ANALÝZA PŘÍRODNÍCH SMĚSÍ TRIACYLGLYCEROLŮ TECHNIKOU HPLC/MS

MIROSLAV LÍSA* a MICHAL HOLČAPEK

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Nám. Čs. Legií 565, 532 10 Pardubice
miroslav.lisa@upce.cz

Došlo 28.6.04, přepracováno 03.01.05, přijato 13.01.05.

Klíčová slova: triacylglyceroly, HPLC-MS

Úvod

Triacylglyceroly (TG) patří do skupiny přírodních lipidů, které jsou v přírodě zastoupeny převážně v rostlinách nebo v tukových tkáních živočichů, kde tvoří až 90 % jejich tukových zásob. Jsou velice důležitou součástí potravy nejen pro svou vysokou energetickou hodnotu, ale i pro obsah esenciálních mastných kyselin (MK) a vitaminů rozpustných v tucích. V těle slouží jako vydatný zdroj přímé nebo potenciální energie uložený do zásob v tukové tkáni. Jsou také významné jako tepelné izolátory některých orgánů a elektrostatické izolátory nervových vláken[1,2].

TG tvoří v přírodě složité směsi a z tohoto důvodu je nutné před vlastní identifikací předřadit separační stupeň. Jedna z nejpoužívanějších technik pro separaci a identifikaci TG ve složitých přírodních směsích je spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systémech s obrácenými fázemi[3–5] (RP-HPLC) a hmotnostní spektrometrie s chemickou ionizací za atmosférického tlaku[6–11] (RP-HPLC/APCI-MS), která byla také použita v této práci. Retence TG v RP-HPLC se zvyšuje s přírůstkem tzv. ekvivalentního počtu uhlíkových atomů (Equivalent Carbon Number, ECN) definovaného jako počet uhlíků (Carbon Number, CN) ve všech acylových řetězcích mínus dvojnásobek počtu dvojných vazeb (Double Bonds, DB), tj. ECN = CN – 2DB (cit.[3–5,9]). Pro značení TG se standardně používá počátečních písmen MK seřazených podle jejich pozice *sn*-1, 2 nebo 3 (stereochemické číslování) v glycerolovém skeletu (zkratky identifikovaných MK viz tabulka I).

Experimentální část

Použitá rozpouštědla (acetonitril (ACN), propan-2-ol, hexan) byla čistoty pro gradientovou HPLC eluci (vše Merck, Darmstadt, Německo). Vzorky olejů (olej z lískových ořechů, vlašských ořechů, kešu ořechů, mandlí, máku tmavého, peciček žlutého melounu, šípků, fíků, datlí, černého rybízu) byly připraveny v laboratoři následujícím postupem. Přibližně 10 g semen nebo ořechů bylo nejdříve rozdrceno v třecí misce na malé částečky, které byly smíchány s 15 ml hexanu. Po 15 min byla tato směs přefiltrována nejdříve s použitím běžného filtračního papíru a následně přes filtr s rozměry pórů 0,45 μm. Z filtrátu byl hexan odpařen při laboratorní teplotě přes noc, čímž byl získán čistý olej.

Experimenty byly prováděny na kapalinovém chromatografu v sestavě pumpa Waters 616, UV detektor s diodovým polem Waters 996, automatický dávkovač vzorků Waters 717+ (vše Waters, Milford, USA) spojeném s hmotnostním spektrometrem s iontovou pastí Esquire 3000 (Bruker Daltonics, Brémy, Německo) s možností ionizace elektrosprejem nebo APCI s rozsahem měřených hmot do *m/z* 6000. Byly použity kolony Nova-Pak C18,

Tabulka I
Mastné kyseliny, jejich zkratky, počet uhlíků (CN) a dvojných vazeb (DB), ekvivalentní počet uhlíkových atomů (ECN)

Mastná kyselina	Zkratka	CN:DB	ECN
Kaprylová	Cy	C8:0	8
Kaprinová	C	C10:0	10
Laurová	La	C12:0	12
Myristová	M	C14:0	14
Pentadekanová	Pe	C15:0	15
Palmitolejová	Po	C16:1	14
Palmitová	P	C16:0	16
Heptadekanová	Mo	C17:1	15
Margarová	Ma	C17:0	17
Stearodonová	St	C18:4	10
Linolenová	Ln	C18:3 (9,12,15)	12
γ-Linolenová	γLn	C18:3 (6,9,12)	12
Linolová	L	C18:2	14
Olejová	O	C18:1	16
Stearová	S	C18:0	18
Ikosadienová	E	C20:2	16
Gadoleová	G	C20:1	18
Arašidová	A	C20:0	20
Henikosanová	H	C21:0	21
Behenová	B	C22:0	22
Trikosanová	T	C23:0	23
Lignocerová	Li	C24:0	24

*M. Lísa získal zvláštní cenu poroty v soutěži O cenu firmy Merck 2004 o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie.

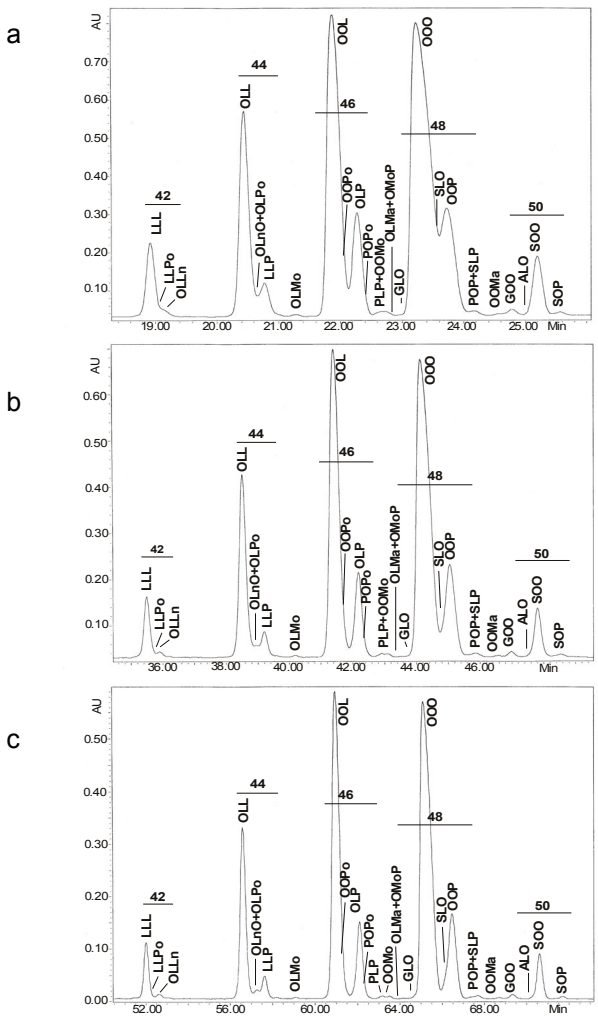
150 a 300 × 3,9 mm, velikost částic 7 µm (Waters, USA). Optimalizace HPLC separací byla provedena s 3% roztokem (*m/v*, ve směsi acetonitril : propan-2-ol : hexan (1:1:1)) vzorku oleje z lískových ořechů při nástřiku 10 µl se spektrofotometrickou detekcí při vlnové délce 205 nm.

Pro studium vlivu délky kolony na separaci bylo použito 15 cm, 30 cm a spojení 15 a 30 cm kolony při průtoku mobilní fáze 1 ml.min^{-1}. Podmínky gradientové eluce v závislosti na délce kolony byly následující:

a) spojení 15 a 30 cm kolony: 0 min – 100 % ACN, 106 min – 31 % ACN a 69 % propan-2-olu, 109 min – 100 % ACN, 110 min konec analýzy;
b) 30 cm kolona: 0 min – 100 % ACN, 71 min – 31 % ACN a 69 % propan-2-olu, 74 min – 100 % ACN, 75 min konec analýzy;
c) 15 cm kolona: 0 min – 100 % ACN, 35 min – 31 % ACN a 69 % propan-2-olu, 38 min – 100 % ACN, 39 min konec analýzy.

Studium vlivu teploty na separaci bylo provedeno na spojených kolonách v délce 30 cm a 15 cm při teplotách 20, 25, 30, 40 a 50 °C. Byla použita gradientová eluce (1 ml.min^{-1}, 0 min – 100 % ACN, 106 min – 31 % ACN a 69 % propan-2-olu, 109 min – 100 % ACN, 110 min konec analýzy).

Byly analyzovány 3 % roztoky (*m/v*, ve směsi acetonitril : propan-2-ol : hexan (1:1:1)) rostlinných olejů při teplotě 25 °C a průtoku mobilní fáze 1 ml.min^{-1} s nástřikem 10 µl vzorku. Mezi jednotlivými nástřiky byla dávkovací jehla oplachována mobilní fází. Pro analýzu byl použit gradient mobilní fáze 0 min – 100 % ACN, 106 min – 31 % ACN a 69 % propan-2-olu, 109 min – 100 % ACN, 110 min konec analýzy. Eluát na výstupu ze spektrofotometrického detektoru byl veden do hmotnostního spektrometru, kde byla pro analýzu TG použita ionizace APCI při záznamu kladných iontů v rozsahu *m/z* = 50–1200, teplota APCI sondy 400 °C a teplota iontového zdroje 350 °C. Průtok sušícího plynu byl 3 l.min^{-1} a tlak zmlžujícího plynu 483 kPa.



Obr. 1. **Vliv délky kolony na separační účinnost** (lískový olej, UV detekce při 205 nm); a – separace na 15 cm koloně, b – na 30 cm, c – spojení 15 a 30 cm kolony

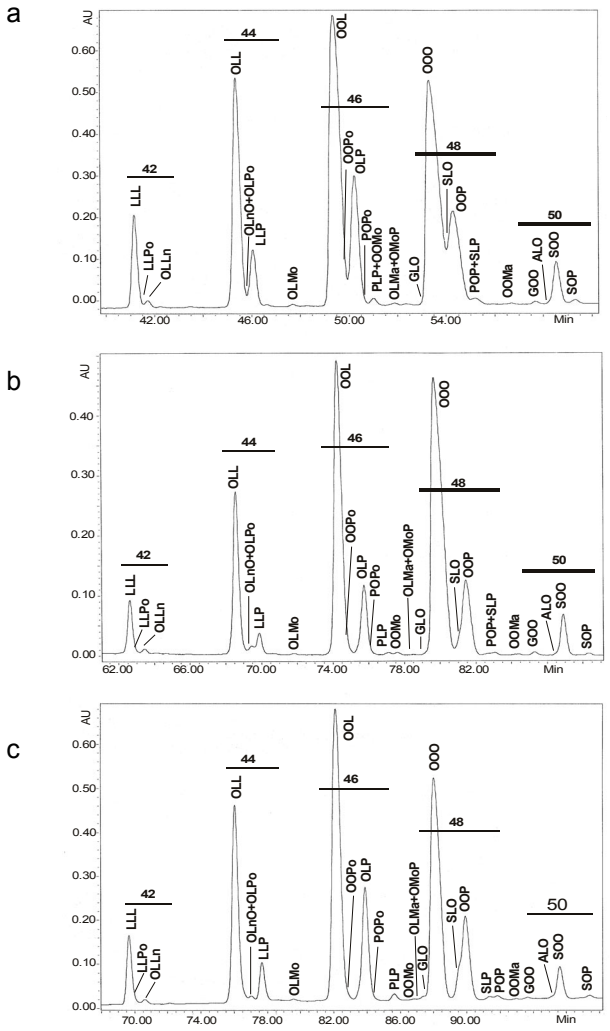
Výsledky a diskuse

Optimalizace metodiky HPLC

V této práci byla pro separaci komplexních směsí TG použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi s gradientovou elucí a složením mobilní fáze acetonitril-propan-2-ol.

Nejprve byl studován vliv délky chromatografické kolony na separační účinnost (na 15 cm koloně, 30 cm koloně a sériovém zapojení 15 a 30 cm kolony), který je patrný na obr. 1. S rostoucí délkou chromatografické kolony roste počet vzájemných interakcí mezi analyzovanými látkami a sorbentem na koloně, což vede ke zlepšení separace. Při použití 30 cm kolony a spojení 15 a 30 cm kolony v porovnání se separací na 15 cm koloně se výrazně zvyšuje rozlišení TG v rámci skupiny se stejným ECN (viz skupina OLL, OLnO a LLP). Zlepšení separační účinnosti bylo také potvrzeno výpočtem rozlišení a počtu teoretických pater, kdy obě hodnoty s prodlužováním kolony rostly. Na základě těchto poznatků bylo vybráno spojení 15 a 30 cm kolony.

Dále byl studován vliv teploty na kvalitu separace (obr. 2) (při 20, 25, 30, 40 a 50 °C). Snižováním teploty se zvyšuje separační účinnost, což může být způsobeno rozdílným prostorovým uspořádáním TG při různých teplotách. Při vyšších teplotách může docházet k rotaci některých vazeb, což by se projevilo ohýbáním acylového řetězce[1], a tím zmenšením interakcí mezi látkou a sorbentem. Zlepšení separace bylo potvrzeno stejným způsobem jako při studiu vlivu délky chromatografické kolony výpočtem rozlišení a teoretického počtu pater. Pro další separace byla vybrána teplota 25 °C jako kompromis mezi separační účinností, dobou analýzy a tlakem mobilní fáze na koloně.



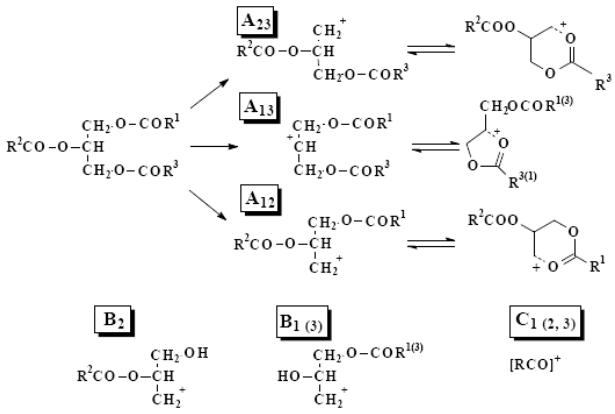
Obr. 2. **Vliv teploty na separační účinnost** (lískový olej, UV detekce při 205 nm); a – separace při 50 °C, b – při 30 °C, c – při 20 °C

A n a l ý z a r o s t l i n n ý c h o l e j ů

K identifikaci TG obsažených v 10 rostlinných olejích byla použita hmotnostní spektrometrie s ionizací APCI po separaci složek optimalizovanou metodikou HPLC. APCI hmotnostní spektra obsahují strukturně důležité fragmentové ionty (obr. 3), z nichž nejvýznamnější jsou $[M+H-RCOOH]^+$ (ionty A) vzniklé ztrátou acylu z polohy *sn*-1, 2 nebo 3. Na základě těchto iontů byla provedena identifikace TG. Ionty $[M+H]^+$ identifikovaných TG, jejich retenční časy t_R a relativní retenční časy *r* jsou uvedeny v tabulce II. Jako standardy pro výpočet relativního retenčního času byly použity TG běžně obsažené v rostlinných olejích, tj. LLLn pro ECN = 36 až 41, LLL pro ECN = 42 a 43, OLL pro ECN = 44 a 45, OOL pro ECN = 46 a 47, OOL pro ECN = 48 a 49, SOO pro ECN = 50 a 51 a AOO pro ECN = 52. S použitím fragmentových iontů A byla určena převládající MK v poloze *sn*-2, protože její ztráta z polohy *sn*-2 je energeticky náročnější než z polohy *sn*-1 a 3 (cit.[6–8]). To lze vysvětlit vznikem méně stabilního pětičlenného cyklu při ztrátě acylu z polohy *sn*-2 oproti vzniku cyklu šestičlenného ztrátou acylu z poloh *sn*-1 nebo 3 (obr. 3).

Separace TG v RP-HPLC je řízena ekvivalentním počtem uhlíkových atomů. V rámci jedné skupiny ECN je separace TG ovlivněna charakterem přítomných MK, jejichž vliv na retenci může být demonstrován na skupinách TG se stejným ECN. Například ve skupině TG s ECN = 48 (OOO, OOP, OPP, PPP) (retenční čas roste v řadě: 84,0 < 85,4 < 87,0 < 88,7 min), čili přítomnost dvojné vazby způsobuje snižování retence daného TG v rámci jedné skupiny ECN. Tento závěr lze potvrdit retencí dvojic LLL a LLPo (retenční čas: 65,3 < 65,7 min) v rámci skupiny ECN = 42, OLL a OLPo (retenční čas: 71,8 < 72,2 min) ve skupině ECN = 44, OOL a OOPo (retenční čas: 77,9 < 78,3 min) ve skupině ECN = 46, u kterých se též snižuje retence se zvyšujícím se počtem dvojných vazeb. Srovnáním retencí skupin TG se stejným ECN a odlišnými MK lze odhadovat z pořadí separace neznámých TG jejich složení, což lze použít k ověření jejich identifikace a vyloučení případných chyb.

Připravené oleje obsahují velký počet TG složených z běžně se vyskytujících nenasycených MK (Po, Ln, L, O) a jejich kombinace s běžnými nasycenými MK (P, S). Jako minoritní byly dále v olejích identifikovány i TG obsahující jednu kyselinu s lichým počtem uhlíků (Mo, Ma). V některých olejích byly zastoupeny kyseliny s delším alifatickým řetězcem (G, B, A, Li). V olejích připravených ze semínek plodů jsou navíc v malém množství zastoupeny kombinace běžných MK a kyselin, které se v rostlinných olejích vyskytují vzácně (C, Cy, Pe, St, E, H, T). Výjimkou je olej ze semínek černého rybízu, který obsahuje velký počet kombinací běžných MK s kyselinou γ-linolenovou (γLn), která převládala v tomto oleji. Od kyseliny linolenové se odlišuje pouze polohou dvojných vazeb v acylovém řetězci (γLn v poloze 6, 9, 12 a Ln v poloze 9, 12, 15) a byla identifikována na základě re



Obr. 3. **Schéma fragmentových iontů pozorovaných v APCI hmotnostních spektrech**

Tabulka II
Triacylglyceroly (TG) nalezené v rostlinných olejích, jejich zkratky, ekvivalentní počet uhlíkových atomů (ECN), molekulové ionty ($[M+H]^+$), retenční časy (t_R) a relativní retenční časy $r = (t_R - t_M)/(t_S - t_M)$ (t_M = 3,2 min, t_S – retenční čas standardu). Zkratky mastných kyselin v jednotlivých TG byly seřazeny sestupně podle jejich hmotností

TG	ECN	$[M+H]^+$	t_R	r	TG	ECN	$[M+H]^+$	t_R	r
LnLnLn	36	873	48,3	0,800	OOPo		857	78,3	1,005
LLnSt		873	49,4	0,819	GOLn		909	78,8	1,012
StStP		847	52,6	0,876	SLL		883	79,0	1,015
LLnLn	38	875	54,0	0,901	OLP		857	79,3	1,019
LLaLa		719	54,8	0,915	GOLa		831	79,4	1,020
OMCy		693	55,9	0,934	ALLn		909	79,6	1,023
OLnSt		875	56,2	0,940	OOM		831	79,7	1,024
MLaLa		667	56,6	0,947	OPPo		831	79,8	1,025
StLnP		849	57,4	0,961	SOLn		883	80,0	1,028
LnLnMo	39	863	57,7	0,966	BLnLn		935	80,1	1,029
LnLnPe		837	58,7	0,984	LPP		831	80,9	1,040
LLLn	40	**877**	**59,6**	**1,000**	SLM		831	80,9	1,040
LLLa		799	60,3	1,012	PPPo		805	81,3	1,046
OLnLn		877	60,6	1,018	OPM		805	81,3	1,046
OOCy		747	61,4	1,032	SOLa		805	81,3	1,046
LMLa		747	61,5	1,034	SLnP		857	81,4	1,047
OLaLa		721	61,8	1,039	OMoMo		857	81,4	1,047
OLSt		877	61,9	1,041	OOMo	47	871	81,5	1,048
LnLnP		851	62,1	1,044	OLMa		871	82,3	1,059
OPCy		721	63,0	1,060	HLLn		921	82,3	1,059
LStP		851	63,1	1,062	OMoP		845	82,7	1,064
MMLa		695	63,8	1,074	TLnLn		949	82,9	1,067
SLnSt		877	64,7	1,090	GOL	48	911	83,1	0,989
LLnMo	41	865	63,3	1,066	**OOO**		**885**	**84,0**	**1,000**
LLL	42	**879**	**65,3**	**1,000**	ALL		911	84,8	1,010
LLPo		853	65,7	1,006	GOM		859	85,0	1,012
OLLn		879	66,4	1,018	BLLn		937	85,1	1,014
LLM		827	66,7	1,023	SOL		885	85,1	1,014
OLLa		801	67,0	1,027	OOP		859	85,4	1,017
OOC		775	67,6	1,037	SLP		859	86,6	1,032
LLnP		853	67,8	1,040	BLLa		859	86,6	1,032
LMM		775	68,2	1,047	SSLn		885	86,9	1,036
LPLa		775	68,3	1,048	AOLa		833	87,0	1,037
SLnLn		879	68,5	1,052	OPP		833	87,0	1,037
OMLa		749	68,5	1,052	SOM		833	87,0	1,037
SLSt		879	69,6	1,069	PPP		807	88,7	1,058
OStP		853	69,8	1,072	HLL	49	925	87,4	1,042
SOCy		749	69,9	1,074	TLLn		951	87,8	1,047
PMLa		723	70,7	1,087	OOMa		873	88,4	1,054
LLMo	43	867	69,0	1,060	OMaP		847	89,7	1,071
LLPe		841	70,3	1,081	GOO	50	913	89,0	0,979
LLnMa		867	70,7	1,087	GSL		939	89,9	0,990
ELL	44	907	70,8	0,985	BLL		913	90,0	0,991
OLL		**881**	**71,8**	**1,000**	LiLLn		965	90,2	0,993
GLLn		907	72,1	1,004	AOL		913	90,4	0,995
OLPo		855	72,2	1,006	GOP		887	90,4	0,995
OOLn		881	72,6	1,012	**SOO**		**887**	**90,8**	**1,000**
LLP		855	73,1	1,019	ALP		887	91,8	1,011
OLM		829	73,7	1,028	SSL		887	91,9	1,013

Pokračování tabulky II

TG	ECN	$[M+H]^+$	t_R	*r*	TG	ECN	$[M+H]^+$	t_R	*r*
SLLn		881	73,8	1,029	SOP		861	92,3	1,017
OLnP		855	74,0	1,032	AOM		861	92,3	1,017
OOLa		803	74,1	1,034	BOLa		861	92,3	1,017
ALnLn		907	74,3	1,036	SPP		835	94,4	1,041
LPM		803	75,1	1,048	TLL	51	953	92,4	1,018
SLLa		803	75,2	1,050	TOLa		875	94,7	1,045
OMM		777	75,5	1,054	SOMa		875	95,0	1,048
OPLa		777	75,6	1,055	LiLL	52	967	94,9	0,988
LnPP		829	75,7	1,057	BOL		941	95,5	0,995
SOSt		881	75,9	1,060	**AOO**		**915**	**96,0**	**1,000**
OLMo	45	869	75,6	1,055	LiLM		915	96,7	1,008
LLMa		869	76,3	1,066	BLP		915	96,8	1,009
LMoP		843	76,4	1,067	ASL		915	96,9	1,010
OLnMa		869	77,0	1,076	LiOLa		889	97,1	1,012
GLL	46	909	77,2	0,991	AOP		889	97,5	1,016
OOL		**883**	**77,9**	**1,000**	SSO		889	97,6	1,017

tenčních časů. Vlivem odlišné polohy dvojných vazeb se retenční čas TG obsahujícího tuto kyselinu posouvá přibližně o 0,7 min k vyšším hodnotám.

Závěr

Byla optimalizována metodika HPLC s obrácenými fázemi a mobilní fází acetonitril-propan-2-ol pro analýzu složitých směsí TG s použitím spojení dvou chromatografických kolon Nova-Pak C18 v sérii při teplotě 25 °C. Tato metoda poskytuje dobré rozlišení TG s různými skupinami ECN, ale i pro TG v rámci jedné skupiny. Byla použita pro analýzu 10 rostlinných olejů (olej z lískových ořechů, vlašských ořechů, kešu ořechů, mandlí, máku tmavého, peciček žlutého melounu, šípků, fíků, datlí, černého rybízu). Celkem bylo v rostlinných olejích identifikováno 130 TG složených z 22 mastných kyselin obsahujících 8 až 24 uhlíků a 0 až 4 dvojné vazby. U identifikovaných TG byla na základě poměrů intenzit určena převládající kyselina v poloze *sn*-2. Přednostně jsou v této poloze zastoupeny nenasycené MK (převážně kyselina linolová).

LITERATURA

1. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.: *Harperova biochemie*. H + H, Jinočany 2001.
2. Vodrážka Z.: *Biochemie*. Academia, Praha 1999.
3. Stolyhwo A., Colin H., Guiochon G.: Anal. Chem. *57*, 1342 (1985).
4. Palmer A. J., Palmer F. J.: J. Chromatogr. *465*, 369 (1989).
5. Héron S.: *Dissertation*. Université Paris 6, Paris 1992.
6. Mottram H. R., Woodbury S. E., Evershed R. P.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *11*, 1240 (1997).
7. Mottram H. R., Evershed R. P.: Tetrahedron Lett. *37*, 8593 (1996).
8. Mottram H. R., Crossman Z. M., Evershed R. P.: Analyst *126*, 1018 (2001).
9. Holčapek M., Jandera P., Zderadička P., Hrubá L.: J. Chromatogr., A *1010*, 195 (2003).
10. Holčapek M., Jandera P., Fischer J., Prokeš B.: J. Chromatogr., A *858*, 13 (1999).
11. Holčapek M., Jandera P., Fischer J.: Crit. Rev. Anal. Chem. *31*, 53 (2001).

M. Lísa and M. Holčapek (*Department of Analytical Chemistry, University of Pardubice, Pardubice):* **Analysis of Natural Mixtures of Triacylglycerols Using HPLC/MS Technique**

An HPLC/MS method was developed for analysis of triacylglycerols (TGs) in plant oils from hazelnut, walnut, cashew nut, and almond as well as from poppy, yellow melon, rose hip, fig, date and black currant seeds. The objective of the present work is unambiguous identification of the maximum number of TGs, based on the optimisation of temperature, column length and gradient steepness. Non-aqueous reversed-phase HPLC with an optimized acetonitrile – propan-2-ol gradient, 30 + 15 cm Nova-Pak C_{18} columns and temperature 25 °C were used in the TG identification based on their positive-ion APCI mass spectra. Total 130 TGs derived from 22 fatty acids C8–C24 with 0–4 double bonds were identified.