

Determinarea acizilor grasi

1. Acizii grasi

Acizii grasi se gasesc in grasimi, acestea fiind in fapt esteri ai glicerinei cu acizii grasi. Gliceridele cu acizi grasi nesaturati genereaza grasimi lichide, iar gliceridele cu acizi saturati genereaza grasimi solide.

Din punct de vedere al capacitatii corpului uman de a-i sintetiza sau nu, acizii grasi se pot clasifica in doua categorii:

- Acizi grasi neesentiali: pot fi sintetizati de catre organism din diferite substante;
- Acizi grasi esentiali: acestia nu pot fi sintetizati de catre organism (datorita insuficientei dotari a enzimelor existente sau chiar lipsei unor enzime) si de aceea, pentru a asigura cantitatea necesara desfasurarii normale a proceselor metabolice, ei trebuie „adusi“ in corpul uman prin alimentatie sau prin intermediul suplimentelor alimentare.

Din punct de vedere al structurii chimice, acizii grasi se clasifica in:

- Acizi grasi saturati;
- Acizi grasi mononesaturati;
- Acizi grasi polinesaturati.

Acizii grasi sunt formati dintr-un lant avand doi pana la treizeci de atomi de carbon si un grup terminal carboxilic $\text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$. Din punct de vedere al lungimii lantului, acizii grasi se clasifica in:

- Acizi grasi cu lant scurt (cu 4-6 atomi de carbon);
- Acizi grasi cu lant mediu (cu 8-12 atomi de carbon);
- Acizi grasi cu lant lung (cu 14 sau mai multi atomi de carbon).

Principalele surse alimentare de acizi grasi saturati sunt produsele de origine animala (carne si lactate), uleiurile folosite la prepararea mancarii si unele grasimi folosite la gatit (untura de porc si unele margarine). Consumul de acizi grasi saturati creste nivelul LDL-colesterolului.

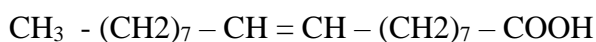
Acizii grasi saturati reprezinta un grup eterogen de molecule cu diferite proprietati metabolice.

Acizii grasi mononesaturati au in structura lor chimică o singura legătură dublă.

Acizii grasi polinesaturati pot fi impartiti in doua grupe distincte in functie de structura lor chimica: n-3 si n-6. Acidul linoleic este principalul reprezentant al categoriei n-6. Această categorie se gaseste in special in uleiurile vegetale.

Acidul oleic

Dintre toti acizii din grasimile naturale, acidul oleic este cel mai raspandit. El contine in molecula o dubla legatura si are urmatoarea formula de structura plana:



In foarte multe grasimi, acidul oleic reprezinta mai mult de jumatate din cantitatea totala de acizi grasi si numai in putine grasimi el apare in proportie mai mica de 10 %.

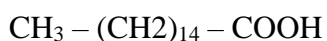
Din nici o grasime studiata pana acum acidul oleic nu lipseste complet.

Grasimile din plantele oleaginoase, indiferent de familia botanica, au un continut ridicat de acid oleic. De exemplu, in uleiul de masline, din totalul acizilor grasi, acidul oleic reprezinta 80%. Uleiurile din rozacee, graminee si alte familii contin 30 – 60 % acid oleic. Si in grasimile animalelor terestre acidul oleic se gaseste in proportie de 40 – 60 %.

Grasimile din lapte contin aproximativ 25 % acid palmitic si 35 – 45 % acid oleic.

Acidul palmitic

Acidul palmitic este un acid gras saturat cu formula de structura plana:



Este un acid aproape la fel de mult raspandit ca si acidul oleic. In foarte multe grasimi se gaseste in proportie de 15 – 50 %.

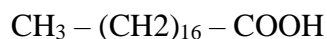
Acidul palmitic se gaseste in:

- grasimile de rezerva din seminte (20 – 25 %)
- grasimile animalelor terestre (25 – 30 %)
- grasimile animalelor si plantelor acvatice (12 – 15 %).

Acesta este principalul acid saturat din componenta acestor grasimi.

Acidul stearic

Acidul stearic este un acid gras cu formula de structura plana:

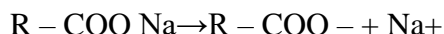


Acest acid gras apare in proportie mare (25 % sau peste 25 %) numai in grasimile de rezerva ale unor mamifere terestre (de exemplu in seul de oaie) si in grasimile unor plante tropicale (de exemplu untul de cacao).

Sapunurile

Gliceridele, care sunt esterii ai acizilor grasi cu glicerina, au drept proprietate chimica principala reactia de hidroliza. In urma acestei reactii chimice se reface structura glicerinei si in cazul in care procesul are loc in mediu bazic se vor obtine sarurile acizilor grasi. Daca hidroliza are loc in prezenta NaOH se obtin sarurile de sodiu ale acizilor grasi respectivi. Aceste saruri sunt sapunuri.

Sapunul de Na este solid, cel de potasiu este lichid si ambele sunt solubile in apa. In solutie apoasa sapunurile sunt ionizate:



2. Determinarea acizilor grasi folosind cromatografia lichida de inalta performanta cu detector evaporativ cu imprastiere a luminii

O inalta performanta a metodei cromatografice lichide cu detector de imprastiere a luminii a fost dezvoltata pentru separarea si analizarea cantitativa a patru lanturi lungi de acizi grasi in patru probe de diferite uleiuri. A fost folosit un mod de elutie izocratica folosind metanol/apa/acid acetic si o coloana analitica de Agilent Eclipse XDB-C18 .

Curbele de etalonare a celor patru acizi grasi au fost foarte bine colerate in intervalul 1-10 mg pentru acidul linoleic, 0.8-10 mg pentru acidul stearic si intre 0.5-10 mg pentru alti acizi grasi.

Patru probe de ulei au fost examinate: ulei de camelie (ceai verde), ulei de masline, ulei de Brucea Javanica si ulei de susan. Un rezultat bun a fost aflat cu metode cromatografice de gaz standard (GC). Metoda propusa ofera diferite avantaje peste cele oficiale ale metodei GC; o mai buna separare si precizie si componentele probelor nu trebuie sa fie derivatizate (conversia unui produs chimic combinat intr-un derivat).

Introducere

Diversitatea lungimii lanturilor de acizi grasi, gradul de nesaturatie, geometria si pozitia legaturilor duble, precum si prezenta a altor grupari face din compozitia lor cea mai definitiva caracteristica a acestor lipide si origini lor. Profilurile de acizi grasi sunt de o importanta considerabila in analiza lipidelor alimentare, extractelor de plante si uleiuri. Ele nu contribuie doar la caracteristicile tipice nutritionale, miros si gust, dar de asemenea sunt foarte folositoare pentru studii de valabilitate.

O varietate de metode cromatografice au fost folosite pentru a analiza acizii grasi. Gaz cromatografia este in prezent cea mai folosita cale in mod frecvent pentru analiza acizilor grasi. Totusi, separarea compusilor carboxilici de catre GC este complicata de catre polaritatea ei relative ridicata si de aceea este necesar a prepara derivate a acizilor grasi nonpolare care sunt mult mai volatile decat componentele acizilor liberi. In acest caz, esterii metilici ai acizilor grasi sunt folositi aproape universal pentru analiza GC a acizilor grasi. In general, GC ofera o excelenta separare si cuantificare impreuna cu sensibilitatea acceptabila. Totusi, exista un interes destul de mare in a folosi cromatografia lichida de inalta performanta (HPLC) pentru studiul acizilor grasi. Avantajele principale ale HPLC fata de GC sunt temperaturile scazute cerute de-a lungul analizei (care reduc riscul de izomerizare a legaturilor duble) si posibilitatea de colectare de fractii pentru analizele ulterioare. In afara de acestea, HPLC este considerata mai flexibila deoarece caracteristica de retentie poate fi usor modificata prin varierea fazei mobile a compozitiei. Asa cum majoritatea acizilor grasi nu arata absorbtia natural vizibila sau regiunile UV si nici fluorescenta naturala, analiza HPLC-UV a acizilor grasi nu este senzitiva si nici selectiva. Cateva metode HPLC au fost dezvoltate pentru analiza acizilor grasi saturati sau nesaturati, utilizand tehnicile de derivatizare pre-colon pentru a creste sensibilitatea si selectivitatea detectiei. Totusi, unele dezavantaje ale acestor metode sunt timpul lung cerut pentru analiza, posibilitatea inexacta a rezultatelor datorita reactiei incompletet sau instabile cu componentele derivatizate, etichetarea neselectiva care duce la interferente secundare si natura costisitoare si instabila a unor reactivi derivatizati.

Detectorul de imprastiere a luminii prin evaporare (ELSD) este din ce in ce mai folosit in cromatografia lichida ca un detector aproape universal eliminand necesitatea de derivatizare de analiti non-absorbanti. Inainte ca raspunsul ELSD sa nu depinda de caracteristicile optice ale probei, nu este nevoie de derivatizare. ELSD ofera mai multe avantaje decat tehnicile traditionale pentru analiza acizilor grasi. Un alt avantaj al ELSD este compatibilitatea cu multisolventa degradeurilor care sunt capabile sa demonstreze rezolutia si viteza analizei. Analiza HPLC a acizilor grasi , asadar, ofera o alternative folositoare pentru GC pentru analiza cantitativa precisa de rutina.

In aceasta articol este descrisa o faza inverse a metodei HPLC pentru determinarea comuni- acidul palmitic(AP), acidul stearic(AS), acidul oleic(AO) si acidul linoleic(AL) folosind ELSD. Factorii cheiei afecteaza separarea si conditiile de detectie au fost investigate. Condițiile adoptate au fost aplicate pentru analiza acizilor grasi în uleiurile selectate: uleiul de camelie, uleiul de masline, uleiul Brucea javanica si uleiul de susan supa saponificare. Pentru comparative, uleiurile au fost transesterificate folosind methanol bor triflorid si analizate folosind metoda conventioanala GC-FID.

2.1. Metode HPLC

Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) acoperă azi, în proporție aproximativ 80%, analiza substanțelor moleculare: organice, organo-metalice și anorganice inclusiv compușii foarte polari sau labili termic precum și compușii cu masă moleculară ridicată (naturali sau sintetici). De aceea, împreună cu cromatografia de gaze constituie un punct de sprijin important în analizele chimice moderne. Deși eficacitatea coloanelor nu o egalează încă pe cea din GC, prin faptul că se poate modifica, pe lângă faza staționară, și faza mobilă, cromatografia de lichide (LC) face posibile separări și analize uneori imposibil de realizat prin alte tehnici. Cuplajul cu spectrometria de masă a transformat, în ultimul timp, această metodă în principalul mijloc de analiza a compușilor moleculari naturali sau sintetici, constituind unul din pilonii pe care se sprijină chimia sintetică actuală și pe care s-a dezvoltat biochimia și biotehnologia modernă.

Metoda constituie o evoluție a unei metode mai vechi, cromatografia pe coloană clasică, care servea în primul rând la izolarea preparativă a compușilor naturali. Prin introducerea pompelor și în consecință, lucrându-se la presiuni tot mai ridicate (200atm), dezvoltarea unor faze staționare performante, de dimensiuni tot mai mici (recent constituite

din granule de faze staționare sferice, cu diametre 2-5 μ m), în coloane tot mai scurte (3-10cm) s-a ajuns, începând cu anul 1969, la configurația actuală .

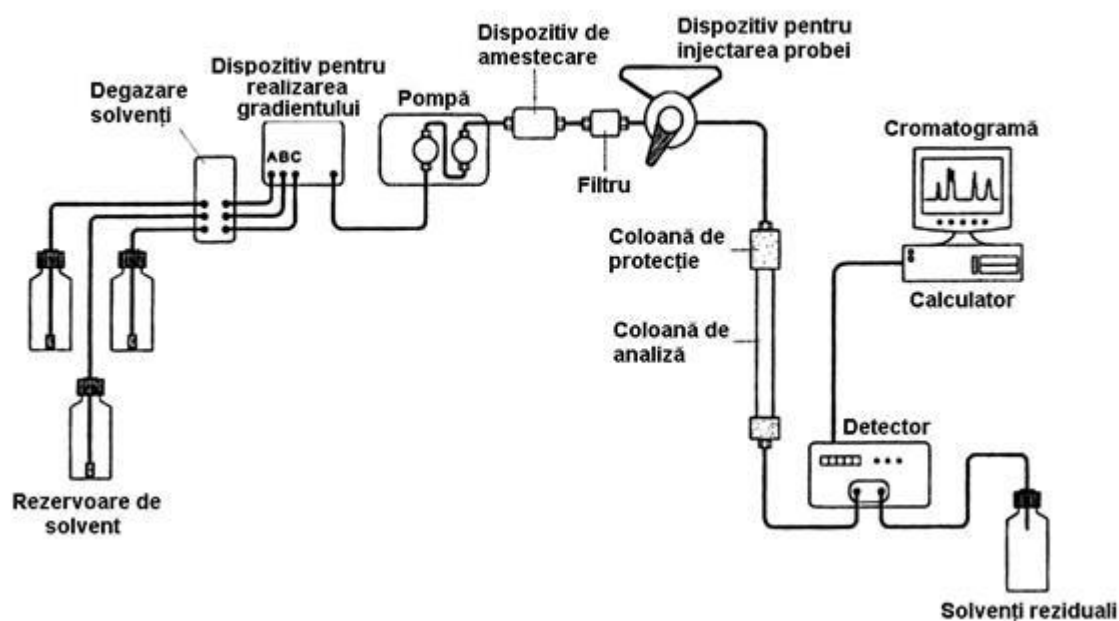


Fig. 1. Prezentarea schematică a unui cromatograf de lichide (HPLC)

Se poate observa că din rezervoarele conținând unul sau mai mulți solvenți pompa (sau pompele), alimentează coloana cu eluent (de regulă un amestec de doi sau mai mulți solvenți). În imediata vecinătate a coloanei se introduce proba, automat, prin intermediul unui ventil. În coloana aflată într-o etuvă termostată, are loc separarea propriu-zisă. Efluentul coloanei intră într-un detector de unde componentul, dacă este separat complet, poate fi colectat și izolat, cu ajutorul unui colector de fracțiuni. Semnalul este înregistrat fie cu un înregistrator, fie direct în memoria unui calculator. În esență, un cromatograf analitic HPLC are structura din fig. 2 unde nu s-a mai prezentat colectorul de fracțiuni, interesant doar din punct de vedere preparative .

Solvent → Pompă → Injector → Coloană → Detector → Înregistrator

Fig. 2. Schema bloc a unui cromatograf HPLC

Pompe pentru HPLC

Pompa este considerată una dintre cele mai importante componente ale HPLC deoarece permite realizarea unui debit constant al eluentului prin întreg sistemul: injector, coloană, detector mărind deosebit de mult viteza separării. Într-un cromatograf de lichide pot exista una sau mai multe pompe, fiecare furnizând o presiune care poate atinge 20mii kPa (cca. 200atm). Presiunea deosebită este necesară deoarece coloana are o umplutură de finețe mare și, în lipsa presiunii, debitul ar fi nepractic de mic.

Există în uz două tipuri principale de pompe, clasificate astfel în funcție de debit: pompe cu presiune constantă (și debit variabil) și pompe cu debit constant.

Pompele cu presiune constantă sunt mai simple (a se citi ieftine) și nu prezintă pulsații în funcționare (care nu ar permite obținerea unei linii de bază netede). Acestea, prezintă dezavantajul că debitul trebuie frecvent modificat pentru a se menține cât mai constant, ceea ce la separări de durată pune probleme, deoarece prin obturarea coloanelor debitul se modifică continuu.

Pompele cu presiune constantă, asemănătoare cu o seringă dar având o capacitate mai mare, pompează continuu pe toată durata separării, pistonul deplasându-se cu o viteză liniară constantă dar după fiecare cursă este necesară oprirea debitului și reumplerea cu solvent a corpului pompei. Deși solvenții utilizați se degazează pentru a se reduce efectele corozive ale oxigenului, datorită presiunilor ridicate la care se lucrează, coroziunea este totuși deosebită. De aceea aceste pompe (corpul, cilindrul, garniturile și supapele) se execută din materiale rezistente la coroziune: safir, agat, teflon sau aliaje speciale.

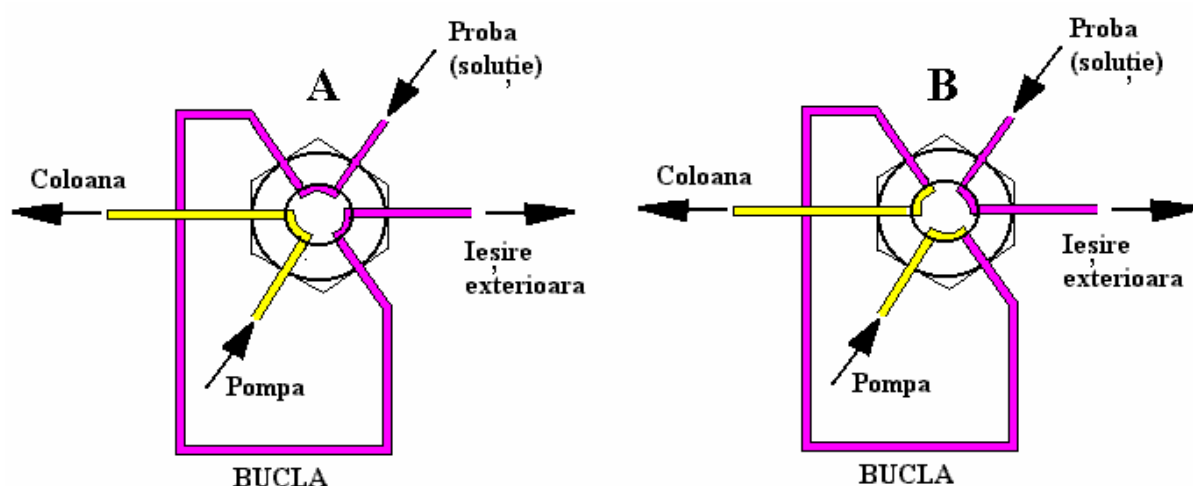
Sisteme de introducere a probei

În cazul HPLC injecția probei trebuie făcută într-un timp cât mai scurt, pentru a nu deranja regimul dinamic al eluentului prin coloană și detector. Dificultatea provine de la presiunea ridicată la care lucrează coloana (20mii kPa). Sistemul cel mai utilizat în cromatografele de lichide este ventilul cu 6 căi, numit și ventil de introducere a probei, prevăzut cu bucle interschimbabile [fig 3].

Deoarece eluentul aderă la pereți, pentru completa îndepărtare a sa în momentul alimentării buclei cu probă, este necesară injectarea prin buclă a unui volum de cel puțin de trei ori volumul acesteia, înainte de comutarea pe analiză. Bucla lucrează în două etape. Etapa A (fig. 3-A) în care bucla este umplută cu probă cu ajutorul unei seringi sau în alt mod. Apoi are loc comutarea pe analiză (fig. 3-B) când prin rotire cu 60°, în direcția acelor de ceasornic,

manual sau automat, bucla este parcursă de eluentul de la pompă și conținutul acesteia este antrenat în coloană. Volumul probelor pentru coloane obișnuite (25cmx4.6mm) este de 10-50μl.

Fig.3 Ventil pentru introducerea probei (cu 6 cai); lucreaza in doua etape: A- alimentarea buclei cu proba; B - după o rotire cu 60° în sensul acelor de ceasornic, antrenarea probei din buclă în coloană



Coloanele în LC

Locul în care se petrece separarea propriu-zisă și - în funcție de calitatea acesteia - se mărește sau micșorează raportul semnal/zgomot, este coloana cromatografică.

Faza stationara si faza mobile

Silicagelul (SiO₂) este considerat materialul cel mai important utilizat ca fază staționară. Acesta a devenit, în ultimii 20 de ani, doar suportul adevăratelor faze - fazele chimic legate - ceea ce nu schimbă importanța sa. Silicagelul s-a obținut la început în formă granulară, neregulată, apoi în formă sferică. Indiferent de formă, granulația trebuie să fie uniformă (se elimină partea fină) pentru că astfel caracteristicile curgerii eluentului sunt mult îmbunătățite.

Puritatea sa avansată este o condiție a bunei funcționări a materialului în LC deoarece prezența unor ioni metalici modifică structura determinând apariția unor centre de adsorbție puternice și de aici apariția unor *cozi* ale picurilor. Silicagelul are o structură tridimensională cu o rețea de bază, tridimensională, formată din legături Si-O-Si iar pe suprafața porilor sau cea exterioară mai prezintă grupe silanol, $\equiv\text{Si-OH}$. Punțile de oxigen apar între atomii de siliciu cu ocazia polimerizării acidului silicic, Si(OH)_4 .

În ultimul timp a mai apărut un tip de fază staționară cu performanțe ridicate. Este vorba de coloanele monolit, realizate din aceleași materii prime și printr-o tehnologie asemănătoare din punct de vedere chimic. Coloana este formată direct în tubul rigid (metalic), de unde și numele. Aceasta nu mai are granule. Prin noua tehnologie, s-au obținut coloane cu performanțe superioare față de cele umplute cu granule.

Faza mobilă

Faza mobilă sau eluentul în LC nu reprezintă un mediu inert ca gazul purtător din GC. De aceea alegerea fazei mobile se face aici în perfectă concordanță cu faza staționară. Astfel faza mobilă diferă destul de mult în funcție de tipul interacțiunilor componentelor separate cu faza staționară din coloană. Singurele caracteristici generale sunt următoarele:

- (1) faza mobilă trebuie să aibă o vâscozitate coborâtă,
- (2) aceasta trebuie să dizolve bine componentele,
- (3) nu trebuie să afecteze funcționarea coloanei,
- (4) trebuie să permită funcționarea detectorului.

Unii eluenți provoacă migrarea unui anumit component mai repede prin coloană. Se spune că aceștia au o tărie relativă mai mare sau, altfel spus, au o putere de eluție mai ridicată. Această denumire provine de la faptul că factorul de capacitate, k , este mai mare și de aceea componentul migrează mai repede. Dar totul depinde de trio-ul component - fază mobilă - fază staționară. Astfel, pe o fază staționară polară, folosind o fază mobilă nepolară, se vorbește de cromatografie de repartitie normală (sau cu faze directe). Din contră, pe o fază staționară nepolară utilizându-se o fază mobilă polară se vorbește de cromatografie de repartitie cu faze inverse (sau inversate). În acest ultim caz au devenit uzuale fazele mobile formate din amestecuri metanol - apă care în cromatografia de repartitie sunt considerate printre fazele mobile mai puțin tari.

Pe o fază staționară polară, amestecul metanol-apă face parte dintre cei mai tari eluenți cunoscuți. În tabelul 3 se prezintă câțiva dintre cei mai întâlniți solvenți și ordinea în care crește tăria lor relativă, în cele două tipuri de cromatografie de repartiție.

În HPLC, solventul are o contribuție importantă în procesul de separare, dar nu trebuie neglijată importanța decisivă a cuplului fază mobilă - fază staționară. Deși unii compuși sunt reținuți slab prin coloană, ieșind destul de repede, *cei reținuți puternic ies din coloană după un timp câteodată nepractic de lung*, lucru care determină diluarea în eluent a componentul în urma parcurgerii coloanei, aceasta micșorându-se calitatea analizei. De aceea s-a recurs la introducerea treptată peste primul solvent (eluent), a unui al doilea solvent mai tare sau a celui de-al treilea, ceea ce în limbajul de specialitate se numește gradient de eluție (sau de concentrație).

La ora actuală soluția la care s-a recurs în practică constă, în general, dintr-un sistem de ventile electromagnetice care permite intrarea solvenților în aceeași pompă, prin intermediul unei camere de amestecare aflate la joasă presiune. Este posibil și un alt montaj în care fiecare solvent are pompa proprie, comandată de un dispozitiv de control al debitului. Acești solvenți intră în camera de amestec și de aici în coloană.

Detectori

Tehnica HPLC s-a dezvoltat o dată cu perfecționarea detectorilor. Detectorii în cromatografie sunt instrumente analitice specializate, situate la ieșirea eluentului dintr-o coloană și care pot înregistra continuu substanțele separate de către aceasta. Deci detectorii constituie acea parte a instrumentației care permite să se observe modul cum decurge separarea prin coloană fără a se vedea componenții propriu ziși ci doar semnalul lor. Întrucât coloanele de separare performante au capacități de încărcare mici, sistemul de detecție trebuie să fie unul foarte sensibil. Totodată, pentru că în LC volumul de probă este de ordinul microlitrilor (8-10μl), volumul detectorilor trebuie să fie de volum apropiat pentru a se putea sesiza în mod continuu picul cromatografic.

În calitate de instrumente se poate utiliza, în principiu, oricare dispozitiv de analiză chimică cunoscut, pentru probe lichide, precum și orice combinații de instrumente fizice. De exemplu, în ultimul timp, combinația dintre un detector refractometric și unul bazat pe difuzia luminii este extrem de eficace în analiza polimerilor în amestec cu monomeri sau oligomeri dintr-un material. Există chiar posibilitatea creșterii sensibilității detecției printr-o reacție chimică în urma adăugării, cu un debit controlat, a unui reactiv potrivit. Tehnica se

numește derivatizare și se poate practica chiar înainte de introducerea probei în coloană, dar și după ieșirea din coloană a componentelor separate. Metoda a fost utilizată până în prezent în special legată de metodele spectrofotometrice (colorimetrice) sau fluorimetrice și mai ales pentru analiza unor amestecuri de compuși numeroși având aceleași funcțiuni reactive (de exemplu aminoacizi).

Caracteristicile detectorilor sunt asemănătoare cu ale celorlalte instrumente analitice și oarecum similare cu cele descrise la metoda GC.

2.2. Metode si materiale

Materiale

Acid palmitic (> 99%), acid stearic(>99%), acid oleic(>99%) si acidul linoleic(>99%) au fost achizitioante de la Sigma-Aldrich sib or triflouridul a fost achizitionat de la Merek. Apa pura a fost preparata in laborator.alte materiale: hidroxid de potasiu,acid acetic si uleiurile de masline, susan, camelia si B. juvanica;

Instrumente

Agilent(model 1200) system HPLC, echipat cu un Alltech ELSd(model 3300) si Eclipse XDB-C18, ZORBA X 5B-C18;

Conditile cromatografice adoptate au fost: faza mobile, mentabol; apa; acid acetic; debitul 10 ml min; volumul injectiei.Temperatura purtata de tubul ELSD a fost setata la 70 °C, gazul nitrogen scurs de pe nebulizer a fost setat la 1,5 l/min.

Prepararea probelor

O solutie stoc a fost preparata in mentanol .Solutia stoc include acidul palmitic ,acidul stearic, oleic si linoleic.

Derivatizarea pentru acizii grasi

Uleiul(0.1g) a fost cantarit exact ,dizolvat in 2 ml de solutie de hidroxid de potasiu de 0.2 molar.Acesta a fost apoi incalzit intr-o baie de abur la 70°C pentru aproximativ 30 de minute.DE-a lungul perioadei,proba a fost amestecata din cand in cand pana cand tot uleiul dispare dupa care 2 ml de mentanol bor triflourid este adaugat. Dupa aceea proba este incalzita la 60°C cu o agitare continua timp de 2 minute si se adauga 2 ml de hexan.

Reultate si discutii

Faza mobile de mentanol/apa este considerabila in separatia HPLC. De aceea efectul compozitiei metanol care variaza intre 85-95% a fost investigat. Metanol 95% nu a separate

acidul palmitic si acidul oleic bine, deoarece timpul analizei a fost prea lung cand folosea metanol 85%.

Analiza probelor de ulei

Comparativ cu metode GC, acizii grasi nesaturati, ca acidul linoleic si acidul oleic, pot fi identificati cu mai mare acuratete cand este folosita metode HPLC-ELSD, posibil datorita temperaturilor scazute inregistrate de-a lungul analizei HPLC-ELSD. Temperaturile scazute reduc riscul de izomerizare a legaturilor duble de carbon.

3. Concluzii

Metode analitice alternative pentru determinarea acizilor grasi au fost dezvoltate folosind HPLC cu detectie ELSD. O buna separare a acizilor grasi a fost atinsa. Comparativ cu metode GC, metoda propusa ofera distincte avantaje: o mai buna separare, precizie imbunatatita si probele nu trebuie sa fie derivatizate.

Rezultatele pe probele de ulei arata ca, comparative cu metode GC, acizii grasi nesaturati au fost identificati cu mai multa acuratete folosind metoda HPLC-ELSD. Deci, aceasta metoda este mult mai convenabila pentru analiza acizilor grasi nesaturati. Totusi, singura deficiente este ca la aceasta metoda limita de detectie a fost un pic mai scazuta decat la metodele GC.

Bibliografie

Horea Iustin NAȘCU, Lorentz JÄNTSCHI “*Chimie Analitică și Instrumentală*” Academic Pres & AcademicDirect , 2006;

www.springerlink.com

www.scribube.com

www.parachute.ro

www.referate.ro