

## Análisis estereoespecífico de los triacil-*sn*-gliceroles de las grasas naturales por métodos enzimáticos y cromatografía líquida de alta eficacia

Por V. Ruíz-Gutiérrez<sup>1</sup> y L.J.R. Barrón<sup>2</sup>

1. Instituto de la Grasa (CSIC). Avda. Padre García Tejero, 4. 41012 Sevilla.

2. Tecnología de los Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. Marqués de Urquijo s/n. 01006 Vitoria-Gasteiz.

### RESUMEN

**Análisis estereoespecífico de los triacil-*sn*-gliceroles de las grasas naturales por métodos enzimáticos y cromatografía líquida de alta eficacia.**

Este artículo es una revisión bibliográfica en la que se discute la complejidad que presenta la determinación de la composición estereoespecífica de los triacil-*sn*-gliceroles de las grasas naturales. Los modelos teóricos de distribución de los ácidos grasos en las grasas naturales pueden ser una estimación útil para la determinación de la composición estereoespecífica de sus triacil-*sn*-gliceroles. Además, se recogen los principales métodos de análisis enzimático y cromatografía líquida de alta eficacia para el análisis estereoespecífico. En ambos métodos, se aíslan distintas fracciones *sn*-glicerídicas que son posteriormente analizadas por cromatografía de gases para conocer su composición en ácidos grasos. Como conclusión, puede señalarse que la información más valiosa para determinar la composición estereoespecífica de los triacil-*sn*-gliceroles resulta de la combinación de diferentes técnicas de análisis como son los análisis enzimáticos, cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta eficacia y cromatografía de gases.

**PALABRAS-CLAVE:** Análisis estereoespecífico — Cromatografía líquida de alta eficacia — Lipólisis — Revisión (artículo) — Triacil-*sn*-glicerol.

### SUMMARY

**Stereospecific analysis of natural fats triacyl-*sn*-glycerols by means of enzymatic methods and high performance liquid chromatography.**

This paper is a review in which difficulties for the determination of the fatty acid stereospecific positions in the triacyl-*sn*-glycerol molecules of natural fats are discussed. For determining the stereospecific composition of the triacylglycerols, theoretical models for positional distribution of fatty acids in natural fats can be a useful estimation. Also, the principal methods for the stereospecific analysis by means of enzymatic analysis and high performance liquid chromatography are included. In both methods, the isolated *sn*-glyceridic fractions are later analysed by gas chromatography in order to know their fatty acid composition. In conclusion, combinations of several different analytical techniques such as enzymatic methods, high performance liquid chromatography, thin layer chromatography and gas chromatography can furnish valuable information to determine the stereospecific composition of the triacyl-*sn*-glycerols.

**KEY-WORDS:** High performance liquid chromatography — Lipolysis — Review (paper) — Stereospecific analysis — Triacyl-*sn*-glycerol.

### 1. DETERMINACION DE LA DISTRIBUCION POSICIONAL DE LOS ACIDOS GRASOS EN LOS TRIACIL-SN-GLICEROLES. MODELOS DE DISTRIBUCION.

Para determinar la composición de una grasa natural, además de llevar a cabo la identificación de sus ácidos gra-

dos constituyentes, es necesario también conocer la distribución de los mismos en las moléculas de los triacil-*sn*-gliceroles, ya que las propiedades físico-químicas de las grasas están influenciadas tanto por la composición como por la distribución posicional de los ácidos grasos en la molécula del glicerol. En este sentido, es tal la influencia que ejerce la distribución posicional de los ácidos grasos que, grasas con la misma composición cualitativa y diferentes tipos de distribución, pueden presentar propiedades completamente diferentes, en particular, en lo que respecta a sus propiedades físicas (Larsson, 1986; Kulkarni y Rama Murthy, 1987).

Por lo tanto, no es nada sorprendente que durante muchos años se hayan realizado continuos esfuerzos con el fin de desarrollar métodos analíticos para la determinación de la distribución de los grupos acilo en las moléculas de los triacil-*sn*-gliceroles de las grasas naturales. No obstante, el análisis cualitativo y cuantitativo de los triacil-*sn*-gliceroles constituyentes de las grasas naturales es una tarea extremadamente difícil debido a la gran similitud de estos componentes en cuanto a sus propiedades físico-químicas, la cual, es todavía mayor en el caso de los estereoisómeros.

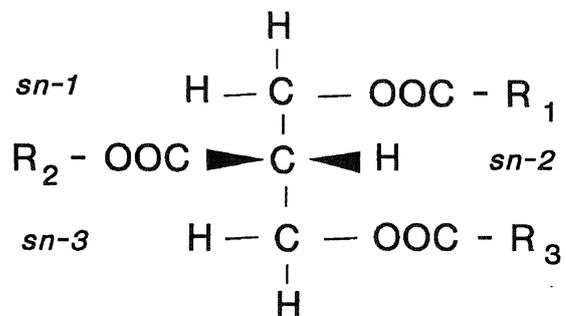


Figura 1  
Configuración estequiométrica de un triacil-*sn*-glicerol mixto.

En la figura 1 se ha representado la molécula de triacil-*sn*-glicerol. El glicerol presenta un plano de simetría formado por los tres carbonos de su molécula. Cuando las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 del glicerol están esterificadas con dos ácidos grasos distintos, la molécula del triacil-*sn*-glicerol será asimétrica y puede tener actividad óptica. La presencia de enantiómeros en los triacil-*sn*-gliceroles de las grasas naturales no es extraña si se tiene en cuenta que en la principal ruta de biosíntesis de los triacil-*sn*-gliceroles en los tejidos animales y vegetales, ruta del *sn*-glicerol-3-fosfato (Weiss y Kennedy, 1956), los sistemas enzimáticos acil-transferasa pueden tener especificidad por determinados ácidos grasos o por ciertas combinaciones de los mismos.

Para tener una idea sobre la complejidad de la distribución posicional de los triacil-*sn*-gliceroles, vamos a considerar el caso de una grasa compuesta por sólo dos ácidos grasos. Considerando que las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de la molécula del glicerol son idénticas e intercambiables, los dos ácidos grasos, A y B, pueden formar 6 triacil-*sn*-gliceroles distintos, y 4 si no se hace distinción entre los isómeros:



Con tres ácidos grasos constituyentes, A, B y C, el número posible de triacil-*sn*-gliceroles se eleva a 18, y a 10 si se excluyen los isómeros. Por lo tanto, es evidente que el número de triacil-*sn*-gliceroles posibles aumenta enormemente con el número de ácidos grasos constituyentes, lo cual confirma la gran dificultad que conlleva el análisis completo de grasas naturales, normalmente compuestas de tres a cinco ácidos grasos mayoritarios, y un amplio número de ácidos grasos minoritarios.

En consecuencia, los distintos investigadores han tratado frecuentemente de simplificar el problema de varias formas, siendo las más comunes las siguientes: por una parte, la mayoría de los estudios no contemplan isómeros, y por otra, las determinaciones no son realizadas normalmente para triacil-*sn*-gliceroles individuales, sino para grupos de triacil-*sn*-gliceroles con variables moleculares similares, por ejemplo peso molecular o grado de insaturación. De acuerdo con esto, muchos investigadores han fraccionado los triacil-*sn*-gliceroles en cuatro grupos según el número de ácidos grasos saturados (S) e insaturados (I) que contienen. Estos grupos se denominan comúnmente S<sub>3</sub>, S<sub>2</sub>I, SI<sub>2</sub> e I<sub>3</sub> (Arumughan y Narayanan, 1982; Parodi, 1982). Con los actuales métodos de separación, fundamentalmente cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía de gases (CG) y cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE), es posible obtener un mayor número de fracciones además de las cuatro anteriores (Christie, 1988; Ruiz-Gutiérrez & Barron, 1995). Además, los distintos investigadores establecen otros grupos específicos de triacil-*sn*-gliceroles, dependiendo del método de análisis empleado, para poder calcular la composición molecular de los mismos a partir de los datos analíticos disponibles.

El objetivo del análisis estereoespecífico de las grasas es llegar a determinar la composición completa de los

triacil-*sn*-gliceroles, y desarrollar modelos teóricos de distribución posicional de los ácidos grasos en los glicéridos naturales para poder, por una parte, elucidar las rutas de su biosíntesis, y por otra, predecir la composición aproximada de una grasa dada. A medida que las técnicas analíticas han ido avanzando, se han propuesto nuevas teorías de distribución de los ácidos grasos en las posiciones *sn*-acilo. En la actualidad estas teorías son mucho más aplicables a las grasas vegetales, sintetizadas *in situ* en la planta, que a las grasas animales, en las que la grasa tiene tanto un origen endógeno como exógeno.

La primera hipótesis propuesta para explicar la distribución de los ácidos grasos en los triacil-*sn*-gliceroles de las grasas naturales fue la teoría de la formación de triacil-*sn*-gliceroles homogéneos, es decir compuestos por un sólo ácido graso. A esta primera teoría le siguieron otras como la teoría de la mínima distribución, o formación del menor número posible de triacil-*sn*-gliceroles homogéneos; la desarrollada por Hilditch y Williams (1964), que postulaba que los ácidos grasos se distribuyen de la forma más amplia posible entre todos los triacil-*sn*-gliceroles; la teoría de la distribución al azar, la cual mantiene que los ácidos grasos se distribuyen estadísticamente entre las tres posiciones *sn*-acilo de las moléculas del glicerol; la teoría de la distribución al azar restrictiva, desarrollada por Kartha (1964), que mantiene que el contenido de los glicéridos totalmente saturados está comprendido dentro de los límites del rango experimental; y por último, la teoría de la distribución al azar en la posición *sn*-2 y distribución al azar en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3.

Vander Wall (1960) y Coleman y Fulton (1961) desarrollaron independientemente esta última teoría a partir de datos obtenidos por hidrólisis de los triacil-*sn*-gliceroles mediante la lipasa pancreática, basándose en las siguientes suposiciones: i) que las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 son equivalentes, ii) que la composición en ácidos grasos en la posición *sn*-2 es diferente e independiente de las posiciones primarias, iii) que los ácidos grasos que ocupan la posición *sn*-2, así como los ácidos grasos que esterifican las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 se distribuyen al azar. Estos investigadores demostraron que era posible calcular la composición de una grasa natural a partir de los datos sobre la composición en ácidos grasos en las distintas posiciones estereoespecíficas obtenidos por lipólisis. El método para calcular la composición de una grasa natural según la teoría de distribución al azar en la posición *sn*-2 y distribución al azar en *sn*-1 y *sn*-3 se expone a continuación. Si se conoce la concentración total de un ácido graso A, en porcentaje molar, y además también su concentración en la posición *sn*-2, [A<sub>2</sub>], su concentración en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 será:

$$[A_1] = [A_3] = 3/2 [A] - 1/2 [A_2]$$

Si se procede de la misma forma con el resto de ácidos grasos que componen la grasa natural, la concentración molar de los diferentes triacil-*sn*-gliceroles será:

$$\begin{array}{l} [\text{AAA}] = [A_1] [A_2] [A_3] 10^{-4} \\ [\text{ABA}] = [A_1] [B_2] [A_3] 10^{-4} \end{array}$$

$$[AAB] = 2 [A_1] [A_2] [B_3] 10^{-4}$$

$$[ABC] = 2 [A_1] [B_2] [C_3] 10^{-4}$$

$$[ACB] = 2 [A_1] [C_2] [B_3] 10^{-4}$$

$$[BAC] = 2 [B_1] [A_2] [C_3] 10^{-4}$$

Los resultados obtenidos utilizando este procedimiento para grasas vegetales han mostrado un alto grado de similitud con los obtenidos años más tarde mediante análisis directo de las grasas por CCF de sílica gel con nitrato de plata y CLAE. Sin embargo, para el caso de muchas grasas animales, debido a su mayor grado de complejidad y grado de asimetría, el modelo de distribución que más se ha ajustado a los datos experimentales ha considerado la distribución de los ácidos grasos, en cada una de las tres posiciones estereoespecíficas, al azar e independiente.

La aplicación de la lipólisis para conocer la distribución posicional de los ácidos grasos en las grasas naturales ha

mostrado que, como era de esperar, los ácidos grasos no siguen una distribución al azar en las moléculas de triacil-*sn*-gliceroles. En la Tabla I se han recogido los porcentajes molares medios de distribución posicional de ácidos grasos de triacil-*sn*-gliceroles de diferentes grasas animales y vegetales. Los aceites vegetales presentan mayoritariamente los ácidos grasos poliinsaturados de longitud de cadena  $C_{18}$  en la posición *sn*-2, mientras que los ácidos saturados, e insaturados de longitud de cadena  $C_{20}$  y  $C_{22}$ , ocupan preferentemente las posiciones *sn*-1 y *sn*-3. El ácido oleico ( $C_{18:1}$ ), mayoritario entre los monoenoicos, se distribuye entre las tres posiciones. En el caso de grasas vegetales saturadas, como las grasas láuricas y las mantecas vegetales, la distribución de algunos ácidos mayoritarios es distinta. Por ejemplo, se localizan preferentemente en la posición central, el ácido oleico, en el caso de la manteca de cacao, y el ácido láurico ( $C_{14:0}$ ), en el aceite de coco (Tabla I).

Tabla I  
Distribución posicional (% molar) de los ácidos grasos en los triacil-*sn*-gliceroles de grasas de origen vegetal y animal (Christie, 1986; Nawar, 1985; Padley, 1986)

Grasa	sn	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:1	C20:5	C22:1	C22:5	C22:6
Aceite soja	1							14		6	23	48	9					
	2							1			22	70	7					
	3							13		6	28	45	8					
Aceite oliva	1							13		3	72	10	1					
	2							1			83	14	1					
	3							17		4	74	5	1					
Aceite colza	1							4		2	23	11	6	16		35		
	2							<1			37	36	20	2		4		
	3							4		3	17	4	3	17		51		
Aceite coco	1		1	4	4	39	29	16		3	4							
	2		<1	2	5	78	8	1		<1	3	2						
	3		<1	32	13	38	8	1		<1	3	2						
Manteca cacao	1							34		50	12	1						
	2							2		2	87	9						
	3							37		53	9							
Grasa láctea	1			1	2	5	10	34	2	10	30	2						
	2		1	1	3	6	18	32	4	10	19	4						
	3	35	13	4	6	1	6	5	1	1	23	2						
Tejido adiposo porcino	1							2	16	3	21	44	12	1				
	2							4	59	4	3	17	8	1				
	3							1	2	3	10	65	24	1				
Tejido adiposo vacuno	1							4	41		17	20	4	1				
	2							9	17		9	41	5	1				
	3							1	22		4	37	5	1				
Aceite bacalao	1							6	15	14	6	28	2	12	2	6	1	1
	2							8	16	12	1	9	2	7	12	5	3	20
	3							4	7	14	1	23	2	17	13	7	1	6

La distribución de los ácidos grasos en la grasa procedente de tejidos adiposos animales presenta marcadas diferencias según sea la especie animal, así como la situación del tejido adiposo en el organismo (Breckenridge, 1978). En la mayoría de las especies animales, los ácidos grasos saturados ocupan preferentemente la posición *sn*-1, aunque también se aprecian porcentajes importantes de ácido oleico en esta posición. Los ácidos insaturados se localizan en general en la posición central, así como algunos ácidos saturados de cadena media. Sin embargo, existen bastantes excepciones, como es el caso de la grasa del tejido adiposo de cerdo, en la que el ácido palmítico (C<sub>16:0</sub>) se concentra en la posición *sn*-2, y los ácidos insaturados de longitud de cadena C<sub>18</sub> en la posición *sn*-3. La distribución de los ácidos grasos en los triacil-*sn*-glicérols de la grasa láctea también presenta importantes diferencias con otras grasas animales, y una gran variabilidad según la especie y la dieta consumida por el animal (Kuksis y col., 1973; De Boever y col., 1984). Los ácidos grasos de cadena corta (C<sub>4</sub> a C<sub>10</sub>) se sitúan, en general, en la posición *sn*-3, y los ácidos grasos saturados de cadena media y larga (C<sub>12</sub> a C<sub>18</sub>) en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2. El ácido insaturado mayoritario, ácido oleico, se concentra en las posiciones primarias (Tabla I). Los aceites de pescado presentan los ácidos poliinsaturados de longitud de cadena C<sub>20</sub> y C<sub>22</sub> en la posición central, mientras que los ácidos monoenoicos se localizan preferentemente en las posiciones primarias (Tabla I).

A la vista de todo lo anteriormente comentado, los modelos de distribución pueden ser considerados como una estimación útil para la determinación de la composición molecular de los triacil-*sn*-glicérols de una grasa natural.

## 2. ANALISIS ESTEREOESPECIFICO POR METODOS ENZIMATICOS

En los años 1950 a 1965, varios equipos de investigación de Francia y Estados Unidos utilizaron la lipasa pancreática porcina para catalizar la hidrólisis de los triacil-*sn*-glicérols (Mattson y Volpenheim, 1963). La lipasa pancreática cataliza la hidrólisis por etapas de los triacil-*sn*-glicérols hasta glicerol y ácidos grasos libres vía intermediarios di- y monoacil-*sn*-glicérols (figura 2). Debido a la hidrólisis selectiva de la lipasa pancreática en las distintas etapas de su actuación, se ha utilizado para conocer la composición en ácidos grasos de la posición *sn*-2 de los triacil-*sn*-glicérols a partir de los 2-monoacil-*sn*-glicérols aislados (Brockhoff y Jensen, 1974). Aunque algunos investigadores han observado distinta especificidad de la lipasa pancreática para algunos ácidos grasos, en particular ácidos poliinsaturados de larga cadena y ácidos de cadena corta, los resultados obtenidos se consideran satisfactorios ya que las diferencias en especificidad son muy pequeñas para la mayoría de las grasas naturales que presentan ácidos grasos comprendidos en un rango normal (Christie, 1986).

A partir de la hidrólisis de la lipasa pancreática, se han desarrollado otros procedimientos enzimáticos de hidrólisis estereoespecífica que permiten conocer la distribución posicional completa de los ácidos grasos en los triacil-*sn*-glicérols (Breckenridge, 1978; Christie, 1982). En la figura 3 se ha representado el procedimiento propuesto por Brockhoff (1965) para el análisis estereoespecífico de triacil-*sn*-glicérols. La composición de la posición *sn*-1 se determina por aislamiento del 1-monoacil-*sn*-glicero-

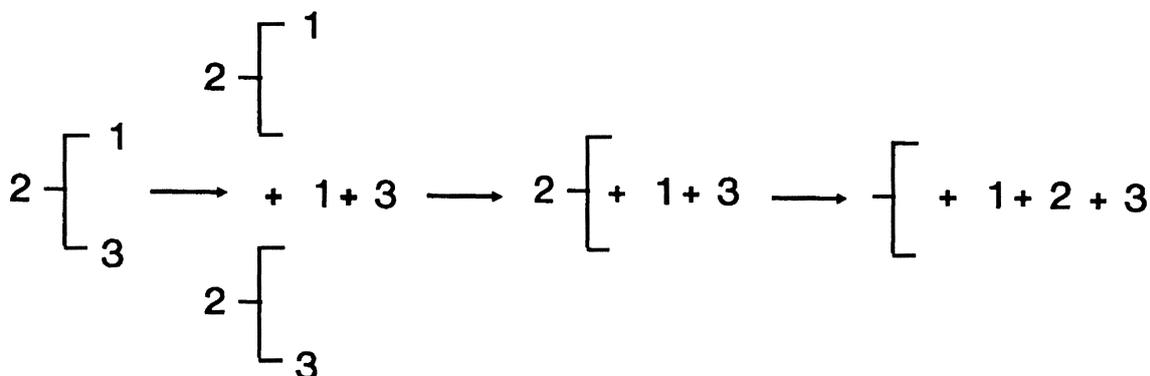


Figura 2  
Hidrólisis de un triacil-*sn*-glicerol mixto mediante la lipasa pancreática.

fosfátido, la posición *sn*-2 mediante la hidrólisis de la lipasa pancreática, y la posición *sn*-3, de forma indirecta, a partir de las anteriores y de la composición total en ácidos grasos de los triacil-*sn*-gliceroles:

$$[sn-3] = 3[\text{triacil-}sn\text{-glicerol}] - [sn-1] - [sn-2]$$

Posteriormente, se desarrollaron otros métodos enzimáticos por modificaciones del propuesto por Brockerhoff (1965) que utilizaban la acción de una diacil-*sn*-glicerol quinasa o derivados fosforilfenólicos (Ruiz-Gutiérrez & Barron, 1995).

### 3. ANALISIS ESTEREOESPECIFICO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA

El análisis estereoespecífico de los triacil-*sn*-gliceroles mediante cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) comenzó a desarrollarse a principios de los años ochenta. La CLAE en fase normal y en fase inversa desarrolladas hasta el momento separaban los triglicéridos de acuerdo a su longitud de cadena y/o grado de insaturación, sin tener en cuenta las posiciones que ocupan los ácidos grasos en la molécula del glicerol. La metodología de análisis CLAE que permite conocer la distribución estereoespecífica de los triacil-*sn*-gliceroles utiliza como sustrato de análisis los derivados mono- y diacil-*sn*-gliceroles. Además, y al igual que para los métodos enzimáticos, para calcular la posición estereoespecífica de los ácidos grasos en los triacil-*sn*-gliceroles, es necesario analizar por cromatografía de gases (CG) los ácidos grasos constituyentes de las fracciones cromatográficas obtenidas.

El análisis estereoespecífico mediante CLAE presenta cierta complejidad ya que, la mayor parte de los análisis, requieren, en primer lugar, una cuidadosa hidrólisis de la muestra, y en segundo lugar, una buena separación de las fracciones enantioméricas obtenidas en una cromatografía CLAE preparativa para el análisis CG de sus ácidos grasos.

La preparación de la muestra requiere una previa hidrólisis parcial de los triacil-*sn*-gliceroles para obtener mono- y/o diacil-*sn*-gliceroles, generalmente mediante la reacción de Grignar con bromuro de etil magnesio (Yurkowski & Brockerhoff, 1966), y posteriormente la formación de compuestos derivados de los mono- o diacil-*sn*-gliceroles y su aislamiento mediante cromatografía de extracción en fase sólida o cromatografía en capa fina (CCF).

La cromatografía de adsorción en fase normal, cromatografía en fase inversa y cromatografía con fases quirales, se han utilizado para el análisis CLAE de los derivados mono- y diacil-*sn*-gliceroles, y en algunos casos de derivados directos de los triacil-*sn*-gliceroles.

En cromatografía de adsorción en fase normal se analizan los 1,3-, 1,2- y 2,3-diacil-*sn*-gliceroles mediante la formación de los derivados diastereoméricos (S)-(+)-1-(1-naftil)etil uretanos (Christie et al. 1991). Laakso y Christie (1990) obtuvieron buenas separaciones de los derivados diastereoméricos de los diacil-*sn*-gliceroles empleando dos columnas en serie de gel de sílice y una fase móvil isocrática hexano:isopropanol (99.5:0.5 v/v). En estas condiciones, los diacil-*sn*-gliceroles derivatizados con (S)-(+)-1-(1-naftil)etil isocianato se elúan en orden creciente 1,3-, 1,2- y 2,3-enantiómeros. Varios autores han señalado que en la determinación del orden de elución de los diastereoisómeros, la magnitud de los efectos estéricos de los sustitui-

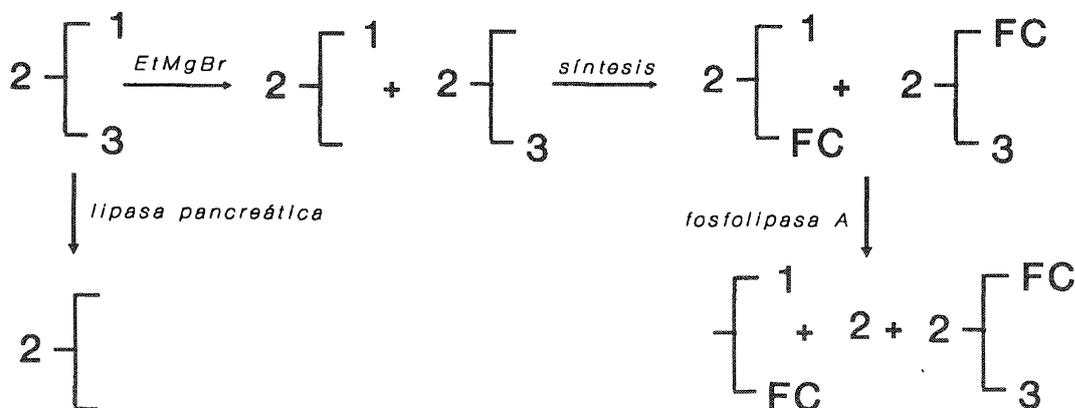


Figura 3

Análisis estereoespecífico de triacil-*sn*-gliceroles mediante el procedimiento de Brockerhoff (1965). FC = fosforicolina

yentes en el carbono quiral del grupo uretano y el carbono primario del glicerol son los factores más importantes. Cuando se utiliza la forma (R)- del agente derivatizante, el orden de elución de los 1,2- y 2,3-diacil-*sn*-glicerolés se invierte, aunque se ha observado que la resolución obtenida es mucho menor (Christie, 1987).

Por otra parte, Laakso y Christie (1990) también observaron que los diacil-*sn*-glicerolés formados por un único ácido graso se eluían según el orden  $C_{18:1}$  (oleico) <  $C_{18:0}$  (esteárico) <  $C_{18:2}$  (linoleico) <  $C_{16:0}$  (palmítico), diferente al esperado en CLAE en fase normal e inversa. Este hecho puede ser debido a la influencia de la conformación espacial de los ácidos grasos sobre las interacciones entre los sustratos y la fase estacionaria.

Como ya se ha indicado anteriormente, mediante la combinación de los datos obtenidos en el análisis por cromatografía de gases de los ácidos grasos de la fracción total de triacil-*sn*-glicerolés, y de las fracciones correspondientes a los 1,2- y 2,3-diacil-*sn*-glicerolés recogidos a la salida del análisis CLAE, puede calcularse la composición estereoespecífica de los ácidos grasos en los triacil-*sn*-glicerolés de una grasa natural.

La cromatografía de fase inversa se ha utilizado en mucha menor extensión que la cromatografía de adsorción para el análisis estereoespecífico de los triacil-*sn*-glicerolés. Con esta técnica, el análisis se ha llevado a cabo vía formación de intermediarios diacil-*sn*-glicerolés, o bien mediante la formación de derivados directos de los triacil-*sn*-glicerolés. En el primero de los casos, Semporé y Bézard (1991) efectuaron separaciones de los 3,5-dinitrofenil uretano derivados (DNFU) de los 1,2- y 2,3-diacil-*sn*-glicerolés con una columna octadecilsilano, fase móvil acetonitrilo:acetona y detección de masas. Los derivados DNFU se han utilizado normalmente para el análisis de los mono- y diacil-*sn*-glicerolés en cromatografía con fases quirales. En el segundo caso, como derivados directos de los triacil-*sn*-glicerolés, Defense (1993) desarrolló un método para el análisis CLAE en fase inversa de los derivados obtenidos por epoxidación de los triacil-*sn*-glicerolés con un único ácido graso monoinsaturado. La epoxidación del doble enlace se realizaba por reacción con ácido *m*-cloroperbenzoico en medio diclorometano. La separación de los derivados epoxidados se llevaba a cabo mediante gradiente de elución de diclorometano:acetonitrilo:acetona, y se detectaban mediante difusión de luz láser. En estas condiciones, fue posible la separación de los isómeros con el ácido insaturado en la posición *sn*-2 de los isómeros *sn*-1 y *sn*-3, los cuales no se resolvían.

La cromatografía en fase quiral también se ha utilizado con éxito para el análisis estereoespecífico de los triacil-*sn*-glicerolés. En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria presenta moléculas quirales que están químicamente enlazadas a un soporte de gel de sílice, evitando así la preparación de derivados diastereoméricos de los glicerolés parciales, como en el caso de la cromatografía de adsorción en fase normal. Las fuerzas implicadas en la separación son bastante complejas y dependen de la naturaleza de las moléculas quirales enlazadas y de los solutos (Ruiz-Gutiérrez & Barron, 1995).

Itabashi y Takagi (1986) obtuvieron buenas separaciones de los derivados DNFU de los mono- y diacil-*sn*-glicerolés, obtenidos por hidrólisis parcial previa de los triacil-*sn*-glicerolés, en una columna con fase estacionaria quiral (S)-2(4-clorofenil)isovaleroil-D-fenilglicina químicamente unida a un soporte de aminopropil-sílice silanizado. Utilizando una fase móvil de hexano:1,2-dicloroetano:etanol (40:12:3, v/v/v) se separaban los monoacil-*sn*-1-glicerolés de los monoacil-*sn*-3-glicerolés (Takagi & Itabashi, 1986). Se obtuvieron resultados similares con fases quirales de D-naftilamina (Camacho et al. 1990). Aunque en general se han utilizado los derivados DNFU de los mono- y diacil-*sn*-glicerolés, otros autores han propuesto los derivados benzoilisopropilideno del glicerol obteniendo también buenos resultados (Ruiz-Gutiérrez & Barron, 1995).

Posteriormente a las anteriores investigaciones, Takagi y Ando (1990, 1991) mejoraron considerablemente la separación de los DNFU-monoacil-*sn*-glicerolés con una fase quiral N-(R)-1-(1-naftil)etilaminocarbonil-(S)-valina. Empleando una columna de mayor longitud (500 x 4 mm i.d.), un flujo lento (0.5 mL/min) y una fase móvil ternaria poco polar, como la anteriormente citada, se conseguían separar los enantiómeros de longitud de cadena  $C_{18}$  de cero a tres dobles enlaces, aunque los tiempos de elución eran extremadamente largos (superiores a seis horas) y, además, algunos isómeros como los de ácido palmítico ( $C_{16:0}$ ) y oleico ( $C_{18:0}$ ) no se resolvían.

Además de analizar los monoacil-*sn*-glicerolés, la cromatografía en fase quiral también se ha empleado para la separación de los derivados DNFU de los diacil-*sn*-glicerolés previamente aislados (Takagi & Itabashi, 1987; Takagi et al. 1990). En general, se han obtenido buenos resultados empleando, como en el caso de los derivados DNFU-monoacil-*sn*-glicerolés, columnas largas de fase quiral N-(R)-1-(1-naftil)etilaminocarbonil-(S)-valina, flujos lentos y fases móviles de baja polaridad (Takagi et al. 1990). De esta forma se conseguía la separación completa de diacil-*sn*-glicerolés saturados homólogos que difieren en más de seis átomos de carbono de longitud total de cadena, aunque todavía permanecen algunos enantiómeros sin resolver.

El desarrollo de nuevas fases estacionarias quirales parece ser uno de los factores determinantes para mejorar la resolución de los DNFU-diacil-*sn*-glicerolés enantiómeros. Así pues, varios autores han desarrollado columnas quirales con (R)-(+)-1-(1-naftil)etilamina enlazada químicamente a un soporte de gel de sílice, consiguiendo buenas separaciones de enantiómeros con una fase móvil hexano:dicloroetano:etanol (40:10:1, v/v/v). Además de mejorarse la resolución de los enantiómeros, los tiempos de análisis se reducen considerablemente puesto que es posible trabajar con columnas más cortas (250 x 4.6 mm i.d) y flujos mayores (1 mL/min). Esta técnica presenta un gran potencial de aplicación futura para el análisis estereoespecífico de los triacil-*sn*-glicerolés de grasas naturales.

Por último, es importante señalar que, con el desarrollo de las actuales técnicas analíticas de separación e identificación, la información más valiosa que puede obtenerse para determinar la composición estereoespecífica de los triacil-*sn*-glicerolés de una grasa natural resulta de la

combinación de diferentes técnicas de análisis como son CCF de sílica gel con nitrato de plata, CLAE en combinación con CG, CLAE con detección de masas y los análisis enzimáticos (Bezard y Ouedraogo, 1980; Kuksis et al. 1985).

#### BIBLIOGRAFIA

- Arumughan, C. y Narayanan, K.M. (1982).- "Triacylglycerol composition of cow milk fat".- J. Food Sci. Technol. India **19**, 303-316.
- Bezard, J.A. y Ouedraogo, M.A. (1980).- "Fractionation of oil triacylglycerols by reversed-phase high-performance liquid chromatography".- J. Chromatogr. **196**, 279-283.
- Breckenridge, W.C. (1978).- "Handbook of Lipid Research" Vol.1.A. Kuksis, (Ed.).- Plenum Press, Nueva York.
- Brockerhoff, H. (1965).- "A stereospecific analysis of triglycerides".- J. Lipid Res. **6**, 10-15.
- Brockerhoff, H. y Jensen, R.G. (1974).- "Lipolytic Enzymes".- Academic Press, Nueva York.
- Camacho, P.L., Geiger, E., Vigh, V., Webster, R. y Thompson, D.H. (1990).- "Separation of the enantiomeric intermediates of some platelet-activating factor analogs on a naphthylalanine-type Pirkle column".- J. Chromatogr. **506**, 611-616.
- Christie, W.W. (1982).- "Lipid Analysis".-2nd Ed.-Pergamon Press, Oxford.
- Christie, W.W. (1986).- "The Positional Distribution of Fatty Acids in Triglycerides en "Analysis of Oils and Fats", p. 313.- R.J. Hamilton y J.B. Rossell, (Eds.).- Elsevier Applied Science, Nueva York.
- Christie, W.W. (1987).- "High-Performance Liquid Chromatography and Lipids. A practical guide".- Pergamon Press, Oxford.
- Christie, W.W. (1988).- "Separation of molecular species of triacylglycerols by high-performance liquid chromatography with a silver ion column".- J. Chromatogr. **454**, 273-284.
- Christie, W.W., Nikolova-Damyanova, B., Laakso, P. y Herslöf, B. (1991).- "Stereospecific analysis of triacyl-*sn*-glycerols via resolution of diastereomeric diacylglycerols derivatives by high-performance liquid chromatography on silica".- J. Am. Oil Chem. Soc. **68**, 695-701.
- Coleman, M.H. y Fulton, W.C. (1961).- "Enzymes of Lipid Metabolism".- Pergamon Press, Nueva York.
- De Boever, J.L., De Brabander, D.L. y Buysse, F.X. (1984).- "Influence de l'alimentation sur la teneur en matière grasse du lait. Etude bibliographique".- Rev. Agric. **37**, 1065-1078.
- Deffense, E. (1993).- "Novel procedure for the separation of monounsaturated triglyceride 1-2 and 1-3 positional isomers from vegetable oil. Description of the method".- Rev. Fr. Corps Gras **40**, 33-39.
- Hilditch, T.P y Williams, P.N. (1964).- "The Chemical Composition of Natural Fats".- 4th Ed.-Chapman and Hall, Londres.
- Itabashi, Y. y Takagi, T. (1986).- "High performance liquid chromatography separation of monoglycerol enantiomers on a chiral stationary phase".- Lipids **21**, 413-416.
- Kartha, A.R.S. (1964).- "Biosynthesis of fat in ripening coconut: in vivo "quantum" synthesis of triglycerides".- J. Sci. Food Agric. **15**, 299-303.
- Kuksis, A., Myher, J.J. y Marai, L. (1985).- "Lipid methodology Chromatography and beyond. Part II. GC/MS, LC/MS and specific enzymic hydrolysis of glycerolipids".- J. Am. Oil Chem. Soc. **62**, 762-767.
- Kulkarni, S. y Rama Murthy, M.K. (1987).- "Relation between properties of fat and rheological characteristic of butter".- Indian J. Dairy Sci. **40**, 232-237.
- Laakso, P., Christie, W.W. (1990).- "Chromatographic resolution of chiral diacylglycerol derivatives: potential in the stereospecific analysis of triacyl-*sn*-glycerols".- Lipids **25**, 349-353.
- Laarson, K. (1986).- "Physical Properties. Structural and Physical Characteristics" en "The Lipid Handbook".- F.D. Gunstone, J.L. Harwood y F.B. Padley (Eds.).-Chapman and Hall, Nueva York.
- Mattson, F.H. y Volpenheim, R.A. (1963).- "Determining the distribution of fatty acids in partial glycerides".- J. Lipid Res. **4**, 392-397.
- Parodi, P.W. (1982).- "Positional distribution of fatty acids in the triglyceride classes of milk fat".- J. Dairy Res. **49**, 73-80.
- Nawar, W.W. (1985).- "Lipids" en "Food Chemistry".- 2nd Ed.-O.R. Fennema.-Marcel Dekker Inc., Nueva York.
- Padley, F.B., Gunstone, F.D. y J.L. Harwood (1986).- "Occurrence and Characteristics of Oils and Fats" en "The Lipid Handbook".- F.D. Gunstone, J.L. Harwood y F.B. Padley (Eds.).-Chapman and Hall, Nueva York.
- Ruiz-Gutiérrez, V. y Barron, L.J.R. (1995).- "Methods for the analysis of triacylglycerols".- J. Chromatogr. B, **671**, 133-168.
- Semporé, G. y Bézard, J. (1991).- "Analysis and fractionation of natural source diacylglycerols as urethane derivatives by reversed-phase high performance liquid chromatography".- J. Am. Oil Chem. Soc. **68**, 702-709.
- Takagi, T. y Ando, Y. (1990).- "Stereospecific analysis of acyl group distribution in triacylglycerols by high performance liquid chromatography with chiral column".- J. Japan Oil Chem. Soc. **39**, 622-628.
- Takagi, T. y Ando, Y. (1991).- "Stereospecific analysis of triacylglycerols by chiral-phase high performance liquid chromatography; direct derivatization of partially hydrolyzed products".- J. Japan Oil Chem. Soc. **40**, 288-292.
- Takagi, T. e Itabashi, Y. (1986).- "High-performance liquid chromatographic separation of monoalkylglycerol enantiomers on a chiral stationary phase".- J. Chromatogr. **366**, 451-455.
- Takagi, T. e Itabashi, Y. (1987).- "Rapid separation of diacyl and dialkylglycerols enantiomers by high performance liquid chromatography on a chiral stationary phase".- Lipids **22**, 596-600.
- Takagi, T., Okamoto, J., Ando, Y. e Itabashi, Y. (1990).- "Separation of enantiomers of 1-alkyl-2-acyl-*rac*-glycerol and of 1-alkyl-3-acyl-*rac*-glycerol by high performance liquid chromatography on a chiral column".- Lipids **25**, 108-110.
- Vander Wal, R.J. (1960).- "Calculation of the distribution of the saturated and unsaturated acyl groups in fats from pancreatic lipase hydrolysis data".- J. Am. Oil Chem. Soc. **37**, 18-24.
- Yurkowski, M. y Brockerhoff, H. (1966).- "Fatty acid distribution of triglycerides determined by deacylation with methylmagnesium bromide".- Biochim. Biophys. Acta. **125**, 55-61.

Recibido: Julio 1995

Aceptado: Noviembre 1995