

Judyta KOSIŃSKA^{1*}, Dorota MARTYSIAK-ŻUROWSKA², Marian KAMIŃSKI¹

¹ Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. Gabriela Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Polska

² Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. Gabriela Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Polska

*Autor do korespondencji, e-mail: judkosin@pg.gda.pl

Zastosowania chromatografii wykluczania (GPC/SEC). Część II – Wykorzystanie GPC/SEC w rozdzielaniu tłuszczów i produktów ich konwersji – artykuł przeglądowy

Streszczenie: Tłuszcze i produkty ich konwersji stanowią złożoną grupę związków organicznych, o różnorodnej i skomplikowanej strukturze. Istotnym problemem, zwłaszcza w rozdzielaniu szczegółowym tak złożonych i zróżnicowanych analitów na poszczególne indywidualia chemiczne jest ogromna różnorodność budowy związków chemicznych przynależnych do poszczególnych klas lipidów. Z drugiej strony, poszczególne klasy lipidów wykazują charakterystyczne cechy pod względem swoich właściwości fizykochemicznych, w tym, pod względem oddziaływań sorpcyjnych, co umożliwia ich rozdzielanie grupowe. Uzyskanie właściwego rozdzielania związków lipidowych na grupy warunkuje możliwość ich dalszego rozdzielania oraz prawidłową identyfikację poszczególnych związków chemicznych występujących w danej grupie. Niniejsza praca przeglądowa przedstawia współczesny stan wiedzy opisany w literaturze, dotyczący jednej z szeroko stosowanych technik wstępnego rozdzielania grupowego tłuszczów oraz produktów ubocznych ich rafinacji lub konwersji, tj. chromatografii wykluczania (ang. GPC/SEC, Gel Permeation Chromatography/Size Exclusion Chromatography).

Słowa kluczowe: chromatografia wykluczania (GPC/SEC), lipidy, acyloglicerole, rozdzielanie tłuszczów, kolumny z wypełnieniem styren-divinylobenzen (SDVB)

Applications of Size Exclusion Chromatography (GPC/SEC). Part II – Usefulness of GPC/SEC in separation of fats and their conversion products – review

Abstract: Fats and their conversion products are a complex group of organic compounds with diverse and complicated structure. A major problem, especially in "detailed" separation of such complex and varied mixtures into individual chemical compounds, is a huge variety of chemical structure of chemical substances that belong to various classes of lipids. On the other hand, particular lipid classes have characteristic features in terms of their physicochemical properties, including sorption interactions, which allows for the group separation. A proper group separation of lipid compounds allows for their further separation and identification of particular chemical compounds present in given class. This review discusses state of the art described in the literature, concerning one of the widely used technique for group separation of fats and refining or conversion by-products, ie. Gel Permeation Chromatography/Size Exclusion Chromatography (GPC/SEC).

Key words: size exclusion chromatography (GPC/SEC), lipids, acylglycerols, separation of fats, columns with styrene-divinylbenzene stationary phase (SDVB)

Skróty użyte w pracy (Used abbreviations)

| Skrót (Abbreviation) | Nazwa polska (Polish name) | Nazwa angielska (English name) |
|-------------------------|---|--|
| Å | Angstrom | Angstrom |
| APCI | Jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym | Atmospheric Pressure Chemical Ionization |
| BHT | Butylowany hydroksytoluen | Butylated hydroxytoluene |
| Da | Dalton | Dalton |
| DAG | Diacyloglicerole | Diacylglycerols |
| d _c | Średnica wewnętrzna kolumny | Column internal diameter |
| DCM | Chlorek metylenu (dichlorometan) | Methylene chloride (dichloromethan) |
| d _p | Średnica ziaren wypełnienia kolumny | Particle diameter of column packing |
| EM | Estry metylowe | Methyl Esters |

| | | |
|----------------------|---|--|
| ELSD | Lasery detektor fotodyspersyjny | Evaporative Light Scattering Detector |
| FAEE | Estry etylowe kwasów tłuszczowych | Fatty Acid Ethyl Esters |
| FAME | Estry metylowe kwasów tłuszczowych | Fatty Acid Methyl Esters |
| FID | Detektor płomieniowo-jonizacyjny | Flame Ionization Detector |
| GC | Chromatografia gazowa | Gas Chromatography |
| GPC | Chromatografia żelowa | Gel Permeation Chromatography |
| HPLC | Wysokosprawna chromatografia cieczowa | High Performance Liquid Chromatography |
| HPSEC | Wysokosprawna chromatografia wykluczania | High Performance Size Exclusion Chromatography |
| IEC | Chromatografia jonowymienna | Ion Exchange Chromatography |
| ISO | Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna | International Organization for Standardization |
| KT | Kwas tłuszczowy | Fatty Acid |
| L | Kwas linolowy | Linoleic Acid |
| L_c | Długość kolumny | Column length |
| LLSD | Lasery detektor fotodyspersyjny | Laser Light Scattering Detector |
| MAG | Monoacyloglicerole | Monoacylglycerols |
| MS | Spektrometr mas | Mass Spectrometer |
| n | Liczba atomów węgla w cząsteczce | Number of Carbon Atoms in Carbon Chain |
| NP | Normalny układ faz | Normal Phase |
| RID | Różnicowy detektor refraktometryczny | Refractive Index Detector |
| RP | Układ faz odwróconych | Reversed Phase |
| S | Kwas stearynowy | Stearic Acid |
| SEC | Chromatografia wykluczania | Size Exclusion Chromatography |
| SDVB | Kopolimer styrenu i diwinylobenzenu | Copolymer of Styrene and Divinylbenzene |
| sn | Numeracja stereospecyficzna | Stereospecific Numbering |
| SPE | Ekstrakcja do fazy stałej | Solid-Phase Extraction |
| T | Toluen | Toluene |
| TAG | Triacyloglicerole | Triacylglycerols |
| THF | Tetrahydrofuran | Tetrahydrofuran |
| TLC | Chromatografia cienkowarstwowa | Thin-Layer Chromatography |
| UV-VIS-DAD | Detektor spektrofotometryczny z matrycą diodową | UV-VIS Diode Array Detector |
| WKT | Wolne kwasy tłuszczowe | Free Fatty Acids |

1. WSTĘP (Introduction)

Lipidy stanowią dużą, niejednorodną chemicznie grupę naturalnych związków organicznych. Wraz z węglowodanami i białkami tworzą podstawową grupę składników pokarmowych. Do lipidów zalicza się substancje organiczne występujące we wszystkich żywych organizmach, które nie rozpuszczają się w wodzie, a rozpuszczają w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak eter etylowy, eter naftowy, chloroform, benzen, aceton, itp. Do lipidów zalicza się także pochodne lipidów naturalnych i związki im pokrewne, które zachowują w/w cechy. Chemia lipidów żywności jest wyjątkowo skomplikowana, gdyż lipidy są substancjami o bardzo złożonej i różnorodnej budowie, ulegającymi wielu przemianom, które inaczej przebiegają w układach izolowanych a inaczej w tkankach. Ze względu na pewne podobieństwa strukturalne lipidy można podzielić na 3 zasadnicze grupy: lipidy proste (acyloglicerole), lipidy złożone (fosfolipidy, glikolipidy i inne lipidy złożone, np. sulfolipidy) i lipidy wtórne (pochodne, np. kwasy tłuszczowe, alkohole, węglowodory).

W literaturze można spotkać także inne propozycje klasyfikacji lipidów. Przykładowo, w 2005 roku Fahy i współautorzy [1] zaproponowali inny schemat klasyfikacji lipidów, w oparciu o twierdzenie, że lipidy powstają w całości lub częściowo z dwóch odrębnych typów podjednostek: grup ketoacylowych i izoprenowych. Zgodnie z tym założeniem lipidy podzielono na 8 grup, tj.: kwasy tłuszczowe, glicerolipidy, glicerofosfolipidy, sfingolipidy, sterole, prenole, sacharolipidy oraz poliketidy.

Z pojęciem „lipidy” związane jest pojęcie „tłuszcz”. Tłuszczami zwykło się nazywać wieloskładnikową mieszaninę związków lipidowych o różnorodnej budowie uzyskaną ze zwierzęcych tkanek tłuszczowych lub roślin oleistych za pomocą tłoczenia bądź ekstrakcji. Podstawowym, lecz nie jedynym składnikiem tłuszczów naturalnych, występującym w największych ilościach są triacyloglicerole (TAG). TAG stanowią zwykle 86-98% tłuszczu surowego i 98-99% tłuszczu rafinowanego. Wszystkie inne składniki lipidowe występujące w

tłuszczach nazywane są potocznie substancjami towarzyszącymi. Ich ilość jest zmienna, na ogół nie przekracza 1-5% i zależy m.in. od surowca tłuszczowego i sposobu wydobywania tłuszczu. Do składników towarzyszących zalicza się przede wszystkim fosfolipidy, których zawartość w niektórych olejach surowych może dochodzić do kilku procent (np. w przypadku masła kakaowego jest to 0,13-5%) [2]. Ponadto w tłuszczach naturalnych obecne mogą być: sterole, witaminy, aldehydy, alkohole, ketony, węglowodory, woski, wolne kwasy tłuszczowe, niepełne acyloglicerole oraz inne (Tabela 1). Obecność znaczących ilości wolnych kwasów tłuszczowych jest najczęściej efektem zaawansowanych procesów hydrolitycznych i lipolitycznego działania enzymów.

Tabela 1. Skład lipidów występujących w przykładowych produktach żywnościowych [3].

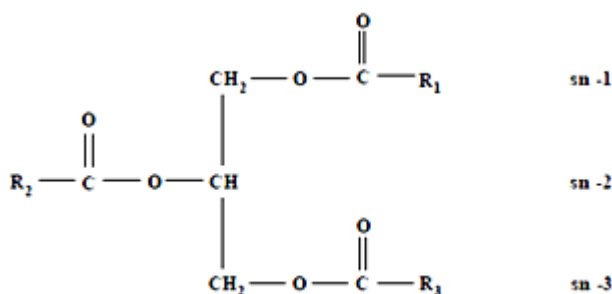
Table 1. Composition of lipids present in exemplary food products [3].

| Lipidy [% z zawartości całkowitej] (Lipids [% of the total content]) | Mleko krowie (Cow's milk) | Soja nasiona (Soybeans) | Pszenica kielki (Wheat germs) | Jabłko miąższ (Apple pulp) |
|---|------------------------------|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Triacyloglicerole (Triacylglycerols) | 94 | 88 | 41 | 5 |
| Mono- i diacyloglicerole (Mono- and diacylglycerols) | 1,5 | - | 1 | - |
| Sterole (Sterols) | < 1 | - | 1 | 15 |
| Fosfolipidy (Phospholipids) | 1,5 | 10 | 20 | 47 |
| Glikolipidy (Glycolipids) | - | 1,5 | 29 | 17 |
| Sulfolipidy (Sulfolipids) | - | - | - | 1 |
| Inne (Other) | - | 0,54 | 7 | 15 |
| Całkowita zawartość lipidów [%] (Total lipid content [%]) | 3,6 | 23,0 | 1,5 | 0,09 |

2. RÓŻNORODNOŚĆ ZWIĄZKÓW LIPIDOWYCH (Diversity of lipid compounds)

Podstawowym elementem budującym lipidy są kwasy tłuszczowe (KT). KT występujące w przyrodzie są kwasami karboksylowymi zazwyczaj o prostych łańcuchach węglowodorowych, zawierających 4–30 atomów węgla. KT występujące w lipidach mogą mieć charakter związku nasyconego lub zawierać od 1 do 6 wiązań podwójnych w łańcuchu węglowodorowym (nienasycone KT). Wiązania podwójne w cząsteczce naturalnych KT występują najczęściej w konfiguracji *cis*, rzadziej w konfiguracji *trans* (izomeria geometryczna). Ponadto w KT występuje izomeria położenia związana z usytuowaniem wiązania podwójnego, np. kwas oktadecenowy C18:1 może mieć teoretycznie 16 izomerów położenia podwójnego wiązania od C2 do C17. Oleje uzyskane z roślin oleistych zawierają średnio 5 – 15 głównych KT, natomiast tłuszcz uzyskany z bardziej złożonych matryc może zawierać nawet kilkadziesiąt różnych KT, np. tłuszcz mleka ludzkiego zawiera łącznie blisko 50 zidentyfikowanych KT [4].

Triacyloglicerole – główny składnik tłuszczów właściwych – są estrami glicerolu i trzech cząsteczek KT. TAG różnią się między sobą nie tylko składem KT, ale również ich położeniem w cząsteczce. Położenie KT w TAG określa się stosując numerację stereospecyficzną „*sn*” (z ang. *stereospecific numbering*). Każda z reszt kwasowych może być umiejscowiona w cząsteczce TAG w pozycji wewnętrznej (pozycja β lub 2, określana jako *sn-2*) albo w jednej z pozycji zewnętrznych (pozycje α i α1 lub 1 i 3, określane jako *sn-1* oraz *sn-3*) (Rys. 1).



Rys. 1. Pozycje *sn-1*, *sn-2* oraz *sn-3* w cząsteczce triacyloglicerolu, gdzie R1, R2, R3 to reszty acylowe kwasów tłuszczowych.

Fig. 1. Positions *sn-1*, *sn-2* and *sn-3* in triacylglycerol molecule, wherein R1, R2, R3 are acyl residues of fatty acids.

W naturze TAG stosunkowo rzadko zawierają w swojej strukturze trzy jednakowe KT. Liczba kombinacji TAG = n^3 (gdzie n = liczba różnych KT), jeżeli uwzględnione są wszystkie izomery. Oznacza to, że jeżeli w TAG występują dwa rodzaje KT, np. kwas stearynowy S i kwas linolowy L, czyli $n = 2$, to liczba możliwych TAG wynosi 8, a możliwe kombinacje są następujące: SSS, SSL, SLS, LSS, LLS, LSL, SLL oraz LLL. Analogicznie, dla 5 różnych KT liczba możliwych TAG wynosi 5^3 – czyli 125, natomiast dla 20 różnych kwasów – 8000. Tłuszcze roślinne zawierają 5–15 różnych KT, a tłuszcze zwierzęce od kilkunastu (tłuszcze zwierząt morskich) do kilkudziesięciu KT (tłuszcze mleczne), zatem liczba możliwych TAG może sięgać kilku milionów. Według dostępnej literatury wiadomo, że w większości naturalnych tłuszczów liczba triacylogliceroli osiąga 50–80% teoretycznie możliwych kombinacji TAG [5].

Pozycje *sn-1* i *sn-3* w TAG nie są tożsame, a rozmieszczenie KT w cząsteczkach TAG nie jest przypadkowe dla danego tłuszczu i ma znaczenie dla jego trawienia oraz wchłaniania (Tabela 2). Skład KT oraz miejsce położenia danego KT w cząsteczce TAG warunkuje właściwości fizyczne i chemiczne tłuszczów. Kwasy tłuszczowe wykazują pewne predyspozycje do zajmowania określonych pozycji w TAG, np. w tłuszczu mleka krowiego długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (np. kwas oktadekanowy C18:0 i *cis*-oktadec-9-enowy C18:1 9c) mają tendencję do zajmowania pozycji *sn-1*, krótkołańcuchowe (np. kwas butanowy C4:0 i heksanowy C6:0) znajdują się w większości w pozycji *sn-3*, a średniołańcuchowe, nasycone KT (np. kwas dodekanowy C12:0 i tetradekanowy C14:0) w pozycjach *sn-2* [6]. TAG w olejach roślinnych mają natomiast odmienną strukturę stereospecyficzną. Pozycje zewnętrzne *sn-1,3* TAG są w przeważającej ilości zajmowane przez kwasy nasycone, natomiast w pozycji wewnętrznej *sn-2* znajdują się głównie kwasy nienasycone, osiemnastowęglowe (w olejach tych ok. 70% kwasu linolowego C 18:2 znajduje się w pozycji wewnętrznej).

Tabela 2. Preferencje KT do zajmowania określonych pozycji w TAG wybranych tłuszczów [6].

Table 2. *KT preferences to occupy certain positions in TAGs of selected fats [6].*

| Rodzaj tłuszczu (Fat type) | <i>sn-2</i> | <i>sn-1,3</i> |
|-------------------------------------|--|---|
| tłuszcz roślinny (vegetable oil) | nienasycone KT (m.in. 18:2, 18:1) | nasycone KT (m.in. 16:0, 18:0) |
| łój wołowy (beef tallow) | nienasycone KT 18:1 | nasycone, większość 16:0 |
| tłuszcz wieprzowy (pork fat) | nasycone, większość 16:0 | jednonienasycone (18:1), nasycone 18:0 |
| tłuszcz rybi (fish fat) | polienowe KT (20:5, 22:6), nasycone (14:0, 16:0) | kwasy monoenowe (18:1) |

Podczas obróbki termicznej tłuszczów (np. smażenia) składniki lipidowe ulegają przemianom oksydacyjnym i oksydacyjno-termicznym, zwłaszcza w obecności innych składników żywności [7]. W wyniku przemian powstaje szereg nowych związków różniących się masą cząsteczkową, począwszy od niskocząsteczkowych lotnych związków chemicznych takich jak estry, eter, aldehydy, ketony, laktony, alkohole, krótkołańcuchowe wolne kwasy tłuszczowe, ale również sprzężone dieny, niepełne TAG, utlenione TAG, dimery TAG oraz polimery TAG [5].

Biorąc pod uwagę ogromną różnorodność budowy związków chemicznych przynależnych do poszczególnych klas lipidów, przedstawioną na przykładzie KT, TAG i ich możliwych produktów konwersji, rozdzielanie tak złożonych i zróżnicowanych analitów na poszczególne indywidua chemiczne jest problematyczne. Znaczne podobieństwo struktury molekularnej składników w obrębie danej klasy sprawia, iż separacja poszczególnych związków chemicznych jest bardzo trudna. Z drugiej strony, poszczególne klasy lipidów wykazują jednak charakterystyczne cechy pod względem swoich właściwości fizykochemicznych, w tym, pod względem oddziaływań sorpcyjnych, co umożliwia ich rozdzielanie grupowe.

3. PODSTAWOWE TECHNIKI I METODYKI ROZDZIELANIA LIPIDÓW, TŁUSZCZÓW I PRODUKTÓW ICH KONWERSJI NA KLASY (GRUPY) – OGÓLNY ZARYS (Basic techniques and methodologies for lipids, fats and products of their conversion group separation – overview)

W analityce składników lipidowych, tłuszczów i produktów ich przemian największe znaczenie mają techniki chromatograficzne, które używane są zarówno do rozdzielania lipidów na klasy, jak i do rozdzielania i oznaczania związków składowych frakcji lipidowych. Ze względu na różnorodność składników lipidowych, w celu wykonania pełnej analizy składu i zawartości poszczególnych lipidów w próbce, najczęściej konieczne jest wstępne rozdzielanie grupowe. Po wyekstrahowaniu lipidów z materiału badanego rozdziela się je na grupy na podstawie różnic w rodzaju i ilości grup względnie łatwo jonizowalnych (aminowych, fosforanowych, karboksylowych) oraz niejonizowalnych i trudno jonizowanych (hydroksylowych, karbonylowych) obecnych w

cząsteczkach. Rozdzielania grupowego można dokonywać za pomocą różnych technik: ekstrakcyjnych – adsorpcji-desorpcji, w tym ekstrakcji do fazy stałej (SPE, *Solid-Phase Extraction*) oraz chromatograficznych – chromatografii cienkowarstwowej (TLC, *Thin-Layer Chromatography*), wysokosprawnej kolumnowej chromatografii cieczowej (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), m.in.: adsorpcyjnej w normalnych układach faz (NP, *Normal Phase*), w układach faz odwróconych (RP, *Reversed Phase*), chromatografii wykluczania (GPC/SEC, *Gel Permeation/Size Exclusion Chromatography*), a także jonowymiennej (IEC, *Ion Exchange Chromatography*), w przypadku składników jonizowalnych.

Z kolei chromatografia gazowa (GC, *Gas Chromatography*) służy do rozdzielania, a w efekcie do oznaczania lotnych i możliwych do przeprowadzenia w lotne pochodne składników ekstraktów. GC znalazła przede wszystkim zastosowanie do badania składu i zawartości kwasów tłuszczowych po przekształceniu ich w estry metylowe (FAME, *Fatty Acid Methyl Esters*) lub etylowe (FAEE, *Acid Ethyl Esters*) [8].

Uzyskanie właściwego rozdzielania związków lipidowych na grupy warunkuje dalszą prawidłową identyfikację poszczególnych związków chemicznych występujących w danej grupie. Jedną z szeroko stosowanych technik wstępnego rozdzielania grupowego lipidów, szczególnie tłuszczów jadalnych i produktów ich konwersji, jest chromatografia wykluczania SEC – *Size Exclusion Chromatography* w układzie GPC – *Gel Permeation Chromatography*, tzn. z zastosowaniem hydrofobowego wypełnienia kolumny i niewodnej fazy ruchomej.

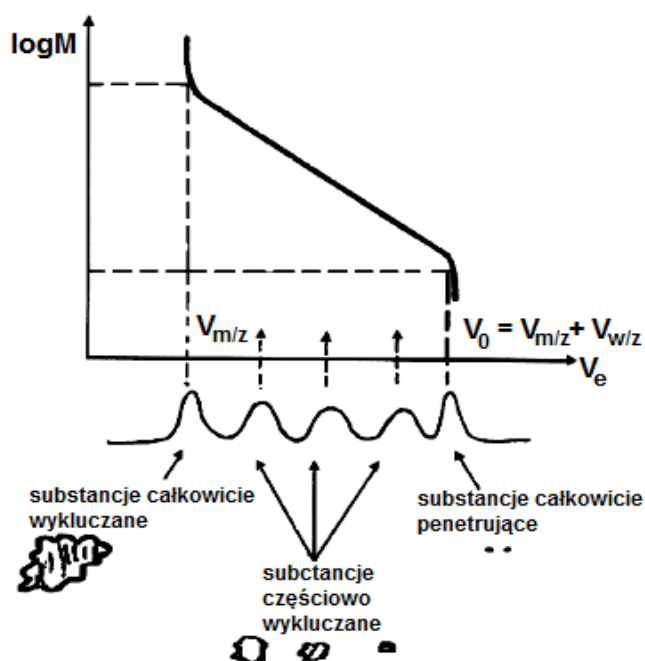
4. CHROMATOGRAFIA WYKLUCZANIA – GPC/SEC (*Gel Permeation/Size Exclusion Chromatography – GPC/SEC*)

Technika GPC/SEC daje możliwość klasyfikowania rozdzielanych związków chemicznych w zależności od różnic w wymiarach cząsteczek, tzw. średnicy, albo promienia hydrodynamicznego, a co za tym idzie – umożliwia rozdzielanie substancji zgodnie ze zróżnicowaniem mas cząsteczkowych (w zakresie do ok. 10 milionów Da).

Mechanizmem decydującym o rozdzielaniu w chromatografii wykluczania realizowanej w sposób „klasyczny”, jest wykluczanie steryczne, tzn. zróżnicowanie łącznych dróg oraz czasu dyfuzji wewnątrz porów o różnych średnicach przez cząsteczki o różnych wartościach średnicy hydrodynamicznej [9, 10].

Zaletą chromatografii wykluczania jest niewątpliwie prostota i wysoka powtarzalność oznaczeń. Wadą – wysoki koszt kolumn, znaczny czas rozdzielania, szczególnie makromolekuł, potrzeba stosowania wąskodispersyjnych wzorców polimerów.

W „klasycznej” chromatografii wykluczania najważniejszy jest taki dobór wypełnienia kolumny (o znanym zakresie średnic porów) oraz eluentu, by zminimalizować, a najkorzystniej całkowicie wyeliminować oddziaływania sorpcyjne między powierzchnią fazy stacjonarnej i cząsteczkami rozdzielanej mieszaniny. Wówczas mechanizm rozdzielania jest termodynamicznie prosty, rozdzielanie molekuł o zróżnicowanych wymiarach ma miejsce na zasadzie różnicowania dróg dyfuzji (Rys.2). W przypadku „zmodyfikowanej” chromatografii wykluczania, występująca dodatkowo sorpcja, tak o charakterze polarnym, jak i hydrofobowym (adsorpcja, podział), może wpływać korzystnie albo przeszkadzać w rozdzielaniu.



Rys. 2. Ilustracja zależności logarytmu masy cząsteczkowej od objętości elucji ($\log M_w = f(V_e)$), otrzymywanej podczas kalibracji metody oznaczania rozkładu masy cząsteczkowej z zastosowaniem chromatografii wykluczania [za zgodą 10].

Fig. 2. Illustration of molecular weight logarithm dependence on elution volume ($\log M_w = f(V_e)$), obtained during calibration method for the determination of molecular weight distribution using size exclusion chromatography [with the consent of 10].

4.1. Fazy ruchome i stacjonarne wykorzystywane w technice GPC/SEC do rozdzielania grupowego lipidów, tłuszczów i produktów ich konwersji (*Stationary and mobile phases used in GPC/SEC during group separation of lipids, fats, and products of their conversion*)

Obecnie najczęściej wykorzystywaną fazą stacjonarną w rozdzielaniu mieszanin substancji lipofilowych o niewielkich wartościach mas cząsteczkowych, w tym tłuszczów i produktów ich konwersji, z wykorzystaniem GPC/SEC, jest kopolimer styrenu i diwinylobenzenu (SDVB). Użycie SDVB o średnicach porów rzędu 50-100 Å (5-10 nm) pozwala na rozdzielanie związków o masie cząsteczkowej w zakresie 100-20000 Da [11]. Najczęściej stosuje się kolumny o długości (L_c) 25 lub 30 cm i o średnicy wewnętrznej (d_c) 7-8 mm (ostatnio także 3-4,6 mm), które często łączy się szeregowo po dwie do pięciu. Kolumny te wypełnione są materiałem ziarnistym o średnicy ziaren (d_p) 5 μ m lub, rzadziej, 3 μ m.

W latach 1988-1998 najczęściej stosowane były kolumny „Ultrastryragel®”, produkcji Waters USA, o średnicy porów 100 i 500 Å i o średnicy ziarna – najczęściej – 10 μ m [17, 23, 26-28, 34, 35, 38], oraz kolumny „PL-gel®”, także o średnicach porów 100 i 500 Å, ale o średnicy ziarna równej najczęściej 5 μ m [12-14, 21, 22, 24, 25, 43], ponieważ były wówczas praktycznie jedynym dostępnym typem kolumn z nowoczesnym wypełnieniem przeznaczonym do badań w warunkach lipofilowych (Tabela 3).

Jako eluent zasadniczo stosowany był THF z dodatkiem butylohydroksytoluenu jako przeciwutleniacza [12-16] lub THF bez dodatku w/w przeciwutleniacza [17-38]. Czasem stosuje się inne rozpuszczalniki takie jak dichlorometan [39, 40, 43, 44, 45] czy toluen [41, 42] oraz mieszaniny w/w (Tabela 3). Eluent powinien dobrze rozpuszczać rozdzielane substancje, tj. tłuszcze i produkty ich konwersji oraz, jak wspomniano, eliminować zjawiska sorpcji analitów na powierzchni porów wypełnienia kolumny.

Stosowane natężenie przepływu fazy ruchomej wynosi 0,3-1,5 mL/min, optymalnie 0,7-1,0 mL/min, co z zastosowaniem kolumn o średnicy 7-8 mm stwarza warunki niskiej dyspersji masy w kolumnie dla analitów o masie cząsteczkowej poniżej 104 Da i pozwala na przeprowadzenie rozdzielania w czasie poniżej 30 min [44].

4.2. Detektory stosowane w technice GPC/SEC do rozdzielania grupowego lipidów, tłuszczów i produktów ich konwersji oraz problem optymalnej detekcji (*Detectors used and a problem of optimal detection in GPC/SEC during group separation of lipids, fats, and products of their conversion*)

W badaniach GPC/SEC dotyczących rozdzielania mieszanin lipofilowych, detekcja najczęściej odbywa się przy użyciu detektora refraktometrycznego (RID, Refractive Index Detector) [12, 14-29, 33-39, 41-46] lub laserowego detektora fotodispersyjnego (LLSD – Light Scattering Detector, ELSD – Evaporative Light Scattering Detector) [13, 14, 30-32, 36]. W celu uzyskania widm rozdzielanych grup składników oraz poszczególnych indywiduów, stosuje się też detektor spektrofotometryczny z matrycą diodową (UV-VIS-DAD, UV-VIS Diode Array Detektor) lub spektrometru mas (MS, Mass Spectrometer) [40,47]. Stosując detektor UV należy pamiętać o odpowiednim doborze długości fali i szerokości wiązki pomiarowej, ponieważ składniki lipidowe absorbują światło o różnych długościach fali (np. TAG i KT – 218 nm). Odpowiedź detektora tego typu zależy od stężenia substancji oraz od molowego współczynnika absorbancji (ϵ), który jest różny nawet dla substancji należących do tego samego szeregu homologicznego. W przypadku detektora LLSD sygnał odpowiedzi jest proporcjonalny do stężenia, a nawet do masy cząsteczkowej składników mieszaniny. Zaletą detektora LLSD oraz RID jest ponadto fakt, że bez znaczenia jest czy stosowany w analizie eluent absorbuje czy też nie promieniowanie świetlne i w jakich zakresach.

Z przeglądu literatury wynika, iż wszyscy autorzy badań dotyczących rozdzielania grupowego tłuszczów i produktów ich konwersji z zastosowaniem chromatografii GPC/SEC stosowali warunki izokratyczne. W przedmiotowych badaniach, na przestrzeni lat, dominowało zastosowanie detektora refraktometrycznego (RID). Detektor ten wykazuje stosunkowo niską czułość oraz nie może być stosowany w warunkach elucji gradientowej – co jednak w przypadku GPC/SEC nie miało miejsca.

Autorzy kilku wymienionych poniżej prac badawczych, zamiast detektora RID, stosowali laserowy detektor fotodispersyjny (LLSD – Light Scattering Detector, ELSD – Evaporative Light Scattering Detector) [13, 14, 30-32, 36]. Niepodważalne zalety stosowania LLSD, w opcji według własnej konstrukcji, w chromatografii cieczowej tłuszczów i produktów ich konwersji przedstawił w swojej rozprawie habilitacyjnej Andrzej Stołyhwo [48]. Autor rozprawy zwrócił po raz pierwszy uwagę na fakt, iż detektor ten może być bardzo dobrym i użytecznym narzędziem badawczym w analizie lipidów.

Jak już wspomniano, w przypadku detektora LLSD, nie ma znaczenia czy stosowane fazy ruchome absorbują czy też nie promieniowanie w zakresie UV-VIS, a także nie ma znaczenia wartość współczynnika załamania światła rozpuszczalnika próbki. Faza ruchoma musi być lotna, o temperaturze wrzenia nie przekraczającej 100-110°C i charakteryzować się niskim stężeniem nielotnej "suchej pozostałości". Stanowi to przewagę detektora LLSD nad detektorem UV/VIS oraz RID. Detektor LLSD nie jest wrażliwy na zmianę składu fazy ruchomej, ani na skład rozpuszczalnika wsadu/próbki dozowanej do kolumny, co umożliwia jego

stosowanie w warunkach elucji skokowej, a także gradientowej, w przeciwieństwie do detektora RID. Detektor LLS D wykrywa praktycznie wszystkie relatywnie nietlotne anality, których temperatura wrzenia jest wyższa niż 160-180°C.

Detektor LLS D, jak i detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID, Flame Ionization Detector), może być ostatnim detektorem w szeregu, jako detektor niszczący próbkę, albo powinien być instalowany „bocznikowo”, poprzedzony detektorem RID i/lub UV-VIS/DAD. Każdy z uzyskanych dzięki nim chromatogramów dostarcza istotnych informacji, stąd celowe jest stosowanie układu kilku detektorów w opisywanych badaniach.

4.3. Wykorzystanie techniki GPC/SEC do rozdzielania grupowego lipidów i tłuszczów (Usefulness of GPC/SEC in group separation of lipids and fats)

Jedną z pierwszych opublikowanych prac dotyczących wykorzystania techniki GPC/SEC do wydzielenia klas lipidów jest opracowanie Christopoulou i Perkins z 1986 [41]. W badaniach uzyskane zostało pełne rozdzielanie (do linii bazowej) standardów acylogliceroli i tych składników w częściowo zhydrolizowanych próbkach olejów przy użyciu dwóch szeregowo połączonych kolumn z wypełnieniem SDVB (Lichrologel PS4 i PS1, $L_c=25$ cm, $d_c=7$ mm, $d_p=5$ μ m) oraz toluenu jako eluentu, przy natężeniu przepływu 0,5 mL/min i detektora refraktometrycznego (Tabela 3). W przypadku rozdzielania próbki wzorców, badacze wyodrębnili frakcje triacylogliceroli (TAG), diacylogliceroli (DAG), monoacylogliceroli (MAG) oraz estru metylowego (EM). Frakcje te zostały wymienione zgodnie z kolejnością elucji, co jest zbieżne z mechanizmem rozdzielania charakterystycznym dla techniki GPC/SEC. Tak dobre rozdzielanie nie zostało już zaobserwowane gdy fazą ruchomą był THF czy DCM, co zostało uzasadnione ich „zbyt wysoką siłą elucyjną, w porównaniu z toluenem”. Jednakże nawet gdy eluentem był toluen, to w momencie gdy do mieszaniny wzorców dodany został przedstawiciel wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) – kwas stearynowy, rozdzielanie do linii bazowej nie miało już miejsca – WKT był eluowany przed MAG, a piki WKT i MAG pozostawały tylko częściowo rozdzielone. To świadczy o tym, że toluen dobrze eliminuje hydrofobowe oddziaływania na powierzchni porów SDVB, jednak słabo eliminuje oddziaływania polarne. Zmniejszenie prędkości przepływu fazy ruchomej – poniżej wartości wybranej przez autorów za optymalną (0,5 mL/min) – nie powodowało już znaczącej poprawy rozdzielczości, natomiast niepotrzebnie wydłużało czas rozdzielania. W pracy wykazano konieczność stosowania co najmniej dwóch szeregowo połączonych kolumn GPC/SEC-HPLC wypełnionych SDVB, w rozdzielaniu próbek tłuszczów i produktów ich konwersji, gdyż zastosowanie tylko jednej z w/w kolumn HPLC skutkowało niedostatecznym rozdzielaniem badanych związków chemicznych. Układ 2-ch kolumn autorzy z powodzeniem zastosowali do rozdzielania mieszaniny mono-, di- i trimerów KT [42].

Celowość stosowania kilku połączonych szeregowo kolumn potwierdził w swej pracy Schoenfelder [33]. Do rozdzielania próbki łoju wybrane zostały trzy szeregowo połączone kolumny PL-gel, każda o długości 30 cm i średnicy wewnętrznej 7,5 mm. Fazą stacjonarną był kopolimer SDVB o średnicy ziarna 5 μ m i średnicy porów 100 Å. Eluentem był THF o natężeniu przepływu 1 mL/min, a detektorem – RID (Tabela 3). Badania miały na celu oznaczenie zawartości mono-, di- i triacylogliceroli oraz glicerolu w próbkach tłuszczu. W metodyce opisanej przez Schoenfelder'a, uzyskano rozdzielanie frakcji TAG, DAG, MAG, z częściowym rozdzielaniem MAG C:16 i MAG C:18 – oraz glicerolu. Metodyka ta nie znalazła jednak zastosowania w przypadku próbek charakteryzujących się dużym zróżnicowaniem kwasów tłuszczowych oraz próbek zawierających kwas oktanowy (C8:0) i kwas dekanowy (C10:0). Porównując chromatogramy otrzymane z THF i DCM, zamieszczone w tych pracach, trudno zauważyć korzystniejsze rozdzielanie poszczególnych frakcji na skutek użycia innej fazy ruchomej niż THF.

Użyciu połączonych szeregowo kilku kolumn SDVB (2-5) do uzyskania separacji klas lipidów poświęcono szereg prac. Hopia i współautorzy [14] zastosowali ponadto wstępny podział składników lipidowych na frakcję polarną i niepolarną przy użyciu techniki SPE. Użycie w dalszych badaniach 3 kolumn PLgel (Polymer Laboratories, Amherst, MA; $L_c=30$ cm, $d_c=8,0$ mm, $d_p=5$ μ m, średnica porów 100, 50 i 50 Å) oraz THF z dodatkiem 0,025% BHT jako fazy ruchomej pozwoliło uzyskać separację TAG, DAG, estrów steroli, MAG oraz wolnych KT i wolnych steroli roślinnych (Tabela 3).

Metodyka oznaczania zawartości mono-, di-, triacylogliceroli oraz glicerolu za pomocą techniki HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography) została znormalizowana i w 2005 roku opracowano normę ISO 18395 [15]. Do rozdzielania badanych próbek zastosowane zostały 2 kolumny SDVB (PL-gel, $L_{c1,2}=30$ cm, $d_{c1,2}=7,5$ mm, $d_{c2}=7,7$ mm, $d_{p1,2}=5$ μ m) o średnicy porów równej 100 Å każda. Procedura opisana w normie jest właściwa do rozdzielania mieszanin zawierających mono- i diacyloglicerole w stężeniach większych niż 10% oraz TAG w ilości mniejszej niż 20%. Nie jest odpowiednia do badania tłuszczów mlecznych oraz tłuszczów i olejów posiadających szeroki zakres długości łańcucha KT ponieważ DAG zbudowane z KT o krótszych łańcuchach mają mniejszą masę cząsteczkową niż MAG zbudowane z KT o dłuższych łańcuchach. Wpłynęłoby to na zmianę kolejności elucji. Opisana w normie metodyka ma także ograniczone zastosowanie do mieszanin acylogliceroli zawierających kwas oktanowy (C8:0) oraz kwas dekanowy (C10:0). W przypadku takich mieszanin możliwe jest oznaczenie tylko MAG i wolnego glicerolu.

Metodyka ta z powodzeniem stosowana jest obecnie do standardowego oznaczania udziału poszczególnych acylogliceroli w olejach spożywczych pochodzenia roślinnego i zwierzęcego [36]. W układzie 2 szeregowo połączonych kolumn z wypełnieniem SDVB (PLgel, Agilent Technologies, USA, $L_c=30$ cm, $d_c=7,5$ mm, $d_p=5$ μ m średnica porów 500 i 500 Å) i THF jako eluentem w przepływie 1 mL/min umożliwia rozdzielanie TAG, DAG i MAG tłuszczów smażalniczych. Zastosowanie w opisanym układzie kolumn o mniejszej średnicy porów (100 i 100 Å) oraz mniejszego przepływu fazy ruchomej (0,5 mL/min) pozwala na rozdzielanie dodatkowo, poza acyloglicerolami, składników polimerowych, będących produktami przemian oksydacyjno-termicznych lipidów oraz wolnych KT. Alternatywne użycie detektora ELSD zamiast RID znacząco zwiększa czułość metody i stabilność linii bazowej [36].



Tabela 3. Zestawienie warunków rozdzielania, detekcji oraz oznaczania stosowanych w technice GPC/SEC do rozdzielania grupowego lipidów, tłuszczów i produktów ich konwersji.

Table 3. Summary of separation, detection and determination conditions used in the GPC/SEC in group separation of lipids, fats and products of their conversion.

| Próbka badana (Examined sample) | Metodyka i warunki rozdzielania/detekcji/oznaczania (Methodology and conditions of separation/detection) | | | Literatura i rok publikacji (Reference and year of publication) | |
|---|---|---|----------------------|---|---|
| | Kolumnały (Column/s) | Warunki elucji – faza ruchoma; program elucji; przepływ eluentu (Elution conditions – mobile phase; elution program; flow rate) | Detekcja (Detection) | | Rozdzielone grupy, zgodnie z kolejnością elucji (Separated groups, listed in elution order) |
| Roztwory w zorców e w THF: FAME, MAG, DAG, TAG zawierające KT od C12:0 do C18:2 | 2 kolumny LiChrogel: PS4 i PS1 (EM Science, Gibbstown, New Jersey; $L_c=25$ cm, $d_c=7,0$ mm, $d_p=5$ μ m) z wypełnieniem SDVB, średnica porów 400 i 100 Å | T lub DCM lub THF. Optymalnie: T; elucja izokratyczna; 0,5 mL/min | RID | 1 – TAG, 2 – DAG, 3 – MAG, 4 – EM, 5 – THF | [41] 1986 |
| Olej szafranowy po metylacji KT przy użyciu diazometanu lipoliza 15 min i 30 min) | | | | Próbka w zorców e zawierająca WKT: 1 – TAG (tristearynian), 2 – DAG (distearynian), 3 – WKT 4 – MAG (monostearynian), 5 – THF | |
| Zużyty, utleniony olej sojowy i Mieszanka w zorców : trimer, dimer, i monomer (stearynian metylu) | | | | 1 – TAG, 2 – DAG, 3 – estry metylowe, 4 – MAG, 5 – monolaurynian (w zorców e wewnątrzny) | |
| Łój, oleje roślinne. Wzorce TAG, DAG, MAG (palmityniany lub steryniany lub oleiniany), gliceryna | Semipreparatyw na SEC – 2 kolumny szklane (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California; $L_c=109$ cm, $d_c=12,5$ mm) z wypełnieniem Bio-Beads SX-2 (SDVB) o granicy wykluczania 2 700 Da | T lub DCM lub THF; elucja izokratyczna; 1 mL/min | RID | 1 – trimer, 2 – dimer, 3 – monomer | [42] 1989 |
| | HPSEC – 2 kolumny LiChrogel: PS4 i PS1 (EM Science, Gibbstown, New Jersey; $L_c=25$ cm, $d_c=7,0$ mm, $d_p=5$ μ m) z wypełnieniem SDVB, średnica porów 400 i 100 Å | | | | |
| | 3 kolumny PL-gel (Polymer Laboratories, Darmstadt; $L_c=30$ cm, $d_c=7,5$ mm, $d_p=5$ μ m) z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100 Å | THF; elucja izokratyczna; 1 mL/min | | Próbka toju: 1 – TAG, 2 – DAG, 3 – MAG (częściowe rozdzielanie MAG C:16 i MAG C:18), 4 – w olny glicerol | [33] 2003 |
| Próbka w zorców (TAG, DAG, MAG, glicerol) i próbka toju. | Dla próbki w zorców – 2 kolumny PLgel (Polymer Laboratories; $L_c=30$ cm, $d_c=7,5$ mm, $d_p=5$ μ m) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100 i 100 Å | THF + 250 μ L BHT (przeciw utleniacz); elucja izokratyczna w temp. 35°C lub 40°C \pm 0,1°C; od 0,8 mL/min do 1 mL/min | RID | Próbka w zorców : 1 – TAG, 2 – DAG, 3 – MAG, 4 – glicerol | [15] 2005 |
| | Dla próbki toju – 5 kolumn PLgel (Polymer Laboratories; $L_c=30$ cm, $d_c=7,5$ mm, $d_p=5$ μ m) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100, 100, 100, 100 i 100 Å | | | Próbka toju: 1 – TAG, 2 – DAG, 3 – monostearynian diglicerolu, 4 – MAG (częściowe rozdzielanie MAG C:16 i MAG C:18), 5 – glicerol | |



| Próbka badana (Examined sample) | Metodyka i warunki rozdzielania/detekcji/oznaczania (Methodology and conditions of separation/detection) | | | Literatura i rok publikacji (Reference and year of publication) | |
|--|---|---|-------------------------|---|---|
| | Kolumnały (Column/s) | Warunki elucji – faza ruchoma; program elucji; przepływ eluentu (Elution conditions – mobile phase; elution program; flow rate) | Detekcja (Detection) | | Rozdzielone grupy, zgodnie z kolejnością elucji (Separated groups, listed in elution order) |
| TAG o różnych liczbach jodowych (od 45 do 130), nasycone KT (od C12 do C20), 18-węglowe KT o różnym stopniu nienasyżenia (od C18:0 do C18:3), olej rzepakowy stosowany w procesie smażenia | 1 kolumna PL-gel (Polymer Laboratories, L _c =30 cm, d _c =7,5 mm, d _p =5 μm) z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100 Å | THF + 200 mg/L BHT (przeciw utleniacz); elucja izokratyczna; 1 mL/min | RID | 1 – polimery, 2 – dimery, 3 – utlenione TAG, TAG, DAG, 4 – WKT. Mieszanka KT : 1 – C20:0, 2 – C16:0, 3 – C12:0. | [12] 1997 |
| | 2 kolumny PL-gel (Polymer Laboratories, L _c =30 cm, d _c =7,5 mm, d _p =5 μm) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100 i 500 Å | | | 1 – polimery, 2 – dimery, 3 – utlenione TAG, TAG, 4 – DAG, 5 – WKT. | |
| TAG (w wydzielone technika SPE) oleju rzepakowego o niskiej zawartości kwasów tłuszczowych oraz z tłuszczu masła i produkty ich autooksydacji | 3 kolumny PL-gel (Polymer Laboratories, Amherst, MA; L _c =30 cm, d _c =8,0 mm) z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100, 50 i 50 Å | THF + 0,025% BHT (przeciw utleniacz); elucja izokratyczna; 0,6 mL/min | ELSD | 1 – polimery, 2 – TAG, 3 – DAG, 4 – sterole/wolne kwasy tłuszczowe | [13] 1993 |
| Mieszanka w zorców: TAG (oleinian), DAG (oleinian), MAG (oleinian), kwas oleinowy, mieszanka steroli i estery steroli, rozdzielone technika SPE na frakcje polarna i niepolarna | 3 kolumny PL-gel (Polymer Laboratories, Amherst, MA; L _c =30 cm, d _c =8,0 mm, d _p =5 μm) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100, 50 i 50 Å | THF + 0,025% BHT (przeciw utleniacz); elucja izokratyczna; 0,6 mL/min | RID | Próbka w zorców przed SPE: 1 – TAG, 2 – DAG, 3 – ester sterolu, 4 – MAG (oleinian), 5 – kwas oleinowy i mieszanka steroli | [14] 1992 |
| | | | LLSD | Frakcja niepolarna: 1 – TAG, 2 – ester sterolu Frakcja polarna: 1 – utlenione TAG, 2 – DAG, 3 – MAG, 4 – kwas oleinowy i mieszanka steroli Próbka w zorców: 1 – TAG, 2 – DAG, 3 – ester sterolu, 4 – MAG, 5 – kwas oleinowy, 6 – wolny sterol | |
| Świeży i zużyty olej smażalniczy – rafinowany olej słonecznikowy | 2 kolumny PL-gel (Hewlett-Packard, L _c =30 cm, d _c =7,5 mm, d _p =5 μm) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB | THF; elucja izokratyczna w temp. 45°C; 1 mL/min | RID | 1 – polimery TAG, 2 – dimery TAG, 3 – utlenione TAG, 4 – DAG, 5 – WKT | [21] 1993 |
| Świeży i zużyty smażalniczy olej słonecznikowy zwykły oraz olej słonecznikowy o wysokiej zawartości kwasów oleinowych | 2 kolumny PL-gel (Hewlett-Packard, L _c =30 cm, d _c =7,5 mm, d _p =5 μm) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100 i 500 Å | THF; elucja izokratyczna w temp. 40°C; 1 mL/min | | 1 – dimery TAG, 2 – utlenione TAG, 3 – DAG, 4 – WKT | [22] 1998 |
| Olej pozyskany z zamrożonych ziemniaków (wcześniej usmażonych) | | | | 1 – polimery TAG, 2 – dimery TAG, 3 – utlenione TAG, 4 – DAG, 5 – WKT (nie wielka ilość) | |
| Świeży i zużyty olej smażalniczy – rafinowany olej słonecznikowy | 2 kolumny PL-gel (Hewlett-Packard, L _c =30 cm, d _c =7,5 mm, d _p =5 μm) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB | THF; elucja izokratyczna w temp. 45°C; 1 mL/min | | 1 – polimery TAG, 2 – dimery TAG, 3 – utlenione TAG, 4 – DAG, 5 – WKT | [24] 1993 |



| Próbka badana (Examined sample) | Metodyka i warunki rozdzielania/detekcji/oznaczania (Methodology and conditions of separation/detection) | | | Literatura i rok publikacji (Reference and year of publication) | |
|---|--|---|-------------------------|--|---|
| | Kolumnały (Column/s) | Warunki elucji – faza ruchoma; program elucji; przepływ eluentu (Elution conditions – mobile phase; elution program; flow rate) | Detekcja (Detection) | | Rozdzielone grupy, zgodnie z kolejnością elucji (Separated groups, listed in elution order) |
| Świeży i zużyty olej smażalniczy – olej słonecznikowy zwykły oraz olej słonecznikowy o wysokiej zawartości kwasu oleinowego | 2 kolumny PL-gel (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, $L_c=30$ cm, $d_c=7,5$ mm, $d_p=5$ μ m) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100 i 500 Å | THF; elucja izokratyczna w temp. 40°C; 1 mL/min | RID | 1 – dimery TAG, 2 – utlenione TAG, 3 – DAG, 4 – WKT | [25] 1995 |
| | | | | 1 – polimery TAG, 2 – dimery TAG, 3 – utlenione TAG, 4 – DAG, 5 – WKT | |
| Tłuszcz smażalniczy | 2 kolumny PLgel (Agilent Technologies, USA; $L_c=30$ cm, $d_c=7,5$ mm, $d_p=5$ μ m) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 500 i 500 Å | THF; elucja izokratyczna; 1 mL/min | RID | 1 – TAG, 2 – DAG, 3 – MAG | [36] 2015 |
| Olej rybny | 2 kolumny PLgel (Agilent Technologies, USA; $L_c=30$ cm, $d_c=7,5$ mm, $d_p=5$ μ m) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100 i 100 Å | THF; elucja izokratyczna; 0,5 mL/min | ELSD | 1 – polimer, 2 – TAG, 3 – DAG, 4 – MAG, 5 – WKT | |
| Olej z pestek winogron | | | | 1 – polimer, 2 – TAG, 3 – DAG, 4 – MAG, 5 – WKT, 6 – rafinowany ester metylowy | |
| Próbka w zorców: TAG (stearynian i palmitynian), DAG (stearynian, palmitynian, mirystynian, laurynian), MAG (palmitynian, laurynian) | 2 kolumny PLgel (Agilent Technologies, USA; $L_c=30$ cm, $d_c=7,5$ mm, $d_p=3$ μ m) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100 i 100 Å | THF; elucja izokratyczna; 1 mL/min | RID | 1 – TAG (tristearynian), 2 – TAG (tripalmitynian), 3 – DAG (distearynian), 4 – DAG (dipalmitynian), 5 – DAG (dimirystynian), 6 – DAG (dilaurynian), 7 – MAG (monopalmitynian), 8 – MAG (monolaurynian) | |
| Frakcja lipidowa pochodząca z 42 próbek kruchych ciasteczek od różnych producentów | Przedkolumna PL-gel (Perkin-Elmer, Beaconsfield, UK; $L_c=5$ cm, $d_c=7,5$ mm) + 3 kolumny PL-gel (Perkin-Elmer, Beaconsfield, UK; $L_c=30$ cm, $d_c=7,5$ mm, $d_p=5$ μ m) z wypełnieniem SDVB, średnica porów: 500, 500 i 100 Å | DCM; elucja izokratyczna; 1 mL/min | RID | 1 – oligopolimery TAG, 2 – utlenione formy TAG, 3 – DAG, 4 – w olne sterole oraz triterpeny dioli, 5 – w olne KT | [39] 2007 |
| Oliwa z oliwek Extra Virgin, oliwa z oliwek typu Lampante Virgin, rafinowana oliwa z oliwek, rafinowana oliwa z wtyłocznym | 3 kolumny PL-gel (Perkin-Elmer Ltd., Beaconsfield, UK; $L_c=30$ cm, $d_c=7,5$ mm, $d_p=5$ μ m) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 500, 500 i 100 Å | DCM; elucja izokratyczna; 0,9 mL/min | RID | Rafinowana oliwa z oliwek: 1 – dimery TAG, 2 – TAG, 3 – DAG, 4 i 5 – nieznanymi pikami, 6 – KT | [43] 1992 |
| | | | | Związki polarne z rafinowanej oliwy z oliwek: 1 – trimery TAG, 2 – dimery TAG, 3 – utlenione TAG, 4 – DAG, 5 – KT | |
| | | | | Oliwa z oliwek Extra Virgin: 1 – TAG, 2 – DAG, 3 i 4 – nieznanymi pikami, 5 – KT | |
| | | | | Związki polarne z oliwy z oliwek Extra Virgin: 1 – utlenione TAG, 2 – DAG, 3 – KT | |
| | | | | Rafinowana oliwa z wtyłocznym: 1 – trimery TAG, 2 – dimery TAG, 3 – TAG, 4 – DAG, 5 i 6 – nieznanymi pikami, 7 – KT | |

| Próbka badana (Examined sample) | Metodyka i warunki rozdzielania/detekcji/oznaczania (Methodology and conditions of separation/detection) | | | | Literatura i rok publikacji (Reference and year of publication) |
|--|--|--|---------------------------|--|--|
| | Kolumnały (Column/s) | Warunki elucji – faza ruchoma; program elucji; przepływ eluentu (Elution conditions – mobile phase; elution program; flow rate) | Detekcja (Detection) | Rozdzielone grupy, zgodnie z kolejnością elucji (Separated groups, listed in elution order) | |
| Oliw a z oliw ek Extra Virgin, rafinow ana oliw az oliw ek, oliw a z oliw ek łagodnie odw oniona, mieszanki tychże olejów | Przedkolumna PL-gel (Perkin-Elmer, Beaconsfield, UK; $L_c=5$ cm, $d_c=7,5$ mm) + 3 kolumny PL-gel (Perkin-Elmer, Beaconsfield, UK; $L_c=30$ cm, $d_c=7,5$ mm, $d_p=5$ μ m) z w ypełnieniem SDVB, średnica porów : 500, 500 i 100 Å | DCM; elucja izokratyczna; 1 mL/min | RID | Oliw a z oliw ek Extra Virgin: 1 – zw iązki polarne, 2 – utlenione TAG, 3 – DAG Rafinow ana oliw a z oliw ek, a także próbka łagodnie odw onionej oliw y z oliw ek: 1 – zw iązki polarne, 2 – oligopolimery TAG, 3 – utlenione TAG, 4 – DAG | [44] 2011 |
| Św ieży i zużyty olej smaźalniczy – olej sojow y – rafinow any, po bieleniu i deodoryzacji | 2 kolumny μ -Spherogel (Beckman; $L_c=30$ cm, $d_c=8,0$ mm oraz $L_c=30$ cm, $d_c=7,7$ mm), średnica porów 500 i 1000 Å | DCM; elucja izokratyczna; 1 mL/min | UV/VIS (234, 254, 270 nm) | Św ieży olej: 1 – dimery TAG, 2 – sprzężone TAG Olej po 56 godzinach smażenia: 1 – zw iązki o najw yższej masie cząsteczkow ej, 2 – tetramery TAG, 3 – dimery TAG, 4 – sprzężone TAG | [40] 1986 |
| Wzorce – EM kw asu oleinow ego; 9-cis, 12-cis-kwasu linolow ego, kw asu linolenow ego, kw asu nonadakanow ego oraz produkty ich utlenienia | 2 kolumny Ultrastyragel (Hew lett-Packard, Avondale, PA, USA; $L_c=25$ cm, $d_c=7,7$ mm) połączone szeregowo, z w ypełnieniem SDVB, średnica porów : 100 i 500 Å | THF; elucja izokratyczna; 1 mL/min | RID | 1 – polimery FAME, 2 – dimery FAME, 3 – utlenione monomery FAME, 4 – FAME w formie nieutlenionej | [17] 2007 |
| Św ieży i zużyty olej smaźalniczy – rafinow any olej słonecznikow y | 2 kolumny Ultrastyragel (Waters Associates, Milford, MA; $L_c=25$ cm, $d_c=7,0$ mm, $d_p<5$ μ m) połączone szeregowo, z w ypełnieniem SDVB, średnica porów 100 i 500 Å | THF; elucja izokratyczna w temp. 45°C; 1 mL/min | | 1 – polimery TAG, 2 – dimery TAG, 3 – utlenione TAG, 4 – DAG, 5 – WKT | [23] 1992 |
| Św ieży olej smaźalniczy – olej baw elniany i słonecznikow y | 2 kolumny Ultrastyragel (Waters Associates; $L_c=25$ cm, $d_c=7,7$ mm, $d_p<10$ μ m) połączone szeregowo, z w ypełnieniem SDVB, średnica porów 100 i 500 Å | THF; elucja izokratyczna w temp. 45°C; 0,5 mL/min | | 1 – dimery TAG, 2 – monomery TAG, 3 – WKT | [26] 1988 |
| Zużyty olej smaźalniczy – olej baw elniany i słonecznikow y | | | | 1 – dimery TAG, 2 – TAG utlenione, 3 – DAG, 4 – WKT | |
| Zużyte oleje smaźalnicze – olej słonecznikow y, olej słonecznikow y o w ysokiej zaw artości kw asu oleinow ego, olej palmow y, mieszanina tychże olejów , FAME | 2 kolumny Ultrastyragel (Waters Associates, Milford, MA; $L_c=25$ cm, $d_c=7,7$ mm, $d_p<10$ μ m) połączone szeregowo, z w ypełnieniem SDVB, średnica porów 100 i 500 Å | THF; elucja izokratyczna; 1 mL/min | | Całkow ita zaw artość kw asów tłuszczow ych: 1 – polimery kw asów tłuszczow ych, 2 – dimery kw asów tłuszczow ych, 3 – monomery KT Fracja niepolarna: 1 – niepolarne dimery kw asów tłuszczow ych, 2 – niepolarne monomery kw asów tłuszczow ych Fracja polarna: 1 – polimery kw asów tłuszczow ych, 2 – utlenione dimery kw asów tłuszczow ych, 3 – utlenione monomery KT | [28] 1995 |

| Próbka badana (Examined sample) | Metodyka i warunki rozdzielania/detekcji/oznaczania (Methodology and conditions of separation/detection) | | | Literatura i rok publikacji (Reference and year of publication) | |
|--|---|---|-------------------------|--|---|
| | Kolumnały (Column/s) | Warunki elucji – faza ruchoma; program elucji; przepływ eluentu (Elution conditions – mobile phase; elution program; flow rate) | Detekcja (Detection) | | Rozdzielone grupy, zgodnie z kolejnością elucji (Separated groups, listed in elution order) |
| Zużyte oleje smażalnicze – olej słonecznikowy o wysokiej zawartości kwasu oleinowego, oliwa z oliwek w yłtoczyn, olej słonecznikowy, olej sojowy | 2 kolumny Ultrastyragel (Waters Associates, Milford, MA; $L_c=25$ cm, $d_c=7,7$ mm, $d_p=10$ μ m) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100 i 500 Å | THF; elucja izokratyczna w temp. 35°C; 1 mL/min | RID | A – próbka oleju w wysokoolenowego utlenionego podczas obróbki termicznej: 1 – polimery TAG, 2 – dimery TAG, 3 – monomery TAG | [27] 1996 |
| | | | | B – Próbką zawierającą związki polarne otrzymane z próbki A (po rozdeleniu ich od niepolarnych TAG z zastosowaniem kolumny z żelazem krzemionkowym): 1, 2 – dimery TAG, 3 – utlenione monomery TAG, 4 – DAG, 5 – WKT | |
| | | | | C – próbka osadu otrzymanego z próbki A po frakcjonowaniu mieszaniną metanol:aceton (10:90 v/v): 1 – oligomery TAG, 2 – monomery TAG | |
| | | | | D – próbka osadu otrzymanego z próbki A po frakcjonowaniu mieszaniną metanol:aceton (15:85 v/v): 1 – oligomery TAG, 2 – monomery TAG | |
| Wzorce TAG (trilinolinian) i WKT (kwas linolowy) | 2 kolumny Ultrastyragel (Waters Associates, Milford, MA; $L_c=25$ cm, $d_c=7,7$ mm, $d_p<10$ μ m) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100 i 500 Å | THF; elucja izokratyczna w temp. 35°C; 1 mL/min | RID | Próbka frakcji polarnej w izolowanej z próbki trilinolinianu poddanej obróbce termicznej: 1 – polimery LLL, 2 – dimery LLL, 3 – utlenione monomery LLL, 4 – monostearynian (wzorec w ewentualny) | [34] 1996 |
| Frakcja polarna pochodząca z olejów rafinowanych oraz ze zużytych olejów smażalniczych | 2 kolumny Ultrastyragel (Waters Associates, Milford, MA; $L_c=25$ cm, $d_c=7,7$ mm, $d_p<10$ μ m) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100 i 500 Å | THF; elucja izokratyczna w temp. 35°C; 1 mL/min | RID | Próbka frakcji polarnej: 1 – polimery TAG, 2 – dimery TAG, 3 – utlenione monomery TAG, 4 – DAG, 5 – monostearynian (wzorec w ewentualny), 6 – WKT | [35] 1996 |
| Olej rzepakowy świeży i poddany obróbce termicznej | 2 kolumny Ultrastyragel (Waters Associates, Milford, MA; $L_c=25$ cm, $d_c=7,7$ mm, $d_p<10$ μ m) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100 i 500 Å | THF; elucja izokratyczna, w temp. 35°C; 1 mL/min | RID | Spolimeryzowane triacyloglicerole (dimery i wyższe oligomery) | [38] 1998 |
| Tłuszcze pochodzenia roślinnego i zwierzęcego zawierające przynajmniej 3% (m/m) spolimeryzowanych triacylogliceroli; także tłuszcze paszowe | Kolumna ze stali nierdzewnej ($L_c=30$ cm, $d_c=7,7$ mm, $d_p=5$ μ m) z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100 Å lub równoważna pod względem zdolności wykluczania i rozdzielczości | THF; elucja izokratyczna; 1 mL/min | RID | Spolimeryzowane triacyloglicerole (dimery i wyższe oligomery), Monomeryczne triacyloglicerole | [37] 1991 |



| Próbka badana (Examined sample) | Metodyka i warunki rozdzielania/detekcji/oznaczania (Methodology and conditions of separation/detection) | | | Literatura i rok publikacji (Reference and year of publication) | |
|---|--|---|-------------------------|---|---|
| | Kolumnały (Column/s) | Warunki elucji – faza ruchoma; program elucji; przepływ eluentu (Elution conditions – mobile phase; elution program; flow rate) | Detekcja (Detection) | | Rozdzielone grupy, zgodnie z kolejnością elucji (Separated groups, listed in elution order) |
| Tłuszcze pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, stosowane do smażenia oraz poddawane innej obróbce cieplnej, zawierające przynajmniej 3% spolimeryzowanych triacylogliceroli (tj. dimery i wyższe oligomery TAG); także tłuszcze paszowe | 2 kolumny ($L_c=30$ cm, $d_c=7,6$ mm, $d_p=5$ μ m) z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100 Å | THF + korzystnie BHT (przeciw utleniacz); elucja izokratyczna, w temp. 35°C; 0,8 mL/min | | Próbka w zorców: 1 – TAG, 2 – DAG, 3 – MAG, 4 – WKT Próbka olejów smażalniczych o różnej zawartości spolimeryzowanych TAG (1-30%): 1 – polimery/oligomery TAG, 2 – dimery TAG, 3 – TAG, 4 – DAG, 5 – MAG, 6 – WKT | [16] 2009 |
| Tłuszcze pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, stosowane do smażenia oraz poddawane innej obróbce cieplnej, zawierające przynajmniej 3% spolimeryzowanych triacylogliceroli; także tłuszcze paszowe | Kolumna ($L_c=30$ cm, $d_c=7,5$ lub 7,8 mm, $d_p=5$ μ m) z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100 Å lub równoważna pod względem zdolności wyluczania i rozdzielczości | THF; elucja izokratyczna; 1 mL/min | RID | 1 – spolimeryzowane TAG (dimery i wyższe oligomery), 2 – monomeryczne TAG | [18] 2003 |
| Olej rzepakowy – poddany obróbce termicznej | Przedkolumna (prekolumna) Phenogel 5 (Phenomenex, Torrance, CA; $L_c=5$ cm, $d_c=7,8$ mm) + 4 kolumny Phenogel (Phenomenex, Torrance, CA, 1, 2 i 3 – $L_c=50$ cm, $d_c=8,0$ mm, $d_p=5$ μ m; 4 – $L_c=30$ cm, $d_c=7,8$ mm, $d_p=5$ μ m) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 500, 100, 100 i 50 Å | THF; elucja izokratyczna; 1 mL/min | RID | 1 – trimery TAG, 2 – dimery TAG, 3 – monomery TAG, 4 – związki o niższej masie cząsteczkowej, takie jak DAG, MAG i WKT | [29] 1994 |
| Trioleinian syntezowany z kwasu oleinowego oraz gliceryna poddane obróbce termicznej | Przedkolumna Phenogel 5 (Phenomenex, Torrance, CA,; $L_c=5$ cm, $d_c=7,8$ mm) + 2 kolumny Phenogel (Phenomenex, Torrance, CA, $L_c=50$ cm, $d_c=8,0$ mm, $d_p=5$ μ m) z wypełnieniem SDVB, średnica porów 500 i 100 Å | THF; elucja izokratyczna; 1 mL/min | ELSD | Przed obróbką termiczną: 1 – TAG, 2 – związki o niższej masie cząsteczkowej Po obróbce termicznej) 1 – tetramery TAG, 2 – trimery TAG, 3 – dimery TAG, 4 – monomery TAG, 5 – związki o niższej masie cząsteczkowej | [30] 1994 |
| Trzy rodzaje olejów, tj.: kukurydziany, sojowy oraz rzepakowy (badane były w formie „surowej” oraz jako oleje rafinowane) | Kolumna Phenogel (Phenomenex, Torrance, CA, $L_c=30$ cm, $d_c=7,8$ mm) z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100 Å | DCM; elucja izokratyczna; 0,5 mL/min | RID | 1 – polimery TAG, 2 – monomery TAG | [45] 1996 |

| Próbka badana (Examined sample) | Metodyka i warunki rozdzielania/detekcji/oznaczania (Methodology and conditions of separation/detection) | | | | Literatura i rok publikacji (Reference and year of publication) |
|--|---|---|-------------------------|---|--|
| | Kolumnały (Column/s) | Warunki elucji – faza ruchoma; program elucji; przepływ eluentu (Elution conditions – mobile phase; elution program; flow rate) | Detekcja (Detection) | Rozdzielone grupy, zgodnie z kolejnością elucji (Separated groups, listed in elution order) | |
| Zużyty olej smażalniczy – olej rzepakowy, olej palmowy | 3 kolumny Phenogel (Phenomenex, Torrance, CA, $L_c=30$ cm, $d_c=7,8$ mm, $d_p=5$ μ m) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 500 Å | THF; elucja izokratyczna; 1 mL/min | RID | 1 – trimery TAG, 2 – dimery TAG, 3 – nieznan polimer, 4 – TAG, 5 – DAG, 6 – MAG, 7 – WKT | [20] 2011 |
| Olej rzepakowy jadalny poddany etanolizie | 2 kolumny Phenogel (Phenomenex, Torrance, CA, $L_c=30$ cm, $d_c=7,8$ mm, $d_p=10$ μ m) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100 i 500 Å | THF; elucja izokratyczna; 0,5 mL/min | RID | 1 – TAG, 2 – DAG, 3 – MAG, 4 – estry etylowe, 5 – gliceryna | [19] 1995 |
| Trioleinian, rafinowany olej rzepakowy, olej słonecznikowy o wysokiej zawartości kwasu oleinowego, rafinowany olej lniany – do których dodano dodatki o 1%, 2% i 5% sterolu (β -sitosterol) i poddano je obróbce termicznej | 2 kolumny tj. kolumna Styragel HR (Waters; $L_c=30$ cm, $d_c=4,6$ mm) oraz kolumna Phenogel (Phenomenex $L_c=30$ cm, $d_c=4,6$ mm) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 100 i 500 Å | THF; elucja izokratyczna; 0,3 mL/min | ELSD | Próbka trioleinianu przed obróbką termiczną: 1 – monomery TAG Próbka trioleinianu po obróbce termicznej: 1 – polimery TAG, 2 – monomery TAG, 3 – produkty hydrolizy TAG Próbka trioleinianu z dodatkiem sitosterolu (od 0 do 5%) po obróbce termicznej: 1 – polimery TAG, 2 – monomery TAG, 3 – produkty hydrolizy TAG Próbka sitosterolu po obróbce termicznej: 1 – sitosterol, 2 – sitostadiene, 3 – cholestadiene | [31] 2013 |
| β -sitosterol (o zbadanym składzie: 71% β -sitosterol, 19% sitostanol, 8% campesterol, 2% campestanol) poddane procesowi fotoutleniania | 3 kolumny Phenogel (Phenomenex, Torrance, CA, USA; $L_c=30$ cm, $d_c=4,6$ mm, $d_p=5$ μ m) połączone szeregowo, z wypełnieniem SDVB, średnica porów 500, 100 i 50 Å | THF; elucja izokratyczna; 0,3 mL/min | ELSD | Próbka β -sitosterolu poddanego procesowi fotoutleniania: 1 – tetramery, 2 – trimery, 3 – dimery, 4 – monomery sterolu, 5 – zdefragmentowane cząsteczki sterolu | [32] 2010 |



4.4. Wykorzystanie techniki GPC/SEC do rozdzielania grupowego tłuszczów i produktów ich konwersji (Usefulness of GPC/SEC in group separation of fats and their conversion products)

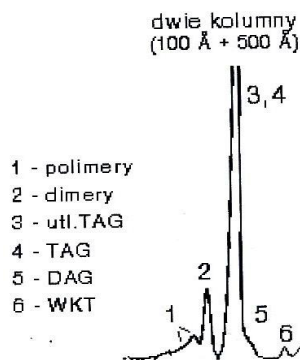
Technika GPC/SEC znalazła szerokie zastosowanie w badaniach i ocenie jakości tłuszczów jadalnych, szczególnie do określania zmian jakościowych tłuszczów smażalniczych podczas ich długotrwałej obróbki cieplnej. Podczas obróbki termicznej tłuszczów składniki lipidowe ulegają szeregu przemianom oksydacyjnym i oksydatywno-termicznym, które powodują powstawanie wielu niepożądanych związków, takich jak: niepełne i utlenione TAG, monomery, dimery oraz polimery TAG. Metoda GPC/SEC pozwala na ich rozdzielanie grupowe, a uzyskane wyniki dostarczają informacji umożliwiających m.in. ocenę właściwości wybranych olejów smażalniczych i wpływu obróbki termicznej na zmianę właściwości użytkowych, określenie „profilu utleniania” badanej próbki czy monitorowanie skuteczności działania przeciwutleniaczy.

W roku 1986 Wite i Wang [40] zastosowali technikę GPC/SEC-HPLC (HPSEC, *High Performance Size Exclusion Chromatography*) do analizy porównawczej próbek świeżego, ogrzewanego w warunkach laboratoryjnych ($182 \pm 2^\circ\text{C}$, 7 godzin dziennie przez 9 dni) i zużytego oleju sojowego (stosowanego do komercyjnego smażenia potraw). Autorzy rekomendowali użycie co najmniej dwóch szeregowo połączonych kolumn wypełnionych SDVB (μ -Spherogel, $L_{c1,2}=30\text{cm}$, $d_{c1}=8\text{ mm}$, $d_{c2}=7,7\text{ mm}$) o dużej średnicy porów (500 oraz 1000 Å). Prędkość przepływu fazy ruchomej, którą był DCM wynosiła 1,0 mL/min (Tabela 3). W w/w pracy można zauważyć, iż nie uzyskano pełnego rozdzielania pików, jednak autorzy byli w stanie zaobserwować zmiany zachodzące w próbkach olejów po poddaniu ich obróbce termicznej, co stanowiło cel ich pracy. Nowatorskim wówczas – w roku 1986 – podejściem, było zastosowanie przez autorów detektora UV/VIS (234, 254, 270 nm), który wcześniej wśród innych badaczy stosujących GPC/SEC nie cieszył się zainteresowaniem. Początkowo użyto detekcji przy trzech różnych długościach fali ze względu na możliwość powstawania różnych produktów konwersji w ogrzewanym oleju: detekcja sprzężonych wiązań dienowych (234 nm), sprzężonego kwasu linolenowego i innych podobnych składników polarnych (254 nm) oraz detekcja grup ketonowych i sprzężonych wiązań trienowych (270 nm). Największą czułość uzyskano dla detekcji przy 234 nm.

Dobarganes [26] do oznaczenia zawartości polarnych składników w ogrzewanym i nieogrzewanym olejach jadalnych zastosował wstępny rozdział składników lipidowych na składniki niepolarne i polarne przy użyciu chromatografii kolumnowej. Związki polarne poddał następnie rozdzielaniu techniką HPSEC stosując klasyczny układ 2 szeregowo połączonych kolumn z wypełnieniem SDVB ($L_c=25\text{ cm}$, $d_c=7,7\text{ mm}$, $d_p<10\text{ }\mu\text{m}$) i średnicą porów 100 i 500 Å uzyskując rozdział polimerów, dimerów TAG, TAG utlenionych, DAG, MAG i WKT. Wprowadzoną przez autorów innowacją było zastosowanie elucji izokratycznej w temperaturze 45°C . Celem badań było określenie przemian zachodzących podczas smażenia w warunkach domowych i przemysłowych oleju: oliwkowego, bawełnianego i słonecznikowego.

Przeprowadzonych zostało wiele eksperymentów, których głównym zamierzeniem było zweryfikowanie właściwości wybranych, świeżych i zużytych olejów smażalniczych, stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych podczas przechowywania, ich zdatności do spożycia, wpływu obróbki termicznej na zmianę właściwości użytkowych, jak również dokonanie oceny skuteczności działania przeciwutleniaczy [17, 23, 26-28, 34, 35, 38, 43].

W zdecydowanej większości prac, których przedmiotem były świeże i zużyte (poddane długotrwałej obróbce cieplnej, np. wykorzystywane wielokrotnie podczas głębokiego smażenia potraw) oleje smażalnicze stosowano kolumny Ultrastyragel® o średnicy porów 100 i 500 Å i średnicy ziarna – najczęściej – $10\text{ }\mu\text{m}$ [17, 23, 26-28, 34, 35, 38], oraz kolumny „PL-gel®”, także o średnicach porów 100 i 500 Å, ale o średnicy ziarna równej najczęściej $5\text{ }\mu\text{m}$ [12-14, 21, 22, 24, 25, 43]. W próbkach zużytych olejów smażalniczych, które zawierały produkty utleniania, powtarzało się niecałkowite rozdzielanie następujących par frakcji: spolimeryzowane TAG ulegały tylko częściowemu rozdzielaniu (nie do linii bazowej) z dimerami TAG, co analogicznie miało miejsce również w przypadku utlenionych TAG / ich nieutlenionych form oraz DAG, z reguły niepełne było też rozdzielanie MAG i WKT [23, 26-28, 35].



Rys. 3. Chromatogram GPC/SEC z rozdzielania oleju rzepakowego po procesie smażenia (10 h) [za zgodą 12].

Fig. 3. GPC/SEC chromatogram of rapeseed oil after frying process (10 h) [with the consent of 12].

Przykład rozdzielania smażalniczego oleju rzepakowego (po 10 godzinach smażenia) przy użyciu 2 szeregowo połączonych kolumn SDVB (PL-gel, Polymer Laboratories, $L_c=30$ cm, $d_c=7,5$ mm, $d_p=5$ μ m, średnica porów 100 i 500 Å) i tetrahydrofuranu z dodatkiem BHT jako eluentu (1 mL/min) został przedstawiony na rysunku 3.

Niezaprzeczalną zaletą techniki GPC/SEC wykorzystywanej w powyższych badaniach jest fakt, iż pozwalała ona na względnie szybkie uzyskanie wyników – czas badania wynosił z reguły 15–30 minut, w zależności od zastosowanego zestawu kolumn oraz prędkości przepływu fazy ruchomej. Badania były prowadzone zawsze w warunkach izokratycznych, eluentem był THF, a detektorem przepływowy różnicowy detektor refraktometryczny (RID). Często kolumny pracowały w podwyższonej temperaturze, wynoszącej 35 lub 45°C, co zapewniało lepszą sprawność rozdzielania.

Technika GPC/SEC okazała się być niezastąpiona do oznaczania spolimeryzowanych form TAG, powstających zarówno we wczesnym jak i zaawansowanym stadium utleniania badanych materiałów. W rezultacie powstały międzynarodowe normy dla tego rodzaju badań, wykorzystujące technikę GPC/SEC w warunkach lipofilowych [16, 18, 33, 37].

Wyniki uzyskane dzięki chromatografii GPC/SEC dostarczały informacji pozwalających na określenie „profilu utleniania” badanej próbki, z uwzględnieniem charakterystyki substratu w formie nieutlenionej, jak również pierwotnych i końcowych produktów utleniania. Badania wykazały, iż określenie zawartości utlenionych monomerów TAG prowadzi do uzyskania istotnych informacji dotyczących wczesnego etapu utleniania, podczas gdy określenie zawartości dimerów TAG jest pomocne przy ustalaniu stopnia zaawansowania procesu utleniania. Dzięki wykonanym badaniom możliwe było także przeprowadzanie kontroli jakości olejów smażalniczych stosowanych w procesie przyrządzania potraw na dużą skalę.

Szczególne znaczenie GPC/SEC w badaniach i ocenie jakości tłuszczów jadalnych, szczególnie stosowanych do smażenia, stało się przyczyną, że w 1991 roku Komisja IUPAC ds. Olejów, Tłuszczów i Pochodnych opublikowała wyniki dwóch testów międzylaboratoryjnych i postanowiła przyjąć znormalizowaną metodykę określania zawartości spolimeryzowanych triacylogliceroli powstających podczas obróbki cieplnej tłuszczów [37]. Metodyka ta dotyczyła zarówno tłuszczów pochodzenia roślinnego, jak i zwierzęcego, w tym tłuszczów paszowych. Jednakże, zawierała ograniczenie – była odpowiednia tylko do badania próbek zawierających przynajmniej 3% (m/m) spolimeryzowanych TAG. Rekomendowaną fazą ruchomą był THF, dla którego przy prędkości przepływu wynoszącej 1 mL/min i elucji izokratycznej, czas badania wynosił około 10 minut. W normie zastosowanie znalazł detektor RID. Wyszczególnione zostało jakiego rodzaju kolumny należy użyć, tj. do przeprowadzenia badań wybrana została kolumna ze stali kwasoodpornej, o długości 30 cm i średnicy wewnętrznej 7,7 mm, z wypełnieniem SDVB o średnicy ziarna 5 μ m i średnicy porów 100 Å lub równoważna pod względem rozdzielczości i zdolności wykluczenia (Tabela 3). W 2001 roku norma została znowelizowana w oparciu o kolejne wyniki badań. Opracowano normę EN ISO 16931 pt. „Oznaczanie zawartości spolimeryzowanych triacylogliceroli metodą wysokosprawnej chromatografii sitowej (HPSEC)”, którą ponownie znowelizowano i w roku 2009 zastąpiono normą ISO 16931:2009 aktualnie obowiązującą również w Polsce [16]. W normie tej, w dalszym ciągu zawarte jest ograniczenie, podkreślające iż opisana metodyka jest odpowiednia do „oznaczania zawartości spolimeryzowanych TAG w olejach i tłuszczach zawierających przynajmniej 3% (licząc z powierzchni pików) tych polimerów”.

Modyfikacje wprowadzone w niniejszej normie, względem metodyki zaproponowanej w 1991 roku przez Wolffa i współautorów [37], polegały na zaleceniu stosowania dwóch szeregowo połączonych kolumn SDVB (dla uzyskania lepszego rozdzielnia) o długości 30 cm i średnicy wewnętrznej od 7,5 do 7,8 mm; o średnicy porów 100 lub 500 Å (np. kolumny PI-gel) oraz, korzystnie, zastosowaniu dodatku przeciwutleniacza (BHT) do eluentu (THF). Dodatkowo, elucja izokratyczna prowadzona była w podwyższonej temperaturze, mieszczącej się w zakresie 30–35 °C. Próbką odniesienia, stosowaną podczas badań, służącą do określenia czasu retencji monomerycznych TAG, była oliwa z oliwek extra virgin, nie zawierająca żadnych spolimeryzowanych TAG. Prędkość przepływu wyniosła 0,8 mL/min, a kolejność elucji przedstawiała się następująco: 1–polimery lub oligomery TAG, 2–dimery TAG, 3–TAG, 4–DAG, 5–MAG, 6–WKT. Ponownie, pary 1-2, 3-4 oraz 5-6 nie ulegały całkowitemu rozdzielaniu do linii bazowej, jednak otrzymane piki chromatograficzne, za wyjątkiem 1 i 2, są wąskie i ostre.

Hansen [29, 30], Ferrari [45] oraz Caldwell [20] i współpracownicy, których przedmiotem prac były tłuszcze poddane obróbce termicznej oraz produkty ich konwersji, stosowali w badaniach od jednej do czterech połączonych szeregowo kolumn SDVB (Phenogel, najczęściej o średnicy wewnętrznej równej 7,8-8,0 mm oraz średnicy porów wypełnienia od 50 do 500 Å , Tabela 3).

Caldwell i współautorzy [20] uzyskali bardzo korzystną rozdzielczość pików chromatograficznych podczas rozdzielania grupowego oleju smażalniczego, z zastosowaniem trzech szeregowo połączonych kolumn SDVB (Phenogel – każda o średnicy porów wypełnienia równej 500 Å , średnicy ziarna 5 μ m, długości 30 cm i średnicy wewnętrznej 7,8 mm) i THF jako eluentu (1 mL/min, Tabela 3). Wydzielone zostały frakcje: 1–trimerów TAG, 2–dimerów TAG, 3–nieznanego polimeru (prawdopodobnie dimeru DAG), 4–TAG, 5–DAG, 6–MAG oraz 7–WKT. Jak donoszą autorzy, rozdzielczość obliczona dla pików 1 i 2 wyniosła 1,6; dla pików 2 i 4 – 2,7; natomiast dla pików 4 i 5 była większa od 1. Wyniki uzyskane dla wspomnianej powyżej próbki badanej można uznać za satysfakcjonujące, gdyż kilkukrotnie rozdzielczość osiągała wartość powyżej 1,5; co wskazuje na rozdzielanie większości pików chromatograficznych, przedstawionych przez autorów w

omawianej pracy, praktycznie do linii bazowej. Jedynie w przypadku pików TAG i DAG można zaobserwować rozdzielanie w około 96%.

Z kolei Hansen [29, 30] oraz Ferrari i współautorzy [45] dokonali oznaczenia zawartości spolimeryzowanych acylogliceroli z zastosowaniem procesu oczyszczania wstępnego, z użyciem krótkiej kolumny (przedkolumny) wypełnionej żelami krzemionkowym – Phenogel 5 ($L_c=5$ cm; $d_c=7,8$; średnica porów 100Å) lub z pominięciem tego procesu. Ferrari i współpracownicy [45] zbadali wpływ oczyszczania wstępnego na otrzymane wyniki. Stwierdzono, że zawartość spolimeryzowanych TAG była niemalże identyczna, niezależnie od tego czy metodyka badawcza obejmowała czy też nie, etap oczyszczania wstępnego, co wykazało brak celowości jego stosowania. Zawartość spolimeryzowanych triacylogliceroli wzrosła o 0,4–1% w przypadku olejów poddanych rafinacji, względem olejów surowych. Ponownie wykazano, iż technika GPC/SEC jest znakomitym narzędziem do weryfikowania jakości badanego oleju smażalniczego [20, 29, 30, 45].

4.5. Inne zastosowania techniki GPC/SEC w badaniach olejów roślinnych (*Other applications of GPC/SEC in plant oils analysis*)

Wysokosprawna chromatografia wykluczania, dzięki swoim zaletom, znalazła zastosowanie także w innych badaniach związanych z analizą lipidów, składników im towarzyszących, jak również przy analizie zanieczyszczeń olejów spożywczych.

Fillières i współpracownicy, wykorzystali chromatografię GPC/SEC do badania przebiegu etanolizy jadalnego oleju rzepakowego (Tabela 3) [19]. Przeprowadzili oni studium wpływu stosowania wybranych modyfikacji warunków prowadzenia procesu transestryfikacji oleju rzepakowego na powstawanie produktów etanolizy. Oceniony został wpływ temperatury, stosunku molowego etanolu do oleju rzepakowego, stężenia katalizatora oraz czasu prowadzenia procesu. Autorzy wykorzystali dwie połączone szeregowo kolumny Phenogel z fazą stacjonarną SDVB, o średnicy porów 100 i 500 Å oraz THF jako fazę ruchomą. Rozdzielanie grupowe frakcji TAG, DAG, MAG, estrów etylowych oraz glicerolu pozwoliło na kontrolowanie wydajności przebiegu procesu etanolizy. Najbardziej korzystne warunki, jeśli chodzi o ilość otrzymanych estrów na skalę laboratoryjną, polegały na zastosowaniu etanolu i oleju w stosunku molowym 6:1 oraz przeprowadzaniu procesu etanolizy w czasie 15 minut (w połączeniu z intensywnym mieszaniem) i w temperaturze 80°C. Technika GPC/SEC została wytypowana do tych badań ze względu na łatwość i szybkość wykonania analiz, miarodajność oraz wysoką powtarzalność oznaczeń.

Z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii wykluczania zbadane zostały także próbki sterolu roślinnego, występującego w olejach roślinnych – β -sitosterolu poddane procesowi fotoutleniania. Rudzińska i współautorzy wykorzystali detektor LLSD do uzyskania wyników z zastosowaniem THF jako eluentu (jednak o bardzo niewielkiej prędkości przepływu, wynoszącej 0,3 mL/min) oraz trzech szeregowo połączonych kolumn Phenogel 500, 100 i 50 Å ($L_c=30$ cm, $d_c=4,6$ mm, $d_p=5$ μ m) [32]. W przypadku próbki poddanej ogrzewaniu w temperaturze 180°C, autorzy byli w stanie wyróżnić pięć grup substancji różniących się wielkością cząsteczek, a mianowicie: tetrametry, trimery, dimery i monomery sterolu oraz fragmentaryczne molekuly sterolu, przy czym zdecydowaną większość stanowiły monomery. Piki chromatograficzne poszczególnych oligomerów w dużej mierze zachodziły jednak na siebie. Zauważono, iż w temperaturze 60°C powstawanie oligomerów jest niewielkie, bądź nie zachodzi wcale. Wyniki uzyskane za pomocą techniki GPC/SEC i detektora LLSD zostały porównane z tymi, pochodzącymi z SEC/APCI-MS (*Size Exclusion Chromatography / Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry*). Co istotne, oligomery o najwyższej masie cząsteczkowej, tj. tetrametry, które zostały rozdzielone od pozostałych frakcji przy użyciu techniki GPC/SEC, nie zostały wykryte przez APCI/MS.

Stosując detektor LLSD i dwie kolumny SDVB (Styragel HR 100 Å, $L_c=30$ cm, $d_c=4,6$ mm) połączone szeregowo z kolumną Phenogel 500 Å ($L_c=30$ cm, $d_c=4,6$ mm) Singh zbadał wpływ dodatku β -sitosterolu na przeciwdziałanie powstawaniu produktów utleniania podczas głębokiego smażenia wybranych olejów spożywczych (Tabela 3) [31]. Autor zwrócił uwagę na konieczność poszukiwania naturalnych przeciwutleniaczy, które mogłyby zapobiegać powstawaniu spolimeryzowanych form acylogliceroli w tłuszczach smażalnych. Do badań wybrany został rafinowany olej rzepakowy, olej słonecznikowy o wysokiej zawartości kwasu oleinowego oraz rafinowany olej lniany, do których dodano dodatkowo 1%, 2% i 5% β -sitosterolu. Oleje te poddano następnie obróbce termicznej w temperaturze 180 °C. Dzięki zastosowaniu techniki GPC/SEC możliwe było wykazanie, iż dodatek wspomnianego sterolu wpływa korzystnie na zmniejszenie ilości spolimeryzowanych TAG, powstających podczas głębokiego smażenia olejów roślinnych.

WNIOSKI KOŃCOWE

Technika wysokosprawnej chromatografii wykluczania znalazła i nadal znajduje szerokie zastosowanie we wstępnym rozdzielaniu grupowym tłuszczów, zwłaszcza jadalnych, oraz produktów ubocznych ich rafinacji i konwersji, powstających w procesach technologicznych przetwarzania, a także w

procesach użytkowania. Podsumowując przegląd literatury, można zauważyć, że jednym z najczęściej spotykanych przykładów zastosowania techniki GPC/SEC jest analiza tłuszczów stosowanych w procesach głębokiego smażenia. Badania prowadzono w warunkach lipofilowych, z użyciem kolumn SDVB oraz z zamiennym stosowaniem takich faz ruchomych jak: tetrahydrofuran (THF) dichlorometan (DCM) czy toluen (T).

Z naszego doświadczenia, opartego na wykonanych badaniach, wynika iż przekonanie, że DCM i THF można stosować w technice SEC zamiennie jest słuszne tylko w przypadku rozdzielania grup związków chemicznych/polimerów o względnie niskiej hydrofobowości oraz polarności oraz o dobrej rozpuszczalności w obu eluentach [49]. Efekty rozdzielania stosunkowo polarnych analitów lub silnie hydrofobowych są różne z wykorzystaniem kolumn SDVB z THF i DCM, a także np. toluenu czy acetonu, jako eluentu, mimo jednakowych mas cząsteczkowych. W przypadku wystąpienia polarnych lub hydrofobowych oddziaływań sorpcyjnych o energiach sorpcji, których nie można zaniedbać, mechanizm prostego wykluczania sterycznego zostaje zaburzony. „Zmodyfikowaną” chromatografię wykluczania w warunkach lipofilowych można, zatem, realizować dzięki zastosowaniu eluentu innego niż tetrahydrofuran oraz SDVB jako wypełnienia kolumn, a także z zastosowaniem innych wypełnień kolumn niż kopolimer styren-diwinylobenzen i z zastosowaniem innej fazy ruchomej, zapewniającej „słabą” adsorpcję wszystkich lub części rozdzielanych grup składników przy zachowaniu dominacji wykluczania. To powinno spowodować wzrost rozdzielczości tak „zaprojektowanego” układu rozdzielczego, a także zapewnić możliwość zasadniczego obniżenia kosztów kolumn. Wyniki tego rodzaju badań będą przedmiotem kolejnej publikacji.

Conclusions

The high-performance size-exclusion chromatography technique was, and still is, widely used in the preliminary group separation of fats, especially edible ones, and their refining and conversion by-products. By-products originate both from technological processing of fats, as well as, their everyday usage. Summarizing literature review, it can be noticed that one of the most common examples of GPC/SEC application is analysis of fats used in deep frying processes. Studies were carried out in lipophilic conditions, using SDVB columns and mobile phases, such as tetrahydrofuran (THF), dichloromethane (DCM) or toluene (T).

Our experience, supported by performed experiments, shows that belief assuming that DCM and THF may be used in SEC technique alternatively is valid only for group separation of chemical compounds/polymers having a relatively low hydrophobicity and polarity and a good solubility in both mobile phases [49]. The effects of relatively polar or highly hydrophobic analytes separation are different using SDVB columns with THF and DCM, as well as, toluene or acetone as eluent. In the case of polar or hydrophobic sorption interactions, with sorption energies that cannot be neglected, the mechanism of simple steric exclusion is disturbed. Therefore, "modified" exclusion chromatography carried out in lipophilic conditions can be conducted by usage of an eluent other than tetrahydrofuran and SDVB as column packing, as well as, by usage of another than styrene-divinylbenzene column packing and with another mobile phase, providing a "weak" adsorption of all or of some part of separated constituents, while maintaining the dominance of exclusion mechanism. This approach should increase the resolution of such "designed" separation system, as well as, provide the opportunity to reduce the columns cost. The results of such studies will be the subject of subsequent publication.

Podziękowania (Acknowledgements)

Prace były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki numer rejestracyjny projektu badawczego: N N312 417237, numer umowy: 4172/B/P01/2009/37, pt. "Wykorzystanie chromatografii wykluczania i adsorpcji do rozdzielania i oznaczania grupowego lipidów i produktów konwersji w tłuszczach jadalnych"

LITERATURA (Literature)

1. E. Fahy, S. Subramaniam, H. A. Brown, Ch. K. Glass, A. H. Merrill, Jr., R. C. Murphy, Ch. R. H. Raetz, D. W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M. S. VanNieuwenhze, S. H. White, J. L. Witztum, E. A. Dennis, *A comprehensive classification system for lipids*, Journal of Lipid Research, 46 (2005) 839-861.
2. J. Kowalska, A. Bzducha, D. Dereniaka, K. Kopańska, A. Nitek, *Ocena autentyczności wybranych czekolad*, ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość 4(59) (2008) 74-79. Tekst dostępny 14.04.2016r. na stronie internetowej: http://www.pttz.org/zyw/wyd/czas/2008,%204%2859%29/08_Kowalska.pdf
3. H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, *Lipids (chapter 3)* in: *Food Chemistry*, 4th revised and extended edition, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 2009.



4. R. Yuhas, K. Pramuk, E.L. Lien, *Human milk fatty acid composition from nine countries varies most in DHA*, *Lipids* 4(9) (2006) 851-858.
5. B. Drozdowski, *Lipidy*. W: *Chemia żywności. Tom 2. Sacharydy, lipidy i białka*. pod red. Z. E. Sikorski, WNT, Warszawa 2012.
6. B. Bałasińska, M. Jank, G. Kulasek, *Właściwości i rola wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w utrzymaniu zdrowia ludzi i zwierząt*, *Życie Weterynaryjne* 85(9) (2010) 749-756.
7. R. Korzeniowska-Ginter, E. Czarniecka-Skubina, *Wyk. tłuszczów do przygotowania potraw smażonych w warunkach domowych*, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna XLV(3)* (2012) 1117-1122.
8. PN-EN 14105:2012, *Produkty przetwarzania olejów i tłuszczów. Estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAME). Oznaczanie zawartości wolnego i ogólnego glicerolu oraz mono-, di- i triacylogliceroli*, Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa, 2012.
9. M. Berek, M. Dressler, M. Kubin, K. Marcinka, *Chromatografia żelowa*, PWN, Warszawa 1989.
10. M. Kamiński, *Chromatografia żelowa w układach lipofilowych i hydrofilowych*. W: Praca zbiorowa pod redakcją M. Kamińskiego, *Chromatografia cieczowa*. Tekst dostępny 14.04.2016r. na stronie internetowej: <http://www.pg.gda.pl/chem/Katedry/Inzynieria/images/data/mk/kniga/05-chromatografia%20zelowa%20SEC%20GPC.pdf>
11. G. Kielbowicz, *Zastosowanie hydrolizy enzymatycznej do ustalania struktury naturalnych fosfolipidów*, praca doktorska, Wrocław 2012. Tekst dostępny 14.04.2016r. na stronie internetowej: http://www.dbc.wroc.pl/Content/17077/Kielbowicz_G_doktor_05_DBC.pdf?handler=pdf
12. R. Pawłowicz, B. Drozdowski, *Analiza jakościowa i ilościowa tłuszczów smażalniczych metodą HPSEC*, *Tłuszcze Jadalne* 32(2-3) (1997) 71-80.
13. A. I. Hopia, A.-M. Lampi, V. I. Piironen, L. E. T. Hyvönen, P. E. Koivistoinen, *Application of high-performance size-exclusion chromatography to study the autoxidation of unsaturated triacylglycerols*, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 70(8) (1993) 779-784.
14. A. I. Hopia, V. I. Piironen, P. E. Koivistoinen, L. E. T. Hyvönen, *Analysis of lipid classes by solid-phase extraction and high-performance size-exclusion chromatography*, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 69(8) (1992) 772-776.
15. ISO 18395:2008, *Animal and vegetable fats and oils -- Determination of monoacylglycerols, diacylglycerols, triacylglycerols and glycerol by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC)*, International Organization for Standardization, Switzerland, Geneva, 2005.
16. ISO 16931:2009, *Animal and vegetable fats and oils -- Determination of polymerized triacylglycerols by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC)*, International Organization for Standardization, Switzerland, Geneva, 2009.
17. G. Márquez-Ruiz G, F. Holgado, M.C. García-Martínez, M.C. Dobarganes, *A direct fast method to monitor lipid oxidation progress in model fatty acid methyl esters by high-performance size-exclusion chromatography*, *Journal of Chromatography A* 1165 (2007) 122-127.
18. PN-EN ISO 16931, *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie zawartości spolimeryzowanych triacylogliceroli metodą wysokosprawnej chromatografii sitowej (HPSEC)*, Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa, 2003.
19. R. Fillières, B. Benjelloun-Mlayah, M. Delmas, *Ethanolysis of rapeseed oil: quantitation of ethyl esters, mono-, di-, and triglycerides and glycerol by high-performance size-exclusion chromatography*, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72(4) (1995) 427-432.
20. J. D. Caldwell, B. S. Cooke, M. K. Greer, *High performance liquid chromatography-size exclusion chromatography for rapid analysis of total polar compounds in used frying oils*, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 88 (2011) 1669-1674.
21. C. Cuesta, F.J. Sánchez-Muniz, C. Garrido-Polonio, S. López-Varela, R. Arroyo, *Thermostative and hydrolytic changes in sunflower oil used in fryings with a fast turnover of fresh oil*, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 70(11) (1993) 1069-1073.
22. A. Romero, C. Cuesta, F. J. Sánchez-Muniz, *Effect of replenishment during deep-fat frying of frozen foods in sunflower oil and high-oleic acid sunflower oil*, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75(2) (1998) 161-167.
23. R. Arroyo, C. Cuesta, C. Garrido-Polonio, S. López-Varela, F.J. Sánchez-Muniz, *High performance size-exclusion chromatographic studies on polar components formed in sunflower oil used for frying*, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 69(6) (1992) 557-563.
24. F. J. Sánchez-Muniz, C. Cuesta, C. Garrido-Polonio, *Sunflower oil used for frying: combination of column, gas and high-performance size-exclusion chromatography for its evaluation*, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 70(3) (1993) 235-240.
25. A. Romero, F. J. Sánchez-Muniz, C. Tulasne, C. Cuesta, *High-performance size-exclusion chromatographic studies on a high-oleic acid sunflower oil during potato frying*, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72(12) (1995) 1513-1517.
26. M. C. Dobarganes, M. C. Pérez-Camino, G. Márquez-Ruiz, *High performance size exclusion chromatography of polar compounds in heated and non-heated fats*, *Fat Science Technology* 8 (1988) 308-310.

27. M. Tasioula-Margari, G. Márquez-Ruiz, M. C. Dobarganes, *Fractionation of oligomeric triacylglycerides and the relation to rejection limits for used frying oils*, Journal of the American Oil Chemists' Society 73(11) (1996) 1579-1584.
28. G. Márquez-Ruiz, M. Tasioula-Margari, M. C. Dobarganes, *Quantitation and distribution of altered fatty acids in frying oils*, Journal of the American Oil Chemists' Society 72(10) (1995) 1171-1176.
29. S. L. Hansen, W. E. Artz, *Supercritical fluid fractionation of thermally oxidized canola oil*, Journal of the American Oil Chemists' Society 71(6) (1994) 615-618.
30. S. L. Hansen, Michelle R. Myers, William E. Artz, *Nonvolatile components produced in triolein during deep-fat frying*, Journal of the American Oil Chemists' Society 71(11) (1994) 1239-1243.
31. A. Singh, *Sitosterol as an antioxidant in frying oils*, Food Chemistry 137 (2013) 62-67.
32. M. Rudzinska, R. Przybylski, Y. Y. Zhao, J. M. Curtis, *Sitosterol thermo-oxidative degradation leads to the formation of dimmers, trimers and oligomers: a study using combined size exclusion chromatography/mass spectrometry*, Lipids 45 (2010) 549-558.
33. W. Schoenfelder, *Determination of monoglycerides, diglycerides, triglycerides and glycerol in fats by means of gel permeation chromatography [C-VI 5b(02)]*, European Journal of Lipid Science and Technology 105 (2003) 45-48.
34. G. Márquez-Ruiz, M. Martín-Polvillo, M. C. Dobarganes, *Quantitation of oxidized triglyceride monomers and dimers as an useful measurement for early and advanced stages of oxidation*, Grasas y Aceites 47(1-2) (1996) 48-53.
35. G. Márquez-Ruiz, N. Jorge, M. Martín-Polvillo, M.C. Dobarganes, *Rapid, quantitative determination of polar compounds in fats and oils by solid-phase extraction and size-exclusion chromatography using monostearin as internal standard*, Journal of Chromatography A 749 (1996) 55-60.
36. Application compendium – Analysis of food by GPC/SEC, Agilent Technologies, dostępne 07.01.2016r na stronie:
https://www.agilent.com/cs/library/applications/ApplicationCompendium_GPC_Food_5991-2029EN.pdf
37. J. P. Wolff, F. X. Mordret, A. Dieffenbacher, *Determination of polymerized triglycerides in oils and fats by high performance liquid chromatography, Results of a collaborative study and the standardized method*, International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Applied Chemistry Division Commission on oils, fats and derivatives, Pure and Applied Chemistry 63(8) (1991) 1163-1171.
38. J. C. Martin, M. C. Dobarganes, M. Nour, G. Marquez-Ruiz, W. W. Christie, F. Lavillonnière, J.L Sébédio, *Effect of fatty acid positional distribution and triacylglycerol composition on lipid by-products formation during heat treatment: I. polymer formation*, Journal of the American Oil Chemists' Society 75(9) (1998) 1065-1071.
39. F. Caponio, T. Gomes, A. Pasqualone, C. Summo, *Use of high performance size exclusion chromatography analysis for the measurement of the degree of hydrolytic and oxidative degradation of the lipid fraction of biscuits*, Food Chemistry 102 (2007) 232-236.
40. P. J. White, Y.-Ch. Wang, *A high performance size-exclusion chromatographic method for evaluating heated oils*, Journal of the American Oil Chemists' Society 63(7) (1986) 914-920.
41. C. N. Christopoulou, E. G. Perkins, *High performance size exclusion chromatography of fatty acids, mono-, di-, and triglyceride mixtures*, Journal of the American Oil Chemists' Society 63(5) 679-684.
42. C. N. Christopoulou, E. G. Perkins, *High performance size exclusion chromatography of monomer, dimer and trimer mixtures*, Journal of the American Oil Chemists' Society 66(9) (1989) 1338-1343.
43. T. Gomes, *Oligopolymer, diglyceride and oxidized triglyceride contents as measures of olive oil quality*, Journal of the American Oil Chemists' Society 69(12) (1992) 1219-1223.
44. F. Caponio, C. Summo, M. T. Bilancia, V. M. Paradiso, E. Sikorska, T. Gomes, *High performance size-exclusion chromatography analysis of polar compounds applied to refined, mild deodorized, extra virgin olive oils and their blends: an approach to their differentiation*, LWT – Food Science and Technology 44 (2011) 1726-1730.
45. R. Ap. Ferrari R., E. Schulte, W. Esteves, L. Brühl, K. D. Mukherjee, *Minor constituents of vegetable oils during industrial processing*, Journal of the American Oil Chemists' Society 73(5) (1996) 587-592.
46. J. A. Rojo, E. G. Perkins, *Cyclic fatty acid monomer formation in frying fats. I. Determination and structural study*, Journal of the American Oil Chemists' Society 64(3) (1987) 414-421.
47. U. Aulwum, J. Barthel, C. Gottschalk, G. Engelhardt, K. Meyer, J. Bauer, *Application of a GPC-LC-MS/MS Method for the Determination of 31 Mycotoxins in Edible Oils*, The Application Notebook, 2009. Tekst dostępny 14.04.2016r. na stronie internetowej:
<http://www.chromatographyonline.com/application-gpc-lc-msms-method-determination-31-mycotoxins-edible-oils>
48. A. Stołyhwo, *Separacja i detekcja w chromatografii cieczowej lipidów (rozprawa habilitacyjna)*, Politechnika Gdańska, Gdańsk, 1986.
49. M. Kamiński, wyniki niepublikowanych badań własnych, the results of own unpublished studies.