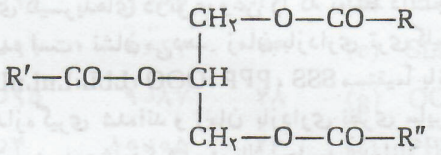
تجزیهٔ تری گلیسریدهای برخی از روغنهای گیاهی

ماری فارن، رنه‌سولیه و ژاك سولیه

لیپیدها، چه منشأ حیوانی و چه منشأ گیاهی داشته باشند، شامل ۸۵ تا ۹۵٪ از تری گلیسریدها، یعنی استرهایی از اسیدهای چرب با گلیسرین، می‌باشند:



تجزیه کیفی و کمی اسیدهای چرب تشکیل دهنده در شناسایی یك روغن و یا چربی مهم است: در حقیقت، بسیاری از خواص یك روغن با ماهیت اسیدهای چرب آن ارتباط دارد: گرانروی، نقطهٔ ذوب، خواص رژیمی، پایداری در برابر گرما (برای سرخ کردن موادغذایی)، اکسید شوندگی (تمایل به‌فاسدشدن)، خشك کنندگی (به‌عنوان حلال رنگ) و غیره.

بعضی اوقات مشاهده می‌شود که روغنها یاچربیها اگرچه‌دارای ترکیب اسید چرب مشابه می‌باشند، ولی خواص نسبتاً متفاوتی دارند. این مسئله می‌تواند به‌این واقعیت مربوط باشدکه ترکیبات چرب‌اساساً ازاسیدهای چرب‌آزادتشکیل نشده‌اند بلکه‌تری گلیسرید هستند. خواص‌آنها نه‌تنها به‌ماهیت اسیدهای چرب، بلکه‌به‌طریقی که‌آنها باگلیسرین استری شده و تری گلیسرید تشکیل داده‌اند، ارتباط دارد.

در واقع اگر تعداد کل تری گلیسریدهایی راکه می‌توانند با n اسید چرب مختلف ساخته شوند، N درنظر بگیریم در این‌صورت خواهیم داشت $N = n^3$، این شامل تری گلیسریدهایی است که با یکدیگر ازنظر نوع اسیدچرب، ایزومری موضعی و همچنین ازنظر انانتیومرها اختلاف دارند. روش ساده‌ای که در حال حاضر امکان انجام دادن این چنین تجزیه‌ای را بدهد وجود ندارد. اگر کسی ایزومرهای نوری را به‌حساب نیاورد، در این‌صورت، تعداد تری گلیسریدهای ممکن برابر است با $N' = (n^3+n^2)/2$. اگر فقط نوع اسید چرب‌را در نظر بگیرید، تعداد ترکیبات برابر $N'' = (n^3+3n^2+2n)/6$ است که شیوه تجزیه‌ای جدید جدا کردن، شناسایی و تجزیه کمی آنها را با روش مناسب HPLC* امکان‌پذیر کرده است (۸-۱).

برای‌مثال، اگرمخلوطی از تری گلیسریدهایی راکه ازاسترهای گلیسرین سه اسیدچرب مختلف A، B و C حاصل شده است درنظر بگیریم، می‌توان به‌طور نظری با HPLC، ۱۰ جزء مختلف راجدا کرد: AAA، BBB، CCC ـ یك ایزومر در هر مورد؛ AAB، AAC، ABB، ACC، BBC، BCC ـ سه ایزومر در هر مورد (یعنی‌یك‌جفت‌انانتیومر و یك ایزومر موضعی)؛ ABC ـ شش ایزومر (یعنی سه‌ایزومر موضعی وانانتیومرهای آنها).

هدف آموزشی

هدف این مقاله این است که به دانشجویان نشان داده شود که تری گلیسریدها یعنی مواد تشکیل دهنده اصلی لیپیدهای طبیعی، شامل‌مخلوطی ازترکیبات مختلف می‌باشندکه به‌تعدادکل‌اسیدهای چرب تشکیل دهندهٔ آنها بستگی دارد. دانشجویان یك تجزیهٔ GC برروی متیل‌استرهای اسیدهای چرب و یك‌تجزیه HPLC بر روی تری گلیسریدها (TG) انجام‌می‌دهند. سپس برای تمامی‌ساختارهای ممکن TG تحقیق‌کرده ونتایج را با ترکیب واقعی روغن یا چربی مقایسه می‌کنند.

اصول عملیات

جداکردن تری‌گلیسریدها از روغن. تری گلیسریدها رامی‌توان به‌طور سریع از سایر مواد تشکیل‌دهندهٔ روغن باکروماتوگرافی در یك ستون سیلیکاژل با مایع شوینده بنزن جدا کرد. این جداسازی اساساً ضروری نیست، زیرا کروماتوگرامهای HPLC که حاصل می‌شوند توسط پیکهای ثانویه آشفته نمی‌شوند.

تجزیه متیل‌استراسیدهای‌چرب با GC. متیل‌استرهای‌اسیدهای چرب *(FAME) توسط تبادل استری حجم یعنی از تری گلیسرید توسط محلولی از سدیم متیلات در متانول، اسیدی‌کردن و استخراج FAME بامتیل t- بوتیل‌اتر تهیه می‌شوند (۹)، سپس لایهٔ آلی می‌تواند مستقیماً برای‌عمل تجزیه GC به‌کار برده شود. شناسایی FAME می‌تواند توسط مقایسه با استانداردهایی که توسط مربی در ابتدای جلسه کروماتوگرافی شده‌اند، انجام گیرد.

تجزیه تری‌گلیسریدها با HPLC و تفسیر کروماتوگرامها. یك جزء از محلول تری گلیسرید توسط HPLC ایزوکراتیك با

* HPLC مخفف High Performace Liquid Chromatography است.ـ م.

* FAME مخفف Fatty Acid Methyl Esters است.ـ م.

استفاده از پروپیونیتریل به‌عنوان حلال به‌اجزای خود تجزیه می‌شود. عمل کروماتوگرافی در حدود ۲۰ دقیقه طول می‌کشد و تعدادی پیك به‌دست می‌آید (درحدود ۱۰ پیك) که باتوجه به‌زمان بازداری آنها شناسایی می‌شوند.

برای شناسایی تری گلیسریدهای مختلف، هر اسید چرب بایك یا دوحرف مخفف نشان داده می‌شود، P برای پالمیتیك اسید، S برای استئاریك اسید، O برای اولئیك اسید، L برای لینولئیك اسید، Ln برای لینولنیك اسید. بنابراین، OLL نشان‌دهندهٔ اولئودی‌لینولئین و غیره است. مربی قبلاً زمان بازداری (R) تعدادی از تری گلیسریدهای همگن را اندازه‌گیری می‌کند: OOO، PPP، SSS، LLL، LnLnLn.

زمان بازداری نظری یك تری گلیسرید معین با اضافه کردن سهم اسیدهای چرب تشکیل‌دهنده به‌راحتی محاسبه می‌شود. اگر یك تری گلیسرید همگن مانند تری‌اولئین را درنظربگیریم، مطابق تعریف داریم $\log RT(O) = 1/3 \log RT(OOO)$. لگاریتم زمان‌بازداری‌هر تری گلیسریدی‌مجموع لگاریتمهای زمان بازداری هر یك از سه اسید چرب تشکیل‌دهنده آن خواهد بود. (۲ و ۱۰). برای مثال،

$$\log RT(POL) = \log RT(P) + \log RT(O) + \log RT(L)$$

$$\log RT(SSO) = 2 \log RT(S) + \log RT(O)$$

دانشجویان بادانستن نوع اسید چرب موجود در روغنها، می‌توانند فهرستی از تمامی تری گلیسریدهای ممکن را از روی $[(n^3+3n^2+2n)/6]$، تهیه کنند که می‌شود ۲۰ تری گلیسرید برای چهار اسیدچرب، ۱۰ تری گلیسرید برای سه‌اسیدچرب وغیره. سپس زمان بازداری نظری برای هرکدام از تری گلیسریدها را محاسبه کرده، تری گلیسریدها را به‌موجب افزایش زمان بازداری آنها مرتب کنند. دانشجویان‌همچنین می‌توانند اعدادتوزیع (PN*) یاعدد توزیع برابر با تعداداتمهای کربن دراسیدهای چرب منهای دوبرابر تعداد پیوندهای‌دوگانه موجود است) را محاسبه نمایند و مشاهده کنند که تری گلیسریدها تقریباً به‌ترتیب اعداد توزیع خود از ستون شوییده‌می‌شوند (۱۰ و ۱۱).

سپس دانشجویان ارتباطی بین زمان بازداری نظری و پیکهایی که عملاً به‌دست آورده‌اند برقرار می‌کنند. دقت درحدود ۰٫۲ $\pm$ دقیقه است. باید توجه کرد که تمامی گلیسریدهای ممکن عملاً مشاهده نمی‌شوند.

نتایج

چهارنوع روغن گیاهی یعنی روغنهای‌هسته انگور، ذرت، تخم کلم و آفتابگردان توسط دانشجویان‌ما در بخش شیمی و زیست‌شناسی کاربردی در دانشگاه پرپینان مورد مطالعه قرار گرفته است. در جدول ۱ ترکیب اسیدهای چرب هریك از آنها داده‌شده است. این روغنها به‌خاطر داشتن سه یاچهار اسید چرب اصلی که همواره در ترکیبات طبیعی مشاهده می‌شوند، انتخاب شده‌اند: پالمیتیك‌اسید (مخفف شده به‌صورت C ۱۶:۰ یعنی دارای ۱۶ اتم کربن وبدون

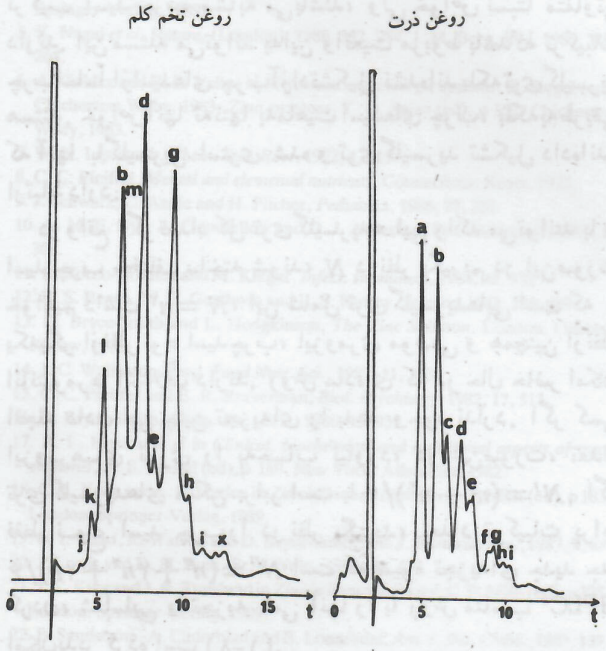
جدول ۱. ترکیب اسیدهای چرب بعضی از روغنهای گیاهی

	RT* (دقیقه)	هسته انگور (%)	ذرت (%)	تخم کلم (%)	آفتابگردان (%)
پالمیتیك اسید	۵٫۰	۵٫۸	۱۰٫۲	۴٫۳	۶٫۱
استئاریك‌اسید	۸٫۸	۳٫۲	مقدارناچیز	مقدارناچیز	۳٫۸
اولئیك‌اسید	۹٫۵	۱۵٫۳	۳۰٫۳	۶۳٫۳	۲۲٫۵
لینولئیك‌اسید	۱۱٫۱	۷۵٫۹	۵۹٫۵	۲۳٫۸	۶۷٫۵
لینولنیك‌اسید	۱۳٫۱	مقدارناچیز	—	۸٫۵	مقدارناچیز

* زمان بازداری FAME مربوط به‌شرایط داده‌شده درقسمت روش‌آزمایش است.

پیوند دوگانه)، استئاریك‌اسید (C ۱۸:۰)، اولئیك‌اسید (C ۱۸:۱ یعنی ۱۸ اتم کربن و یك‌پیوند دوگانه)، لینولئیك‌اسید (C ۱۸:۲) و لینولنیك‌اسید (C ۱۸:۳). شکل ۱ کروماتوگرام HPLC نوعی تری گلیسریدهای دونوع‌روغن را که توسط دانشجویان ما به‌دست آمده است، نشان می‌دهد. زمان بازداری تری گلیسریدهای همگن LnLnLn، LLL، OOO، PPP، SSS مستقیماً بانمونه‌های‌تجاری اندازه‌گیری شده‌اند و زمان بازداری نظری سایر تری گلیسریدها باتوجه به‌روش ذکرشده دربالا محاسبه شده‌اند. نتایج در جدول۲ خلاصه شده است.

کل زمان لازم برای انجام آزمایشها در هرگروه دو نفری در حدود سه‌ساعت است. برای اینکه از دستگاهها بهتر استفاده شود، گروههای آزمایش‌کننده با فواصل زمانی یك ساعت آزمایش را شروع می‌کنند، بنابراین آنها می‌توانند از هریك از دستگاههای HPLC و GLC حدود یك‌ساعت استفاده کنند.



شکل ۱. کروماتوگرام HPLC تری گلیسریدهای روغن تخم کلم و روغن ذرت. حروف مربوط به تری گلیسریدها در جدول ۲ آمده است.

* PN مخفف Partition Numbers است. ـ م.

جدول ۲. ترکیب تری گلیسریدی بعضی از روغنهای گیاهی(الف)

تری گلیسرید		PN(ب)	Th.RT(ج) (دقیقه)	Exp.RT(د) (دقیقه)	%TG(ه) هسته انگور	%TG ذرت	%TG تخم کلم	%TG آفتابگردان
LLnLn	(j)	۳۸	۴ر۱۴	۴ر۲۱	—	—	۰ر۳	—
LLLn	(k)	۴۰	۴ر۷۱	۴ر۸۴	—	—	۲ر۵	—
LLL	(a)	۴۲	۵ر۳۷	۵ر۳۶	۳۹ر۳	۲۱ر۴	—	۲۶ر۹
OLLn	(l)	۴۲	۵ر۷۷	۵ر۶۱	—	—	۸ر۴	—
OLL	(b)	۴۴	۶ر۵۷	۶ر۵۶	۲۶ر۶	۲۷ر۶	۱۰ر۵	۲۸ر۵
OOLn	(m)	۴۴	۷ر۰۷	۶ر۹۰	—	—	۱۰ر۵	—
PLL	(c)	۴۴	۷ر۳۴	۷ر۵۵	۱۱ر۰	۱۱ر۷	—	۷ر۶
LOO	(d)	۴۶	۸ر۰۵	۷ر۹۳	۸ر۷	۱۵ر۹	۲۷ر۶	۱۱ر۰
POL	(e)	۴۶	۹ر۰۰	۸ر۹۱	۱۴ر۴	۱۰ر۹	۴ر۵	۸ر۶
SLL	(e)	۴۶	۹ر۱۲	۸ر۹۱	—	۳ر۴	۲۹ر۹	—
OOO	(g)	۴۸	۹ر۸۷	۹ر۹۵	—	۴ر۸	—	۴ر۰
PPL	(f)	۴۶	۱۰ر۰۵	۱۰ر۴	—	۲ر۳	۲ر۹	۹ر۰
POO	(h)	۴۸	۱۱ر۰۳	۱۱ر۳۲	—	—	—	۲ر۴
SOL		۴۸	۱۱ر۳۰	۱۱ر۵۰	—	۰ر۹	۱ر۹	—
PPO	(i)	۴۸	۱۲ر۳۲	۱۲ر۳۶	—	—	—	۰ر۸
PSL		۴۸	۱۲ر۶۲	۱۲ر۸۷	—	۰ر۶	—	—
PPP		۴۸	۱۳ر۷۶	۱۳ر۷۷	—	—	—	۰ر۳
SOO		۵۰	۱۳ر۸۵	۱۳ر۶۰	—	۰ر۵	۱ر۰	۰ر۹
بقیه	(x)							

الف) زمان بازداری استانداردها: LnLnLn ۳ر۶۴ دقیقه، LLL ۵ر۳۷ دقیقه، OOO ۹ر۸۷ دقیقه، PPP ۱۳ر۷۶ دقیقه، SSS ۲۷ر۲۷ دقیقه.

ب) PN = عدد توزیع

ج) $Th.RT$ = زمان بازداری نظری

د) $Exp.RT$ = زمان بازداری تجربی

ه) TG = تری گلیسرید.

روش آزمایش

محلولها. پروپیونیتریل، بنزن، اتر نفت، متیل t- بوتیل اتر، متانول. تمامی این حلالها بی آب هستند. پروپیونیتریل صاف می‌شود وتوسط عمل فرا صوتی تحت فشار کم، گاز زدایی می‌شود.

عامل تبادل استری. محلول سدیم متیلات تقریباً ۰ر۲N در متانول، توسط انحلال ۰ر۴۶ g سدیم در ۱۰۰ mL متانول مطلق تهیه می‌شود؛ محلول آبی سولفوریک اسید ۱N.

استانداردها. تری گلیسریدهای OOO ، PPP، SSS، LLL، LnLnLn ؛ متیل استر اسیدهای اولئیک، پالمیتیک، استئاریک، لینولئیک ولینولنیک.

روغنهای مورد آزمایش. نمونه‌های تجاری که از فروشگاه خریداری شد .

دستگاهوری

HPLC. ما یک دستگاه مرک را که به یک شکست سنج دیفرانسیلی واترز ویک ثبات انتگرال گیر مرک مجهز بود؛ ستون لیکروزورب

مرك RP۱۸۵ μm و به‌طول ۲۵cm با قطر درونی ۴mm، سرنگ ۲۰μL؛ سرعت عبور ۱mL/min به‌کار بردیم.

GC. کروماتوگراف‌دلسی به یک ستون مویینه‌ای آغشته به کربوواکس ۲۰M به‌طول ۲۵m و قطر داخلی ۰٫۳۲mm و با تزریق‌کننده یاتبخیرکننده مجهزبود. شرایط تجزیه: آون ۱۹۰°C، تزریق‌کننده ۲۵۰°C و آشکارساز ۲۵۰°C. گاز هلیم بافشار ۰٫۷ بار، سرنگ ۱μL؛ ثبات هولت‌پاکارد انتگرال‌گیر.

روش

خالص‌کردن و تجزیه تری‌گلیسریدها. به‌دقت ۰٫۱ g روغن را وزن کنید. ۵ g سیلیس (مرك کیسل ژل ۴۰) را که در ۲۰mL اتر نفت به صورت تعلیق در آمده است به‌داخل‌ستون‌کروماتوگرافی‌به‌طول ۳۰cm وقطر ۱۲mm بریزید. مایع بالای سطح جامد را خارج کنید و روغن را که در ۱mL کلروفرم حل شده است روی سیلیس اضافه کنید و با ۳۰mL بنزن بشویید. حلال را تحت‌فشارکم تبخیر کنید و تری‌گلیسریدها را در ۲ mL کلروفرم حل‌کنید. ۲۰ μL از نمونه مورد تجزیه برای تجزیه با HPLC کافی است.

استری کردن اسیدهای چرب. پس‌از مطالعه TGتوسطHPLC، ترکیب کلی اسیدهای چرب TG با تجزیه‌GC می‌تواندتعیین شود. کلروفرم را تبخیر کرده وباقیمانده را در ۲mL متیل *t*- بوتیل اتر حل می‌کنند. سدیم متیلات (۱ mL) اضافه می‌شود؛ این مخلوط را برای مدت یك‌دقیقه خوب‌هم‌می‌زنند و می‌گذارند تا برای مدت ۲ دقیقه ساکن‌بماند و سپس با ۰٫۲mL محلول سولفوریك‌اسید یك نرمال خنثی می‌کنند. بعدازمخلوط‌کردن، ۳mL آب‌اضافه می‌کنند ومخلوط را هم‌می‌زنند و دوباره می‌گذارند تا ساکن بماند. FAME. راکه درفاز آلی است باGC تجزیه می‌کنند؛ ۰٫۵ μL را به‌دستگاه کروماتو گراف تزریق‌کنید.

ترجمهٔ محمد صادق خواجوی

• Analysis of the Triglycerides of Some Vegetable Oils
Marie Farines, Renée Soulier, and Jacques Soulier
Journal of Chemical Education, May 1988

مراجع

1. Herslof, B.; Podlaha, O.; Toregard, B. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1979, *56*, 864.
2. Goiffon, J. P.; Reminiac, C.; Ollo, M. *Rev. Fr. Corps Gras* 1981, *28*, 167.
3. Peterson, B.; Podlaha, O.; Toregard, B. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1981, *58*, 1005.
4. Phillips, F. C.; Erdahl, W. L.; Privett, O. S. *Lipids* 1982, *17*, 992.
5. Singleton, J. A.; Pattee, H. W. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1984, *61*, 761.
6. Phillips, F. C.; Erdahl, W. L.; Privett, O. S. *Lipids* 1984, *19*, 880.
7. Stolyhwo, A.; Colin, H.; Guiochon, G. *Anal. Chem.* 1985, *57*, 1342.
8. Aitzetmuller, K. *Prog. Lipids Res.* 1982, *21*, 171.
9. Cecchi, G.; Biasini, S.; Castano, J. *Rev. Fr. Corps Gras* 1985, *32*, 163.
10. Goiffon, J. P.; Reminiac C.; Furon, D. *Rev. Fr. Corps Gras* 1981, *28*, 199.
11. Perrin, J. L.; Naudet, M. *Rev. Fr. Corps Gras* 1983, *30*, 279.

آمونیوم هیدروکسید وجود ندارد!

نیتروژن در لایهٔ والانس خود فقط ۴ اوربیتال دارد. مهم نیست‌که سه اوربیتال p و یك اوربیتال s چگونه هیبرید شده‌اند، نیتروژن فقط می‌تواند حداکثر چهار پیوند تشکیل دهد. اگر NH_4OH وجود می‌داشت، می‌بایستی صددرصد به NH_4^+ و OH^- یونیده می‌شد. تترامتیل آمونیوم هیدروکسید وجود دارد و همچون سدیم هیدروکسید یك باز قوی است.

فسفر می‌تواند از اوربیتالهای d خالی در لایهٔ والانس خود استفاده‌کند و اجزایی نظیر فسفر پنتاکلرید و یون هگزافلوئوروفسفات پدید آوردکه هم‌ارز نیتروژنی آنها شناخته نشده است. همین طور، یك فسفین اکسید را می‌توان به صورت $R_3P=O$ نیز نوشت، در حالی‌که ساختار یك آمین اکسید به $R_3N^+-O^-$ محدود است.

چون آمونیاك و آب هر دو قطبی هستند و در تشکیل پیوند هیدروژنی درگیر می‌شوند، جای شگفتی نیست‌که برهم‌تأثیر متقابل بگذارند. آمونیاك آبپوشیده جامد با دمای ذوب پایین وجود دارد. درآمونیاك مایع آبی، مطالعات رزونانس مغناطیسی هسته نشان می‌دهدکه طول عمر تماس ناشی از بر خوردی‌که توسط پخش‌کنترل می‌شود حدود 10^{-10} ثانیه است.

نباید دانشجویان شیمی را با نوشتن $NH_4OH(\text{آبی}) \rightleftharpoons NH_4^+ + OH^-$ گمراه‌کنیم، بلکه همیشه باید معادله‌را چنین بنویسیم، $NH_3(\text{آبی}) + H_2O \rightleftharpoons NH_4^+ + OH^-$

همین‌طور از انبار موادشیمیایی آزمایشگاه نیز باید بخواهیم‌که برخلاف معمول بر روی بطریهای خود برچسب «آمونیوم‌هیدروکسید» نزنند، زیرا وجود خارجی ندارد.

ترجمهٔ رقیه عباسعلی‌پور

• *Journal of Chemical Education*, January 1988