieodzownymi rozpuszczalnikami lipofilowych witamin a także substratami szeregu ważnych szlaków metabolicznych m. in. syntezy hormonów prostagladyn i fosfolipidów. Tłuszcze naturalne są też bardzo ważnym surowcem dla przemysłu chemicznego. Obok tradycyjnych kierunków zastosowań, dynamicznie w ostatnich latach rozwija się tak zwana oleochemia, wyznaczając nowe perspektywiczne kierunki zastosowań triglicerydów: biodegradowalne nowej generacji środki powierzchniowo czynne, komponenty paliw motorowych, środków smarowych itd.

Pełna charakterystyka triglicerydów obejmuje oznaczenie rodzaju kwasów tłuszczowych w nich występujących oraz określenie ich pozycji – jest zagadnieniem złożonym. My ograniczymy się do próby oznaczenia średniej udziału poszczególnych kwasów karboksylowych w analizowanych naturalnych tłuszczach zwierzęcych i olejach roślinnych.

W przyrodzie odkryto ponad 800 różnych kwasów tłuszczowych. Najczęściej jednak spotykamy (na szczęście dla podejmujących trud ich analizy), kilkanaście kwasów tłuszczowych, wśród których dominujące znaczenia mają niewątpliwie: kwas

palmitynowy (C16:0), stearynowy (C18:0), oleinowy (C18:1), linolowy (C18:2) i linolenowy (C18:3). Skład danego triglicerydu zależy generalnie od gatunku organizmu, który go syntezuje, ale jest zmienny w dość szerokich granicach, na co wpływają zarówno indywidualne cechy osobnicze jak i tak prozaiczne przyczyny jak warunki klimatyczne, sposób odżywiania, wiek organizmu.

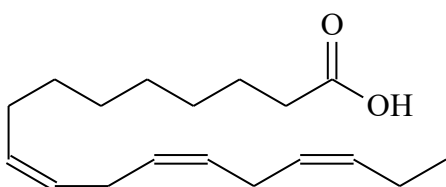
Warto zapamiętać sobie kilka uwag z zakresu chemii naturalnych triglicerydów:

- znamienita większość naturalnych kwasów tłuszczowych to związki o parzystej liczbie atomów węgla – wynika to z mechanizmu biosyntezy tych związków – w kolejnych etapach dołączane są fragmenty  $C_2$  - acetylowe
- naturalne nienasycone kwasy tłuszczowe są zawsze stereoizomerami *cis*-, co przyjęło się oznaczać literą Z – zusammen (w przeciwieństwie do E – entgegen)
- kwasy nasycone, o liniowej strukturze cząsteczki mają wysokie temperatury krzepnięcia (tłuszcze stałe w temperaturze pokojowej!) w przeciwieństwie do swych nienasyconych, a szczególnie polinienasyconych homologów
- dominującymi kwasami karboksylowymi o charakterze nasyconym są oczywiście palmitynowy (ssaki) i stearynowy (rośliny)
- charakterystycznymi kwasami tłuszczowymi występującymi w tkankach zwierząt morskich są polinienasycone struktury jak klupanodonowy – (Z,Z,Z,Z,Z)-4,8,12,15,19-dokozapentaenowy
- o dziwo wbrew cenie i wiadomością płynącym z reklam, skład oleju z oliwek jest zbliżony do kompozycji kwasów tłuszczowych występujących w oleju rzepakowym, (no ale ten specyficzny smak?)

Poniżej zestawiono najczęściej występujące w przyrodzie i najbardziej charakterystyczne kwasy tłuszczowe:

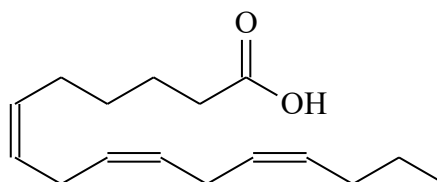
- masłowy C4:0 butanowy

- kapronowy C6:0                      heksanowy
- kaprylowy C8:0                      oktanowy
- kaprynowy C10:0                      dekanowy
- laurynowy C12:0                      dodekanowy
- mirystynowy C14:0                      tetradekanowy
- palmitynowy C16:0                      heksadekanowy
- stearynowy C18:0                      oktadekanowy
- arachidowy C20:0                      ejkozanowy
- behenowy C22:0                      dokozanowy
- lignocerowy C24:0                      tetrakozanowy
- oleinowy C18:1                      (Z)-9-oktadekenowy
- linolowy C18:2                      (Z,Z)-9,12-oktadekadienowy
- erukowy C22:1                      (Z)-13-dokozaenowy
- rycynolowy hydroksy-C18:1      12-hydroxy-(Z)-9-oktadekaenowy



$\alpha$ -linolenowy C18:3

(Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienowy



$\gamma$ -linolenowy C18:3

(Z,Z,Z)-6,9,12-oktadekatrienowy

Przykładowy skład najczęściej spotykanych tłuszczów zwierzęcych i olejów roślinnych przedstawia się następująco:

Źródło tłuszczu	Zawartość kwasów tłuszczowych [%]					
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	Inne
Rzepak	3.4	1.9	59.6	18.3	10.7	
Oliwka	14.2	2.0	70.0	12.6	1.0	

Soja	8.9	3.9	26.7	52.0	7.6	
Słonecznik	7.5	5.1	28.3	60.1	1.0	
Smalec	27.5	20.1	41.2	5.1	0.1	
Masło	30.1	10.5	25.0	2.4	2.7	C4:0-4.0; C12:0-12.6
Kokos	9.5	4.2	14.3	3.6	0.0	C12:0-48.5; C14:0-15.6
Len	4.2	3.2	27.4	16.1	46.8	
Orzeszki Tunga	2.3	3.0	8.2	8.3	-	70.3 - 9,11,13-oktadekatrienowy
Rycynus	1.9	1.4	5.7	6.5	0.6	83.7 – 12-hydroksy-9-oktadekaenowy

Proszę powyższe zestawienie mieć na uwadze. Zadaniem jakie sobie postawimy na tych ćwiczeniach laboratoryjnych będzie próba określenia źródła pochodzenia analizowanego triglicerydu. Oczywiście nie chodzi o to aby sprecyzować ściśle gatunek rośliny, z której na przykład olej pochodzi, stopień nasłonecznienia plantacji itp. Ostatecznie nie będziemy konkurować z Louistem de Finnes, ale coś sensownego będziemy mogli chyba powiedzieć, dać odpowiedź najbardziej prawdopodobną.

## 2. Nomenklatura kwasów tłuszczowych.

Stosowane są powszechnie co najmniej 4 sposoby nazewnictwa kwasów tłuszczowych. Dwa z nich już poznaliśmy: tradycyjny i systematyczny, jednoznaczny, zgodny z zasadami chemii organicznej. Pozostałe dwa używane są raczej w chemii żywności ale myślę, że warto się z nimi zapoznać z uwagi na przedmiot naszych zajęć, niewątpliwie z chemią żywności organicznie związany.

Bez wnikania w szczegóły zasady tych „nomenklatur” zostaną podane na przykładach.

ω

α- linolenowy C18:3

γ-linolenowy C18:3

18:3(ω-3)PUFA

18:3(ω-6)PUFA

- PUFA – Polyunsaturated fatty acid

- cyfra przy ω określa przy którym atomie węgla zaczynają się wiązania podwójne licząc, wbrew ogólnie przyjętym zasadom, od „końca węglowodorowego” kwasu karboksylowego. Ma to duże znaczenie fizjologiczne. Polinienasycone kwasy karboksylowe szeregu ω-6, są niezwykle cenne dla metabolizmu człowieka. Kwas γ-linolenowy występuje w oleju z wiesiołka, ale i też w owocach czarnej porzeczki!

Δ

α- linolenowy C18:3

γ-linolenowy C18:3

18:3Δ<sup>9Z,12Z,15Z</sup>

18:3Δ<sup>6Z,9Z,12Z</sup>

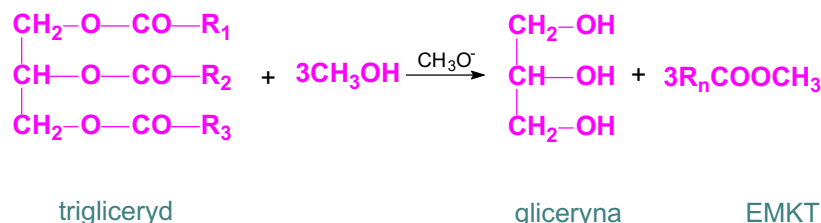
Niewątpliwie sposób bardziej precyzyjny, jednoznaczny.

### 3. Zasady analityki triglicerydów.

Ilościowego oznaczenia udziału poszczególnych kwasów tłuszczowych w próbkach triglicerydów niewątpliwie najłatwiej dokonać korzystając z chromatografii gazowej. Przedtem jednak zasadniczo zmienić strukturę chemiczną analizowanych związków, „uwalniając” poszczególne kwasy karboksylowe. Glicerynę trzeba w tym zastąpić innym alkoholem – monohydroksylowym. Najlepiej metanolem. W wyniku takiego procesu metanolizy uzyskujemy estry metylowe kwasów tłuszczowych – EMKT, które są połączeniami o stosunkowo wysokiej lotności, ich analiza metodą GC jest możliwa.

Opracowano kilka sposobów metanolizy triglicerydów. Najprostszy to zasadowa alkoholiza tłuszczu metanolem:

## Metanoliza triglicerydów



Doskonałym katalizatorem tej reakcji, do celów analitycznych prowadzonej w nadmiarze metanolu, jest metanolan wapnia, związek słabo rozpuszczalny w mieszaninie reakcyjnej, co pozwala poddawać analizie chromatograficznej produkty metanolizy bezpośrednio po reakcji. Rzecz jasna można jako katalizator stosować tradycyjnie roztwór wodorotlenku sodu w metanolu, ale obecność NaOH w analizie jest co najmniej kłopotliwa. Ten prosty sposób zawodzi gdy analizowana próbka zawiera wolne kwasy tłuszczowe. Związki te dezaktywują zasadowe katalizatory tworząc mydła. Ponadto tym sposobem wolnych kwasów tłuszczowych zanalizować się nie da. Pozostaje analiza tradycyjna, której poszczególne etapy zilustrować można następująco:

- zmydlanie próbki wodnym roztworem wodorotlenku sodu
- rozkład mydeł sodowych roztworem kwasu solnego
- ekstrakcja wolnych kwasów tłuszczowych do warstwy organicznej na przykład eterem dietylowym
- synteza estrów metylowych kwasów tłuszczowych na drodze bezpośredniej reakcji z metanolem, katalizowana kwasem Lewisa (trifluorek boru)

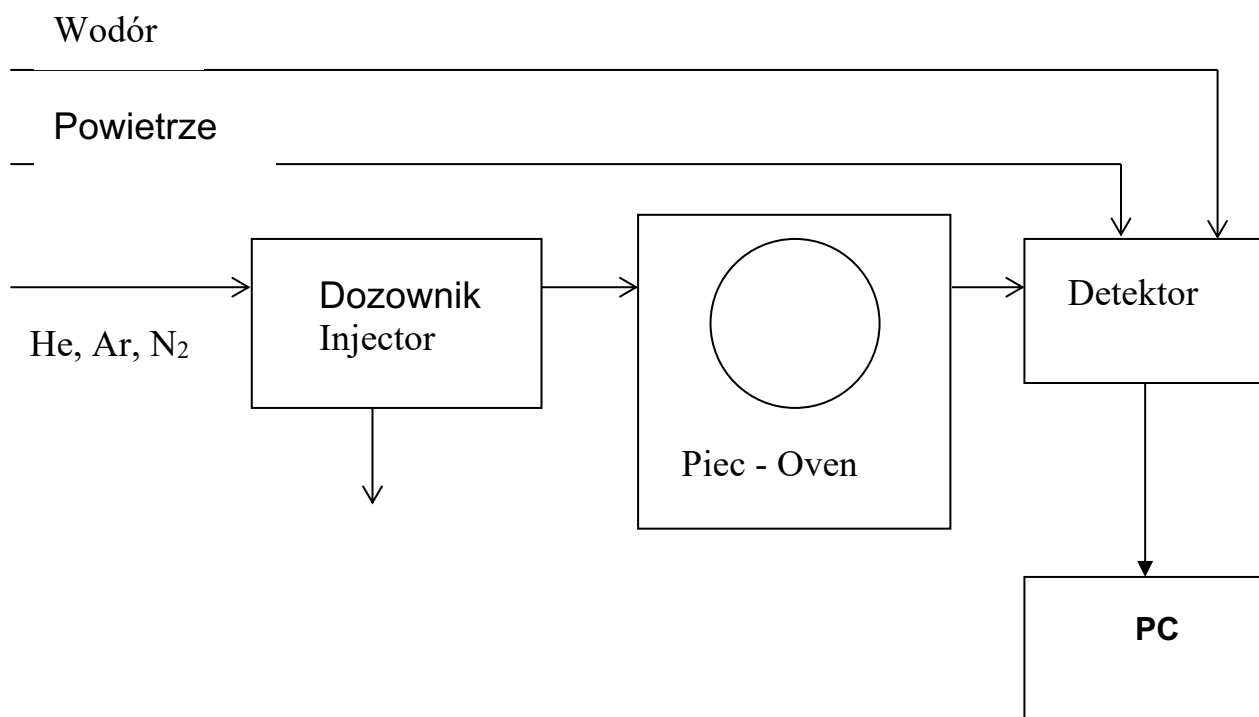
Bardziej złożone procedury pozwalają oznaczać skład wolnych kwasów tłuszczowych (selektywna metanoliza azometanem) obok tych związanych z gliceryną.

#### 4. Chromatografia gazowa - GC.

Proszę, żadną miarą nie traktować poniżej zamieszczonego krótkiego tekstu jako kompendium wiedzy z chromatografii gazowej!!! Tu zostanie zasygnalizowanych tylko kilka zagadnień bezpośrednio związanych z wykonywanymi ćwiczeniami.

GC jest instrumentalną metodą rozdziału mieszanin związków chemicznych w stanie gazowym, a więc takich które możemy przeprowadzić w stan pary bez rozkładu termicznego! Metoda daje informacje jakościowe i ilościowe o składzie analizowanych mieszanin z rzadko spotykaną w technice efektywnością rozdzielczą.

#### Schemat blokowy GC-FID



**Gaz nośny.** Transportuje analizowaną próbkę od dozownika do detektora. Wymagany inertny, najlepszy w większości przypadków jest hel, ale i najdroższy. Wpływa istotnie na efektywność rozdziału analizowanych mieszanin. Gazy różnią się

m. in. przecież lepkością, przewodnictwem cieplnym, reaktywnością chemiczną. My używamy azotu.

**Dozownik.** Tu wprowadza się próbkę do układu analitycznego. Na przykład mikrostrzykawką poprzez membranę z inertnego kauczuku. W dozowniku próbka odparowuje i dalej przemieszcza się w strumieniu gazu nośnego. Dozowniki mają bardzo niekiedy złożoną konstrukcję i spełniają specjalne zadania. Często stosowane są automaty, tak zwane autosamplery. Istotne znaczenie ma temperatura pracy dozownika. Za niska, nie zapewnia odparowania próbki, za wysoka może ją rozłożyć. Zwykle nie cała wprowadzona próbka do detektora poddawana jest analizie. Gaz nośny jest dzielony i część wyprowadza się na zewnątrz. Ta procedura w pewnym sensie zastępuje rozcieńczanie analizowanej próbki do wymaganego poziomu. Stosunek podziału strumień analizowany/strumień opuszczający aparaturę nazywany jest splitem. Pamiętajmy! – im większy split, tym mniejszy próg wykrywalności, co wcale nie znaczy, że optymalny jest jak najmniejszy.

**Piec.** W piecu znajduje się kolumna chromatograficzna, w której przebiega zasadniczy proces rozdziału analizowanych mieszanin. Rolą pieca jest utrzymywanie kolumny w precyzyjnie zaprogramowanej temperaturze. Kilka uwag odnośnie temperatury analizy, obok rodzaju kolumny najważniejszego parametru:

- wyższa temperatura to krótszy czas retencji (czas analizy)
- niższa temperatura podnosi efektywność rozdziału
- temperatura zbyt niska to długi czas analizy i nieostre sygnały w detektorze („rozwleczone” piki)
- im temperatura wyższa tym lepkość gazy wyższa, zwiększają się opory przepływu przez kolumnę, spada przepływ gazu.



**Kolumny kapilarne.** – „Siała napędowa” procesu rozdziału substancji w kolumnie chromatograficznej są różnice w ich temperaturach wrzenia i fizykochemiczne oddziaływanie z materiałem, zwykle polimerowym pokrywającym powierzchnię wewnętrzną kolumny, ich wzajemne powinowactwo. Pamiętajmy, wybierając rodzaj kolumny, że podobne oddziałuje najsilniej z podobnym. Silnie polarne związki przechodzą przez niepolarną kolumnę jak przez „pustą rurę” bez najmniejszej skłonności do rozdziału. Obecnie standardowo używa się kolumn kapilarnych – są to kwarcowe rurki o długości nawet kilkudziesięciu metrów, wewnątrz pokryte fazą aktywną a na zewnątrz elastycznym polimerem podnoszącym ich trwałość mechaniczną.

Przykłady kolumn chromatograficznych

**HP – 1** – niepolarna – 100% olej metylosilikonowy, analiza węglowodorów

**HP – 5** – słabo polarna – 95% olej metylosilikonowy, 5% olej fenylosilikonowy, aromaty, chloroalkany, odporne na wysokie temperatury, do 360°C

**HP – INNOWAX** – mocno polarna, związki tlenowe. Pracuje do 260°C.

**HP Chiral –  $\beta$  – Cyclodextrin** - chiralna, rozdziela izomery optyczne

Parametry pracy kolumn GC:

- rodzaj wypełnienia
- długość kolumny [5 – 100 m] - length
- średnica wewnętrzna [0,1 – 0,53 mm] – ID
- grubość fazy aktywnej [ $\sim$ 01-05  $\mu$ m] – film thickness

Bardziej sprawna kolumna to: długa i o małej średnicy. Ale taka kolumna to zwykle długi czas analizy i mniej stabilna praca.

**Detektor FID.** Doskonały detektor do analizy węglowodorów. Zasadniczym elementem detektora jest palnik wodorowy (stąd wodór i powietrze w naszym GC).

Palący się płomień wodoru w detektorze ma określone, mierzone przez układ przewodnictwo elektryczne. W chwili gdy do płomienia dotrze ze strumieniem gazu nośnego nasza próbka, przewodnictwo gwałtownie zmienia się. Ta zmiana wyrażana zwykle w mV jest źródłem tworzenia się sygnałów w detektorze, rejestrowanych następnie przez odpowiedni układ elektroniczny.

Zasadnicze parametry pracy detektora to: temperatura, dopływ powietrza i wodoru.

**PC.** Sterowanie chromatografem, rejestracja, wyników, przetwarzanie danych

## 5. Analiza EMKT – wiadomości ogólne.

Podstawą analizy jest porównanie chromatogramu analizowanej próbki estrów metylowych kwasów karboksylowych i mieszaniny wzorcowej EMKT o znanym składzie. Położenie sygnałów (pików), estrów metylowych poszczególnych kwasów jest identyfikowane na podstawie ich czasów retencji – analiza jakościowa. Poziom sygnału, zintegrowana powierzchnia pików, jest proporcjonalna do stężenia analizowanego związku – podstawa analizy ilościowej.

Wzorzec estrów metylowych niskoerukowego oleju rzepakowego (AOCS)

Estry metylowe:

1. Kwasu mirystynowego	(14:0)	1,0 %
2. Kwasu palmitynowego	(16:0)	4,0 %
3. Kwasu stearynowego	(18:0)	3,0 %
4. Kwasu oleinowego	(18:1)	60,0 %
5. Kwasu linolowego	(18:2)	12,0 %
6. Kwasu linolenowego	(18:3)	5,0 %
7. Kwasu arachidowego	(20:0)	3,0 %
8. Kwasu cis-11-eikozanowego	(20:1)	1,0 %
9. Kwasu behenowego	(22:0)	3,0 %
10. Kwasu erukowego	(22:1)	5,0 %
11. Kwasu lignocerowego	(24:0)	3,0 %

## 6. Parametry układu chromatograficznego GC.

### Dozownik:

- objętość dozowanej próbki 1  $\mu$ l
- gaz nośny: azot
- split: 1:10
- temperatura dozownika: 250°C

### Kolumna:

- HP-Innowax, 25m, ID 0,32 mm
- stałe ciśnienie 14,5 psi

### Program temperaturowy:

- start 150°C – 1 min
- narost I 15°C/min do 200°C – 2 min
- narost II 5°C/min do 220°C – 2 min

### Detektor:

- temperatura 280°C
- przepływ H<sub>2</sub> – 40ml/min
- przepływ N<sub>2</sub> – 25ml/min
- przepływ powietrza – 40ml/min

## 7. Procedura analityczna.

Student otrzymuje do analizy dwie próbki. Jedna to mieszanina estrów metylowych kwasów tłuszczowych (EMKT), drugą stanowi próbka naturalnego triglicerydu (TG) o nieznanym składzie. Oczywiście droga dalszego postępowania jest w każdym z przypadków różna. Zadaniem jest oznaczenie ilościowego składu kwasów tłuszczowych w obydwu próbkach.

### 7.1. Analiza EMKT.

W zasadzie próbka po rozcieńczeniu może być bezpośrednio poddawana analizie chromatograficznej. Do fiolki o pojemności 2 ml dozujemy około 25 mg EMKT (1 kropla) i około 1,5 ml węglowodorowego rozpuszczalnika – heksanu lub heptanu. Fiolkę zamykamy i po chwili wytrząsania jest gotowa do analizy.

### 7.2. Analiza TG

W kolbie o pojemności 10 ml umieszczamy: 1 kroplę triglicerydu, 2 ml mieszaniny metanol-heptan (3:1), 50 mg metanolanu wapnia i mieszadło magnetyczne. Kolbę zamykamy chłodnicą zwrotną i umieszczamy na płycie mieszadła magnetycznego (500 obr/min). Mieszaninę reakcyjną doprowadzamy do wrzenia i w tym stanie utrzymujemy 10 min. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej, próbka EMKT jest gotowa do analizy chromatograficznej.