

## Zadanie 2. Analiza triglicerydów - porównanie składu kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego i oliwy z oliwek

### 1. Triglicerydy – wstęp

Z chemicznego punktu widzenia tłuszcze roślinne i zwierzęce, zwykle nazywane są triglicerydami (choć prawidłowa nazwa brzmi triacyloglicerole), 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.

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.

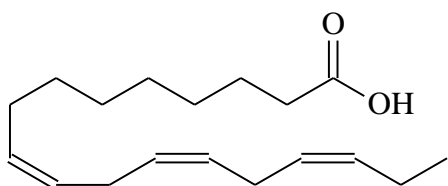
W przyrodzie odkryto ponad 800 różnych kwasów tłuszczowych, najczęściej jednak spotykamy kilkanaście, wśród których dominujące znaczenia mają niewątpliwie: kwas palmitynowy (C<sub>16</sub>:0), stearynowy (C<sub>18</sub>:0), oleinowy (C<sub>18</sub>:1), linolowy (C<sub>18</sub>:2) i linolenowy (C<sub>18</sub>: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:

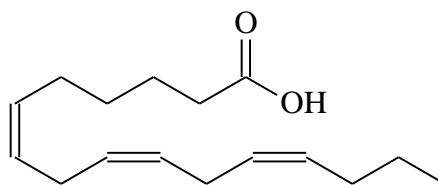
- znamienita większość naturalnych kwasów tłuszczowych to związki o parzystej liczbie atomów węgla – wynika to z mechanizmu biosyntezy tych związków – w kolejnych etapach dołączane są fragmenty C<sub>2</sub> - acetylowe
- naturalne nienasycone kwasy tłuszczowe są zawsze stereoizomerami *cis*-, co przyjęło 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

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

Tabela. Skład najczęściej spotykanych tłuszczów zwierzęcych i olejów roślinnych:

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



sposobem wolnych kwasów tłuszczowych zanalizować się nie da. Pozostaje analiza tradycyjna, której poszczególne etapy zilustrować można następująco:

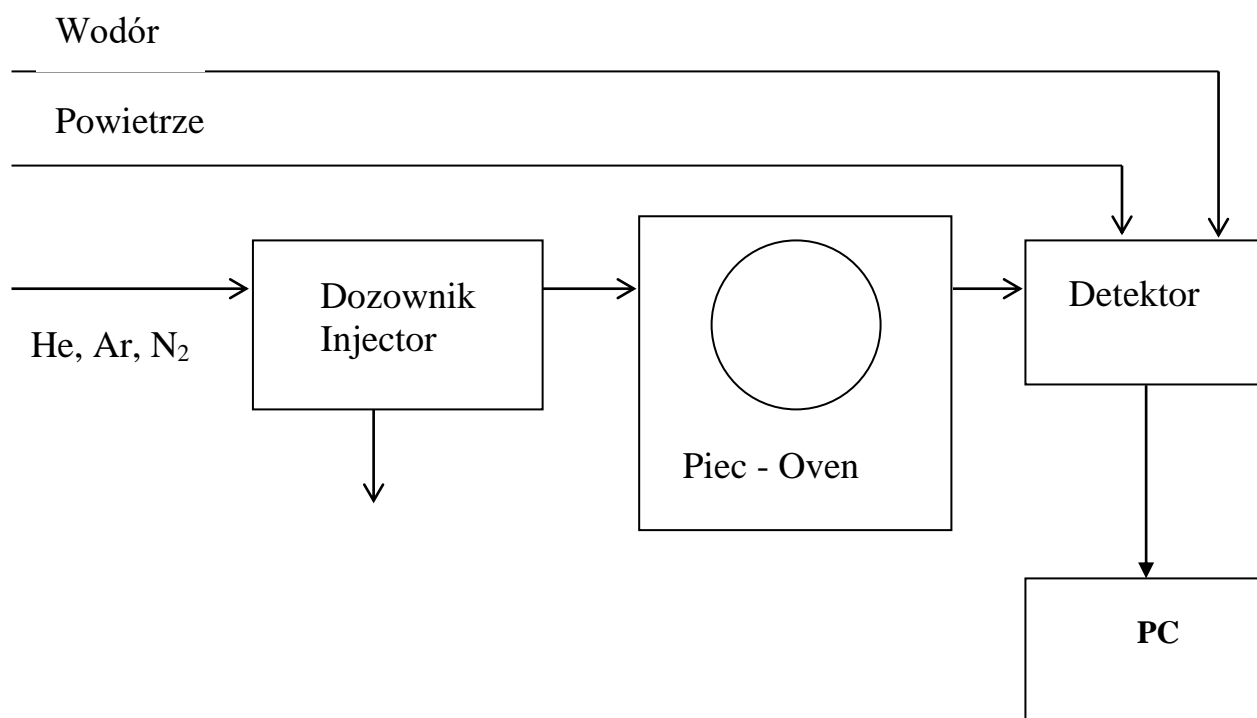
- zmydlanie próbki wodnym roztworem wodorotlenku sodu
- rozkład mydeł sodowych roztworem kwasu solnego
- ekstrakcja wolnych kwasów tłuszczowych do warstwy organicznej na przykład eterem dietylowym
- synteza estrów metylowych kwasów tłuszczowych na drodze bezpośredniej reakcji z metanolem, katalizowana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

GC jest instrumentalną metoda rozdzielu 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 rozdzielu analizowanych mieszanin. Gazy różnią się m. in. przecież lepkością, przewodnictwem cieplnym, reaktywnością chemiczną.

**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 rozdzielania 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 rozdzielania
- 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.** – „Siłą napędową” procesu rozdzielania 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 rozdzielania. 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 [~01-05  $\mu\text{m}$ ] – 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). Pałący 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):

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: 1:25
- temperatura dozownika: 250°C

*Kolumna:*

- BP-5 MS, 30m, ID 0,25 mm
- przepływ gazu 1 ml/min

*Program temperaturowy:*

- start 80°C – 6 min
- narost I 15°C/min do 170°C
- narost II 5°C/min do 260°C

*Detektor:*

- temperatura 280°C
- przepływ H<sub>2</sub> – 40 ml/min
- przepływ powietrza – 400 ml/min

## 7. Procedura analityczna

Celem ćwiczenia jest porównanie składu kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego i oliwy z oliwek oraz oznaczenie jakościowe kwasów tłuszczowych w badanych próbkach. Student otrzymuje do analizy trzy próbki. Jedną stanowi mieszanina wzorców/standardów estrów metylowych kwasów tłuszczowych (EMKT), drugą i trzecią stanowią próbki naturalnych triglicerydów, oleju rzepakowego (TGR) i oliwy z oliwek (TGO). Próbkę mieszaniny wzorców poddajemy bezpośredniej analizie

chromatograficznej, natomiast próbki trójglicerydów musimy do analizy chromatograficznej odpowiednio przygotować. W analizie na chromatografii gazowej próbkę wzorców oznaczamy jako SKY a próbki estrów badanych kwasów tłuszczowych, jako TGXY, gdzie X = O lub R, Y – nr zespołu (jedynkę ma zespół rozpoczynający ćwiczenia od Zadania 1). Wyniki analiz zapisujemy w katalogu: C:\TC4\GC\Dane\Kurs6\.

### 7.1. Analiza EMKT

W zasadzie próbka wzorców estrów metylowych kwasów tłuszczowych po rozcieńczeniu może być bezpośrednio poddawana analizie chromatograficznej. Do fiolki dodajemy określoną ilość EMKT i rozpuszczamy w określonej objętości heksanu (jest już przygotowana). Analizie chromatograficznej poddajemy 1 µl przygotowanego roztworu (patrz instrukcja obsługi GC). Metoda analizy chromatograficznej o nazwie PUFA\_GC.MTH została zaprogramowana wcześniej i znajduje się w katalogu C:\TC4\GC\Metody\

### 7.2. Analiza TG

Do fiolki o pojemności 5 ml dodajemy 20 µg oleju (potrzebny jest roztwór podstawowy), 40 µl metanolanu sodowego i 960 µl metanolu. Fiolkę szczelnie zakręcamy, wytrząsamy i umieszczamy na 10 min. w bloku grzejnym o temp. 100 °C. Po upływie wyznaczonego czasu próbkę ochładzamy do temp. pokojowej, dodajemy 1,5 ml kwasu Lewisa (BF<sub>3</sub> w metanolu) i uzyskaną mieszaninę reakcyjną ponownie umieszczamy w bloku grzejnym (10 min., 100 °C). Po tym czasie zawartość fiolki schładzamy i dodajemy 1 ml heksanu. Fiolkę zakręcamy i wytrząsamy (ręcznie) przez ok. 1 min. Następnie dodajemy 1 ml nasyconego roztworu NaCl, fiolkę przez chwilę wytrząsamy, po czym wirujemy przez 5 min. przy 2200xg (można pozostawić w spokoju do swobodnego rozwarstwienia). Następnie za pomocą pipety zbieramy warstwę organiczną (górną) i przenosimy ją do plastikowej probówki Eppendorfa 2ml. Do tak uzyskanego ekstraktu dodajemy ok. 0,5 g bezwodnego siarczanu sodowego, celem usunięcia resztek wody, wytrząsamy przez ok. 1 min, wirujemy ok. 3 min. przy maksymalnej sile odśrodkowej, po czym nadsącz przenosimy do szklanej fiolki o pojemności 2 ml, całość rozpuszczalnika usuwamy za pomocą strumienia azotu. Suchą pozostałość rozpuszczamy w 100 µl heksanu i 1 µl takiego roztworu poddajemy analizie chromatograficznej podobnie jak wzorce EMKT. Obecne w próbce estry metylowe kwasów tłuszczowych identyfikujemy na podstawie czasu retencji w porównaniu z czasami retencji wzorców i danymi producenta.

## 8. Wyniki i wnioski

W sprawozdaniu porównaj uzyskane chromatogramy wzorców i badanych olejów i na podstawie danych producenta określ rodzaj kwasów tłuszczowych obecnych w próbkach (patrz załącznik Zadanie II – TG wyniki).

