

## Vysokoučinná kvapalinová chromatografia triacylglycerolov

ŠTEFAN SCHMIDT—SILVIA HURTOVÁ

**Súhrn:** Predložená práca uvádza literárny prehľad analýzy triacylglycerolov jedlých tukov a olejov metódou HPLC na obrátených fázach pri použití bezvodých mobilných fáz. Diskutuje sa vplyv mnohých faktorov ovplyvňujúcich chromatografický proces, ako teplota, dĺžka kolóny, priemer častíc náplne kolóny, dĺžka naviazaného uhľovodíkového reťazca, polarita rozpúšťadla, zloženie a prietok mobilnej fázy. Pozornosť sa venuje aj zvýšeniu účinnosti a selektivity separácie najmä tzv. kritických párov triacylglycerolov za súčasného zníženia času analýzy.

Prírodné tuky a oleje rastlinného a živočíšneho pôvodu sú zložené z veľmi pestrých kombinácií rôznych triacylglycerolových molekúl, ktoré určujú ich fyzikálnu povahu, chemické vlastnosti a biologickú hodnotu. Analýza triacylglycerolov, ako majoritných zložiek jedlých tukov a olejov, prešla svojim vývojom. Prvé separačné techniky, frakcionácia a kryštalizácia, sa ukázali pre rutinnú analýzu zdĺhavé, navyše vyžadovali veľké množstvá vzoriek a neboli ani dostatočne reprodukovateľné [1].

Rozhodujúcim krokom, ktorý znamenal značný pokrok v analýze triacylglycerolov (TAG), bolo zavedenie chromatografických metód. V minulosti sa na chromatografickú analýzu TAG využívali metódy tenkovrstvovej a neskôr rozdeľovacej plynovej chromatografie (TLC a GLC). Týmito postupmi sa TAG zadelovali len do určitých tried. Metóda TLC, najmä so stacionárnou fázou (SF) modifikovanou  $\text{Ag}^+$  iónmi (niekedy aj tzv. argentačná TLC, resp. Ag-TLC), separuje TAG na základe stupňa ich nenasýtenosti, t.j. podľa počtu dvojitéch väzieb (NDB — number of double bonds). Metóda GLC separuje na nepolárnych fázach TAG podľa dĺžky reťazca, t.j. podľa počtu atómov uhlíka (CN — carbon number) v acylovom reťazci mastných kyselín triacylglycerolov.

---

Ing. Štefan Schmidt, CSc., Ing. Silvia Hurtová, Katedra mlieka, tukov a hygieny potravín, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Keďže zloženie prírodných triacylglycerolov, vyskytujúcich sa v tukoch a olejoch, je mimoriadne rôznorodé, žiadna jednoduchá analytická technika nemôže rozdeliť všetky TAG v nich prítomné. Preto ani Ag-TLC, ba ani GLC, neposkytujú pri analýze triacylglycerolov uspokojivé výsledky. Úplná elúcia zložiek TAG, a teda aj ich dobrá separácia, je možná iba kombináciou najmä chromatografických metód. Kombináciou Ag-TLC a GLC možno získať dobré výsledky, avšak hlavnou nevýhodou týchto techník najmä Ag-TLC je ich pracnosť, časová náročnosť a nie sú ani dostatočne reprodukovateľné [1—3]. Metóda kapilárnej vysokoteplotnej GLC je účinná najmä pri analýze relatívne nasýtených triacylglycerolov živočíšneho pôvodu, ale problematická pri analýze olejov s vyššou nenasýtenosťou TAG molekúl (napr. rybie oleje a niektoré rastlinné oleje).

Značný pokrok v chromatografickej analýze TAG sa dosiahol v poslednej dekáde so zavedením metódy vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC), ktorá prekonala predtým používané metódy Ag-TLC a GLC. Používaním vysokoúčinnných kolón sa podstatne zlepšilo rozlíšenie TAG zmesí na dobre definovateľné druhy alebo skupiny [4]. Metóda HPLC (vysokoúčinnná kvapalinová chromatografia na obrátených fázach (RP) s bezvodou (NA) mobilnou fázou), sa ukázala ako veľmi vhodná na kvalitatívnu a s určitým obmedzením i kvantitatívnu analýzu triacylglycerolov [5].

Tento typ analýzy má význam z hľadiska stanovenia identity tukov a olejov, ich kvalitatívnej kontroly, t. j. zisťovanie prítomnosti cudzorodých látok, alebo prítomnosti prídavku menej kvalitných tukov (napr. prídavok kokosového alebo stuženého tuku ku kakaovému maslu). Na základe nových poznatkov, týkajúcich sa zloženia TAG, umožňuje táto metóda študovať aj biosyntézu v rastlinných a tkanivových bunkách [6].

### Teoretické aspekty a prehľad literatúry

Chromatografický systém RP-HPLC (RP kolóny s  $C_8$ , resp.  $C_{18}$  skupinami chemicky viazanými na silikagéli) separuje TAG nielen podľa počtu atómov uhlíka, ale aj podľa počtu dvojitych väzieb (NDB). Delenie sa uskutočňuje na základe rozdeľovacieho (partičného) čísla PN (partition number), resp. hodnoty ECN (equivalent carbon number) [4, 5], ktoré je definované ako:

$$PN \equiv ECN = CN - f \times NDB,$$

kde koeficient  $f$  nadobúda hodnotu okolo 2 [7].

S klesajúcim počtom atómov uhlíka (CN) a s rastúcim počtom dvojitych väzieb (NDB) budú TAG rýchlejšie eluovať z kolóny. Prítomnosť každej dvojitej

väzby je chromatograficky ekvivalentná skráteniu reťazca o dva atómy uhlíka [8].

Technika RP-HPLC sa v minulých rokoch využívala na separáciu zložitých zmesí TAG, o čom svedčia i mnohé publikované práce. Väčšina z nich sa zaoberá využitím bezvodých mobilných fáz a alkylových stacionárnych fáz v kolóne (t. j. NARP-HPLC) s refraktometrickým (RI) detektorom [2].

Aj napriek mnohým výhodám RP-rozdeľovacej chromatografie (t. j. chromatografie s nepolárnou stacionárnou fázou), v porovnaní s adsorpčnou chromatografiou alebo chromatografiou na normálnych (polárnych) fázach, ostáva ešte celý rad ťažkostí ovplyvňujúcich rozlíšenie jednotlivých štruktúr TAG z prírodných materiálov [4]:

1. vodno-alkoholické rozpúšťadlá (normálne používané ako mobilné fázy) nie sú vhodné na separáciu TAG tukov a olejov, vzhľadom na použité stacionárne fázy kolón (RP-kolóny). Preto sa používajú organické mobilné fázy (MF), ktoré sú vhodnejšie na analýzu TAG, hoci môže dôjsť k stratám, spôsobeným vyzrážaním najmä trinasýtených foriem TAG v kolóne počas ich analýzy;

2. horšie rozlíšenie TAG s rovnakou hodnotou PN, resp. ECN, hlavne tzv. kritických párov zmesí TAG s minimálnymi rozdielmi v dĺžke acylového reťazca a stupni nenasýtenosti mastných kyselín (MK) tvoriacich triacylglyceroly;

3. ťažkosti pri dosiahnutí dobrého rozlíšenia separovaných TAG, zahrňujúcich širokú oblasť PN, v prijateľnom čase analýzy;

4. problémy spojené s detekciou TAG, najmä pri použití UV a RI detektora. Pri použití UV detektora, extrémne nízka absorpcia TAG v UV oblasti spektra vedie k ohraničenému počtu organických rozpúšťadiel používaných ako mobilná fáza. Rozpúšťadlá musia solubilizovať triacylglyceroly a zároveň neabsorbovať v UV oblasti. Pri použití RI detektora sú ťažkosti najmä so stabilitou alebo nízkou citlivosťou, spojené s nemožnosťou použitia gradientovej elúcie na zlepšenie separácie triacylglycerolov;

5. obťažná identifikácia chromatografických pík (najmä nerozlíšených kritických párov TAG), spojená s problémom získania individuálnych TAG v čistom stave.

Prvá významná práca v HPLC analýze triacylglycerolov bola publikovaná v roku 1975, kedy Pei a kol. [9] úspešne demonštrovali aplikáciu HPLC analýzy TAG na RP kolónach (častice 35—45  $\mu\text{m}$ ), pri použití MF metanol (MeOH) :  $\text{CHCl}_3$  = 9 : 1 a RI detektora.

Základy analýzy triacylglycerolov metódou HPLC položili Wada a kol. [7, 10], ktorí použili na analýzu sójového oleja ODS kolóny ( $\mu$ -Bondapak C18) a mobilnú fázu MeOH :  $\text{CHCl}_3$  = 9 : 1. Jednotlivé zberané TAG frakcie detegované RI detektorom sa potom analyzovali rozdeľovacou plynovou chromatografiou. Na charakterizáciu zložiek triacylglycerolov, Wada definoval a použil

už uvedené kritérium PN, ktoré zohľadňuje vplyv CN aj NDB acylových reťazcov mastných kyselín v triacylglyceroloch.

Koncom 70. rokov prispeli k pokroku vo vývoji analýzy TAG práce Parrisa [11, 12], ktorý separoval TAG palmového a kukuričného oleja metódou NARP-HPLC na kolóne Zorbax ODS (5  $\mu$ m častice). Použil RI a UV detektor a izokratickú elúciu s MF dichlórmetán (DCM) : acetonitril (ACN) a ACN : tetrahydrofurán (THF) v rôznych objemových pomeroch. Hörslof a kol. [13] sa sústredili na separáciu tzv. kritických párov rôznych typov TAG, pri použití viacerých rozpúšťadlových systémov na vzorkách kokosového a palmojadrového oleja.

Začiatkom 80. rokov Plattner [14] opísal separáciu kritických párov TAG obsahujúcich kyselinu palmitovú (16 : 0) a olejovú (18 : 1) s prídavkom AgNO<sub>3</sub> k rozpúšťadlovému systému. Kritické páry sú definované ako zložky, ktoré majú rovnaké PN, resp. ECN, ako napr. (16 : 0) a (18 : 1) s ECN = 16. Vo svojej práci Plattner sledoval i vplyv výberu kolón a uviedol rozdiely v selektivitě stacionárnych fáz kolón v systéme RP-HPLC.

Roku 1981 bola publikovaná práca Jensena [15], ktorý sledoval vplyv teploty kolóny na separáciu TAG olivového a kokosového oleja na LiChrosorb RP-18 náplňových kolónach, keď použil mobilnú fáz zmes ACN : THF : n-hexán. Zistil lineárny vzťah funkčnej závislosti  $\log k = f(1/T)$ , kde  $k$  je kapacitný faktor a  $T$  teplota v kelvinoch.

Skutočný prelom v analýze triacylglycerolov zaznamenali práce El-Hamdyho a Perkinsa [16, 17], ktorí študovali interakcie MF a náplní kolón, vplyv polaritý MF, veľkosti častíc náplne a dĺžku uhľovodíkového reťazca naviazaného na silikagél, v snahe optimalizovať podmienky RP-HPLC. Zaoberali sa tvorbou kritických párov, ktoré spôsobujú jednu z najväčších ťažkostí pri separácii triacylglycerolov metódou RP-HPLC, vzhľadom na ich identické správanie napriek rozdielom v dĺžke uhľovodíkového reťazca, počte dvojitéh väzieb a geometrickej konfigurácii. Tieto kritické páry, napr. OOO ( 54 : 3), POO (52 : 2), POP (50 : 1) a PPP (48 : 0) (O — olejová kyselina, P — palmitová kyselina), majú rovnaké ECN = 48 : 0. Rovnako sa medzi kritické páry zaraďujú i polohové izoméry TAG napr. OOO a EEE ( E — elaidová kyselina). Počas tejto práce [17] sa dosiahla výborná separácia kritických párov TAG ako OOO, POP, PPP, ďalej StOO, StOP a StStP (St — stearová kyselina), ako i OOO a EEE. Prínosom tejto práce je i zavedenie pojmu TCN (theoretical carbon number), na definovanie druhov nenasýtených TAG. Teoretické číslo TCN sa môže určiť z diagramu, ktorý udáva závislosť kapacitného faktora ( $k$ ) od počtu atómov uhlíka (CN) korešpondujúcich nasýtených TAG. Hodnota TCN sa môže vypočítať zo vzťahu:

$$TCN = ECN - \sum_{i=1}^3 U_i,$$

kde  $U_i$  je faktor určený experimentálne pre tú-ktorú masťnú kyselinu (MK), napr. pre nasýtené acylové skupiny MK má hodnotu 0, pre oleoyl = 0,6—0,65, linoleyl = 0,7—0,8 a elaidyl = 0,2. Zavedenie tohto pojmu uľahčilo identifikáciu nenасыtených TAG druhov, na čo poukázali vo svojej práci Phillips a kol. [18] v snahe vyriešiť problémy nedostatočného rozlíšenia chromatografických pík, najmä pre zmesi TAG, ktoré majú rovnaké PN, resp. ECN a tiež problém simultánných analýz TAG zahrňujúcich širokú oblasť PN. Okrem vplyvu teploty kolóny na separáciu TAG, ako uvádza napr. práca Jensena [15], ktorý poukázal na pozitívny vplyv nižších teplôt (14,5°C), niektorí autori sledovali aj vplyv stacionárnej fázy. Skúmal sa vplyv veľkosti častíc náplne (osvedčili sa najmä náplne s veľkosťou častíc 5  $\mu\text{m}$ , ale aj 3  $\mu\text{m}$ ) alebo dĺžky uhlíkovodíkového reťazca viazaného na silikagél [16], kde autori zistili priaznivý vplyv dlhšieho reťazca uhlíka (C18 versus C8 skupiny) a vyššieho percenta rozloženia uhlíka na náplni.

Mnohí autori študovali vplyv zloženia mobilnej fázy na rozlíšenie TAG. Ako sa dalo očakávať, s poklesom polarít MF sa zvýši hodnota kapacitného faktora  $k$ . Paulus [19] použil acetón, s inými menej polárnymi rozpúšťadlami, ako  $\text{CHCl}_3$ , THF a *i*-PrOH. Poukázal na zlepšenie selektivity ( $\alpha$ ) pre kritické páry TAG: LOO—LPO (PN = 46, L-kyselina linolová) a OOO—POO (PN = 48). K obdobnému výsledku došiel i Parris [11, 12], ktorý použil mobilnú fázu 40 % DCM a ACN, čím zlepšil selektivitu pre kritické páry s PN = 44 a 46. Všeobecná rozpúšťadlová zmes používaná na rozlíšenie TAG s rovnakým PN, resp. ECN bola zmes acetonitril—acetón, avšak napriek zlepšeniu rozlíšenia sa nedosiahlo úplné rozlíšenie TAG typu: OOLn (Ln — kyselina linolénová), PLL, StLLn, POLn s PN = 44 alebo StStL a POL s PN = 46, prípadne StOL a POO s PN = 48. Dong a Dicesare [6] dosiahli výborné rozlíšenie párov OOO—POO použitím mobilnej fázy acetón—acetonitril v pomere 7 : 3.

Pravidlom analýzy TAG metódou HPLC bola izokratická elúcia, ktorá je vhodná v spojení s RI detektorom pri analýze relatívne jednoduchých zmesí TAG niektorých rastlinných olejov. Pre zložitejšie zmesi triacylglycerolov sa použila rôzna gradientová elúcia, v závislosti od typu použitého detektora. Parris navrhol gradient THF v ACN v spojení s IR detektorom [12]. Robinson a Macrae [20] navrhli gradient etanolu [21] gradient od 100 % ACN ku 100 % EtOH zmesi ACN : EtOH : *n*-hexán = 40 : 40 : 20 s použitím hmotnostného (MS) detektora.

Sledoval sa aj vplyv použitého rozpúšťadla vzorky, pričom sa zistila veľká interakcia medzi molekulami rozpúšťadla, MF a uhlíkovodíkovými ligandmi SF. Singleton a Pattee [22] odporúčali použiť  $\text{CHCl}_3$  ako najlepšie rozpúšťadlo na dobré rozlíšenie TAG. V súvislosti so zložením mobilnej fázy, niektorí autori, najmä v posledných rokoch, navrhujú použiť jednozložkovú MF, predovšetkým *n*-propionitrilu [3, 23, 24]. Frede [23] zlepšil separáciu TAG špeciálnym teplot-

ným postupom v spojení s *n*-propionitrilom ako eluentom a RI detektorom. Tshimidou a Macrae [8] si všimali aspekty dávkovania roztoku, najmä injektovaný objem, návažok vzorky a vlastnosti injektovaného roztoku vo vzťahu k mobilnej fáze. Ďalšie zlepšenie rozlíšenia separácie TAG opisujú práce Christieho [25, 26], ktorý používa na separáciu jednoduchých lipidov HPLC kolóny s prídavkom  $\text{Ag}^+$  iónov. V snahe vylepšiť rozlíšenie TAG s rovnakým PN, sa využilo i spojenie adsorpčnej chromatografie na  $\text{AgNO}_3$  impregnovaných silikagélových kolónach a RP—HPLC, ako opisuje práca Kempera a kol. [27].

Aitzetmüller vo svojej výbornej práci [28] opísal možnosť použitia prietokového (tlakového) gradientu pri RP—HPLC s použitím RI detektora.

### Záver

V súčasnosti sa výskum v oblasti HPLC analýzy triacylglycerolov zameriava najmä na tieto aspekty:

- optimalizáciu deliacich podmienok,
- mechanizmy delenia a elučné deje,
- vplyv eluentov a elučných rýchlostí na delenie tzv. kritických párov,
- deliace materiály, najmä 3 a 5  $\mu\text{m}$  častíc, guľovitých a nepravidelných náplňových materiálov,
- deliace teploty (možnosti delenia TAG s vysokým podielom nasýtených TAG pomocou tepelne programovateľnej HPLC),
- kvantitatívne aspekty.

Možnosti zlepšenia separácie TAG molekulových druhov sa ukazujú i pri použití nových detekčných systémov. Popri využití IR detektora v spojení s FTIR (IČ spektroskopia s Fourierovu transformáciou), je to najmä tzv. LS (Light Scattering) detektor, ktorý je založený na rozptyle svetla po odparení rozpúšťadla eluátu a vytvorení jemnej hmloviny analyzovaných látok. Detektor sa dá použiť s gradientovou elúciou, nie je závislý od teploty okolia a dá sa jednoducho adaptovať predradením deliaceho člena na zber separovaných látok. Stolyhwo a kol. [29, 30] testovali nový typ MS detektora s využitím rozptylu laserového svetla na vzorkách mliečneho tuku, pričom deklarovali jeho výborné vlastnosti, prevyšujúce LS detektory s konvenčným svetelným zdrojom.

Ani v budúcnosti nemožno očakávať pokles intenzity prác na poli analýzy triacylglycerolov, pretože ide o jeden z najväčších problémov v analytike prírodných látok vôbec. Kombinácie rôznych možných triacylglycerolov už pri relatívne jednoduchých olejoch a tukoch v zložení masných kyselín, dosahujú niekoľko stoviek typov individuálnych štruktúr TAG molekúl. Úspešné riešenie

tohto problému si vyžaduje použitie viacerých inštrumentálnych analytických metód, z ktorých nezastupiteľné a prioritné postavenie má však technika vyso-  
kúčinnej kvapalinovej chromatografie.

## Literatúra

1. KIMMEY, R. L.—PERKINS, E. G., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, 1984, s. 1209.
2. SHUKLA, V. K. S., *Progress Lipid Res.*, 27, 1988, s. 5
3. FIEBIG, H. J., *Fette, Seifen Anstrichm.*, 87, 1985, s. 53
4. BARRÓN, L. J. R.—SANTA-MARÍA, G., *Chromatographia*, 28, 1989, s. 274.
5. FIEBIG, H. J., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 324, 1984, s. 216.
6. DONG, M. W.—DICESARE, J. L., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60, 1983, s. 788.
7. WADA, S.—KOIZUMI, C.—NONAKA, I., *Yukagaku*, 26, 1977, s. 92.
8. TSHIMIDOU, M.—MACRAE, R., *J. Chromatogr. Sci.*, 23, 1985, s. 155
9. PEI, P. T. S.—HENRY, R. S.—RAMACHANDRAN, S., *Lipids*, 10, 1975, s. 152.
10. WADA, S.—KOIZUMI, C.—NONAKA, I., *Yukagaku*, 27, 1978, s. 579.
11. PARRIS, N. A., *J. Chromatogr.* 149, 1978, s. 615.
12. PARRIS, N. A., *J. Chromatogr.* 157, 1978, s. 161.
13. HÖRSLOF, B.—PODLAHA, O.—TÖREGARD, B., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56, 1979, s. 864.
14. PLATTNER, R. D., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58, 1981, s. 638.
15. JENSEN, G. W., *J. Chromatogr.*, 204, 1981, s. 407.
16. EL-HAMDY, A. H.—PERKINS, E. G., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58, 1981, s. 49.
17. EL-HAMDY, A. H.—PERKINS, E. G., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58, 1981, s. 867.
18. PHILLIPS, F. C. et al., *Lipids*, 19, 1984, s. 142.
19. PAULUS, R. E., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60, 1983, s. 189.
20. ROBINSON, J. L.—MACRAE, R., *J. Chromatogr.*, 303, 1984, s. 286.
21. HÖRSLOF, B.—KINDMARK, G., *Lipids*, 20, 1985, s. 783.
22. SINGLETON, J. A.—PATTEE, H. W., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, 1984, s. 761.
23. FREDE, E., *Chromatographia*, 21, 1986, s. 29.
24. FARINES, M.—SOULIER, R.—SOULIER, J., *J. Cem. Educ.*, 65, 1988, s. 464.
25. CHRISTIE, W. W., *J. High Resolut. Chromatogr.*, 10, 1987, s. 148.
26. CHRISTIE, W. W., *J. Chromatogr.*, 454, 1988, s. 273.
27. KEMPER, K. et al., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 331, 1988, s. 634.
28. AITZETMÜLLER, K., *J. High Resolut. Chromatogr.*, 19, 1990, s. 375.
29. STOLYHWO, A.—COLIN, H.—GUIOCHON, G., *J. Chromatogr.*, 265, 1983, s. 1.
30. STOLYHWO, A. et al., *J. Chromatogr.*, 288, 1984, s. 253.

Do redakcie došlo 22. 4. 1992

## Highperformance liquid chromatography of triacylglycerols

### Summary

The work presented gives résumé on analysis of triacylglycerols in edible fats and oils by reversed-phase HPLC method using non-aqueous mobile phases. Influence of several parameters on chromatographic process, as temperature, column length, diameter of column packing particles, length of bound hydrocarbon chain, polarity of solvent, composition and flow rate of mobile phase, is being discussed. Consideration is also given to increase efficiency and selectivity of separation process, mainly the so-called critical pairs of triacylglycerols, with simultaneous decrease in analysis time.

## Жидкостная хроматография высокого давления триацилглицеринов

### Резюме

Предложенная работа дает обзор анализа триацилглицеринов пищевых жиров и масел методом, HPLC на «повернутых» фазах при использовании безводных фаз. Дискутируется влияние многих факторов влияющих на процесс хроматографии, как температура, длина колонны, диаметр частиц наполнения колонн, длина углеводородной цепи, полярность растворителя, состав и протекание подвижной фазы.

Внимание уделено также повышению действия и селективности сепарации главным образом так называемых «критических пар» триацилглицеринов, при одновременном сокращении времени анализа.