

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Белгородский государственный национальный
исследовательский университет»

На правах рукописи

Нгуен Ван Ань

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В СОСТАВЕ
ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНОВ И В СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСАХ
МЕТОДОМ ВЭЖХ**

02.00.02 – аналитическая химия

ДИССЕРТЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Научный руководитель
доктор химических наук, профессор
Дейнека Виктор Иванович

Белгород – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Обзор масел с радикалами сопряженных высших жирных кислот	10
1.1.1. Классификация жирных кислот в составе ТАГ растительных масел	10
1.1.2. Виды жирных кислот с сопряженными двойными связями	11
1.1.3. Особенности свойств масел, содержащих радикалы с сопряженными двойными связями	14
1.1.4. Источники растительных масел, содержащих радикалы с сопряженными двойными связями	15
1.2. Методы качественного и количественного определения сопряженных жирных кислот в растительных маслах	21
1.2.1. Метод, основанный на электронной спектроскопии поглощения	21
1.2.2. Хроматографические методы	25
1.3. Методы исследования комплексов включения	41
1.3.1. Комплексы включения мочевины	41
1.3.2. Комплекс включения циклодекстрина	43
ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ГЛАВЕ 1	48
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТА	49
2.1. Объекты исследования	49
2.2. Метод экстракции масел	50
2.2.1. Метод экстракции масел из семян растений	50
2.2.2. Метод экстракции жиров сыров и молока	50
2.3. Способ отчистки масел для определения методом ВЭЖХ	51
2.4. Контроль каталитической активности сорбента к сорбируемому материалу ...51	
2.5. Хроматографические условия	52
2.5.1. ОФ ВЭЖХ для разделения ТАГ	52
2.5.2. Масс-спектрометрия в режиме химической ионизации при атмосферном давлении	52
2.5.3. ВЭЖХ для разделения жирных кислот	52
2.5.4. Определение параметров удерживания ТАГ	53
2.6. Метод внутренней нормировки	54
2.6.1. Рефрактометрический детектор	54
2.6.2. Спектрофотометрический детектор	54
2.7. Спектрометрические методы	55
2.8. Метод графического разделения смежных пиков	55
2.9. Метод исследования комплекса включения липидов-β-циклодекстрина	55

2.9.1. Метод получения комплекса включения	55
2.9.2. Метод определения содержания вещества «гостя»	55
2.9.3. Рентгенофазовый анализ	56
2.9.4. Дифференциальная сканирующая калориметрия и термогравиметрический анализ	56
2.9.5. Анализ методом ядерного магнитного резонанса	56
2.9.6. Молекулярное моделирование	56
2.10. Метод омыления масел	57
2.11. Метод фракционирования сопряженных жирных кислот	57
2.12. Статистическая обработка результатов	58
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	60
3.1. Выбор условий для определения ТАГ методом ВЭЖХ	60
3.2. Установление качественного и количественного состава ТАГ растительных масел	74
3.2.1. Разделение ТАГ масла семян момордики кохинхинской	75
3.2.2. Масло семян кентрантуса красного	78
3.2.3. Масло семян жакаранды мимозолистной	81
3.2.4. Масло семян трихозанта змеевидного	84
3.2.5. Масло семян катальпы бигнониевидной	85
3.2.6. Масло семян календулы лекарственной	88
3.2.7. Масло семян <i>Sapium dicolor</i>	91
3.2.8. Масла семян некоторых растений	95
3.3. Уравнение относительного удерживания ТАГ	113
3.4. Закономерности удерживание триацилглицеринов	116
3.5. Особенности УФ-спектров кислот с сопряженными двойными связями	121
3.6. Разделение жирных кислот, содержащих сопряженные двойные связи	127
3.7. Исследование комплексов включения липидов	131
3.7.1. Комплексы включения мочевины с жирными кислотами	131
3.7.2. Комплексы включения липидов с циклодекстринами	136
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	147
ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ	148
ЛИТЕРАТУРЫ	149
ПРИЛОЖЕНИЕ	169
П 1. Определение воспроизводимости метода ОФ ВЭЖХ при разделении ТАГ	169
П 2. Применение относительного удерживания для определения состава ТАГ различных масел	172
П 3. Схематическая иллюстрация механизма удержания ТАГ на ОФ ВЭЖХ	175

П 4. Разделение жирных кислот методом ОФ ВЭЖХ.....	176
П 5. Оптимальное соотношения гости и ЦД.....	177
П 6. Подтверждение комплексообразования методом ИК спектроскопии.....	179
П 7. Компьютерное моделирование супрамолекулярных комплексов	181
П 8. Установление подлинности молочных жиров	182

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Высшие непредельные жирные кислоты с сопряженными двойными связями в отличие от обычных метилен-разделенных (включая незаменимые) обладают великолепными свойствами, включающими антиканцерогенный и атерогенный действия, увеличение иммунной системы, антидиабетическое следствие и т.д. Масла, образованные таким кислотами, представляют большой интерес для лакокрасочной промышленности в качестве высыхающих масел. Растительные масла официально контролируют по относительному количеству метиловых эфиров высших жирных кислот (определяемых с использованием газовой хроматографии), образующихся при обработке исследуемого масла раствором метилата натрия в метаноле (ГОСТ 30418-96 и ГОСТ Р 51483-99). Но этот метод имеет два недостатка: во-первых, необходим тщательный контроль процесса, поскольку возможны потери некоторых высоко химически активных кислот. Во-вторых, при таком превращении теряется информация о распределении радикалов кислот по триацилглицеринам (ТАГ), - характеристика, трудно поддающаяся фальсификации. Альтернатива методу – контроль видового состава ТАГ без химического модифицирования масла с использованием обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). Однако, анализ видового состава ТАГ масел является довольно сложной задачей т.к. необходимо достигать определения большого числа ТАГ, в построении которых участвуют все кислоты. Кроме этого существуют «проблемные» пары ТАГ, соединений с близкими временами удерживания, полное (на уровне базовой линии) разделение которых труднодостижимо. Другая проблема связана с детектированием, поскольку из-за отсутствия в большинстве радикалов жирных кислот эффективных хромофоров наиболее популярный спектрофотометрический детектор оказывается мало применимым.

Успехи в исследовании биологически активных веществ связывают не только с их обнаружением и выделением, но и с оптимизацией их применения. В свете развития современных технологий для улучшения ряда свойств высоко гидрофобных соединений используется образование ими супрамолекулярных комплексов с циклодекстринами. Особенно это касается химически нестабильных и крайне малорастворимых в воде соединений, к которым относятся масла или жирные кислоты с сопряженными С=C-связями. Такие супрамолекулярные формы отличаются повышенной растворимостью или диспергируемостью в воде, улучшенными характеристиками по стабильности благодаря защите активных центров стенками молекул-«хозяев» (защита от действия света, окисления и т. д.).

Цель диссертационной работы. Определение триацилглицеринов, содержащих радикалы кислот с сопряженными двойными связями, в маслах семян растительных источников методом ОФ ВЭЖХ с использованием независимых способов идентификации. Разработка аналитических способов контроля образования супрамолекулярных комплексов жирных кислот с мочевиной и жирных кислот и триацилглицеринов - с циклодекстринами.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Разработка способа экстракции, концентрирования и очистки масел, исключающих разрушение или изомеризацию лабильных полиеновых соединений.
2. Подбор хроматографических условий для разделения триацилглицеринов и жирных кислот с сопряженными двойными связями.
3. Установление закономерностей разделения ТАГ и жирных кислот в условиях ОФ ВЭЖХ, определение параметров относительного удерживания, включая построение карты разделения, и объяснение полученных закономерностей.
4. Создание аналитического обеспечения для контроля процесса обогащения октадекатриеновыми кислотами гидролизата масел за счет образования тубулатоклатратов с мочевиной.
5. Создание способов аналитического обеспечения для контроля комплексообразования сквалена, некоторых масел и жирных кислот с сопряженными двойными связями с циклодекстринами.

Научная новизна.

Разработан способ пробоподготовки масла семян, учитывающий высокую химическую лабильность соединений, содержащих сопряженные С=C-связи перед определением методом ВЭЖХ.

Разработан способ определения состава ТАГ растительных масел с радикалами кислот с сопряженными двойными связями в условиях ОФ ВЭЖХ.

Предложен вариант компьютерного разделения «проблемных» (трудно разделяемых) пиков, позволяющий осуществлять ВЭЖХ определение ТАГ в маслах на микроколоночном хроматографе марки Милихром.

Доказана эффективность инкрементного подхода, дополненного анализом электронных спектров поглощения и масс-спектров при определении видового состава ТАГ, эстолидов (тетраацилглицеринов), содержащих радикалы кислот с сопряженными двойными связями (диеновые, триеновые и тетраеновые кислоты).

Разработан подход количественного анализа жирных кислот методом внутренней нормировки ТАГ, построенных изомерными сопряженными октадекатриеновыми

кислотами без введения поправочных коэффициентов на чувствительность по каждому из веществ, основанный на использовании аналогичных изобестических длин волн в качестве аналитических.

В работе впервые получены данные о видовом составе ТАГ, а также полиненасыщенных жирных кислот масла в семенах с радикалами кислот с сопряженными двойными связями в большом числе объектов Белгородской и Вьетнамской флоры, включающие сведения о видовом составе ТАГ более 20 масел семян растений.

Для объяснения селективности разделения ТАГ с изомерными сопряженными октадекатриеновыми кислотами предложена модель строения поверхности обращенно-фазовых сорбентов, полученных химической модификацией силикагеля алкилдиметилхлорсиланами.

Разработано аналитическое сопровождение методов получения и изучения состава супрамолекулярных комплексов включения некоторых липидов (сквалена, масел и жирных кислот) с мочевиной и циклодекстринами.

Расширена векторная модель для определения подлинности настоящих сыров и молока методом ОФ ВЭЖХ. Предложен новый способ для экстракции жиров из молока, основанный на лиофильном высушивании молока и экстракции полученного порошка *n*-гексаном.

Практическая значимость

Методом ОФ ВЭЖХ найдены и определены составы ТАГ 22 масел семян, содержащих радикалы с сопряженными двойными связями для получения субстанций биологически активных веществ.

Система индексации удерживания триацилглицеринов, содержащих радикалы сопряженных октадекатриеновых кислот, введена в курс «Хроматографические и ионообменные методы» и использована для определения масел во Вьетнаме. Внедрение предлагаемой системы индексаций позволит расширить аналитические возможности лабораторий при определении ТАГ, содержащих радикалы с сопряженными двойными, не обладающих дорогостоящим оборудованием (системы препаративного выделения, масс-спектрометры, ЯМР-спектрометры и т.д.) для переноса результатов определения веществ, выполненных в одних лабораториях на другие лаборатории, оснащенные только традиционным хроматографическим оборудованием. Приложенная векторная модель позволяет определить сыры, приготовленные с добавками неживотных жиров. Методы получения комплексов включения липидов с циклодекстринами и мочевины введены в курс «Актуальные проблемы современной химии» (раздел 2: супрамолекулярная химия).

Положения, выносимые на защиту:

1. Метод твердофазной экстракции на силикагеле с контролируемой каталитической активностью эффективен для очистки растительных масел с химически лабильными сопряженными жирными кислотами при выделении масел из семян при комнатной температуре н-гексаном.

2. Способ определения видового состава ТАГ, содержащих радикалы кислот с сопряженными двойными связями в растительных маслах в условиях ОФ ВЭЖХ в элюентах системы «ацетонитрил – пропанол-2 (ИПС)» обеспечивает достаточную для дифференциации изомерных октадекатриеновых кислот и их производных селективность и стабильность. Селективность разделения объяснена предложенной моделью строения «мономерной» C18-стационарной фазы.

3. Компьютерное разделение «проблемных» (трудно разделяемых) пиков (в программе *Magicplot*) позволяет осуществлять эффективное определение видового состава ТАГ в режиме ОФ ВЭЖХ не только при использовании стандартных аналитических колонок, но и на микроколоночном хроматографе марки Милихром.

4. Предложен метод определения точек аналогичных изобестическим, который позволяет методом внутренней нормировки проводить количественный анализ соотношения различных ТАГ, образованных изомерными сопряженными октадекатриеновыми кислотами, без введения поправочных коэффициентов на чувствительность по каждому из веществ.

5. Аналитическое сопровождение методов получения и изучения состава супрамолекулярных комплексов включения некоторых липидов (сквалена, масел и жирных кислот) с мочевиной и циклодекстринами включает ОФ ВЭЖХ и хроматографию на Ag^+ -фазе.

Апробация работы. Основные результаты исследований были представлены на: 7-й Международной научно-методической конференции «Фармообразование-2018» (г. Воронеж 2018), XV Международной научно-практической конференции «Иониты-2017» (г. Воронеж 2018), 7-ой Международной научно-практической «Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства» (г. Белгород 2018), Международной конференции «Экстракция и мембранные методы в разделении веществ» (г. Москва 2018), I Молодежной научно-практической конференции с международным участием «Естественнонаучные, инженерные и экономические исследования в технике, промышленности, медицине и сельском хозяйстве» (г. Белгород 2017), III Всероссийской молодежной конференции «Проблемы и достижения химии кислород- и азотсодержащих биологически активных соединений» (г. Уфа 2018), IV Всероссийской молодежной

конференции «Достижения молодых ученых: химические науки» (г. Уфа 2017), II Всероссийской научной конференции (с международным участием) «Актуальные проблемы адсорбции и катализа» (г. Плес 2017), II Всероссийской заочной научно-практической конференции «Современные информационные технологии в образовании и научных исследованиях: ИНФОТЕХ - 2018» (г. Уфа 2018), X Международной школе-конференции «Фундаментальная математика и ее приложение в естествознании» (г. уфа 2018), IV Всероссийской студенческой научно-практической конференции «Химия: достижения и перспективы» (г. Ростов-на-Дону 2019), Всероссийской научной конференция «Химия и технология растительных веществ» (г. Сыктывкар 2019), X всероссийской школе-конференции молодых ученых "Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем" (г. Иваново 2019), Восьмом Всероссийском симпозиуме и Школе-конференции молодых ученых «Кинетика и динамика обменных процессов» фундаментальные проблемы separation science (г. Москва 2019 г.)

Публикации. Основные результаты диссертации опубликованы в 28 работах, в том числе в 12 статьях, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК РФ, из которых 7 в международных журналах, индексируемых в SCOPUS и WoS, 16 материалов в сборниках трудов конференций и всероссийских журналах.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, основной части (3 главы), заключения, списка литературы из 233 источников, 8 приложений. Работа изложена на 189 страницах, содержит 86 рисунков, 66 таблиц.

Личный вклад аспиранта. Результаты, представленные в диссертации, выполнены лично автором или под его руководством, в том числе: обзор литературных данных, подготовка и проведение экспериментальных исследований, обработка и оформление полученных данных, подготовка материалов к публикации и представления результатов на конференциях.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Обзор масел с радикалами сопряженных высших жирных кислот**1.1.1. Классификация жирных кислот в составе ТАГ растительных масел**

Жирные кислоты представляют собой структуры, в которых к карбоксильной группе присоединены более четырех sp^3 -гибридных атома углерода. На химические и физические свойства различных жирных кислот напрямую влияет количество атомов углерода молекулы [1]. В зависимости от длины цепи жирные кислоты делят на (Рис. 1.1): короткоцепочечные жирные кислоты, содержащие четыре-десять атомов углерода (от C4 до C10); жирные кислоты средней цепи, содержащие двенадцать-четырнадцать атомов углерода (от C12 до C14); длинноцепочечные жирные кислоты с шестнадцатью-восемнадцатью (от C16-C18) атомов углерода в составе; и, наконец, очень длинноцепочечные жирные кислоты, обладающие от двадцати (C20) атомами углерода и выше.

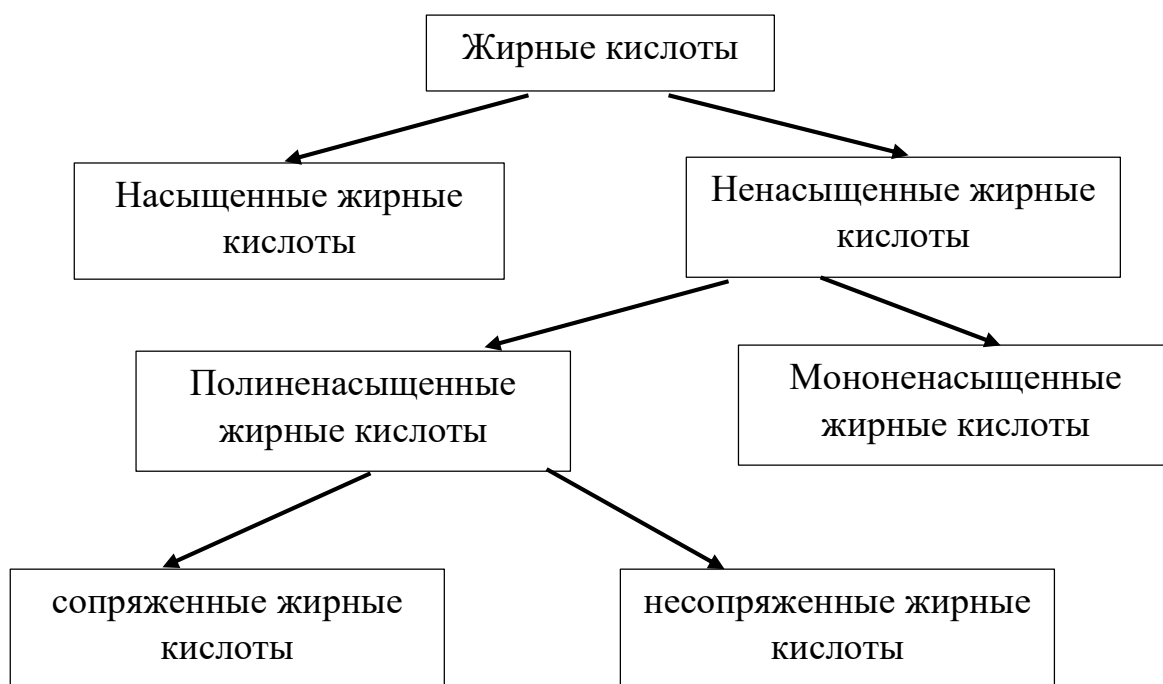


Рис. 1.1. Схема классификации жирных кислот

Обычно жирные кислоты имеют линейное строение углеродного скелета, при этом они классифицируются в зависимости от их степени ненасыщенности [2]:

- Насыщенные жирные кислоты

Общая формула: $CH_3(CH_2)_nCOOH$, где $n=4\div 22$

Самыми распространенными насыщенными жирными кислотами высших растений являются пальмитиновая кислота (C16) и стеариновая кислота (C18). Другие основные

насыщенные жирные кислоты, обнаруженные в растительных липидах, показаны в таблице 1.1.

Таблица 1.1.

Некоторые основные жирные кислоты в растительных маслах [3]

Структурная формула	Обозначения	Тривиальное название	Систематическое название
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	C14:0	Миристиновая кислота	Тетрадекановая кислота
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	C16:0	Пальмитиновая кислота	Гексадекановая кислота
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	C18:0	Стеариновая кислота	Октадекановая кислота
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	C20:0	Арахидиновая кислота	Эйкозановая кислота
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7- \\ \text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7- \\ \text{COOH} \end{array}$	C18:1 ^{9Z}	Олеиновая кислота	<i>цис</i> -9-Октадеценная кислота
$\begin{array}{c} \text{CH}_3(\text{CH}_2)_3-(\text{CH}_2- \\ \text{CH}=\text{CH})_2-(\text{CH}_2)_7- \\ \text{COOH} \end{array}$	C18:2 ^{9Z,12Z}	Линолевая кислота	<i>цис,цис</i> -9,12-Октадекадиеновая кислота
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-(\text{CH}_2- \\ \text{CH}=\text{CH})_3-(\text{CH}_2)_7- \\ \text{COOH} \end{array}$	C18:3 ^{9Z,12Z,15Z}	α -Линоленовая кислота	<i>цис,цис,цис</i> -9,12,15-Октадекатриеновая кислота

- Ненасыщенные жирные кислоты: Ненасыщенные жирные кислоты представляют собой соединения, которые содержат одну или несколько несопряженных (метилен-разделенных) двойных связей в их углеводородной цепи.

Общая формула: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_m-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_x-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$

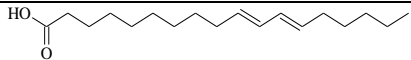
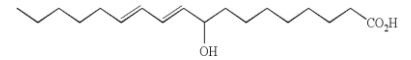
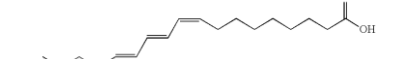
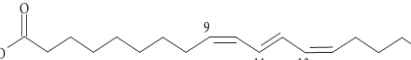
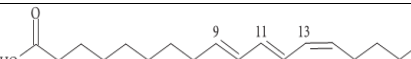
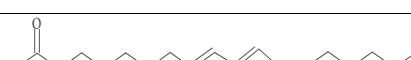
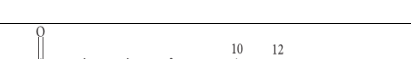
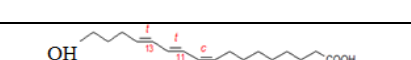
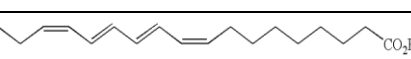
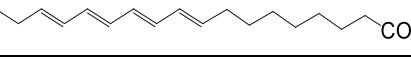
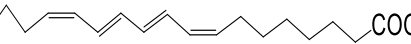
- Сопряженные жирные кислоты являются полиненасыщенными жирными кислотами, в которых по меньшей мере одна пара двойных связей разделена только одной простой σ -связью.

1.1.2. Виды жирных кислот с сопряженными двойными связями

В природе присутствуют несколько различных жирных кислот с сопряженными двойными связями (Табл. 1.2). Они включают в себя сопряженные диеновые, триеновые и тетраеновые кислоты и их производные; они встречаются в различных растительных маслах и растениях, а также в морских водорослях [4].

Таблица 1.2.

Самые распространенные сопряженные жирные кислоты, встречающиеся в растительных маслах

Систематическое название	Обозначения	Тривиальное название	Структурная формула	Ссылка
(10- <i>транс</i> ,12- <i>транс</i>) октадека-10,12-диеновая кислота	$C_{17}H_{31}COOH$; $C_{18}:2^{10E,12E}$			[11]
9-гидрокси-(10- <i>транс</i> ,12- <i>транс</i>) октадекадиеновая кислота	$C_{18}H_{32}O_3$; $C_{18}:2^{9OH, 10E,12E}$	Диморфеколовая кислота		[12]
9- <i>цис</i> , 11- <i>транс</i> , 13- <i>транс</i> октадекатриеновая кислота	$C_{17}H_{29}COOH$; $18:3^{9Z,11E,13E}$	α -Элеостеариновая кислота		[13]
9- <i>транс</i> , 11- <i>транс</i> , 13- <i>транс</i> октадекатриеновая кислота	$C_{17}H_{29}COOH$; $18:3^{9E,11E,13E}$	β -Элеостеариновая кислота		[13]
9- <i>цис</i> , 11- <i>транс</i> , 13- <i>цис</i> октадекатриеновая кислота	$C_{17}H_{29}COOH$ $18:3^{9Z,11E,13Z}$	Пуниковая кислота		[13]
9- <i>транс</i> , 11- <i>транс</i> , 13- <i>цис</i> октадекатриеновая кислота	$C_{17}H_{29}COOH$; $18:3^{9E,11E,13Z}$	Катальповая кислота		[13]
8- <i>транс</i> , 10- <i>транс</i> , 12- <i>цис</i> октадекатриеновая кислота	$C_{17}H_{29}COOH$; $18:3^{8E,10E,12Z}$	Календовая кислота		[13]
8- <i>цис</i> , 10- <i>транс</i> , 12- <i>цис</i> октадекатриеновая кислота	$C_{17}H_{29}COOH$; $18:3^{8Z,10E,12Z}$	Жакарандовая кислота		[13]
9- <i>цис</i> , 11- <i>транс</i> , 13- <i>транс</i> -18 гидросид октадекатриеновая кислота	$C_{18}H_{30}O_3$; $18:3^{18-OH,9Z,11E,13E}$	α -Камлоленовая кислота		[14]
9- <i>цис</i> , 11- <i>транс</i> , 13- <i>транс</i> , 15- <i>цис</i> октадекатетраенная кислота	$C_{17}H_{27}COOH$ $18:4^{9Z,11E,13E,15Z}$	α -паринаровая кислота		[6]
9- <i>цис</i> , 11- <i>транс</i> , 13- <i>транс</i> , 15- <i>цис</i> октадекатетраенная кислота	$C_{17}H_{27}COOH$ $18:4^{9Z,11E,13E,15Z}$	β -паринаровая кислота		[6]
8- <i>цис</i> , 10- <i>транс</i> , 12- <i>транс</i> , 14- <i>цис</i> октадека-8,10,12,14-четырыеновая кислота	$C_{17}H_{27}COOH$ $18:4^{8Z,10E,12E,14Z}$			[15]

Наиболее часто встречающиеся в природе сопряженные полиеновые кислоты с восемнадцатью атомами углерода представляют собой бесцветные кристаллические вещества [5, 6]. Один из видов таких кислот включает изомерные сопряженные октадекадиеновые кислоты (сопряженные линолевые кислоты), которые содержатся главным образом в мясных и молочных продуктах [7]. Многие растительные масла также содержат радикалы сопряженных триеновых жирных кислот [5].

Схема биосинтеза некоторых растительных кислот, включая конъюгированные триены, предложена в работе [10] (Рис. 1.2).

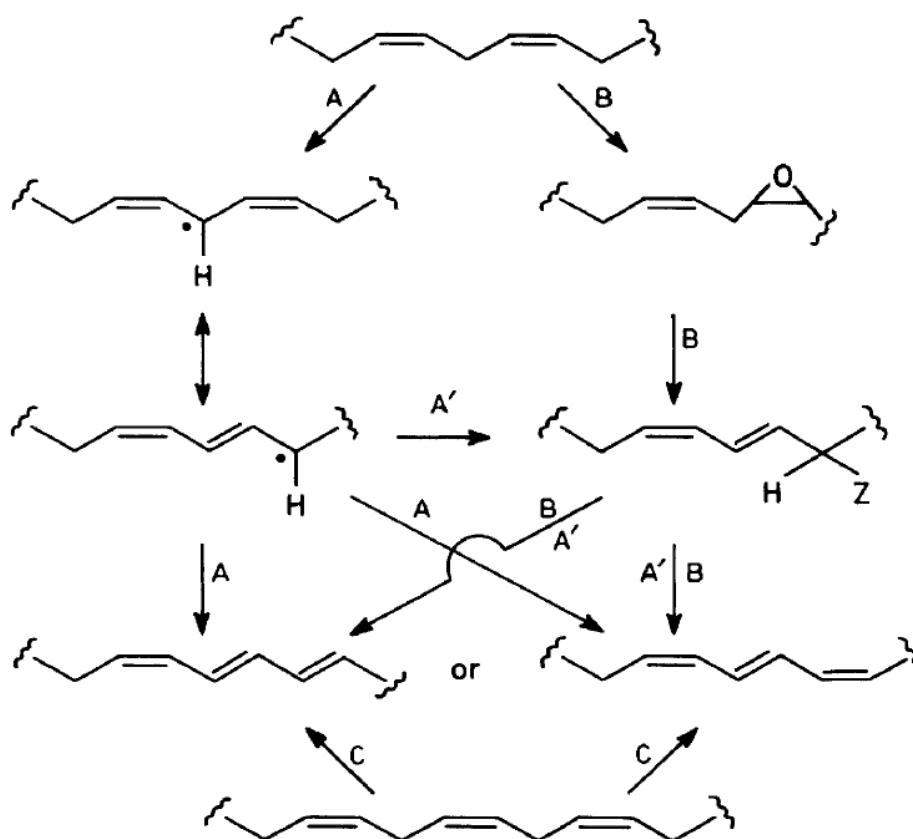


Рис. 1.2. Схема биосинтеза сопряженных кислот

Путь А – образование аллильного радикала (тип реакции липоксигеназы). Путь В начинается с моноэпексидирования, затем происходит раскрытие эпокси-цикла с образованием гидроксидиена ($Z = OH$) с последующей дегидратацией.

Другие типы кислот с более сложной структурой также известны, например, паринаровая (октадекатетраеновая) кислота, некоторые гидроксильированные кислоты (α -камллоеновая кислота) и кислоты с ацетиленовыми связями в сопряжении [8]. Очевидно, что во всех известных природных сопряженных (триеновых или тетраеновых) высших жирных кислотах средняя двойная связь находится только в *транс*-конфигурации.

В некоторых работах [9] утверждают, что для масел с сопряженными двойными связями обычно сопряженная кислота представлена основной кислотой и небольшими примесями других кислот. Это явление объясняется механизмом биосинтеза конъюгированных кислот [10]. Они продуцируются биологически из метилен-разделенной жирной кислоты (октадекатриен-9,12-новой кислоты). При этом образуются свободные радикалы, которые имеют *транс* конфигурацию в положении 10 или 12 (путь А и путь В на рисунке 1.2 в цепи атомов углерода).

1.1.3. Особенности свойств масел, содержащих радикалы с сопряженными двойными связями

Масла, образованные высшими жирными кислотами с сопряженными двойными связями, представляют большой интерес как в фармакологии (в качестве активных ингредиентов различного назначения), так и в лакокрасочной промышленности (в качестве пленкообразующих веществ). Кроме того, соединения с сопряженными двойными связями обладают высокой химической активностью, легко вступая в ряд превращений.

Биологическая активность сопряженных жирных кислот

Высшие непредельные жирные кислоты с сопряженными двойными связями в отличие от обычных метилен-разделенных (включая незаменимые) обладают уникальными свойствами, включающими антиканцерогенный и атерогенный эффекты, способны укреплять иммунную систему, оказывать антидиабетическое действие [5]. Большое количество исследований *in vitro* и *in vivo* [16-20] указывает на то, что сопряженные октадекадиеновые кислоты влияют на энергетический обмен и на ожирение в организме. В работе [21] показано, что увеличение дозы сопряженных октадекадиеновых кислот с 2.5 до 10 г на 1 кг пищи уменьшает массу тела и степень ожирения вне зависимости от энергоемкости и жирности пищи и пропорционально количеству потребленных кислот. Кроме того, экспериментально показана эффективность сопряженных октадекадиеновых кислот в снижении риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний за счет уменьшения содержания холестерина и триацилглицеринов в плазме крови [22]. А также сопряженные октадекадиеновые кислоты обладают способностью модулировать иммунную систему организма [23, 24], подавлять развитие опухолевых процессов [25] и др. О подобном биологическом воздействии сопряженных октадекатриеновых и октадекадиеновых кислот свидетельствуют работы [26 – 29]. Установлено, что α -элеостеариновая кислота быстро превращается в наиболее

активную 9Z,11E-октадекадиеновую кислоту [30]. Поэтому неудивительно, что сопряженные октадекатриеновые кислоты обладают эффектом, аналогичным действию сопряженных октадекадиеновых кислот [31] по антиканцерогенной активности, по снижению массы жира.

Химическая активность сопряженных жирных кислот

Радикалы с сопряженными двойными связями в масле на воздухе могут быстро полимеризоваться, образуя нерастворимые пленки [32] (Рис. 1.3.).

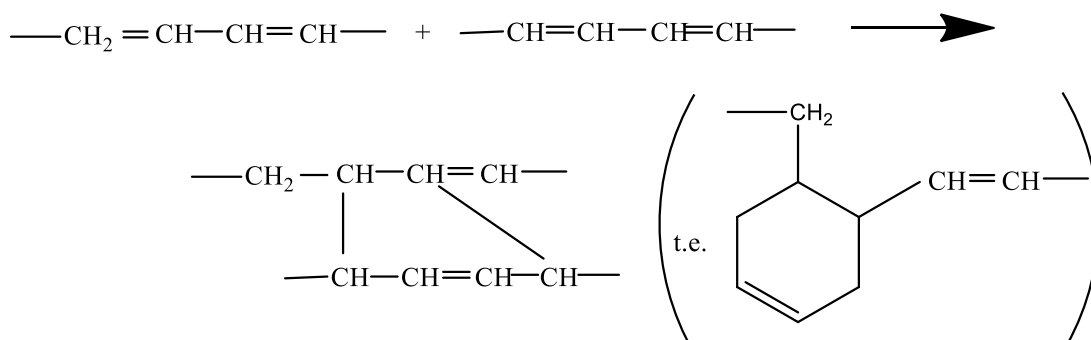


Рис. 1.3. Полимеризация сопряженных жирных кислот

Это свойство очень важно не только для лакокрасочной промышленности, но и может быть использовано для создания биоразлагаемых полимерных материалов [33]. Именно тунговое масло, содержащие 60-70 мол.% α-элеостеариновой кислоты издавна широко используется в лакокрасочной промышленности.

Кроме сопряженных октадекатриеновых кислот и соединения с двумя сопряженными двойными связями обладают высокой химической активностью, легко вступая в ряд превращений. При определенных условиях (свет, температура, катализатор) эти соединения могут подвергаться изомеризации, окислению и т.д.

1.1.4. Источники растительных масел, содержащих радикалы с сопряженными двойными связями

Жирные кислоты с сопряженными двойными связями встречаются в маслах многих семян. Они были идентифицированы в масле семян растительных семейств *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Rosaceae*, *Balsaminaceae*, *Bignoniaceae*, *Compositae*, *Valerianaceae* и *Punicaceae* [8]. Все выше перечисленные семейства относятся к категории двудольных. Семена растений некоторых других семейств также могут содержать небольшие количества сопряженных кислот (4-6 %) [34].

Семейство *Cucurbitaceae*

В соответствии с литературными данными многие виды семейства *Cucurbitaceae* содержат конъюгированные кислоты, представленные в основном элеостеариновой и пуниковой кислотами (Табл. 1.3).

Таблица 1.3.

Виды растений семейства *Cucurbitaceae*, содержащие сопряженные кислоты

Вид	сопряженная кислота	Другие жирные кислоты	Масличность	Ссылка
<i>Momordica cochinchinensis</i>	α Э-58.61%	П-17.99%, С-2.05%, О-7.92%, Л-10.94%	52.7	[35]
<i>Momordica charantia</i>	α Э: 63.4-67.9%	П:1.6-1.9%, С: 21.7-26.5%, О:2.6-4.0%, Л: 3.1-4.6%	40.6-44.5	[36]
<i>Momordica dioica</i>	α Э-55.2%	-	33.5	[37]
<i>Momordica balsamina</i>	α Э-16.8%, Пу-27.2%, β Э-9.5%, КТ-9.2%	П+С: 21.1%, О-6.2%, Л-7.6%	20	[38]
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	α Э-2.1%, Пу-28%, КТ-0.4%	П-4.8%, С:3.1%, О-11.8%, Л-38.2%	62	[39]
<i>Trichosanthes anguina</i>	α Э-3.43%, Пу-48.48%, КТ-9.2%	П-5.31%, С:8.15%, О-16.4%, Л-17.22%	32.3	[9]
<i>Diplocyclos pamnatus</i>	Пу-38.2%	П-8.1%, С-4.9%, О-4.9%, Л-43.9%	23	[40]
<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	α Э:57.2-63.43%, β Э: 19.9-11.33%, КТ:3.72-2.93%	П:2.03-3.41%, С:2.28-3.14%, О:3.350-8.94%, Л-6.62-7.4%	17.3-29.6	[41]
<i>Fevillea trilobata</i>	Пу-30%, α Э: 9%	П+С: 43%, О-11%, Л-7%	-	[42]
<i>Cyclanthera exfoliens</i>	Пу-25.7%	-	32.8	[37]
<i>Thladiantha dubia</i>	Пу-38.1%, α Э-6.3%	П-3.9%, С-0.9%, О-11.5%, Л-39.1%	-	[43]
<i>Cayaponia africana</i>	Пу-38.2%	-	13.9	[37]
<i>Cucurbita cordata</i>	Пу-18.31%	П-10%, С-7%, О-38%, Л-36%	16.1	[40]
<i>Cucurbita digitata</i>	Пу-18.31%	П-10%, С-5%, О-24%, Л-43%	20.2	[40]
<i>Apodanthera undulata</i>	Пу-33%	П+С: 14%, О-14%, Л-38%	-	[44]
<i>Cucurbita palmata</i>	Пу-16.3%	П-8%, С-5%, О-30%, Л-35%	31.6	[45]
<i>Telfairia occidentalis</i>	α Э-7.1-12.4%	-	34.5-36.4	[37]
<i>Apodanthera undulata</i>	Пу-33%	Л-14%, О-38%	-	[44]

Примечание: С – стеариновая, П – пальмитиновая, Л – линолевая, Пу - пуниковая, α Э – α -элеостеариновая кислоты

В настоящее время данные по жирнокислотному составу некоторых масел в мировой литературе существуют разночтения. Так, например, результаты определения жирнокислотного состава масла семян *Momordica cochinchinensis* в различных литературных источниках отличаются друг от друга. В работе [18] предполагалось определить к какому типу линоленовых кислот относится триеновая кислота этого масла, наличие которой было установлено с помощью метода газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией. При этом в цитируемой работе указывается, что α -элеостеариновая кислота вообще не была обнаружена. В то время как в работе [3] сообщалось о наличии данной кислоты в масле момордики кохинхинской в Вьетнаме (58.61% α -элеостеариновой).

Семейство *Bignoniaceae*

Необычные жирные кислоты, например, 9 - *транс*, 12 – *транс* октадекадиеновая и 10 – *транс*, 12-*транс* октадекадиеновая встречаются в некоторых растениях семейства *Bignoniaceae* (Табл. 1.4). Кроме того, сопряженные октадекатриеновые жакарандовая и катальповая кислоты были обнаружены в масле семян растений этого семейства.

Таблица 1.4.

Некоторые виды растений в семействе *Bignoniaceae*, содержащие сопряженные кислоты

Вид	конъюгированная кислота	Другие жирные кислоты	Масличность	Ссылка
<i>Jacaranda mimosifolia</i>	Ж-36%	П+С: 8%, О-12%, Л-44%	28.3	[45]
<i>Jacaranda semiserrata</i>	Ж-33.1%	П:8%, С:2%, О:31%, Л: 26%	12.9	[46]
<i>Catalpa ovata</i>	Кт-42.25%, β Э-0.55%	П: 2.77%, С-2.65%, Л-7.71%, О-22.28%, С18:2(9Е,12Е)-10.39%	31.6-36.0	[9]
<i>Catalpa bignonioides</i>	Кт-42.25%	П+С: 10%, О-5%, Л-45%, С18:2(9Е,12Е)-19%	15.6	[45]
<i>Catalpa speciosa</i>	Кт-34%	-	22	[47]
<i>Chilopsis linearis</i>	Кт-22%, С18:2(10Е,12Е)-10%	П+С: 7%, Л-28%, О-17%, С18:2 (9Е,12Е)-16%	28.3	[45]

Примечание: Ж – жакарандовая, Кт – катальповая кислоты

Семейство *Compositae* (*Asteraceae*)

Семейство *Compositae* известно как богатый источник таких сопряженных кислот как: 9-гидрокси-(10Z,12Z) октадека-10,12-диеновой и календовой кислот [48]. В работе [48] были изучены масла семян 29 видов растений пяти родов *Calendula*., При этом показано, что в масле сорта *Dimorphotheca* обнаружена диморфеколовая кислота (9-

гидроксил-10-*транс*,12-*транс* октадекадиеновая кислота). Также в маслах представителей 14 видов *Osteospermum*, 2 видов *Calendula*, и 2 видов *Chrysanthemoides*, обнаружены сопряженные триеновые кислоты (14-60%). В другой работе [49] исследовали масла семян 17 видов *Calendula*. Основная сопряженная кислота в масле семян *C. arvensis* была идентифицирована как 8-*транс*, 10-*транс*, 12- *цис* октадекатриен-8,10,12-новая кислота (календовая кислота). С использованием спектрометрического метода показано, что масло 17 видов растений содержат одну и ту же кислоту (календовую кислоту от 38.9 до 58.4%). В работе [12] доказали, что масло семян *Calendula officinalis* содержит D-(+)-9-гидроксил-10-*транс*,12-*цис* октадекадиен-10,12-овую кислоту. В другой работе [50] конъюгированная триеновая кислота была выделена и идентифицирована в масле семян *Calendula officinalis* как 8-*транс*, 10-*транс*, 12-*цис* октадекатриеновая кислота (47%).

Семейство *Valerianoidece (Caprifoliaceae)*

Семейство *Valerianoidece* включает в себя три вида, которые содержат кислоты с сопряженными двойными связями. В том числе масло семян *Centranthus ruber* [45] было известно, как источник двух изомерных сопряженных октадекатриеновых кислот – α - и β -элеостеариновых в сопоставимых количествах. В нем жирнокислотный состав составляет α -элеостеариновой (28%), β -элеостеариновой (17%), линолевой (36%), олеиновой (4%) и насыщенные (18%). В то время как в масле семян *Centranthus macrosiphon* содержится α -элеостеариновая (52%), линолевая (35%), олеиновая (5%), стеариновая (3%), и пальмитиновая (5%) кислоты [44]. Масло семян *Valeriana officinalis* оказалось наиболее богатым источником α -элеостеариновой кислоты (44.6%) [44].

Семейство *Balsaminaceae*

Отличительной особенностью масла семян семейства *Balsaminaceae* является состав сопряженных октадекатетраеновых кислот, который представлен в основном α -паринаровой кислотой. Данная кислота была найдена в маслах семян всех видов семейства *Impatiens*. В работе [44] показано, что масло семян *Impatiens Glandulifera* содержит 17.4% α -паринаровой, 29.8% линолевой, 11.8% стеариновой, 8.8% пальмитиновой и 16.8% неидентифицированной кислоты. В другом виде *Impatiens Balsamina* жирнокислотный состав составляет: α - паринаровая – 30%, линолевая – 13%, олеиновая – 18%, α -линоленовая – 25% и насыщенные – 14% [45]. В другой работе [58] в масле семян *Impatiens Edgeworthii* с использованием УФ и ИК спектрометрий содержание α - паринаровой кислоты составило 48%.

Семейство *Rosaceae (Chrysobalanaceae)*

Основным представителем сопряженных кислот семейства *Rosaceae* является α -элеостеариновая кислота. Однако в масле семян *Parinarium* содержится не только α -

элеостеариновая кислота, но и конъюгированная октадекатетраеновая (паринаровая) кислота (Табл. 1.5).

Таблица 1.5.

Некоторые растения семейства *Rosaceae*, содержащие сопряженные кислоты

Вид	конъюгированная кислота	Другие жирные кислоты	Масличность	Ссылка
<i>Acioa edulis (cotia chestnut)</i>	$\alpha\text{Э}$ -7.3% 4-оксо-9Z,11E,13E- C18:3-19%	П-28.3%, С-6.8%, О- 26.5%, Л-8.8%	73.6	[51]
<i>Prunus spinosa</i>	$\alpha\text{Э}$: 10.63%,	П:7.56%, С: 2.48%, О:38.56%, Л:38.01%	-	[9]
<i>Prunus mahaleb</i>	$\alpha\text{Э}$ -38.32%	П:3.87%, С: 1.86%, О:31.29%, Л:22.96%-	31	[52]
<i>Prunus avium L.</i>	$\alpha\text{Э}$:9.9-13.2%	П:6.8-7.6%, С:1.6-2.6%, О:23.9-37.5%, Л:40-48.9%-	18	[53]
<i>Parinari insularum</i>	$\alpha\text{Э}$ -63.7%	-	65.2	[54]
<i>Parinari montana</i>	$\alpha\text{Э}$ -35.72%	П-10.73%, С:6.49%, О- 35.28%, Л-10.33%	56.8	[55]
<i>Parinari excelsa</i>	$\alpha\text{Э}$ -47%	П-8%, С-6%, О-28%, Л- 11%	62	[56]
<i>Chrysobalanus icaco</i>	$\alpha\text{Э}$ -22%, Pr-10% 4 охo-9Z,11E,13E,15Z C18:4-11	П-4%, С18%, О-11%, Л- 6%	51	[57]
<i>Prunus fruticose (Cerasus fruticose)</i>	$\alpha\text{Э}$ -9.7%	П-1.3%, С-4%, О-46.1%, Л-38.9%	-	[59]
<i>Parinarium laurinum</i>	$\alpha\text{Э}$ -9.7%, Pr-40.9%	П-3.4%, С-3.9%, О-1.9%, Л-1.8% C18:2-17.8%	-	[44]

Примечание: Pr - α -паринаровая и $\alpha\text{Э}$ – α - элеостеариновая кислоты

Семейство *Pomegranate*

Масло семян граната (*Punica granatum*), который относится к семейству *Pomegranate*, оказалось богатым источником пуниковой кислоты. Существует множество работ [45, 60 - 62], исследовавших жирнокислотный и ТАГ состав, а также применение этого масла. Результаты показывают, что масло образовано октадекатриеновой (55-86%), линолевой (2.5-10%), олеиновой (3-9%), пальмитиновой (1-3%) и стеариновой кислотами. Октадекатриеновые кислоты представлены в основном пуниковой и небольшими примесями α -элеостеариновой кислоты.

Семейство *Euphorbiaceae*

В семействе *Euphorbiaceae* имеется большое количество различных кислот, содержащих сопряженные двойные связи (Табл. 1.6). При этом основными представителями этих кислот является α -элеостеариновая кислота, а некоторые виды данного семейства содержат α -камлоленовую и паринаровую кислоты. Особенность масел семян ряда видов растений - наличие жирных кислот, содержащих гидроксильные группы, благодаря чему были обнаружены тетраацилглицерины – «эстолиды». В работе [64] с использованием метода MALDI-TOF MS показано, что масла семян *Mallotus philippensis* и *Trewia nudiflora* являются богатыми источниками эстолидов, которые образуются благодаря биосинтезу α -камлоленовой кислоты (18-гидрокси-D-9-цис, 11-транс, 13-транс октадекатриеновой кислоты).

Таблица 1.6.

Виды семейства *Euphorbiaceae*, содержащие сопряженные кислоты

Вид	конъюгированная кислота	Другие жирные кислоты	Масличность	Ссылка
<i>Vernicia fordii</i> (<i>Tung tree</i>)	α Э-67.69%, Пу-1.33%, β Э-11.27%	П-2.61%, С-2.13%, О- 6.57%, Л-7.07%	-	[9]
<i>Aleurites montana</i>	α Э: 61.2%, С18:3-2%	П:6.3%, С: 1.7%, О:9.0%, Л:18.7%	38.8	[63]
<i>Ricinodendron rautanenii</i> (<i>manketti</i>)	α Э-23.8%	-	42	[54]
<i>Trewia nudiflora</i>	α Э-6.4%, α -Ка-48.7%	П-4.9%, С-5.1%, О-8.4%, Л-12%	19.3	[64]
<i>Mallotus philippensis</i>	α Э-2.7%, α -Ка-51.7%	П-5.5%, С-3.2%, О-10.9%, Л-20.6%	-	[64]
<i>Aleurites trisperma</i>	α Э-39%	-	63.5	[65]
<i>Garcia nutans</i>	α Э-72.4%	-	53.83	[65]
<i>Sebastiania brasiliensis</i>	α Pr-32.5%	П-7.3%, С-4.4%, О-8.4%, Л-12%, α Лн-34	23.4- 26.3	[66]
<i>Ricinocarpos bowmanii</i>	α Э-60.9%	П-6%, С-3.4%, О-13.5%, Л-9.8%	38.5	[67]
<i>Ricinocarpus tuberculatus</i>	α Э-46.8%	П-7.8%, С-4.7%, О-17.5%, Л-15.7%	34.2	[67]

Примечание: α -Ка - α -камлоленовая и α Pr - паринаровая кислоты

Более того, масло семян *Sapium sebiferum* является интересным, поскольку оно содержит в дополнение к ряду высоконасыщенных триацилглицеринов также ряд эстолидов. В работе [68] показано, что масло содержит радикалы традиционных α -

линоленовой, линолевой, олеиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот и двух необычных алленовой о-гидрокси-5,6-октадиеновая и *транс*-2, *цис*-4-декадиеновой кислот.

1.2. Методы качественного и количественного определения сопряженных жирных кислот в растительных маслах

Для определения сопряженных жирных кислот в растительных маслах чаще всего применяют хроматографические методы, спектральные методы, а также гибридные методы анализа (Рис. 1.4). Сочетая различные аналитические методы, возможно качественное и количественное определение сопряженных жирных кислот с высокой точностью за короткое время.

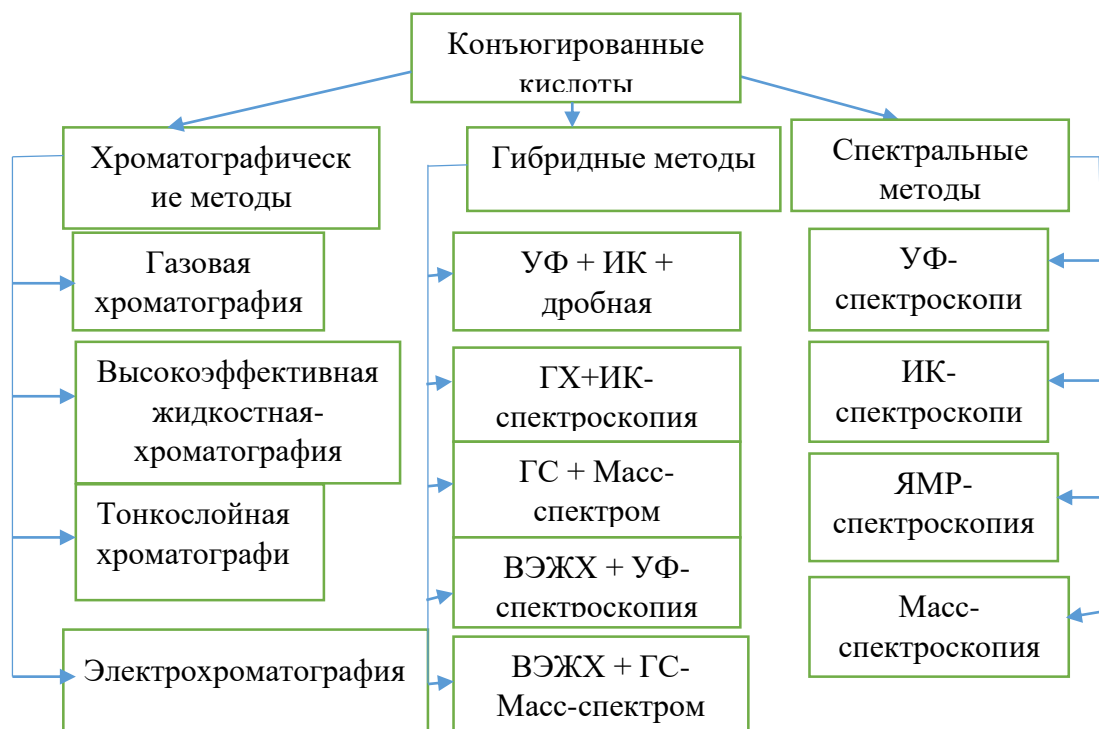


Рис. 1.4. Схема методов определения конъюгированных кислот

1.2.1. Метод, основанный на электронной спектроскопии поглощения

1.2.1.1. УФ - спектроскопия

Функциональные группы с высокой электронной плотностью, такие как карбонильные группы, нитро группы, двойные и тройные связи, сопряженные двойные облигации и т.д., сильно поглощают в ультрафиолетовой или видимой области спектра при характерных длинах волн и с высокими молярными коэффициентами экстинкции. Вследствие наличия карбоксильной группировки, все жирные кислоты показывают поглощение в дальней ультрафиолетовой области. В работе [69] найдены насыщенные

кислоты с широкой полосой поглощения около 205 нм ($\epsilon = 50$) и с сильным поглощением около 185 нм. Остаточное поглощение при 210 нм может быть использовано для детектирования производных любых кислот, но в случае полиненасыщенных кислот интенсивность поглощения вокруг в этом диапазоне сильно повышается. Гораздо больший спектроскопический интерес представляют конъюгированные полиеновые кислоты. Благодаря наличию хромофорной группировки сопряженные полиеновые кислоты способны интенсивно поглощать УФ-излучение. При этом УФ-спектры *транс-транс* изомеров поглощают в области меньших длин волн, чем *цис-транс* или *цис-цис* изомеры, а интенсивность максимумов поглощения в этом ряду уменьшается [70]. УФ спектры изомеров октадекадиен-9,11-овых и октадекадиен-10,12-овых кислот характеризуются максимумами поглощения при 230, 232 или 234 нм с конфигурацией для *транс-транс*-, *транс-цис* и *цис-цис*-изомеров, соответственно [71]. При изменении положения двойной связи (перемещение двойных связей в сторону карбоксильной группы, как, например, в случае декадиен-2,4-овой кислоты) максимум поглощения и интенсивности в спектре изменяются вследствие сопряжения диеновой группировки с карбоксильным радикалом [72].

Более того, спектры сопряженных триеновых кислот характеризуются наличием трех максимумов поглощения. С увеличением сопряжения двойных связей λ_{\max} движется в сторону видимого диапазона. В таблице 1.7 приведены спектральные характеристики этих кислот. Сопряженные диены имеют максимальную длину волны около 230 нм, триены около 270 нм и тетраены около 300 нм (Рис. 1.5). В работе [77] использовались электронные УФ спектральные свойства липидов как инструмент для их идентификации. При этом диодно-матричный детектор может быть очень полезен при использовании в хроматографии в качестве дополнительного инструмента для идентификации пика.

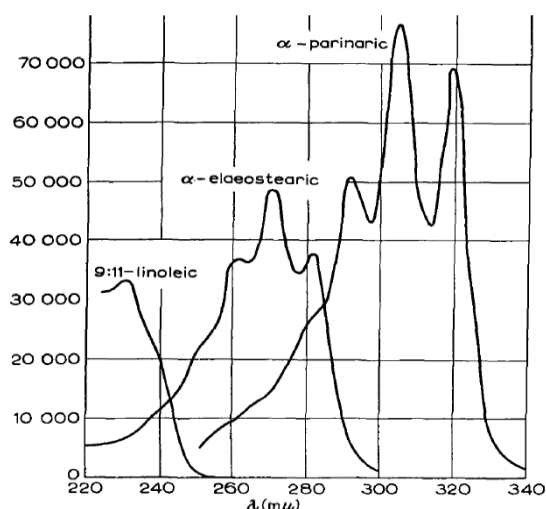


Рис. 1.5. Электронные спектры поглощения линолевой, α -элеостеариновой и α -паринаровой кислоты в этаноле [70]

Таблица 1.7.

УФ спектры C18 сопряженных кислот (λ max, нм)

Конфигурация	растворитель	λ макс (нм)	Молярный коэффициент поглощения	Ссылка
9, 11, 13				
E, E, E	Этанол	259; 268; 279	47000; 61000; 49000	[73]
	Циклогексан	259; 269; 280	40900; 56200; 42800	[70]
	Метанол	258; 268; 279	45100; 61200; 7300	[70]
Z,Z,Z	циклогексан	265.5; 275; 287	--; 47.800; --	[70]
Z, E, E	метанол	261; 271; 282	38900; 52800; 41200	[70]
	Этанол	261; 271; 281	36000; 47000; 38000	[73]
	циклогексан	262; 271.5; 283	36200; 48100; 37000	[70]
Z, E, Z	Этанол	264; 274; 285	35000; 46000; 36500	[73]
E, E, Z	циклогексан	262; 272; 283	--; 604*;--	[74]
18-ОН, 9,11,13				
Z, E, E	Этанол	261; 271; 282	40500; 52000;42000	[75]
E, E, E	Этанол	258; 268; 279	45000; 60000;47000	[75]
8, 10, 12				
Z, E, Z	циклогексан	265; 275; 287	--; 540*; --	[74]
E, E, Z	циклогексан	262; 272; 283	--; 902*; --	[54]
E, E, E	циклогексан	259; 269; 280	--; --; --	[50]
9,11,13,15				
Z, E, E, Z	Этанол	292; 305(304.2); 319	50500; 76700 (78000); 69200	[70, 76]
	циклогексан	293; 305; 319	50300; 77300; 69100	[70]
	Гексан	--; 304; 318.9	-; -; 78000	[76]
E, E, E, E	Этанол	288; 301 (299.4); 316	-; 81700 (89000); --	[70, 76]
	Гексан	--; 298.9; 313.5	--; 91000; --	[76]

* удельный молярный коэффициент $E_{1cm}^{1\%}$

1.2.1.2. ИК-спектр кислоты с сопряженными двойными связями

Важное место в установлении строения сопряженных полиеновых жирных кислот занимал метод инфракрасной спектроскопии (Табл. 1.8). В соответствии с литературными данными [78] олефины типа $RCH=CHR'$ характеризуются интенсивной полосой при $950-1100\text{ см}^{-1}$, обусловленной деформационными колебаниями *транс*-этиленовых водородных атомов. *Цис*-форма имеет полосу при $909 - 1000\text{ см}^{-1}$ и значительно более низкую интенсивность, а также полосы очень высокой интенсивности в области $620-730\text{ см}^{-1}$ и малой интенсивности в интервале $1600-1660\text{ см}^{-1}$. Первое систематическое исследование ИК спектров изомеров сопряженных диеновых кислот было проведено на примере метиловых эфиров декадиен-2,4-овых кислот и соответствующих декадиен-2,4-олов [79]. Их спектры незначительно отличались положением слабых полос в области валентных колебаний $C=C$ связей (1600 см^{-1}) и очень резко отличались в области деформационных колебаний $C-H$ связей при этиленовых атомах углерода ($940-1000\text{ см}^{-1}$) [72].

Таблица 1.8.

Коэффициенты экстинкции (К) C18-жирных кислот в области $900-1000\text{ см}^{-1}$ ИК спектров

Положения	конфигурация	$\nu_{\max}(\text{см}^{-1})^*$	К	Литер.
9	цис	968	0.124	[80]
	транс	968	0.601	[80]
9, 11	<i>Транс-транс</i>	987	1.270	[80]
	<i>Цис-транс</i>	950; 985	0.501; 0.453	[80]
10, 12	<i>Транс-транс</i>	988	1.300	[80]
	<i>Цис-транс</i>	950; 985	0.65; 0.485	[80]
9, 11, 13	Цис- транс-транс	965, 992	0,416; 1.425	[80]
	Транс-транс-транс	994	1.955	[80]
	Цис-транс-цис	981, 931	-	[81]
	Цис-цис-транс	987, 965, 942	-	[81]
8, 10, 12	Цис-транс-цис	982, 929	-	[81]
	Транс-транс-цис	987,955	-	[81]
	Транс-транс-транс	990	-	[81]
9,11,13,15	Цис-транс-транс-цис	998	2.80	[80]
	Транс-транс-транс-транс	952 994	0,483 1.55	[80]

* спектры в растворе в CS_2

Показано, что для *транс-транс*-изомера имеется только одна интенсивная полоса при $950-1010\text{ см}^{-1}$, в то время как в спектрах всех *транс-цис*-изомеров присутствует и другая несколько менее интенсивная полоса при $950-970\text{ см}^{-1}$. Полосы при $1600 - 1660\text{ см}^{-1}$ имеют значительно меньшую интенсивность и являются менее отличительными для изомерных диенов.

Аналогичные закономерности наблюдаются и в ИК спектре сопряженных триеновых и тетраеновых кислот. Все без исключения «полностью *транс*» кислоты имеют в ИК спектрах только одну интенсивную полосу в области $940-1000\text{ см}^{-1}$. Их изомеры, содержащие как *цис*, так и *транс*-этиленовые связи, имеют в ИК спектрах, как правило, два интенсивных пика в той же области и полосу в области $650-750\text{ см}^{-1}$, характерную для *цис*-этиленовой связи. При фотохимической изомеризации *цис-транс*-изомеров в «полностью *транс*» форме пик при 960 см^{-1} исчезает, а полоса при 1000 см^{-1} сдвигается до 970 см^{-1} . Таким образом, качественная оценка характера ИК спектров сопряженных полиеновых кислот позволяет установить, имеют ли они «полностью *цис*», «полностью *транс*» или *цис-транс*-конфигурацию.

Количественные соотношения *цис* и *транс*-этиленовых связей в сопряженных полиеновых кислотах могут быть определены измерением интенсивности полосы в области $970-1000\text{ см}^{-1}$, характерной для неплоских деформационных колебаний *транс*-водородов при двойных связях. Было установлено, что эта величина прямо пропорциональна числу *транс*-этиленовых связей в полиеновой цепи и является кратной интенсивности соответствующей полосы (968 см^{-1}) в спектре элаидиновой кислоты (при условии измерения на одном и том же приборе). В работе [79] показаны инфракрасные свойства метилового эфира конъюгированных кислот. Они поглощают в диапазоне $900-1100\text{ см}^{-1}$ с характерными пиками при $948, 968, 982, 988\text{ см}^{-1}$.

1.2.2. Хроматографические методы

Хроматографический метод является наиболее часто используемым современным методом для определения конъюгированных жирных кислот. Капиллярная газовая хроматография, ион-серебряная высокоэффективная жидкостная хроматография и обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией обеспечивают разделение изомеров сопряженных кислот, а также смеси ТАГ. В случае растительных масел сопряженные жирные кислоты распределяются в основном в молекуле ТАГ. Поэтому для определения их может быть предложено два

варианта – определение видового состава триацилглицеринов без химического модифицирования или определение высших жирных кислот (или их производных).

1.2.2.1. Газовая хроматография

Для разделения метиловых эфиров жирных кислот наиболее часто используют метод капиллярной газовой хроматографии [82]. При этом в начале должны быть превращены ТАГ в производные, обычно метиловые сложные эфиры, хотя возможны и другие сложные эфиры. Для переэтерификации наиболее часто используют два метода: кислотный и основной катализ реакции переэтерификации [83]. В методе основного катализа используются алкоголят-анионы, например, метилат натрия или калия в метаноле [84]. А кислотные катализаторы обычно включают раствор 5% безводного хлористого водорода в метаноле [85], раствор 1 - 2% концентрированной серной кислоты в метаноле или раствор 14% трифторида бора в метаноле [86]. Однако соединения с сопряженными двойными связями обладают высокой химической активностью, легко вступая в ряд превращений. Поэтому при таком превращении необходим тщательный контроль процесса, поскольку возможны потери некоторых высоко химически активных кислот [9, 87-89]. В работе [88] было установлено, что сопряженные октадекатриеновые кислоты были наиболее восприимчивым к изомеризации в условиях кислотного метилирования. В указанной работе были предложены условия для оптимизации метилирования с использованием кислотного или основного катализа для минимизации продуктов, полученных за счет изомеризации. При использовании кислотного катализа изомеризация зависит от температуры и времени процесса метилирования. Реагент метилирования BF_3 /метанол вызывал большую изомеризацию, чем H_2SO_4 /метанол. Было установлено, что использование H_2SO_4 /метанола при 40°C в течение 10 мин наиболее целесообразно для избежания изомеризации. В случае основного катализа метилирование в MeONa /метанол при 40°C в течение 10 мин может минимизировать изомеризацию сопряженных октадекатриеновых кислот. В другой работе [9] во избежание потери конъюгированных триеноатов получение метиловых эфиров проводили с $0.5\text{M CH}_3\text{ONa}$ - CH_3OH в течение 10-12 часов при комнатной температуре в атмосфере азота для анализа масел, содержащих конъюгированные триеноаты. *Ostrowska* и другие [90] показали, что использование кислотного и основного катализа, включая раствор HCl и BF_3 / метанол, тетраметилгуанидин / метанол и триметилсилилдиазометан, вызывают изомеризацию сопряженных диеновых кислот.

При газовой хроматографии для разделения метиловых эфиров используются капиллярные колонки с различной степенью полярности (Рис. 1.6). При этом для

разделения метиловых эфиров высших жирных кислот подходят колонки *Carbowax* (полиэтиленгликоль под разными торговыми названиями) с различной степенью полярности и высокополярные колонки, например, CP-Sil 88™, VPX70™ или SP-2340™. Также сообщалось [91, 92], что для разделения изомерных сопряженных октадекадиеновых радикалов могут быть использованы длинные полярные колонки, например, CP-Sil 88™ [93], VPX70™ [94] или SP-2560™ [95]. При этом указанные изомеры элюируются после несопряженных диенов. Позиционные изомеры эфиров появляются в порядке: C18:2^{9Z,11E} < C18:2^{8E,10Z} < C18:2^{11Z,13E} < C18:2^{10E,12Z} [96, 97]. В работах *Sassano G.* и др. [69, 61] разделили изомеры сопряженных октадекатриеновых кислот в масле граната при использовании метода ГС-МС с колонкой CP-Sil88 CB 50м. Капиллярная ГХ-ИК-Фурье и ГХ-МС являются ценным инструментом для идентификации позиционных изомеров и изомеров конфигурации двойной связей жирных кислот.



Рис. 1.6. Порядок элюирования метиловых эфиров жирных кислот на колонках ГХ различной полярности

Капиллярная газовая хроматография в сочетании с масс-спектрофотометрией представляет собой эффективный и высоко чувствительный метод. При масс-спектрофотометрическом детектировании имеется два типа производных эфиров для определения расположений двойных связей: 4-метил-1,2,4-триазолин-3,5-диона (MTAD), образованный реакцией Дильса-Альдера конъюгированных двойных связей с диенофилом [98] (Рис. 1.7) и 2-алкенил-4,4-диметилпиперазин (DMOX) [51] (Рис. 1.8).

Масс-спектры производных DMOX очень удобны для определения размещения двойной связи в молекуле [99], особенно в полиненасыщенных и сопряженных систем [51, 55, 100, 101]. Хорошие хроматографические свойства производных DMOX позволяют эффективно решать сложные смеси.

Кроме того, капиллярная газовая хроматография используется для определения состава ТАГ. При этом для разделения видового ТАГ в масле обычно используются капиллярные колонки длиной 10-25 м и диаметром 0,25-0,32 мм и термостойкостью до 380°C [102, 103]. Разделение ТАГ с различными молекулярными массами выполняется на неполярной колонке с 1-5% фенильным покрытием [104].

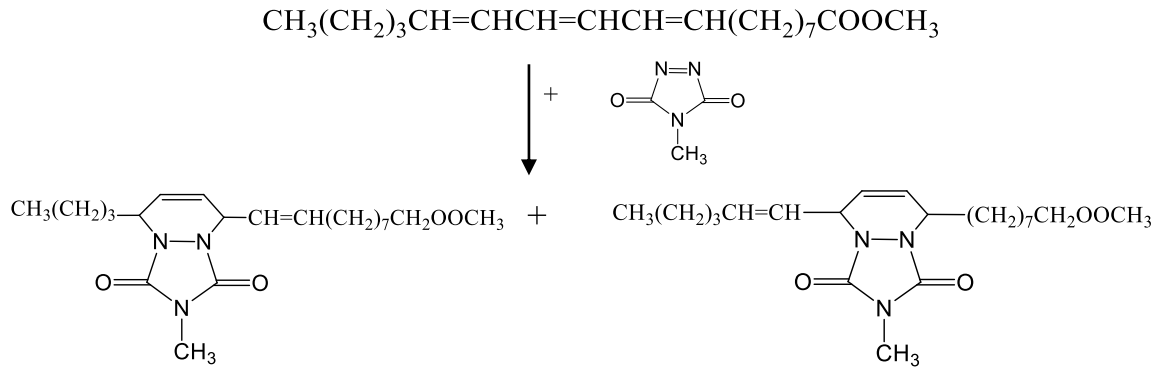


Рис. 1.7. Получение производного 4-метил-1,2,4-триазолин-3,5-диона (MTAD) [98]

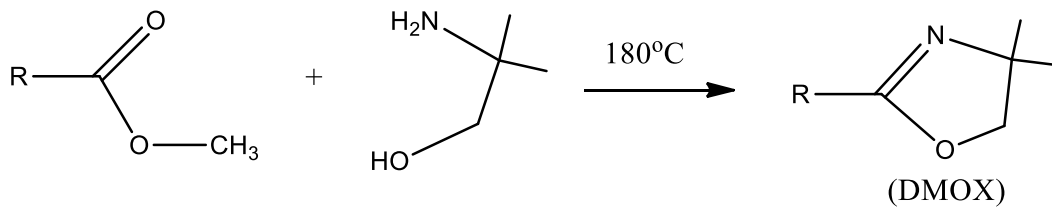


Рис. 1.8. Получение производного 4-метил-1,2,4-триазолин-3,5-диона [99]

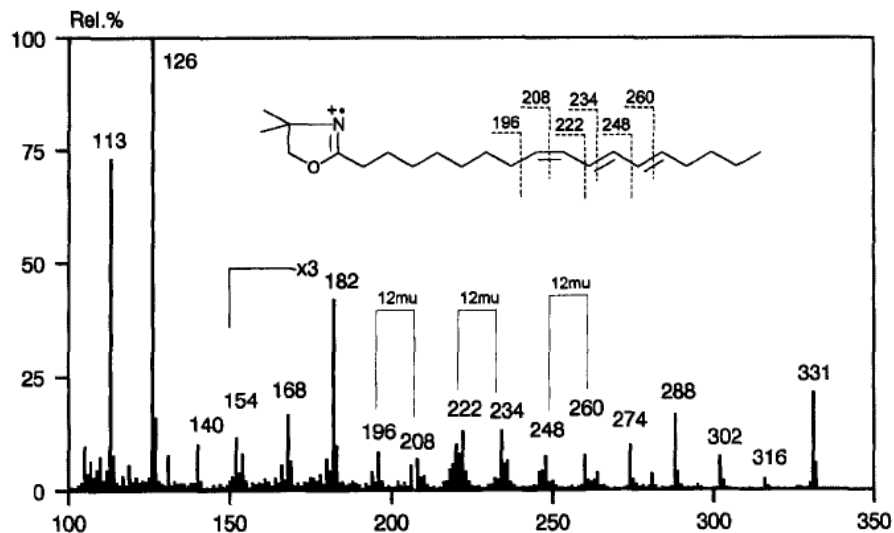


Рис. 1.9. Масс-спектры DMOX-производные α -элеостеариновой кислоты

Разделение ТАГ на полярных колонках с 65% фенильным покрытием и на среднеполярных колонках с 50% фенильным покрытием имеет дополнительные разрешения в зависимости от степени ненасыщенности [105–107] и положения и конфигурации двойных связи в радикалах жирных кислот [51, 108]. Высокомолекулярные ненасыщенные виды ТАГ, такие как Лн₃, легко разрушаются при высокой температуре, поэтому применение этого режима ограничено для сильно ненасыщенных масел [109].

1.2.2.2. Ион-серебряная высокоэффективная жидкостная хроматография

Ион-серебряная высокоэффективная жидкостная хроматография (Ag^+ -ВЭЖХ) является распространенным методом для анализа изомеров сопряженных кислот. В модели Deware-Chatte-Duncanson первая донорно-акцепторная связь (σ -связь) образуется перекрытием связывающей π -орбитали олефина с вакантной s-орбиталью иона серебра. Вторая связь π -связь образуется за счет перекрывания несвязывающей π -орбитали олефина с заполненной d-орбиталью иона серебра [110].

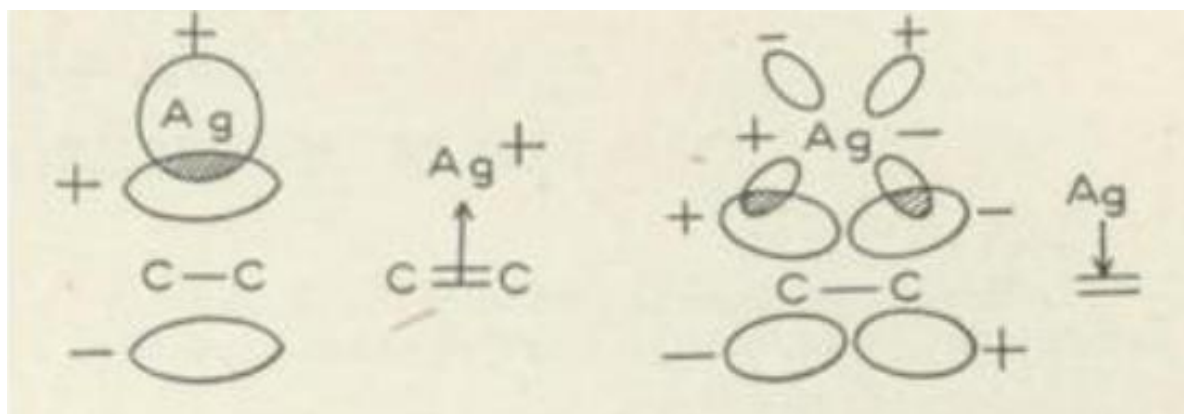


Рис. 1.10. Описание комплексной связи между ионами серебра и двойными связями по модели Deware-Chatte-Duncanson [111]

Устойчивость π -комплексов зависит от количества, типа, геометрии и положения двойных связей в молекуле аналитов. Связывание в комплексе будет зависеть от наличия электронов на заполненных орбиталях и от интегралов перекрывания этих орбиталей, определяющихся стерическими факторами. При ион-серебряной хроматографии стабильность комплексов возрастает с увеличением числа двойных связей; *цис*-изомеры удерживаются сильнее, чем *транс*-изомеры, прочность взаимодействия уменьшается с увеличением длины цепи; но при начальном росте расстояния между двойными связями увеличивается, а затем (при дальнейшем росте) уменьшается. Взаимодействие сопряженных двойных связей с ионами серебра более слабое, чем взаимодействие несопряженных двойных связей, по-видимому, из-за делокализации π -электронов в

сопряженных двойных связях [110, 112]. Большую стабильность *цис*-изомера можно отнести либо к снятию напряжения, когда комплекс образуется, либо к стерическому затруднению со стороны двух громоздких групп. Конъюгированные полиены образуют менее стабильные комплексы, чем комплексы с метилен-разделенными двойными связями, и стабильность увеличивается с увеличением расстояния между двойными связями, возможно, потому, что в последнем случае может образовываться хелатный комплекс.

Для Ag^+ -ВЭЖХ наиболее часто используется два основных типа колонок: колонки *Nucleosil SA* [113], или *ChromSpher 5*, насыщенные ионами серебра [114]. Для разделения изомеров метиленовых эфиров жирных кислот обычно используют два системы элюентов [115 – 118]:

- i. гексан или гептан с небольшим количеством ацетонитрила (АЦН) и/или уксусной кислоты, или
- ii. гексан, ацетон, дихлорметан и/или АЦН.

В работе [116] с использованием трех колонок *ChromSpher 5*, соединенных последовательно, и изократического режима системы 0.1 % ацетонитрила в гексане разделили сложную смесь изомеров сопряженных октадекадиеновых кислот. В другой работе [119] *Y. Cao* и др. были успешно разделены 8 изомеров сопряженных октадекатриеновых кислот при использовании 0.1 % ацетонитрила в гексане. Результаты подтверждены методом ГХ-МС и ЯМР ^{13}C , ^1H , ^{13}C - ^1H COSY.

Стоит отметить, что Ag^+ -ВЭЖХ оказалась мощной технологией для разделения изомеров триацилглицерина. Элюенты с хлорсодержащими растворителями и ацетонитрилом, имеющим высокое сродство с ионном серебра часто используются как модификаторы подвижной фазы на основе *n*-гексана. *Joh* и др. [120] с использованием колонки *NucleosilTM 5 SA* (4.6x250 мм), насыщенной ионами серебра и системы растворителей дихлорметан/1,2-дихлорэтан/ацетон/ацетонитрил, разделили ТАГ масла семян момордики харантия. В работе [121] *R. Adlof* использовал колонку *ChromSpher Lipids* и изократические системы растворителя (от 0.3 до 0.7 %) ацетонитрила в *n*-гексане для разделения некоторых пар ТАГ, имеющих одинаковое число двойных связей. В другой работе [121] *M. Lisa* успешно разделила позиционные изомеры ТАГ с использованием трех колонок *ChromSpher Lipids* (250 мм × 4,6 мм, 5 мкм) в градиентном режиме – изопропанол, ацетонитрил в гексане. Компоненты элюируются в следующем порядке:

SSS> SSM> SMM> SSD> MMM> SMD> MMD > MMD> SDD= SST> MDD= SMT> MMT>
DDD=SDT> MDT>= STT > DDT > MTT> DTT> TTT,

где S, M, D и T обозначают насыщенный, моно-, ди- и триеновые кислоты соответственно (без дифференциации их положения в молекуле ТАГ).

Сочетание ОФ ВЭЖХ и Ag^+ -ВЭЖХ в двухмерной хроматографии с использованием либо online [122], либо offline режима [123, 124] обещает идентификацию наибольшего числа ТАГ в сложных смесях.

Кроме того, колонки с силикагелем, импрегнированным ионом серебра использовали для разделения ТАГ. Однако этот вариант имеет множество ограничений: во-первых, срок службы колонки был ограничен элюированием ионов серебра подвижной фазой, во-вторых, ионы серебра могут повреждать детектор, а также загрязнять фракции, полученные после разделения. Другим недостатком является то, что этот тип колонки коммерчески недоступен.

Метод Ag^+ -ВЭЖХ успешно использовали в обращено-фазовой жидкостной хроматографии с использованием ионов серебра в подвижной фазе для препаративного разделения ТАГ [125, 126]. Наилучшее разделение было получено для разделения ТАГ в подвижной фазе, содержащей 0.15-0.20 М раствор AgNO_3 [127]. Увеличение концентрации ионов серебра приводило к уменьшению удерживания и к увеличению R_s . Концентрация уксусной кислоты практически не сказывалась на удерживания аналитов [128]. Однако следует учитывать возможность осаждения металлического серебра в хроматографической системе. Поэтому необходимо тщательно очищать хроматографическую систему после использования, и не оставлять серебросодержащие растворы в длительном контакте с ячейками детектора.

1.2.2.3. Обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

Метод обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) был также применен для разделения жирных кислот или метиленовых эфиров кислот. Однако, этот метод имеет ограничения при разделении сложных смесей геометрических изомеров жирных кислот. Разделение несопряженных и некоторых сопряженных жирных кислот может быть реализовано с использованием колонки C18. В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил / вода / уксусная кислота (70: 30: 0.12 % об.) для достижения оптимального разделения [129, 130]. В работе [9] использовали колонку 250 см x 4,6 мм *Zorbax ODS* и элюент ацетонитрил / H_2O (4:1, об/об) для разделения смеси конъюгированных октадекатриеновых кислот. А в работе [39] метиловые эфиры жирных кислот разделены на колонке *ChromSpher TM C18* (3 μm , 100 x 4.6 мм) с использованием ацетонитрил / вода (80:20, об / об) при скорости потока 1 мл / мин.

Однако, в соответствии с литературными данными при превращении ТАГ в производные эфиры для определения жирнокислотных составов возможны потери некоторых высоко химических активных веществ. Таким образом, результаты расчета жирнокислотного состава масла могут включать ошибки. Более этого при этом превращении теряется информации о распределении жирных кислот по триацилглицеринам - характеристики чувствительны к целому ряду фальсификаций. Альтернатива методу – контроль видового состава ТАГ без химического модифицирования масла с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для разделения ТАГ использовали стационарные фазы с различной длиной привитого радикала, но наиболее часто используются C18-фазы. Стандартную колонку 250×4.6 мм с размером частиц 5 мкм можно легко заменить колонкой 100×3 мм с размером частиц 3 мкм, с экономией времени анализа и растворителя и без потери разрешения. В самом деле, вариант ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием колонки 100×2.1 мм с размером частиц 1.7 мкм дали отличные результаты разделения ТАГ в сочетании с масс-спектрометрией [131] или с детектором по светорассеиванию [132]. Для подвижной фазы ацетонитрил является наиболее широко используемым органическим растворителем, который может быть заменен на пропионитрил. Обычно ацетон, *n*-гексан, изопропанол, дихлорметан, тетрагидрофуран или метил-*трет*-бутиловый эфир были предложены в качестве органических модификаторов, обеспечивая хорошее разделение сложных смесей ТАГ [133].

При анализе триацилглицеринов методом обращено-фазовой хроматографии трудности связаны с детектированием ТАГ. Наиболее часто используются рефрактометрический и спектрофотометрический детекторы [134]. Недостаток альтернативных высокоэффективных вариантов детектирования – по светорассеиванию [135] и по анализу масс-спектров [136, 137] связан с дороговизной оборудования. Рефрактометрический детектор используется только в изократических условиях элюирования. Этот детектор очень чувствителен к колебаниям температуры, и имеет низкую чувствительность [138]. Некоторые авторы использовали детекторы на основе инфракрасного поглощения для определения ТАГ. Инфракрасный (ИК) детектор использовался в спектральной области карбонильной функции (от 1650 до 1860 см^{-1}) [139]. Хотя этот детектор подходит для градиентного режима, но при этом обычно наблюдается большой шум базовой линии [140, 141]. Спектрофотометрический детектор в УФ области (от 200 до 237 нм) использовался в градиентном режиме [142], но в этом

случае многие растворители (например, хлороформ, ацетон, толуол или этилацетат поглощают сильно) не могут быть использованы в качестве модификаторов подвижной фазы из-за поглощения света. Пламенно-ионизационный детектор может быть использован со всеми типами летучих растворителей и при градиентном элюировании, хотя чувствительность снижается [143]. Масс-спектрометрический детектор является неоценимым средством как для обнаружения, так и для идентификации триацилглицеринов [68]. При этом ионизация при атмосферном давлении (APCI) хорошо подходит для идентификации компонентов [144, 145].

Одной из наиболее сложных областей исследований методом ОФ ВЭЖХ для определения ТАГ является идентификация пиков на хроматограмме. К настоящему времени для идентификации ТАГ используется анализ относительного удерживания, основанный на введении различных вариантов эквивалентных углеродных чисел (ECN) [146], или в ряде случаев более удобный метод инкрементной модели [147]. Отнесение ТАГ в ОФ ВЭЖХ на основе анализа отношения удерживания ТАГ с их структурами.

Соотношение между структурами и удержанием молекул ТАГ при ОФ ВЭЖХ

В соответствии с литературными данными [148] порядок элюирования ТАГ при ОФ ВЭЖХ определяется основными структурными элементами: длиной углеродного скелета и степенью ненасыщенности и/или наличием полярных функциональных групп. Удерживание соединений, имеющих одинаковую степень ненасыщенности или одинаковые полярные группы, должно увеличиваться с длиной цепи (увеличение количества метиленовых групп или атомов углерода) [149]. В случае полярных функциональных групп удерживание уменьшается с ростом их числа, потому что, во-первых, площадь гидрофобных контактов со связанными цепями уменьшается, а во-вторых, полярные взаимодействия с подвижной фазой становятся сильнее. Эффект ряда функциональных групп, которые могут существовать в жирных кислотах, был представлен в следующем порядке (уменьшение удерживания) [150]:

кетон- < гидрокси-эпоксидная << тройная связь < цепь на две метиленовые группы
короче < циклопропенил- < двойная связь < циклопропанил.

Легкость поляризации двойных связей вызывает уменьшение удерживания, поскольку двойные связи участвуют в полярных взаимодействиях с подвижной фазой и изменяют конформацию остатков жирных кислот и ослабляют притяжение между ними и углеводородными цепями стационарной фазы [151]. Была предложена теория, которая связывает удерживание со структурами радикалов жирных кислот, чтобы предсказать их удержание, если структура известна, или предсказать структуру, если известно удержание.

Wada и др. [152] предложили концепцию «чисел распределения» (partition number, PN), рассчитанный по формуле $PN = CN - 2 \times DB$, где CN: сумма числа атомов углерода в трех радикалах кислот в ТАГ, и DB количество двойных связей в них. Удерживание триацилглицеринов увеличивается с увеличением PN. И пики, имеющие одинаковое значение PN образуют «критические пары» или «проблемы пары» (например, пары ЛОП и ЛО₂, ОП₂ и П₃ и др.), полное разделение которых труднодостижимо.

С постепенным совершенствованием инструментария были разработаны несколько концепций, которые более точно представляют взаимосвязь между структурой и удерживанием. В работе [153] введена величина ECN (эквивалентные углеродные числа). ECN определяли по графикам зависимости времени удерживания от числа атомов углерода в ТАГ, с градуировкой по ТАГ, образованным радикалами насыщенных жирных кислот в условиях изократического элюирования. Зависимость значения ECN от CN описывается уравнением:

$$ECN = CN - a \times DB$$

где a - величина, определенная экспериментально, близкая, но не равная 2.

Удерживание ненасыщенных триацилглицеринов было рассчитано по этому уравнению, и значение ECN ненасыщенных триацилглицеринов является нецелыми числами.

Компоненты с одинаковым PN имели разные значения ECN. Очевидно, что концепция ECN не учитывает:

- 1) распределение атомов углерода между остатками жирных кислот,
- 2) распределение двойной связи между цепями жирных кислот,
- 3) положение и конфигурацию двойных связей внутри цепи и
- 4) позиционное распределение остатков жирных кислот в молекуле.

Было предложено несколько подходов, в которых учитываются особенности ацильных остатков. *Podlaha u Toregard* [154] предполагали другой вариант для расчета значения ECN. Значение ECN данного триацилглицерина в качестве суммы «частичного» ECN трех радикалов жирных кислот в молекуле ТАГ.

$$ECN_{ABC} = ECN(A) + ECN(B) + ECN(C) = ECN(A_3)/3 + ECN(B_3)/3 + ECN(C_3)/3.$$

EI-Hamdi u Perkins [151] учитывали ацильные остатки, исправляя ECN фактором U_j , который представляет собой сумму экспериментально определенных инкрементов (постоянную для данной стационарной и подвижной фазы и менее 1) для каждого из трех остатков жирных кислот. Новое значение было обозначено теоретическим углеродным номером (TCN); $TCN = ECN - (\sum U_j)$. Значения U_j определялись числом различных двойных связей и составляли: 0.0 для насыщенных, 0.2 для *транс*-9-C18:1, 0.6-0.65 для

цис-9-C18:1 и 0.7-0,8 для *цис*-9, *цис*-12-C18: 2, 0.39 для *цис*-9, *цис*-12 [151], *цис*-9, *цис*-12-*цис* -15-C18:3 [143]. При этом ряд элюирования ТАГ увеличивается с увеличением значения TCN.

В альтернативном подходе *Sempore* [155] применил принцип аддитивности свободных энергий сольватации и предположил, что относительное время удерживания ТАГ α_i (реперное вещество Л₃ триолеат), состоящего из кислот А, В и С, может быть описано уравнением:

$$\lg\alpha(ABC) = \lg\alpha(A) + \lg\alpha(B) + \lg\alpha(C) = \lg\alpha(A_3)/3 + \lg\alpha(B_3)/3 + \lg\alpha(C_3)/3.$$

Используя этот подход, *Sempore* и др. идентифицировали 84 ТАГ в арахисовом масле.

Рассматривая ту же концепцию, *Stolyhwo* и др. [156] предположили, что относительное время удерживания может быть определено по формуле:

$$\lg\alpha(ABC) = b \times (CN_A + CN_B + CN_C) + a.$$

Коэффициент b не является одинаковым для насыщенных и ненасыщенных триацилглицеринов. Значение b будет одинаковым для гомологичного ряда метиловых эфиров жирных кислот и триглицеридов. a - вклад функциональной группы. Для триглицеридов существуют два типа групп: сложноэфирные группировки и двойные связи. Применяя принцип аддитивности групповых вкладов в свободные энергии, можно написать: $a = a_1 + a_2$ где a_1 представляет собой вклад трех сложноэфирных групп глицерина, и a_2 представляет собой вклад ненасыщенных связей, присутствующих в алкенильной цепи (a_2 является отрицательным, поскольку ненасыщенные триглицериды удерживаются слабее, чем соответствующие насыщенные радикалы). В работе [157] представлен метод для прогнозирования времени удерживания триацилглицеринов в неводной обращенной фазе. При этом они использовали экспериментальные данные времени удерживания стандартных ТАГ и учет вклада функциональных групп, присутствовавших в молекуле ТАГ для прогнозирования времени удерживания других ТАГ. Результаты показали, что вклад функциональных групп радикалов в положении *sn*-2 выше, чем в положении *sn*-1 (3), особенно для полярных функциональных групп, таких как гидроксильная группа.

Takahashi и др. [158, 159] использовали принципы аддитивности химических потенциалов с использованием «матричной» модели. Метод учитывает длину углеродных цепей в радикалах кислот, количество двойных связей и функциональных групп в молекуле.

Однако параметр ECN или TCN может быть использован только лишь в качестве приблизительной характеристики удерживания ТАГ, поскольку они зависят от состава подвижной фазы и от марки сорбентов. Разработка анализа относительного удержания

[160] была направлена на то, чтобы избежать зависимости от состава подвижной фазы. В этом подходе удерживание вещества имеет две параметрические зависимости:

$$\log k(i) = a_0 + a_1 \times \log k(A)$$

где $k(i)$ – фактор удерживания вещества i , $k(A)$ – фактор удерживания реперного вещества A .

Дейнека В.И. предполагает инкрементный подход [147], использующий вклады функциональных групп для расчета изменения удерживания вещества при замене радикалов двух жирных кислот в соответствующих парах ТАГ, если при этом остальные два радикалов в каждой из молекул остаются неизменными:

$$\Delta(i \rightarrow j) = \lg k(j) - \lg k(i).$$

Инкремент $\Delta(i \rightarrow j)$ не зависит от природы оставшихся двух неизменных заместителей, но зависит от состава подвижной фазы. Для данной хроматографической системы инкременты при замене радикала кислоты C другим радикалом кислот D двух ТАГ, состоящего из кислот A , B , C и D , определяются уравнением:

$$\Delta(C \rightarrow D) = \lg k(ABD) - \lg k(ABC)$$

Таким образом, для расчета удерживания всех 20 ТАГ, состоящих из кислот A , B , C и D , необходимо и достаточно указать удержание реперного вещества (например, A_3) и трех значений: $\Delta(A \rightarrow B)$, $\Delta(B \rightarrow C)$ и $\Delta(C \rightarrow D)$. С использованием инкрементов $\Delta(L_n \rightarrow L)$, $\Delta(L \rightarrow O)$, $\Delta(O \rightarrow П)$ и $\Delta(П \rightarrow C)$, рассчитанных времени удерживанием стандартного масла Дейнека В.И. и др. определили состав видового ТАГ более 100 различных растений [160 - 163]. Кроме того, в жидкостной хроматографии удерживание вещества зависит не только от взаимодействия «сорбат - сорбент», но и от взаимодействий «подвижная фаза – сорбат» и «подвижная фаза – сорбент». По этой причине в ОФ ВЭЖХ для определения ТАГ Дейнекой В.И. предложено использовать двухпараметрическую систему индексации:

$$\lg k(B) = b + a \times \lg k(A)$$

в которой между удерживанием ТАГ B относительно удерживания ТАГ A (реперное вещество), существует двухпараметрическая зависимость, зависящая от величины интерсепта b и наклона a прямой линии тренда [164]. При таком подходе нет необходимости в тщательном приготовлении подвижной фазы строго заданного состава. Уравнение относительного удерживания хорошо воспроизводится для стационарных фаз многих производителей. Если на один график нанести линии трендов для всех веществ смеси, то получается «карта разделения», которая позволяет оценить разделительную способность выбранной хроматографической системы [165]. Развитие метода с введением понятия «точки конвергенции» позволило объяснить ограниченные

возможности однопараметрического подхода к индексации удерживания в жидкостной хроматографии и преимущества двухпараметрической индексации, которая в случае веществ с высокой гидрофобностью позволяет переносить параметры уравнений относительного удерживания даже между стационарными фазами различных производителей. Более того, предложен метод анализа, позволяющий оценивать число двойных связей в жирнокислотных радикалах триглицеридов по координатам точки конвергенции.

Таблица 1.9.

Хроматографические условия для разделения ТАГ, содержащих сопряженные двойные связи в растительных маслах

метод	Условия определения
	Масло <i>Trichosanthes kirilowii</i> и Масло <i>momordica charantia</i>
ОФ ВЭЖХ [39]	<ol style="list-style-type: none"> 1. колонка: ChromSpher™C18 (3 μм, 100×4.6 мм), температура колонки: комнатная температура 2. элюент: дихлометан/ацетонитрил (20:80 об. %), скорость ПФ: 1мл/мин 3. детектор: спектрофотометрический (λ = 205 нм) 4. идентификация пиков: каждую фракцию собирали и переметилированы, потом анализированы методом ГХ.
Ag ⁺ - ВЭЖХ [120]	<ol style="list-style-type: none"> 1. колонка: Nucleosil™5SA, 250×4.6 мм, температура колонки: комнатная температура 2. градиент элюента: 1,2-дихлоэтан/дихлометан (1:1) (А); ацетон (В); ацетон/ацетонитрил (9:1) (С): от 100% растворителя А до 50% А и 50% В в течение 5 мин. Потом 20% А и 50% В и 30% С – 60 мин; 50% В и 50% С - 5 мин, скорость ПФ: 1 мл/мин 3. детектор: детектор светорассеяния DDL21 4. идентификация пиков: Каждый пик собран и переметилирован, потом анализированы методом ГХ
Масло <i>Vernicia fordii</i> и Масло <i>momordica charantia</i>	

ОФ ВЭЖХ [36, 168]	<ol style="list-style-type: none"> 1. колонка: 3 колонки Supelco C18 (150×4.6 mm) 2. элюент: ацетон/ацетонитрил (3:1 об. %), скорость ПФ: 1 мл/мин 3. детектор: рефрактометрический детектор 4. идентификация пиков: использование стандартных ТАГ; Пики были собраны и переметилированы, потом анализированы методом ГХ
<i>Масло Gynostemma pentaphyllum</i>	
Ультра ВЭЖХ [41]	<ol style="list-style-type: none"> 1. колонка: ACQUITY колонка UPLC ВЕН C18 (1.7 μm, 100×2.1 мм), температура колонка: 40°C 2. градиент элюента: ацетонитрил/изопропанол (90:10) (А); ацетонитрил/изопропанол (45 : 55) (В): от 10 % В до 30 % в течение 20 мин; до 90 % В в 22 мин, скорость П.Ф: 0.3 мл/мин 3. детектор: тандемный масс-спектрометрический 4. идентификация пиков: фрагменты $[M+H]^+$, а также диацилглицериновые фрагменты $[M-RCO_2]^+$.
<i>Масло Prunus avium</i>	
ОФ ВЭЖХ [53]	<ol style="list-style-type: none"> 1. колонка: Merck Lichrosorb C18 (250×4 мм) 2.1 для рефрактометрического детектора: элюент: ацетон/ацетонитрил (2:1); скорость ПФ: 0.8 мл/мин 2.2. Для детектора по светорассеиванию, масс-спектрометрического и диодно-матричного ультрафиолетового (УФ) детектор (Waters 990): градиент элюента: ацетон/изопропанол (55:45) (А); изооктан (В): 100% А - в течение 5 мин; от А/В (100:0) до (90:10) в 35 мин; скорость, скорость П.Ф: 1 мл/мин 3. Идентификации пиков с помощью ГХ-МС, ^1H-NMR, $^{13}C-NMR$
<i>Масло pomegranate</i>	
ОФ ВЭЖХ [61]	<ol style="list-style-type: none"> 1. колонка ACE[®] 5 C18 (5 μm, 250×4.0 мм) 2. элюент: ацетон/ацетонитрил (25:75 % об.), скорость ПФ: 1 мл/мин 3. детектор: диодно-матричный детектор (215 нм) 4. идентификации пиков: каждый пик собран и переметилирован, потом анализированы методом ГХ-МС

ОФ ВЭЖХ [62]	1. колонку Kromasil 100-5C18 (250×4.6 мм), температура колонка: 30°C 2. элюент: дихлометан/ацетонитрил (20:80) + 0.4 об. % триэтиламина, скорость П.Ф: 1мл/мин 3. детекторы: диодно-матричный (270 нм) и масс-спектрометрический. 6. идентификации пиков: использование инкрементного подхода и электронный спектр. Отнесение пиков подтверждено анализом масс-спектров
Масла семейства <i>Rosaceae</i>	
ОФ ВЭЖХ [59]	1. колонку Kromasil 100-5C18 (250 x 4,6 мм), температура колонка: 30°C 2. элюент: изопропанол/ацетонитрил для УФ детектора и ацетон/ацетонитрил (25:75%) для РФ детектора, скорость П.Ф: 1мл/мин 3. детектор: Рефрактометрический и спектрофотометрический (280нм). 4. идентификации пиков: использование инкрементного подхода и комбинации двух детектора

Масс-спектрометрия является мощным аналитическим инструментом, который может предоставить информацию о структуре соединений. В оптимальных условиях он может обеспечить данные о молекулярных массах протонированных молекулярных ионов $[M + H]^+$ ТАГ, а также их продуктов их частичной фрагментации - диацилглицериновых ионов, $[M - RCOO]^+$, позволяющих идентифицировать жирные кислоты, присутствующие в каждом виде ТАГ [68, 144, 166]. Химическая ионизация при атмосферном давлении представляет собой сравнительно недавний метод масс-спектрометрической ионизации, который имеет значительный потенциал для комбинированного анализа ВЭЖХ и МС, особенно это касается неполярные соединения как ТАГ.

Существует также метод, в котором объединена ОФ ВЭЖХ с газовой хроматографией для анализа жирных кислот в пиках, собранных на выходе из колонки [167]. Этот вариант трудоемкий, поскольку он требует сбор пиков, этерификации и, наконец, разделения метиловых эфиров жирных кислот методом ГХ. Кроме того, ТАГ с радикалами сопряженных двойных связей легко обнаруживаются обычным спектрофотометрическим детектированием. При этом диодно-матричный детектор является благоприятными из-за возможности регистрации электронных спектров, являющихся ортогональными (относительно времени удерживания) свойствами для идентификации веществ. В работе [59] использовали ортогональные свойства (время удерживания и электронный спектр) для определения видового ТАГ в некоторых маслах семян граната. Справедливость инкрементного подхода была подтверждена анализом полученных масс-спектрометров.

1.2.2.4. Тонкослойная хроматография

Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) обычно используют для разделения липидов на классы [169]. Для этого наиболее часто используют три типа ТСХ, включающих нормально-фазовую ТСХ (НФ-ТСХ) [170], обращено-фазовую ТСХ (ОФ-ТСХ) [171] и ион-серебряную ТСХ (Ag^+ -ТСХ) [172].

Таблица 1.10.

Разделение жиров методом ТСХ

Образцы	Хроматографические условия
ТАГ молочных жиров [177]	ПФ: хлороформ / толуол, 1: 1, Пластинки с силикагелем, пропитанные солями серебра (Ag^+ -ТСХ)
Изомеры диацилглицеринов [178]	Двумерная тонкослойная хроматограмма: первое направление: (Ag^+ -ТСХ) в элюенте хлороформ / изопропанол (99 : 1 об.%), насыщенные AgNO_3 . Второе направление: (Ag^+ -ОФ-ТСХ) 5% (мас. %) в элюенте - раствор борной кислоты в метаноле, насыщенный нитратом серебра и <i>n</i> -тетрадеканом.
ТАГ масла семян хлопкового [176]	Пластинки <i>Kieselguhr G</i> (ОФ-ТСХ): ПФ - ацетон / ацетонитрил (7:3 об.). Для Ag^+ -ТСХ: ПФ - петролейный эфир / ацетон / этилацетат (100:4:2).
ТАГ масла подсолнечного [179]	Для Ag^+ -ТСХ: ПФ : хлороформ / метанол (98:2 об.).
Соевые бобы и льняные масла [180]	Пластинки <i>Kieselguhr G</i> (ОФ-ТСХ): ПФ - ацетон / ацетонитрил (7:3 об.). Для Ag^+ -ТСХ: ПФ - гексан / ацетон / этанол (10:6:1 об.).
метиловые эфиры масел <i>M. Charantia</i> и <i>T. anguina</i> [181]	Силикагелевые пластины (высокоэффективный вариант); ПФ: гексан / диэтиловый эфир (94: 6 об.); сканирование пластины при 254 нм.

Примеры использования тонкослойной хроматографии в разделении ТАГ и жирных кислот представлены в таблице 1.10.

Обнаружение разделенных пятен обычно осуществляют путем окрашивания парами йода или опрыскиванием другими специальными реагентами (серной кислотой с последующим нагреванием), либо по флуоресценции (после обработки дихлорфлуоресцеином или фосфорномолибденовой кислотой). Методика НФ-ТСХ эффективна при разделении липидов на основные классы и обычно используется для разделения и очистки класса ТАГ от других липидных классов [173, 174].

Используя Ag^+ -ТСХ, виды ТАГ можно разделить на подклассы в зависимости от степени ненасыщенности [175], а при использовании ОФ-ТСХ происходит разделение по длине цепей жирнокислотных радикалов [171]. Благодаря таким комбинациям Ag^+ -ТСХ и ОФ-ТСХ большинство видов ТАГ можно эффективно разделить, хотя несколько критических пар остаются неразделенными [176]. Наконец, жирные кислоты, обычно в виде метиловых эфиров, могут быть разделены по количеству и конфигурации двойных связей методом Ag^+ -ТСХ [155].

1.3. Методы исследования комплексов включения

1.3.1. Комплексы включения мочевины

Мочевина в присутствии подходящих молекул «гостей» кристаллизуется с образованием кристаллической решетки, содержащей каналные пустоты спиралевидной формы шестиугольной призмы (Рис. 1.11). Пустоты могут содержать молекулы алканов линейной структуры, число атомов углерода в которых больше или равно 6-8 [182].

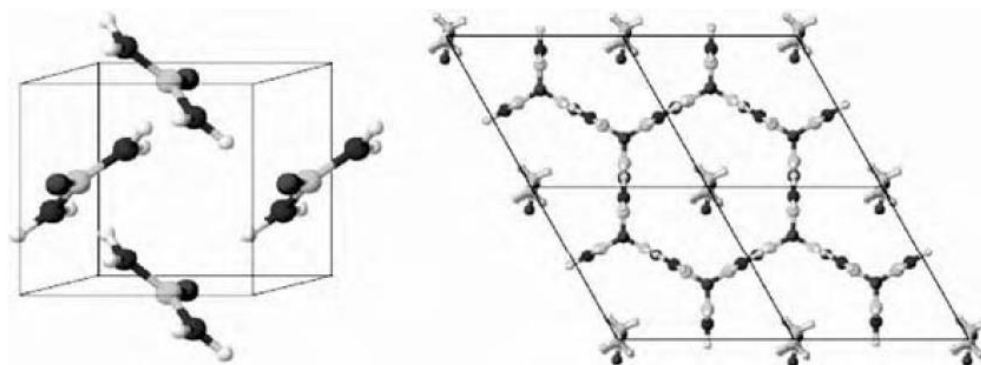


Рис. 1.11. Кристаллические структуры чистых мочевины и комплекса включения мочевины и жирной кислоты (пальмитиновой кислоты)

В образующихся тубулатоклатратах молекулы мочевины образуют спиралевидные цепи, связанные между собой, в пустотах которых удерживаются молекулы (или радикалы) алканов за счет нековалентных взаимодействий [183]. Гексагональный канал

достаточно широк, чтобы принимать молекулы с диаметром около 5 Å [184], вероятность внедрение в эти полости молекул с большим диаметром уменьшается. Следовательно, образование и стабильность комплексов мочевины определяется их формой, размером и геометрией [185].

Одним из наиболее широких применений комплекса включения мочевины является фракционирование насыщенных жирных кислот из смеси с ненасыщенными кислотами [186]. В ходе кристаллизации мочевины из раствора при низкой температуре в комплекс в первую очередь вовлекаются насыщенные мононенасыщенные жирные кислоты, при этом полиненасыщенные жирные кислоты остаются в растворе [182, 187]. Это связано с тем, что наличие двойных связей в жирных кислотах не позволяет переходить в конформацию, «идеальную» для образования комплексов.

Стабильность комплексов включения мочевины напрямую зависит от ряда факторов: чем короче цепи и чем больше число двойных связей, тем меньше ее стабильность [188]. *Транс*-изомеры образуют более стабильные комплексы по сравнению с соответствующими им *цис*-изомерам, а соединения с сопряженными двойными связями образуют более стабильные аддукты, чем соединения с метилен-разделенными двойными связями [185]. Молярное отношение мочевины к жирным кислотам в комплексах составляет 12÷14 : 1 (моль).

Таблица 1.11.

Содержание некоторых жирных кислот в тубулатоклатратах

Жирная кислота	Молярное соотношение	Жирная кислота	Молярное соотношение
Пальмитиновая	12.6	Линолевая	13.1
Стеариновая	14.3	Линоленовая	13.6
Олеиновая	13.7	α -Элеостеариновая	13.7
Октадека-10,12-диеновая	14.2	β -Элеостеариновая	14.0

Наиболее существенными параметрами, влияющими на степень кристаллизации, являются соотношения мочевины/жирная кислота и температура процесса. Соотношение мочевины и жирных кислот может быть применено для фракционирования жирных кислот по разной степени ненасыщенности. Во время использования низких концентраций мочевины различные жирные кислоты конкурируют за участие в процессе комплексообразования в зависимости от способности образовывать наиболее стабильное соединение включения. Мочевина связывает жирные кислоты и их производные в соотношении примерно 3 : 1 по массе. При приготовлении аддуктов часто необходимо

применять избыток мочевины, чтобы получить удовлетворительный выход из равновесия. Комплексообразование с мочевиной происходит главным образом в метаноле и этаноле, особенно в первом, потому что он обеспечивает более высокие коэффициенты концентрации. Однако использование метилового спирта может привести к метилированию некоторых жирных кислот во время обработки включения мочевины, что влечет за собой образование смеси свободных жирных кислот и метиловых эфиров. Условия комплексообразования мочевины и восстановления нескольких авторов суммированы в таблице 1.12

Таблица 1.12.

Концентрация полиненасыщенных кислот в исходном наборе жирных кислот (X_E) и в фильтрате (X_u) (% от суммы жирных кислот), а также выходы (R), полученные для стеариноновой и докозагексаеновая кислота (ДГК)

Образец	Условие ^a	стеариноновой			ДГК			Лит.
		X_E	X_u	R	X_E	X_u	R	
масло печени трески	3:1, 4°C, метанол	2.4	10	100	11.7	44.6	100	[189]
Рыбий жир	3:1, 15°C, метанол	1.7	7.2	84.7	13.6	40.9	60.2	[190]
Рыбий жир	2.6:1, 5°C, этанол	0.8	5.1	-	3.9	29.2	64	[191]
Рыбий жир	3:1, 1°C, этанол	3.6	11.2	100	4.4	11.1	88	[192]
масло семян черной смородины	4:1, 4°C, этанол	3.7	15.5	-	18.2	79.6	-	[193]
масло печени трески	4:1, 28°C, этанол	2.4	6.6	92.4	10.9	30.2	91.3	[187]

^a Условие комплексообразования: соотношение мочевины : жирные кислоты (по массе), температура кристаллизации и растворитель.

1.3.2 Комплекс включения циклодекстрина

Циклодекстрины (ЦД) — это циклические олигосахариды, которые состоят из глюкопиранозных звеньев, связанных между собой α -(1,4)-гликозидными связями. Существует несколько видов ЦД: α , β и γ -циклодекстрины, состоящие соответственно из шести, семи и восьми единиц глюкозы, расположенных в виде полого цилиндра с открытым концом [194].

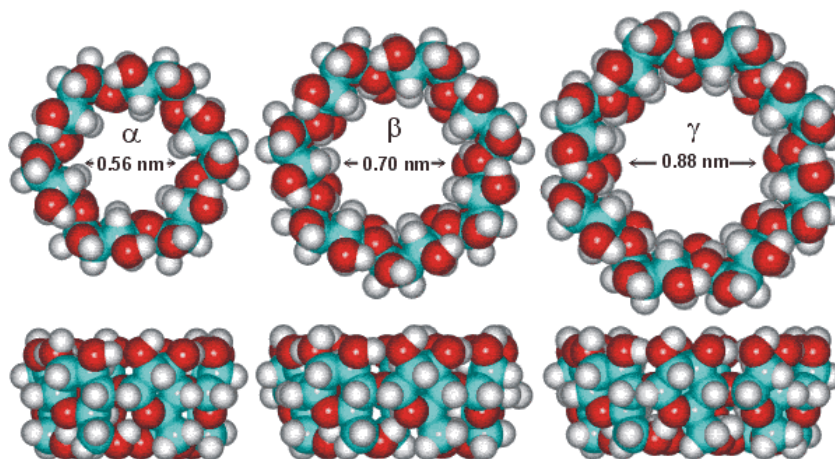


Рис. 1.12. Структура α , β и γ -циклодекстринов

Благодаря уникальному пространственному расположению гидроксильных групп, молекулы ЦД имеют гидрофильную внешнюю поверхность и гидрофобную внутреннюю полость (Рис. 1.12). Поэтому ЦД обладают способностью инкапсулировать гостевые молекулы с образованием «комплексов включения» в присутствии воды.

Таблица 1.13.

Физико-химические параметры базисных циклодекстринов [195, 196]

Свойство	α - ЦД	β - ЦД	γ - ЦД
Число остатков глюкозы в макроцикле	6	7	8
Молекулярная масса, Да	972.8	1134.9	1297.1
Внешний диаметр тора, Å	13.7	15.3	16.9
Внутренний диаметр полости тора, Å	5.2	6.6	8.4
Высота тора, Å	7.8	7.8	7.8
Объём внутренней полости, Å ³	174	262	472
Растворимость в воде при 25°C, г/100 мл	14.5	1.85	23.2
Температура разложения, °C	278	299	267
$[\alpha]_D$ (25°C)	150.5	162.0	177.4

Также ЦД можно модифицировать, гидроксилкилируя, алкилируя и сульфоалкилируя с целью повышения растворимости исходных нативных циклодекстринов. В результате этого как циклодекстрины, так и их производные являются удобным инструментом для создания новых препаратов, используемых для

увеличения растворимости субстанций. Кроме того, они используются для улучшения физической и химической стабильности активных субстанций (защита от воздействия света, окисления и т. д.).

Методы получения комплексов включения на основе циклодекстринов [197]

Комплексы включения обычно получают при перемешивании веществ в суспензиях или растворах. Метод получения комплекса оказывает большое влияние на свойства конечного продукта: на вязкость, на растворимость и на стабильность комплекса.

- **Метод соосаждения:** циклодекстрин (ЦД) растворяют в воде и, перемешивая раствор, добавляют молекулы-«гостя» для включения в гидрофобную полость. При использовании насыщенных растворов циклодекстрина в процессе комплексообразования будет образовываться осадок. Перемешивание продолжается в течение определенного промежутка времени, после чего осадок комплексов включения декантируют, отделяют посредством центрифугирования, либо фильтрацией, а затем высушивают. Полученный таким образом можно промыть малым количеством воды или же органических растворителей, которые смешиваются с водой (например, метанол, этанол, ацетон).
- **Метод сорастирания:** комплексы могут быть получены в процессе перетирания в ступке смеси вещества «гостя» с циклодекстринами при добавлении небольших количеств воды. По окончании процесса комплексообразования смесь либо необходимо высушить без дополнительной обработки, либо промыть небольшим количеством воды (или органическим растворителем), с последующей фильтрацией или центрифугированием.
- **Методы распылительной и сублимационной сушки:** При данном методе циклодекстрин растворяется в двойном объеме воды, потом полученный раствор смешивается с веществом-«гостем» и перемешивается. Затем реакционная смесь высушивается на распылительной или сублимационной сушке для получения комплексов включения, которые переходят в аморфное состояние.
- **Метод с применением сверхкритического CO₂:** Получение комплекса основано на том, что под давлением физическая смесь «гостя» и ЦД подвергается обработке сверхкритическим CO₂. При разгерметизации, длительность которой может достигать 30 мин, гомогенизированный частично кристаллизуется.

Методы анализа комплексов включения с циклодекстринами

Для подтверждения образования комплексов взаимодействие молекулы гостя с ЦД может быть использован ряд методов.

- **Термический анализ.** Результаты, полученные благодаря использованию данного метода анализа, дают возможность установить, подвержено ли вещество «гостя» фазовым

переходам, либо происходят ли изменения молекулярной структуры в процессе градиентного увеличения температуры системы. Во время нагревания в широком температурном диапазоне, вещество может претерпевать изменения при следующих процессах: плавление, испарение, деструкция, окисление или полиморфные превращения. Различие характера фазовых переходов, а также энергии активации процесса деструкции веществ в составе комплексов включения по сравнению с исходными соединениями, или в составе физической смеси, указывают на образовании комплексов включения.

- **Рентгеновская дифрактометрия.** Полученные дифракционные пики указывают на кристалличность продукта. При образовании комплекса возможны следующие изменения: снижение кристалличности, смещения пиков, исчезновение старых, появление новых пиков дифракции или появление полностью диффузного участка.
- **Инфракрасная (ИК) спектроскопия:** Метод ИК-спектроскопии дает возможность подтвердить получение комплексов включения. При анализе ИК-спектров для комплексов включения четко прослеживаются изменения, обусловленные образованием (или разрушением) водородных связей. В соответствие с этим полосы поглощения для характерных функциональных групп смещаются в низкочастотную область. В то же время увеличиваются интенсивность и ширина полос поглощения. Самые ярко проявляющиеся изменения в ИК-спектре наблюдаются при участии гидроксогрупп в образовании водородных связей в момент формирования комплексов включения. Физическая смесь «гостя» и ЦД приводит к наложению друг на друга их спектров без каких-либо изменений. Межмолекулярные водородные связи, формируясь при помощи молекул «гостя», разрываются, что приводит к смещению полос поглощения образца при образовании комплекса.
- **Ядерная магнитная резонансная (ЯМР) спектроскопия.** При исследовании комплексов включения применяют методы спектроскопии протонного магнитного резонанса на ядрах ^1H , также, как и спектроскопию ядерного магнитного резонанса на ядрах ^{13}C . Наиболее информативным методом доказательства формирования комплексов включения является метод ^1H -ЯМР-спектроскопии. Этот метод анализа позволяет найти выраженный химический сдвиг сигналов атомов водорода ЦД Н-3 Н-5 протонов, которые ориентированы внутрь полости тора, что связано с расположением молекулы вещества «гостя» в гидрофобной полости. В колебательных спектрах, локализованных на внешней поверхности молекулы ЦД Н-1, Н-2 и Н-4 атомов, отмечаются незначительные изменения химических сдвигов. Исследования проводятся на образцах, растворенных в «тяжелой воде» (D_2O), диметилсульфоксиде (DMSO-d_6), ацетоне- d_6 или других растворителях.

- *Диаграмма растворимости фаз*: Higuchi и Connors [198] классифицировали комплексы на основе их влияния на растворимость молекул «гостя». В методе избыточное количество вещества «гостя» добавляли к водному раствору, содержащему различные концентрации циклодекстринов. Смеси встряхивали при постоянной температуре до достижения равновесия. Образцы были отфильтрованы и определяли концентрацию вещества «гостя».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ГЛАВЕ 1

Анализ литературных данных показывает, что сопряженные жирные кислоты (диеновые, триеновые и тетраеновые) существуют в основном в виде ТАГ; они синтезируются в некоторых растениях семейств *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Rosaceae*, *Balsaminaceae*, *Bignoniaceae*, *Compositae*, *Valerianaceae* и *Punicaceae*. Такие масла представляют большой интерес в фармакологии и в лакокрасочной промышленности. При этом в России такие масла до сих пор не производят. Более того, информация о составе ТАГ и жирных кислот ряда растений либо противоречивая, либо не полная.

Для определения сопряженных жирных кислот, а также состава ТАГ в растительных маслах чаще всего применяют хроматографические методы (ОФ ВЭЖХ, Ag^+ -ВЭЖХ, газовой хроматографии), спектральные методы, масс-спектрометрии, а также гибридные методы анализа. Показано, что такие соединения обладают высокой химической активностью, легко вступая в ряд превращений. Методы ОФ ВЭЖХ и серебряная ВЭЖХ эффективны при разделении ТАГ и изомерных сопряженных кислот. Однако, существование некоторые нюансы при идентификации пиков, а также при количественном анализе.

Показано, что мочевины при наличии подходящих молекул гостя с диаметром около 5\AA способна образовывать тубулатоклатраты. Это позволяет фракционировать жирные кислоты с различными размерами, степенью ненасыщенности и геометрией. Для повышения биодоступности липидов возможно получение их супрамолекулярных комплексов с циклодекстринами. Комплексообразование может быть подтверждено методами ИК-спектроскопии, рентгенофазового анализа, дифференциально-термического анализа и ^1H -ЯМР.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1. Объекты исследования

В работе мы исследовали растительные масла, содержащие жирные кислоты с сопряженными двойными связями. Для экстрагирования ТАГ мы использовали различные объекты семян - от известных сортов и видов растений ботанического сада НИУ «БелГУ» и растений во Вьетнаме до растительных масел, приобретенных в розничной торговле.

Среди исследованных образцов:

- Семена видов момордики: момордика кохинхинская (*Momordica cochinchinensis*), М. харантия (*M. Charantia*), *Momordica subangulata*, М. бальзамическая (*Momordica balsamina*).
- Семена видов тладианты: Тладианта сомнительная (*Thladiantha dubia*) и *Thladiantha nudiflora*.
- Семена жакаранды мимозолистной (*Jacaranda mimosifolia*).
- Семена видов трихозант: Т. змеевидный (*Trichosanthes cucumerina*) и *Trichosanthes Pilosa*.
- Масла монгонго или манкетти (*Schinziophyton rautanenii*).
- Семена кентрантуса (*Centranthus ruber*).
- Семена катальпы (*Catalpa ovata*).
- Семена валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis*).
- Семена календулы лекарственной (*Calendula officinalis*).
- Семена *Vernicia montana*.
- Семена *Diplocyclos palmatus*.
- Семена *Sapium discolor*.
- Семена *Impatiens Balsamina*.
- Семена *Chilopsis linearis*.
- Семена граната (*Punica granatum*).
- Семена «бешеного огурца» (*Ecballium elaterium*).
- Семена *Gynostemma pentaphyllum*.

Материал для исследования (сыры и молока различных марок) был приобретен в магазинах города Белгорода. По ряду причин марки исследованных в работе сыров в тексте не указаны.

Для получения комплексов включения использовали мочевины (ЭКОС.1, России), бета-циклодекстрин (Kleptose®), метил бета-циклодекстрин (crusmeb, Lestrem, France) и свален (98%, Alfa Aesar™).

ТАГ обозначали по общепринятой схеме, указывая буквами радикалы кислот без дифференциации их положения в молекуле. Буквенные обозначения радикалов кислот: $\alpha\text{Э}$ – радикалы $\text{C18:3}^{9\text{Z},11\text{E},13\text{E}}$ ((9Z,11E,13E)-октадека-9,11,13-триеновой) и $\beta\text{Э}$ - $\text{C18:3}^{9\text{E},11\text{E},13\text{E}}$, Пу - $\text{C18:3}^{9\text{Z},11\text{E},13\text{Z}}$, Ж - $\text{C18:3}^{8\text{Z},10\text{E},12\text{Z}}$, Кт - $\text{C18:3}^{9\text{E},11\text{E},13\text{Z}}$, Кл - $\text{C18:3}^{8\text{E},10\text{E},12\text{Z}}$, $\beta\text{Кл}$ - $\text{C18:3}^{8\text{E},10\text{E},12\text{E}}$, αPr – $\text{C18:4}^{9\text{Z},11\text{E},13\text{E},15\text{Z}}$, βPr – $\text{C18:4}^{9\text{E},11\text{E},13\text{E},15\text{E}}$, Л – линолевой ($\text{C18:2}^{9\text{Z},12\text{Z}}$), О – олеиновой ($\text{C18:2}^{9\text{Z}}$), П – пальмитиновой (C16:0) и стеариновой (C18:0). Формула, например, L_2O обозначает ТАГ с двумя радикалами линолевой кислоты и с одним радикалом олеиновой кислот.

2.2. Метод экстракции масел

2.2.1. Метод экстракции масел из семян растений

Из-за высокой химической лабильности сопряженных полиеновых соединений экстракция кипящим растворителем в аппарате Сокслета исключена, поэтому в работе использовали экстракцию растворителями из измельченных семян при комнатной температуре. Масла из измельченных семян экстрагировали *n*-гексаном при комнатной температуре. К навеске размолотых семян массой 2.0 ± 0.1 г в фарфоровой ступке добавляли 10 мл растворителя, тщательно растирали фарфоровым пестиком, после отстаивания экстракт отделяли от осадка при помощи шприца. К остатку добавляли новую порцию растворителя, и все последовательные экстракты объединяли в одной колбе. Полноту экстракции контролировали спектрофотометрическим методом - до прозрачности последнего экстракта при 270 нм ($A < 0.02$).

Массу экстрагированного масла определяли гравиметрическим способом, - после отгонки растворителя из объединенного экстракта на вакуумном ротационном испарителе при температуре термостата 30 °С.

2.2.2. Метод экстракции жиров сыров и молока

Для экстракции жиров сыров навеску измельченного сыра (0.5 г) переносили в стакан, добавляли натрий серноокислый безводный (0.1 г), добавляли 20 мл петролейного эфира, сыр разминали стеклянной палочкой под слоем экстрагента и смесь выдерживали в ультразвуковой бане в течение 20 мин. Экстракт отделяли от твердого осадка фильтрованием через бумажный фильтр. Для экстракции использовали 3 последовательные порции экстрагента. Экстракты объединяли и петролейный эфир удаляли на вакуумном ротационном испарителе. Для ВЭЖХ определения полученное масло растворяли в подвижной фазе (в ацетоне).

Для экстракции жиров молока навеску a (г) ($a = 10-15$ г) молока помещаем в стеклянный бюкс размером ($\varnothing=60 \times 30$ мм). Замораживаем образец в морозильной камере, и лиофильно высушиваем (при -40°C и 0.02 Bar) в течении 8 – 10 ч (до постоянной массы). После этого проводили исчерпывающую экстракцию жиров из сухого сырья петролейным эфиром: в фарфоровой ступке, пятикратно, порциями по 10 мл при комнатной температуре. Растворитель удаляли на вакуумном ротационном испарителе и определяли массовую долю свободного жира и долю воды.

2.3. Способ очистки масел для определения методом ВЭЖХ

Твердофазную очистку масла выполняли на насадочных картриджах ДИАПАК С (БиоХимМак СТ, Москва). Перед сорбцией через насадку пропускали 6 мл n -гексана. Затем проводили сорбцию масла из 20 мл его раствора в n -гексане концентрацией ~ 10 мг/мл. Масло десорбировали с силикагеля ацетоном (порциями по 1 мл); растворитель удаляли на вакуумном ротационном испарителе.

2.4. Контроль каталитической активности сорбента к сорбируемому материалу

Для оценки сохранности масла в сорбированном состоянии вначале из очищенного масла момордики выделили основной компонент триацилглицеринового комплекса (ди- α -элеостеарат-стеарат, α -Э₂С) в условиях полупрепаративной хроматографии. Для этого использовали хроматограф *Shimadzu LC20*, хроматографическую колонку 250×10 мм SUPELCOSIL™LC-18, 5 мкм в подвижной фазе 50 об. % пропанола-2 и 50 об. % ацетонитрила. Из полученного образца приготовили раствор α -Э₂С в n -гексане (3.0 мг/мл), и по 1 мл полученного раствора перенесли в виалы, к которым добавили по 0.2 г сорбента, оставив смесь при комнатной температуре вне доступа прямого солнечного света с периодическим встряхиванием содержимого. По истечению заданного времени сорбент отделяли от раствора, и сорбат экстрагировали ацетоном, ацетон удаляли на вакуумном ротационном испарителе и остаток растворяли в подвижной фазе для ВЭЖХ. Для проверки применимости силикагеля для твердофазной экстракции масла контролировали превращение индивидуально выделенного α Э₂С, используя метод обращенно-фазовой ВЭЖХ. Полученные результаты показали, что исходный образец содержал лишь небольшое количество изомера, но при контакте с силикагелем в течение двух суток от начального соединения не осталось практически и следов. За время порядка 0.5 – 1.0 ч небольшие разрушения заметны, но степень таких превращений не превышает доли процента, т.е. патроны ДИАПАК С могут быть использованы для твердофазной очистки

масел с радикалами октадекатриеновых кислот, но время контакта образца с сорбентом следует ограничивать.

2.5. Хроматографические условия

Для обращено-фазовой ВЭЖХ использовали хроматографическую систему *Shimadzu LC20* с рефрактометрическим (RID 10A) и спектрофотометрическим детекторами, и систему хроматограф *Agilent 1200 Infinity* с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами и Милихром-А02 (ЗАО "ЭкоНова"). Все эксперименты проводили в изократических режимах, хроматограммы записывали, хранили и обрабатывали, используя специализированные программные продукты *ChemStation* (при спектрофотометрическом и масс-спектрометрическом детектировании) и ПП Мультихром 1.5. и *LC Solution*, Shimadzu (при рефрактометрическом детектировании).

2.5.1. ОФ ВЭЖХ для разделения ТАГ

Мы использовали хроматографические колонки: Kromasil 100-5C18 4.0×250 мм, Kromasil 100-5C18 4.6×250 мм, Kromasil -100 5C18 4.6×75 мм, SUPELCOSIL™ 100-5LC-18 250×10 мм, Nucleosil C18 4.0×250 мм, Lichrospher C18 4.0×250, Диасфер C18 4.6×250. В работе для разделения ТАГ использовали подвижные фазы систем «ацетонитрил - ацетон» (состав ацетонитрила от 10-20 %) или «ацетонитрил - пропанол-2» (содержание пропанола-2 от 30-60 %) скорость подачи элюента 0.8-1.0 мл/мин.

2.5.2. Масс-спектрометрия в режиме химической ионизации при атмосферном давлении

Масс-спектрометрическое детектирование (6130 Quadrupole MS, Agilent) осуществляли в режиме химической ионизации при атмосферном давлении в стандартных для режимов условиях, при напряжении фрагментатора - 150 В; сигналы записывали для положительно заряженных ионов. Использовали колонки Диасфер-110-C18 или Kromasil 110-3.5C18 2.1 × 150 мм, скорость подвижной фазы: 0.1-0.2 мл/мин и система элюент ацетонитрил- пропанол-2 с добавками аммония формиата (HCOONH_4) 0.2 мМ.

2.5.3. ВЭЖХ для разделения жирных кислот

Условия для разделения жирных кислот на ОФ ВЭЖХ: Колонка: Kromasil 100-5C18 4.6×250 мм; Подвижная фаза: 20% ацетон и 1% уксусная кислота в ацетонитриле (для

рефрактометрического детектора); 5% вода и 1% уксусная в ацетонитриле (для спектрофотометрического детектора)

Для Ag^+ -ВЭЖХ: колонку Shodex IC YK-421 4.6×125 мм, модифицировали ионами серебра. Для этого через колонку пропускали водный раствор HCOONH_4 1% со скоростью потока 0.8 мл/мин в течение 1 час. Потом промывали колонку водой в течение 1 часа. 1 мл раствор AgNO_3 (0.2 мг/мл) был введен в колонку в течение 1 час, затем промывали колонку метанолом в течение 1 часа, подвижная фаза: 0.05% ацетонитрил, 1% уксусная кислота в гексане

2.5.4. Определение параметров удерживания ТАГ

Фактор удерживания ТАГ рассчитывали по формуле:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

где t_R – время удерживания вещества, мин.;

t_0 (или t_M) – мертвое время системы (использовали расчетный метод).

Метод расчета мертвого времени

«Мертвое» время колонки рассчитывали по удерживанию серии ТАГ, предполагая, что факторы удерживания (k) в гомологических рядах увеличиваются на одну и ту же величину (инкремент) в логарифмических единицах:

$$\frac{t_R(\text{M}_3) - t_M}{t_R(\text{M}_2\Pi) - t_M} = \frac{t_R(\text{M}_2\Pi) - t_M}{t_R(\text{МП}_2) - t_M} = \frac{t_R(\text{МП}_2) - t_M}{t_R(\text{П}_3) - t_M}$$

Для системы Shimadzu LC-20 с рефрактометрическим детектированием мы использовали ряд: тримиристинат (M_3), димиристинат-пальмитат ($\text{M}_2\Pi$), миристинат-дипальмитат (МП_2) и трипальмитат (П_3). А для системы Agilent 1200 с спектрофотометрическим детектированием: $\text{Э}_3 - \text{Э}_2\text{Л} - \text{ЭЛ}_2$

$$\frac{t_R(\alpha \text{Э}_3) - t_M}{t_R(\alpha \text{Э}_2\text{Л}) - t_M} = \frac{t_R(\alpha \text{Э}_2\text{Л}) - t_M}{t_R(\alpha \text{ЭЛ}_2) - t_M}$$

Инкременты рассчитывали по формулам:

$$\Delta(\text{X} \rightarrow \text{Л}) = \lg k(\text{CDЛ}) - \lg k(\text{CDX}); \quad \Delta(\text{Л} \rightarrow \text{О}) = \lg k(\text{XYО}) - \lg k(\text{XYЛ});$$

$$\Delta(\text{Л} \rightarrow \text{П}) = \lg k(\text{XYП}) - \lg k(\text{XYЛ}); \quad \Delta(\text{П} \rightarrow \text{С}) = \lg k(\text{XYС}) - \lg k(\text{XYП}).$$

2.6. Метод внутренней нормировки

2.6.1. Рефрактометрический детектор

Отклик рефрактометрического детектора прямо пропорционален разности показателей преломления определяемых веществ и подвижной фазы. Поэтому для количественного анализа ТАГ при рефрактометрическом детекторе необходимо использовать исправленную площадь пиков. Для этого использовали расчетные значения коэффициентов преломления индивидуальных триглицеридов (по программе *ChemSketch 2.0*) и подвижной фазы, рассчитанные по формуле

$$n_D = x_1 \cdot n_{D1} + x_2 \cdot n_{D2}$$

где n_D – коэффициент преломления соответствующего элюента, x_i его мольная доля в смеси. Затем определяли разность

$$\Delta n_i = n_i - n_D.$$

Поправки на площади пиков рассчитаны по формуле:

$$S_{(i)} = \frac{S_{0(i)}}{k_i}$$

Где $S_{(i)}$ - Площадь пика i после поправки

$S_{0(i)}$ – Исходная площадь пика i

k_i – Расчётный коэффициент, рассчитанный по формуле

$$k_{(i)} = \frac{\Delta n_i}{\Delta n_{(X_3)}}$$

где X_3 – реперный триацилглицерин.

2.6.2. Спектрофотометрический детектор

При расчетах по площадям пиков, определенных с использованием спектрофотометрического детектора использовали поправочные коэффициенты, равные числу радикалов октадекатриеновой кислоты (n_i) в молекуле ТАГ.

$$\alpha(TG_i) = \frac{S_i / n_i}{\sum_i S_i / n_i} \cdot 100\% \quad \text{и} \quad \alpha(Acid_j) = \frac{\sum_i \alpha(TG_i) \cdot n_{ij}}{\sum_j \sum_i \alpha(TG_i) \cdot n_{ij}} \cdot 100\%$$

Для масла семян, содержащего один радикал сопряженной кислоты хроматограммы записывали при длине волны в максимуме поглощения. А для масла, содержащего более одного радикала сопряженных кислот хроматограммы записывали при изобестической длине волны для прямого количественного расчета соотношений между

концентрациями различных видов ТАГ без введения поправок на различие в коэффициентах экстинкции.

2.7. Спектрометрические методы

Спектрофотометрические исследования выполняли в кварцевых кюветах (спектрофотометр UV-2550 *Shimadzu*) с длиной оптического пути 1 см. Спектры записывали в диапазоне длин волн от 210 до 400 нм.

ИК-спектры записывали на спектрометре IR Prestige в тонкой пленке в диапазоне волнового числа от 450 см⁻¹ до 4000 см⁻¹, разрешение 4 см⁻¹ и номер скана 50.

2.8. Метод графического разделения смежных пиков

Для графического разделения смежных пиков использовали программу *Magicplot student 2.7.2*, с аппроксимацией пиков немодифицированными Гауссианами. (<https://magicplot.com/downloads.php>). Такая программа позволяет разложить неразделенные пики со степенью разделения R_s не менее 0.4 с погрешностью 1 %.

2.9. Метод исследования комплекса включения липидов-β-циклодекстрина

2.9.1. Метод получения комплекса включения

Комплекс включения жирных кислот и сквалена приготовлен методом осаждения дисперсий гостя из водных растворов β-ЦД при механической гомогенизации (US-4102 Ulab – 25000 грм) в течение 8 мин. Образующийся при этом осадок отделяли от раствора центрифугированием, отмывали осадки 3 мл водой три раза и лиофилизировали (Freezone 2.5 Labconco при 0.021 мБар и -48°C), получая белый порошок. Выход продукта рассчитывали по формуле (растворимость комплекса в воде очень маленькая, поэтому расчёт выполняли из предположение о полном осаждении комплекса:

$$\text{выход} = \frac{m_{\text{осадок}}}{m_{\text{гости}} + m_{\beta\text{ЦД}}} 100(\%)$$

В случае комплекса сквален с метилциклодекстрином (Me-βЦД) и масла с β-ЦД в исходной смеси осадок не образуется. Поэтому после диспергирования отделяли избыток «гостя» и комплекс сушили методом замораживания с последующей лиофилизацией.

2.9.2. Метод определения содержания вещества «гостя»

Содержание соединения «гостя» в комплексе определяли методом ОФ ВЭЖХ с использованием градуировочного графика. Для этого к навеске 20 мг комплекса,

добавляли 3 мл ацетона и перемещали в течение 15 мин, затем смесь центрифугировали и определили сквален в ацетоновом растворе методом ВЭЖХ. Процесс повторяли три раза для полноты экстракции. Полноту экстракции контролировали методом ИК спектроскопии отстающего порошка β -ЦД. Содержание соединения «гостя» в комплексе включения рассчитали по формуле:

$$\% m_{\text{гостя}} = \frac{m_{\text{гостя}}}{m_{\text{комплекса}}} \cdot 100.$$

2.9.3. Рентгенофазовый анализ

Дифракционные спектры β -ЦД, Ме- β -ЦД и комплексов включения были измерены с помощью рентгеновского дифрактометра *Rigaku Ultima IV* с использованием детектора DTEX / ULTRAT. $\text{CuK}\alpha$ -излучение ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) применяли для измерения углов дифракции в области от 5° до 50° под напряжением 40 кВ и током 30 мА и со скоростью $5^\circ / \text{минуту}$. Дифракционный спектр β -ЦД сравнивали со стандартной дифракцией из библиотеки с помощью программного обеспечения Jade 5 для распознавания кристаллических структур.

2.9.4. Дифференциальная сканирующая калориметрия и термогравиметрический анализ

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), измеряющие термограммы теплового потока, и термогравиметрический анализ (ТГА) β -ЦД, Ме- β -ЦД и их комплексы включения проводился с использованием SDT Q600 в атмосфере аргона. Анализ проводили от 25 до 500°C при скорости нагрева $10^\circ\text{C мин}^{-1}$.

2.9.5. Анализ методом ядерного магнитного резонанса

Спектры ^1H ЯМР измеряли на спектрометре JEOL JNM-ECA 600 (Российский университет дружбы народов), работающем на частоте 600 МГц при комнатной температуре. β ЦД, Ме- β -ЦД и комплексы включения были растворены в D_2O , а сквален растворен в CDCl_3 . Химические сдвиги представлены в м.д. с использованием тетраметилсилана в качестве внутреннего стандарта.

2.9.6. Молекулярное моделирование

Первоначальная структура молекул была построена с использованием *Gaussian view 05*. Начальная геометрия была выполнена и оптимизирована методом РМЗ программой *HyperChem*.

2.10. Метод омыления масел

Для устранения разрушения сопряженных полиеновых соединений при гидролизировании мы проводили гидролиз масел в мягких условиях. Масло было добавлено избытком раствора NaOH 3М в спирте (свежий) и перемещали в течение не меньше 2 часа в комнатной температуре. Затем полученный раствор нейтрализован раствором концентрированной HCl до pH=3. Жирные кислоты экстрагированы из раствора гексаном.

2.11. Метод фракционирования сопряженных жирных кислот

Обычно 2.5 г мочевины растворяли в 20 мл этанола 96%. Мы добавляли определенную массу ЖК к раствору мочевины и встряхивали в реакционной колбе. Полученный раствор поставили в холодильнике при -20°C в течение 12 часов, после этого кристаллы комплексов были отфильтрованы на вакуумом для отделения комплексов от фильтрата. Полученные комплексы промывали холодным этанолом для удаления всех следов фильтрата.



Рис. 2.1. Схема фракционирования жирных кислот с использованием мочевины

После фильтрации жидкую фазу упаривали до небольшого объема в вакуумном роторном испарителе. Слегка подкисленная теплая вода ($\text{pH} \approx 5$, 100 мл) с небольшим количеством гексана (10 мл) применяли для экстракции ЖК как из фильтрата, так и из изолированных комплексов. Масса полученного ЖК была определена гравиметрическим методом после испарения растворителя и рассчитаны эффективности восстановления (%).

2.12. Статистическая обработка результатов

Экспериментальные результаты обрабатывали методом математической статистики при малой выборке [199 – 201]. Величины стандартного отклонения малой выборки (S) и относительного стандартного отклонения (S_r) были определены по формулам:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \text{и} \quad S_r = \frac{S}{\bar{X}} \times 100(\%)$$

где X_i – результат однократного измерения; \bar{X} – среднее значение измеренной величины; n – количество параллельных измерений.

Количественные результаты величины были выражены в виде $\bar{X} \pm S$ или $\bar{X} \pm S_r(\%)$.

Для определения погрешности пробоподготовки мы использовали способ "введено - найдено" [202]. При этом был анализирован образец с известным содержанием определяемого компонента. Полученный результат ("найдено") сравнивают с заданным содержанием ("введено"). Относительный показатель пробоподготовки определили по формуле:

$$\theta = \frac{|m_{\text{вве.}} - m_{\text{най.}}|}{m_{\text{вве.}}} \times 100(\%)$$

Таблица 2.1.

Результаты оценки погрешности пробоподготовки

Масса масла момордики (мг)		Относительная показатель (θ , %)
введено	найдено	
20.7	19.2 ± 0.8	7.3
33.5	31.6 ± 0.6	5.6
45.9	43.5 ± 0.4	5.3

Показано, что потери масла по предложению метода не превышает 8%.

Для контроля воспроизводимости результатов параллельных записей хроматограмм одного и того же раствора масла было выполнено 5 последовательных хроматографирований без длительных пауз, а также было записывано различные растворы, приготовленные из различных навесок размолотых семян плодов одного растения. В результате было определено (в приложении П1), что стандартное отклонение определения логарифмов факторов удерживания не выше 0.002 единиц. Относительное стандартное отклонение определения площади пиков с использованием программы Magicplot не превышает 1% для основного компонента и для суммы площади пиков не превышает 0.5%.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Выбор условий для определения ТАГ методом ВЭЖХ

В соответствии с литературными данными для разделения липидов на классы лучше использовать нормально-фазовую хроматографию [169]. При этом обращено-фазовая хроматография предназначена для разделения компонентов одного и того же класса липидов, например, триацилглицеринов [203]. Это объясняется тем, что при нормально-фазовой хроматографии вещества разделяются по числу и типу полярных групп, а вещества внутри групп различаются по липофильности основных частей молекул. Основные компоненты большинства растительных масел – триацилглицерины, в структуре которых содержится одинаковое число полярных групп – по три сложноэфирные группировки, и различие между ними состоит в липофильности радикалов высших жирных кислот.

На рисунке 3.1 показано разделение ТАГ масла семян момордики кохинхинской, которые в условиях нормально-фазовой хроматографии элюируются в виде неразделенного широкого пятна.

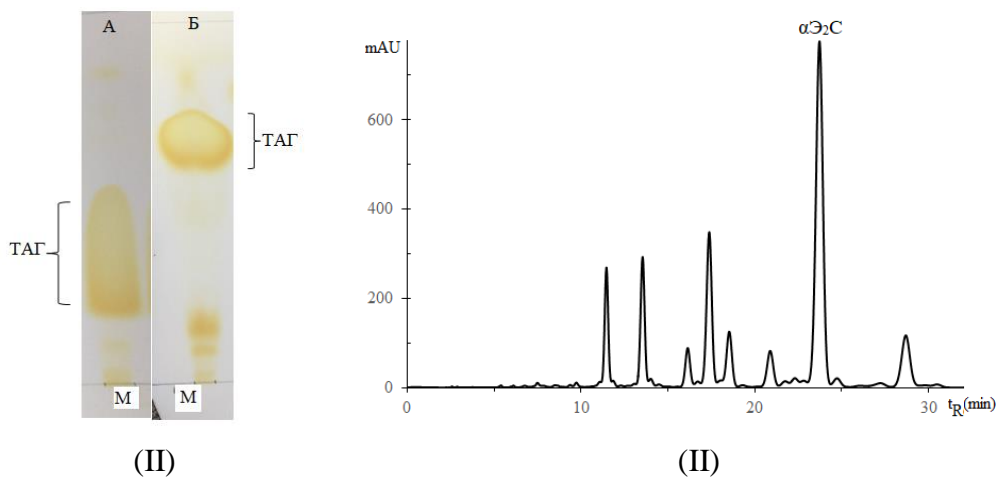


Рис. 3.1. Разделение на классы липидов масла семян момордики кохинхинской в условиях ТСХ (I) и разделение ТАГ этого масла методом ОФ ВЭЖХ (II)

Условия: пластины Сорбфил (силикагель); подвижные фазы: А – 5 % ацетона в *n*-гексане; Б – 9% ацетона в *n*-гексане; для ВЭЖХ: колонка 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18; температура термостата колонки: 30°C; ПФ: 45 об. % ИПС и 55 об.% CH₃CN; 1.0 мл/мин.

Пропорциональность между удерживанием веществ в обращенно-фазовой хроматографии и их свойствами принято анализировать по сравнению с расчетным значением логарифма коэффициента распределения веществ в системе «октанол-1 – вода» (CLOGP, [204]). Кроме того, при анализе удерживания ТАГ используют также и так называемые «эквивалентные углеродные числа» (ECN, [153]). Для расчета CLOGP

предложено несколько компьютерных программ, одна из которых (ACD LOGP) была использована в настоящей работе. Расчетные параметры этого показателя с эквивалентными углеродными числами и временами удерживания ТАГ масла семян момордики кохинхинской представлены в таблице 3.1, и их корреляция – на рисунке 3.2.

Таблица 3.1.

Характеристики липофильности и удерживания ТАГ масла момордики кохинхинской

№	ТАГ	t_R , мин***	$\lg k$ (± 0.002)	LOGP*	ECN**
1	$\alpha\text{Э}_3$	10.204	0.489	20.60 ± 0.33	36
2	$\alpha\text{Э}2\text{Л}$	11.964	0.578	21.00 ± 0.32	38
3	$\alpha\text{Э}Л2$	14.143	0.668	21.39 ± 0.37	40
4	$\alpha\text{Э}2\text{О}$	15.173	0.705	21.64 ± 0.31	40
5	$\alpha\text{Э}2\text{П}$	16.164	0.738	21.09 ± 0.30	40
6	$\alpha\text{Э}ЛО$	18.123	0.796	22.03 ± 0.31	42
7	$\alpha\text{Э}ЛП$	19.38	0.829	21.49 ± 0.30	42
8	$\alpha\text{Э}2\text{С}$	20.464	0.856	22.16 ± 0.30	42
9	$\alpha\text{Э}ЛС$	24.587	0.946	22.55 ± 0.30	46

* - LOGP рассчитаны по программе ChemSketch 2015.2.5;

** - $ECN = CN - 2 * DN$ (CN- сумма числа углеродов трех радикалов, DN- сумма числа двойных связей)

*** - рассчитан при составе элюента 42% изопропанол и 58% ацетонитрил

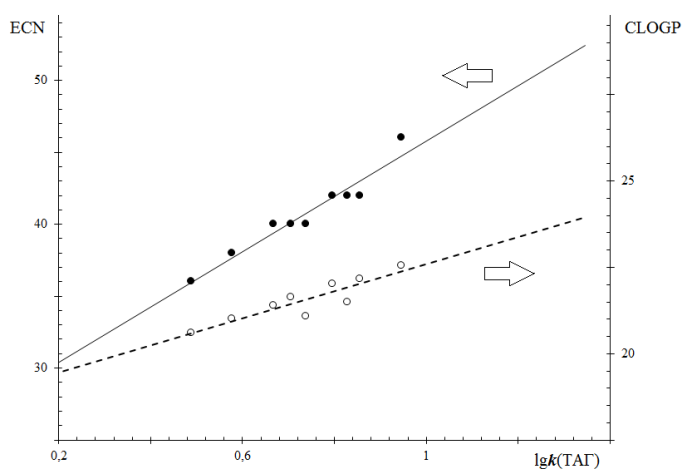


Рис. 3.2. Корреляции между $\lg k(\text{ТАГ})$ и параметром липофильности (CLOGP) и эквивалентными углеродными числами (ECN)

Однако, соотношения между $I_{gk}(\text{ТАГ})$ и CLOGP или ECN (Рис. 3.2) имеют примерный характер. Так, R^2 для первой зависимости составляет лишь 0.9389, а для второй – 0.8134 при явной тенденции к линейной зависимости в обоих случаях.

Выбор стационарной фазы

В обращенно-фазовой хроматографии используют фазы с различной длиной привитого радикала – от C1 до C18 и даже выше [205]. В случае высоко липофильных соединений, к которым относятся и ТАГ обычных масел, механизм удерживания предполагает проникновение молекул внутрь привитой фазы. Поэтому удерживание увеличивается с ростом длины привитой фазы, что подтверждается нашими данными (Рис. 3.3).

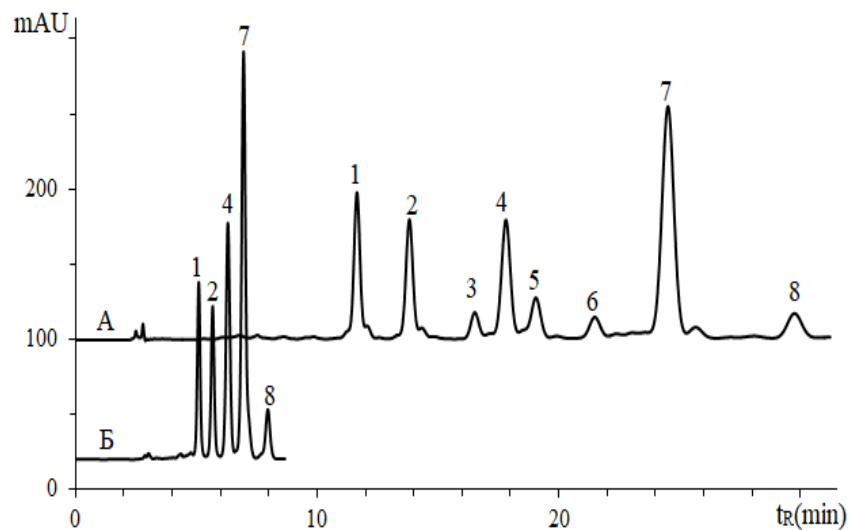


Рис. 3.3. Хроматограммы масла семян момордики кохинхинской на двух стационарных фазах.

Условия записи хроматограмм: (А) колонка 4.6×100 мм Kromasil 100-5C18; (Б) колонка 4.6×100 мм Kromasil 100-5C8; температура термостата колонок 30оС. ПФ: 45 об.% ИПС и 55 об.% CH₃CN, 0.8 мл/мин.

Так удерживание ТАГ масла семян момордики кохинхинской в подвижной фазе 45 об. % ИПС и 55 об. % ацетонитрила резко уменьшается при переходе от стационарной фазы C18 к фазе C8. Следовательно, фазы C18 более удобны по сравнению с фазами с более короткими привитыми радикалами, т.к. снижение концентрации ИПС нежелательно вследствие снижения растворимости ТАГ при росте концентрации ацетонитрила в подвижной фазе. Более того, замена C18 на C8 фазу приводит и к снижению эффективности разделения компонентов ТАГ исследуемого масла, поскольку диапазон удерживаний всех веществ, как видно по карте разделения, уменьшается. Отметим, что уменьшение относительного удерживания веществ более заметно для менее ненасыщенных ТАГ (Рис. 3.4 и Рис. 3.5).

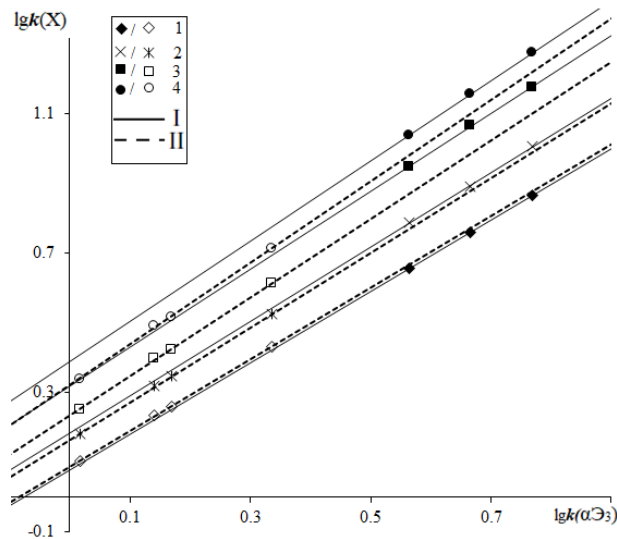


Рис. 3.4. Удерживание некоторых ТАГ масла семян момордики относительного три- α -элеостеарата ($\alpha\text{Э}_3$). 1 – $\alpha\text{Э}_2\text{Л}$, 2 – $\alpha\text{Э}_2\text{О}$, 3- $\alpha\text{Э}_2\text{С}$, 4– $\alpha\text{ЭЛС}$; I – колонка 100×4.6 Kromasil C18 и II – колонка 100×4.6 Kromasil C8.

Триацилглицерины, с различными ECN, хорошо разделяются на обеих колонках, но для ТАГ, с одинаковыми ECN, разделение на фазе C8 лучше, чем на фазе C18. Кроме этого относительное удерживание ТАГ, содержащих радикалы линолевой кислоты ($\alpha\text{-Э}_3$ взят в качестве реперного соединения) на фазе C8 больше, чем на фазе C18. Но для ТАГ, содержащих радикалы олеиновой, стеариновой и пальмитиновой кислот, соотношение обратное.

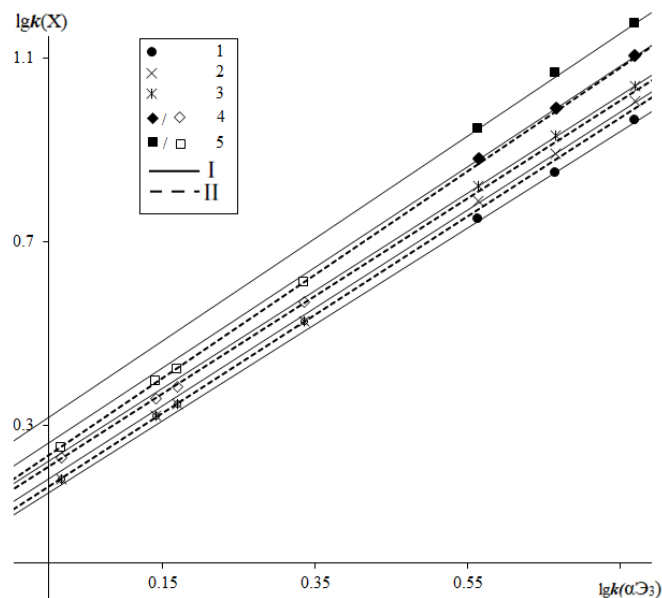


Рис. 3.5. Удерживание некоторых (с другими ECN) ТАГ масла семян момордики относительного три- α -элеостеарата ($\alpha\text{Э}_3$). 1 – $\alpha\text{ЭЛ}_2$, 2 – $\alpha\text{Э}_2\text{О}$, 3 – $\alpha\text{Э}_2\text{П}$, 4 – $\alpha\text{ЭЛО}$, 5 – $\alpha\text{Э}_2\text{С}$; I – колонка 100×4.6 Kromasil C18 и II – колонка 100×4.6 Kromasil C8.

Таким образом, лучшим вариантом для разделения ТАГ является обращено-фазовая ВЭЖХ с использованием фазы C18. При сопоставлении удерживания ТАГ масла

семян момордики кохинхинской в подвижной фазе 45 об.% ИПС и 55 об.% ацетонитрила удерживание резко уменьшается при переходе от колонки Kromasil к колонкам некоторых других марок (Рис. 3.6). По указанной выше причине наш выбор был остановлен на колонке Kromasil C18.

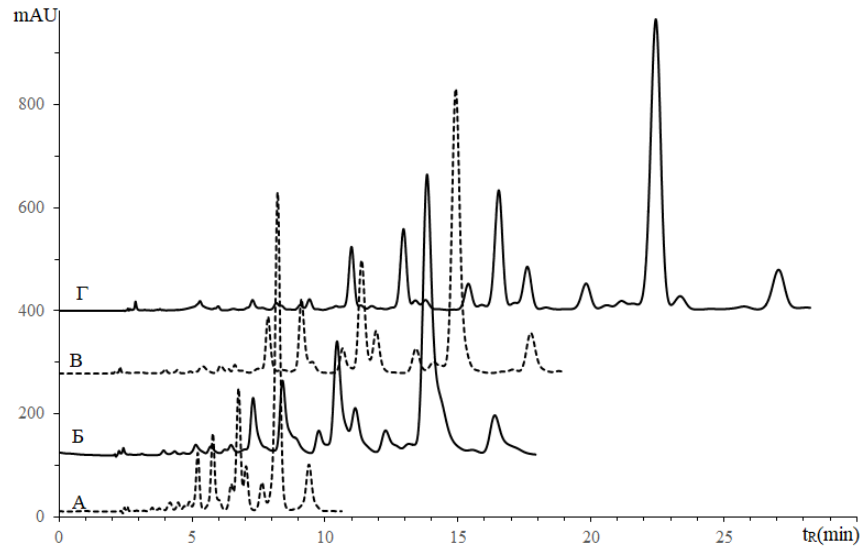


Рис. 3.6. Разделение смеси липофильных веществ на четырех стационарных фазах различных производителей. А - Nucleosil 250×4.0-C18, Б - Lichrospher 250×4.0-C18, В- Диасфер 250×4.6-C18, и Г- Kromasil -250×4.6-C18.

Условия записи хроматограмм: температура термостата колонок 30°C; ПФ: 45 об.% ИПС и 55 об.% CH₃CN; 1.0 мл/мин; при 270 нм.

Выбор состава ПФ

Идеальный элюент для ВЭЖХ должен удовлетворять следующим условиям:

1. Быть приемным для выбранного способа детектирования.
2. Хорошо растворять анализируемые объекты и быть инертным по отношению к компонентам проб.
3. Позволять осуществлять эффективное разделение компонентов.
4. Иметь соответствующие физические свойства для минимизации технических и экологических проблем.

Известно, что к числу органических растворителей, наиболее часто используемых для приготовления подвижных фаз в обращено-фазовой хроматографии, относятся ацетонитрил, метанол и тетрагидрофуран. Ацетонитрил известен как органический растворитель с уникальными характеристиками. Например, этот растворитель в очищенном виде не поглощает УФ спектр (только в диапазоне < 195 нм), не создает высокое давление на входе в хроматографическую колонку, имеет небольшое значение коэффициента преломления и т.д. Наши исследования по замене ацетонитрила метанолом показали меньшую пригодность использования метанола в качестве базового

растворителя из-за более высокой вязкости подвижных фаз, и, как следствие, - более низкой эффективности хроматографической системы (по числу теоретических тарелок). Поэтому ацетонитрил в настоящей работе был использован как основной компонент подвижной фазы при анализе ТАГ в частности. Но при его использовании необходимо подвижную фазу модифицировать более липофильными растворителями для изменения элюирующей силы подвижной фазы и для повышения растворимости растительных масел в ацетонитриле. Модификаторы, используемые чаще всего при разделении триацилглицеринов:

хлороформ или тетрагидрофуран > дихлорметан > ИПС > ацетон
(расположены по уменьшению элюирующей силы) [203].

Выбор модификатора зависит от способа детектирования.

Рефрактометрическое детектирование

Чувствительность рефрактометрического детектора зависит от разности показателей преломления определяемых веществ и подвижной фазы. Поэтому для выбора подвижной фазы необходимо обратить внимание на коэффициент преломления растворителей. В таблице 3.2 представлены физические свойства нескольких растворителей, обычно используемое подвижной фазе для разделения ТАГ методом ОФ ВЭЖХ.

Таблица 3.2.

Физические свойства нескольких растворителей и ТАГ для ОФ ВЭЖХ

Растворители	n_D^{20} [206]	Показатель преломления** (± 0.02)	Диапазон пропускания, нм***
Растворитель			
Ацетонитрил	6.2	1.341	>195
Ацетон	5.4	1.358	>330
Изопропанол	4.3	1.378	>210
Этилацетат	4.3	1.372	>255
Тetraгидрофуран	4.2	1.407	>220
Дихлорметан	3.4	1.424	>230
Диэтиловый эфир	2.9	1.353	>215
ТАГ****			
Три- α -элеостеарат		1.501 \pm 0.02	>320
Трипальмитат		1.464 \pm 0.02	>200

** - <https://refractiveindex.info/>

*** - Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976 (184). – 541 с.

**** - расчет по программе Chemsketch 2.5

Из представленных данных видно, что тетрагидрофуран и дихлорметан имеют наиболее высокие значения показателей преломления, близкие к показателям преломления ТАГ. Поэтому они неприемлемы для определения ТАГ вследствие низкой чувствительности детектирования. Диэтиловый эфир был также исключен из списка приемлемых модификаторов вследствие высокой летучести.

Растворимость масла момордики кохинхинской в нескольких растворителях была определена весовым методом после отделения насыщенного раствора масла от избытка масла и последующего удаления растворителя на вакуумном ротационном испарителе. Полученные результаты представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3.

Растворимость масла момордики кохинхинской в нескольких растворителях

Растворитель*	Растворимость (мг/мл)	Растворитель	Растворимость (мг/мл)
Ацетон	253 ± 2	Этилацетат	52 ± 2
Ацетонитрил	5 ± 1	ИПС	34 ± 2
Диэтиловый эфир	180 ± 3	Тetraгидрофуран	55 ± 2
Дихлорметан	64 ± 1	Метанол	6 ± 1

* - при температуре 25 ± 1°C

Основная проблема рефрактометрического детектирования состоит в относительно низкой чувствительности (по сравнению со спектрофотометрическим детектированием). В нашей работе было установлено, что для получения хроматограмм с низким уровнем шумов при использовании стандартной аналитической колонки (250×4.6 мм), заполненной сорбентом Kromasil 100-5C18, желательно использовать пробу с концентрацией масла 3 – 6 мг/мл. Поэтому при указанном варианте детектирования наиболее эффективным модификатором подвижной фазы из приведенного выше списка является ацетон.

Следует учитывать, что приемлемые времена удерживания ТАГ, образованных с участием сопряженных триеновых высших жирных кислот, при использовании элюентной системы «ацетонитрил – ацетон» получаются при введении до 30 об. % ацетонитрила, при этом и удерживание менее ненасыщенных ТАГ существенно увеличивается, а растворимость ТАГ с насыщенными ВЖК оказывается достаточно низкой.

Спектрофотометрическое детектирование

Для определения ТАГ с сопряженными двойными связями методом ОФ ВЭЖХ с использованием спектрофотометрического детектора можно использовать несколько систем элюентов, которые не поглощают в УФ-диапазоне с максимумами абсорбции сопряженных соединений (220 - 350 нм). Собственная абсорбция ацетона и этилацетата в УФ-диапазоне исключает их применение. И вследствие высокой летучести диэтилового эфира возникают технические проблемы, препятствующие широкому использованию элюентов на его основе. При сопоставлении дихлорметана и ИПС установили, что первый из них обладает примерно на 1/3 большей элюирующей силой и немногим (примерно на 20 %) большей эффективностью хроматографической системы (по числу теоретических тарелок). Но смеси дихлорметана с ацетонитрилом могут быть неприемлемыми из-за подкисления дихлорметана при хранении высоко химически лабильных сопряженных триеновых соединений (Рис. 3.7).

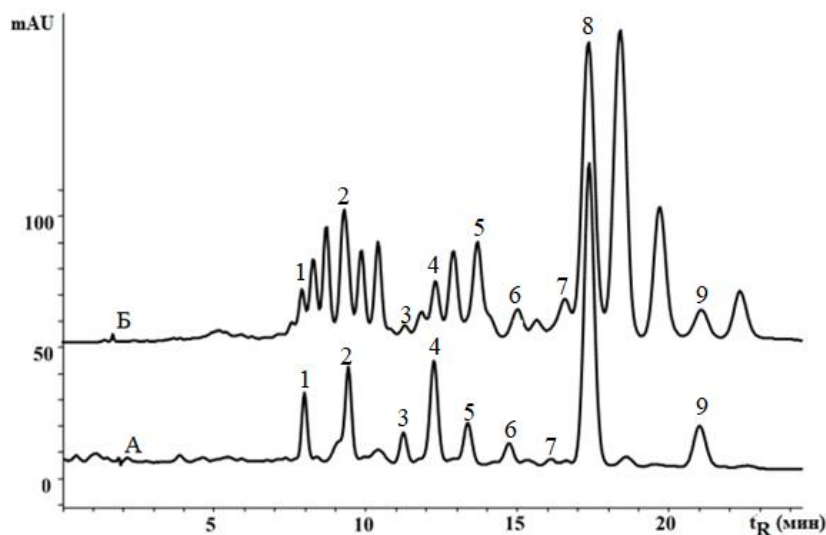


Рис. 3.7. Сохранность масла семян момордики кохинхинской: А – исходное масло, Б – масло, хранившееся в элюенте с дихлорметаном в ацетонитриле в течение 30 дней. Условия: колонка 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18; температура термостата колонок 30°C, ПФ: 40 об.% ИПС и 60 об.% CH₃CN; 1.0 мл/мин; λ = 272 нм; номер пиков в таблице 3.1.

На рисунке 3.7 представлены хроматограммы масла момордики кохинхинской после хранения в элюенте (40 об. % дихлорметана, 55 об. % CH₃CN) в течении 30 дней. Сравнение данной хроматограммы с исходной (записанной до закладки масла на хранение) свидетельствует о том, что масло претерпело заметные изменения. По указанной выше причине наш выбор был остановлен на элюентной системе «ацетонитрил – ИПС».

Для выбора состава подвижной фазы при постоянной скорости подачи ПФ (1 мл/мин) и температуре (30°C) исследовали зависимость степени разделения компонентов сложной смеси от состава ПФ. В качестве компонентов, разделение которых является наиболее критичным, были выбраны соединения № 3, 4 и 5 из масла семян момордики кохинхинской. Фрагменты хроматограмм представлены на рисунке 3.8, а параметры разделения в таблице 3.4. По представленным данным для полого разделения компонентов № 3, 4 и 5 следует использовать ПФ, содержащие не более 50% ИПС. При этом покое разделение всех компонентов масла момордики может быть осуществлено за времена порядка 20 мин.

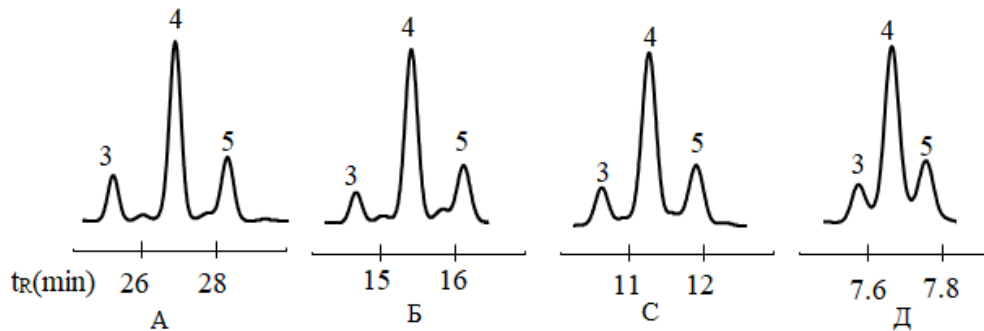


Рис. 3.8. Разделение трех ТАГ при различном содержании ИПС в смеси с ацетонитрилом: А – 35 % ИПС, Б – 40 % ИПС, С – 50 % ИПС и Д – 60 % ИПС.

Таблица 3.4

Зависимость разделения трех ТАГ масла семян момордики кохинхинской от состава ПФ

Параметры	Подвижная фазы (доля ИПС об. В CH ₃ CN)			
	35%	40%	50%	60%
Время записи хроматограмм	50	29	19	11
Степень разделения двух пар ТАГ, R _s				
Между пиками 3 и 4	2.43	1.94	1.48	0.98
Между пиками 4 и 5	2.24	1.71	1.40	0.97

Некоторые авторы использовали *n*-гексан как модификатор в системе элюентов ИПС – ацетонитрил для увеличения элюирующей силы и улучшения формы пиков при разделении ТАГ [133, 207] (Рис.3.9).

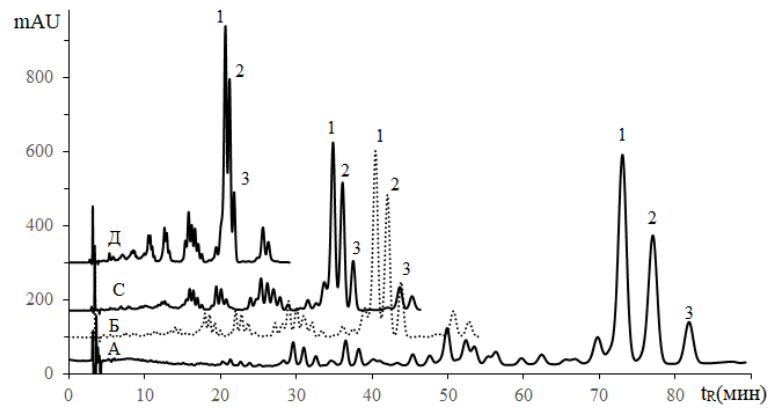


Рис. 3.9. Разделение ТАГ масла семян момордики (при хранении в течение 4 месяцев) при добавлении *n*-гексана в подвижную фазу (ацетонитрил / ИПС 7:3 об.).

Добавка *n*-гексана: А – 0 %, Б – 5 %, С – 8 %, Д – 13 %.

Мы решили более подробно изучить эффекты, вызванные добавлением к подвижной фазе *n*-гексана. Мы исследовали изменение степени разделения 3-х компонентов: α Э₂С (1), α ЭβЭС (2) и βЭ₂С (3) в нескольких составах подвижных фаз. Подвижные фазы различались либо содержанием *n*-гексана при постоянном соотношении ИПС : АЦН (3:7) либо различной долей ИПС, но уже без добавок *n*-гексана. Полученные результаты показаны на рисунке 3.9 и рисунке 3.10. Очевидно, что при добавлении *n*-гексана к подвижной фазе (ИПС и АЦН (3:7 об.)), а также при увеличении концентрации ИПС сила элюирования ТАГ увеличивается. Однако степень разделения $R_s(1/2)$ и $R_s(2/3)$ заметно уменьшается при добавлении *n*-гексана к подвижной фазе. При одинаковом времени анализа образцов добавление *n*-гексана только уменьшает степень разделения ТАГ с сопряженными двойными связями на мономерной фазе. Более того добавки гексана нисколько не влияют на формы пиков.

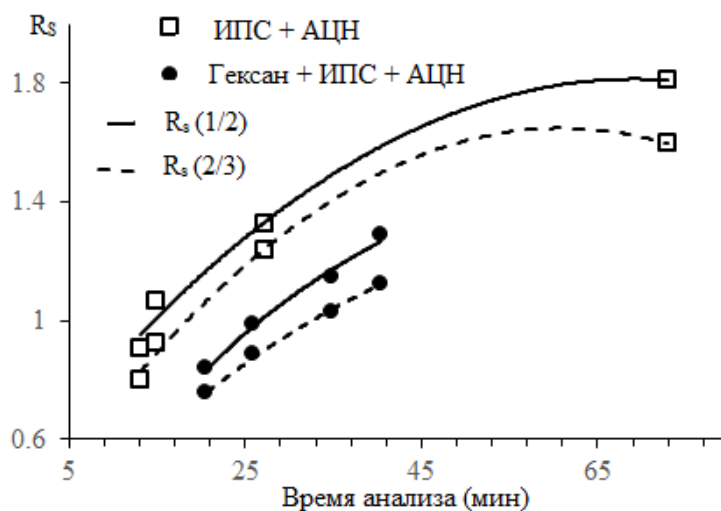


Рис. 3.10. Сравнение степени разделение α Э₂С (1), α ЭβЭС (2) и βЭ₂С (3) при двух составах подвижной фазы.

Выбор скорости подвижной фазы

Для разделения ТАГ растительных масел использовали хроматографические системы: (1) Agilent 1260 Infinity; микроколоночный хроматограф (2) Милихром-А02 (ЗАО "ЭкоНова") со спектрофотометрическим детектором. Важным параметром хроматографической системы является скорость подвижной фазы, которая влияет на эффективность колонки в данной элюентной системе.

Сопоставление графиков Ван-Деемтера (уравнение 3.1) для трех хроматографических систем на примере ТАГ (α Э)₂Л представлено на рисунке 3.11:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (3.1)$$

где: H – высота эквивалентной теоретической тарелки, мкм; A – константа, связанная с так называемой «вихревой» диффузией; B – константа, связанная с продольной диффузией; C – константа, связанная с «сопротивлением» массопереносу, u – линейная скорость подачи подвижной фазы, см/мин.

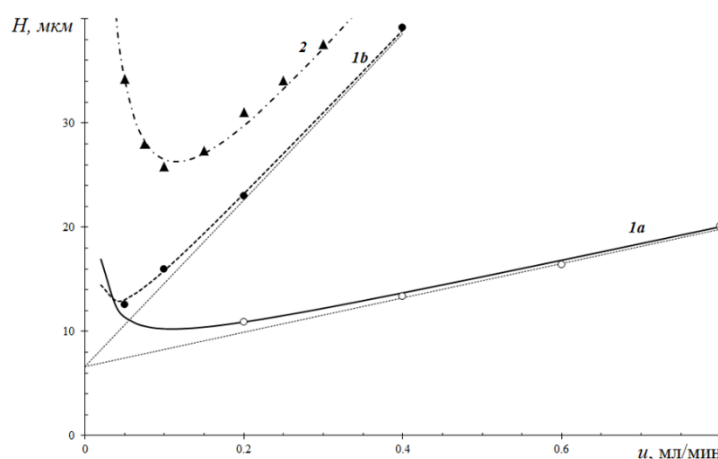


Рис. 3.11. График Ван-Деемтера для трех хроматографических систем. Тестовое вещество: (α Э)₂Л; марка стационарной фазы Kromasil 100-5C18; колонки: 1a – 4.6 × 250 мм (Agilent), 1b - 2.1 × 150 мм (Agilent), 2 - 2.0 × 75 мм (Милихром). Подвижная фаза 45 % ИПС и 55 % ацетонитрила. Температура термостатов колонок – 35 °С.

На рисунке 3.11 графики для систем 1a и 1b не совпадают, хотя это связано с тем, что данные приведены для объемной скорости подвижной фазы. При отнесении результатов к одинаковой линейной скорости (обратно пропорциональной площади поперечного сечения колонки) они практически совпадают, и это не удивительно вследствие заполнения колонок одним и тем же сорбентом одним и тем же производителем. Переход от стандартной аналитической хроматографической колонки размером 4.6×250 мм к микроколонке размером 2×75 мм благоприятен в том смысле, что удается уменьшить практически на порядок расход дорогостоящих растворителей. Если

при этом сохраняется размер частиц сорбента, упакованных в колонку, то только вследствие уменьшения длины колонки число теоретических тарелок должно уменьшиться более чем в 3 раза. Но реальное уменьшение оказалось еще больше. Экспериментальные точки для системы 2 (Рис. 3.11) имеют откровенный минимум, достичь который на хроматографе *Agilent* оказалось весьма проблематично, при этом все они располагаются заметно выше точек, найденных в условиях *1a* и *1b*. Это указывает на дополнительную потерю эффективности, что может быть следствием, например, иного способа введения пробы с остановкой потока в системе 2. Но очевидно, что наивысшая эффективность (по числу теоретических тарелок) в системе 2 достигается при скорости подачи подвижной фазы 100 мкл/мин. Именно эта скорость была использована при записи хроматограмм в настоящей работе. Из представленных данных следует, что в системе 1 при диапазоне скорости 0.1-0.3 мл/мин высота теоретической тарелки оптимальная. Но в этом диапазоне скорости элюент неудобно использовать, из-за больших временных затрат на анализ ТАГ растительных масел. В конечном счете, была выбрана скорость в диапазоне 0.8 – 1.0 мл/мин.

Выбор температуры колонки

Температура колонки очень важна для совпадения время удерживания веществ и разделения компонентов методом ВЭЖХ. Поскольку сорбция ТАГ – процесс экзотерический, то удерживание уменьшается при повышении температуры. Хроматограммы масла момордики записаны при различных температурах колонки с использованием элюента 45% ИПС в ацетонитриле (расчет для компонента α -Э₂С). Результаты представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5.

Параметры разделения ТАГ в масле момордики кохинхинской при различных температурах

Температура колонки	25°C	30°C	35°C	40°C
Время записи хроматограмм (мин)	23	21	20	18
Степень разделения пары ТАГ, R_s				
Между пиками Э ₃ и Э ₂ Л	2.40	2.35	2.32	2.21
Между пиками Э ₂ Л и Э ₂ О	3.73	3.63	3.53	3.32
Между пиками Э ₂ О и Э ₂ П	1.33	1.21	1.15	0.98
Число теоретических тарелок* ($\pm 2.8\%$)				
N	16529	18465	19670	22219

* - погрешность связана с расчетом ширины на половине высоты пика.

Очевидно, что чем выше температуры колонки, тем ниже степень разделения пары ТАГ α -Э₂О и α -Э₂П. Это объясняется тем, что более высокие температуры

благоприятствуют движению молекул аналитов в привитом слое стационарной фазы и увеличивают растворимость ТАГ, что приводит к обоим случаям в более низких значениях I_{gk} и сокращению времени анализа, но при этом наблюдается уменьшение параметра разделения вплоть до потери разделения в некоторых парах ТАГ. Повышенные температуры благоприятствуют эффективному элюированию насыщенных триацилглицеринов с длинной цепью, с которыми часто возникают проблемы растворимости. В итоге в работе использовали температура термостата колонок в диапазоне 30-35°C.

Выбор метода детектирования

Для идентификации общие ТАГ можно использовать несколько вариантов детектирования: рефрактометрический детектор, спектрофотометрический, масс-спектрометрический, или испарительный детектор рассеяния света. Каждый детектор имеет как достоинства, так и недостатки.

Рефрактометрический детектор

Рефрактометрический детектор - это детектор, используемый для детектирования веществ без приемлемых для спектрофотометрического детектирования хромофоров, таких как ТАГ многих масел. Основной недостаток рефрактометрического детектирования связан не столько с невозможностью использования градиентного элюирования, сколько в его относительно низкой чувствительности. По этой причине требуется использование более высоких концентраций масла в образце, что вследствие нелинейности изотерм сорбции может привести к искажению форм пиков, и, как следствие, времен удерживания, осложняя применение инкрементного подхода для предсказания удерживания ТАГ в сложных смесях.

Влияние концентрации масла в анализируемой пробе на получаемые хроматографические параметры анализировали, сопоставляя хроматограммы серии проб растворов льняного масла с последовательно уменьшающейся концентрацией (Рис. 3.12).

По хроматограммам, представленным на рисунке 3.12, видно, что формы пиков ТАГ для начальной пробы (50 мг/мл) заметно искажены, но при разбавлении они постепенно «улучшались» и для концентрации 6.26 мг/г коэффициент асимметрии снизился от 2.55 до 1.15 для трилинолеата. Однако важные для расчета состава ТАГ разности логарифмов факторов удерживания, определенные по временам, соответствующим максимумам пиков, при однотипных заменах радикалов в ТАГ изменялись в существенно меньшей степени. Наконец, экспериментально было установлено, что в качестве наиболее удобной оценки времени удерживания индивидуальных ТАГ при не очень большой перегрузке колонки можно использовать

время, соответствующее середине основания пика при рефрактометрическом детектировании. В таком случае применение инкрементного подхода без погрешностей, превышающих 0.002 логарифмические единицы возможно уже при концентрации ниже 6-10 мг/мл.

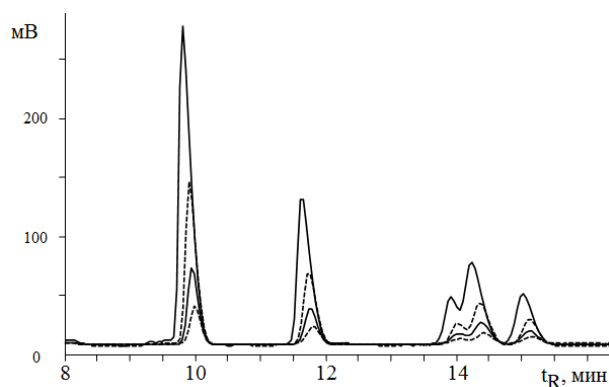


Рис. 3.12. Фрагменты хроматограмм проб льняного масла с различными концентрациями масла в анализируемой пробе. Уменьшение концентрации (сверху вниз): 50.0; 25.0; 12.5 и 6.25 мг/мл. ПФ: 30 об.% CH_3CN в ацетоне, 1 мл/мин; детектор рефрактометрический.

Спектрофотометрический детектор

В настоящее время спектрофотометрический детектор является самым распространенным детектором в ВЭЖХ. Этот тип детектора может быть не слишком дорогим (по сравнению с масс-спектрометрическим детектором и детектором по светорассеиванию). Он имеет более высокую чувствительность (примерно на порядок выше, чем при рефрактометрическом детектировании), относительно менее чувствителен к изменениям температуры окружающей среды или скорости потока подвижной фазы. Кроме этого использование УФ-детекторов допускает градиентное элюирование. При спектрофотометрическом детектировании вследствие более высокой чувствительности детектора можно использовать значительно меньшие концентрации образца в пробах, что позволяет получать достаточно симметричные пики и использовать время удерживания в максимуме пика в качестве параметра удерживания. Однако при определении ТАГ в масле, содержащем радикалы с сопряженными двойными связями, спектрофотометрический детектор не может оценить долю ТАГ, в которых отсутствуют радикалы сопряженных кислот. Поэтому перед использованием спектрофотометрического детектирования необходимо убедиться в отсутствии или оценить долю этих ТАГ используя рефрактометрическое детектирование, что и было использовано в настоящей работе.

Отметим, что альтернативный детектор по светорассеиванию отличается дороговизной.

Масс-спектрофотометрический детектор

Масс-спектрометрия (МС) является мощным аналитическим инструментом, который может предоставить как структурную информацию о соединениях, так и количественные данные, относящиеся к массе. В оптимальных условиях он может обеспечить определение молекулярной массы ТАГ, их эмпирическую формулу и часто полную структуру соединения благодаря частичной фрагментации. Но имеющийся в нашем распоряжении простой детектор с одним квадруполем практически не пригоден для количественного анализа.

На практике для получения масс-спектров в режиме электрораспыления используют такие полярные и относительно летучие растворители, как воду, метанол или ацетонитрил. Но если масс-спектрометрия проводится с использованием неводной системы растворителей, то интенсивность ионизации является относительно низкой. Для повышения эффективности ионизации в растворитель добавляют либо ацетат или формиат аммония, либо ацетат натрия или лития [208] (Рис. 3.13). Добавление этих ионов в элюент не влияло на время удерживания анализируемых веществ.

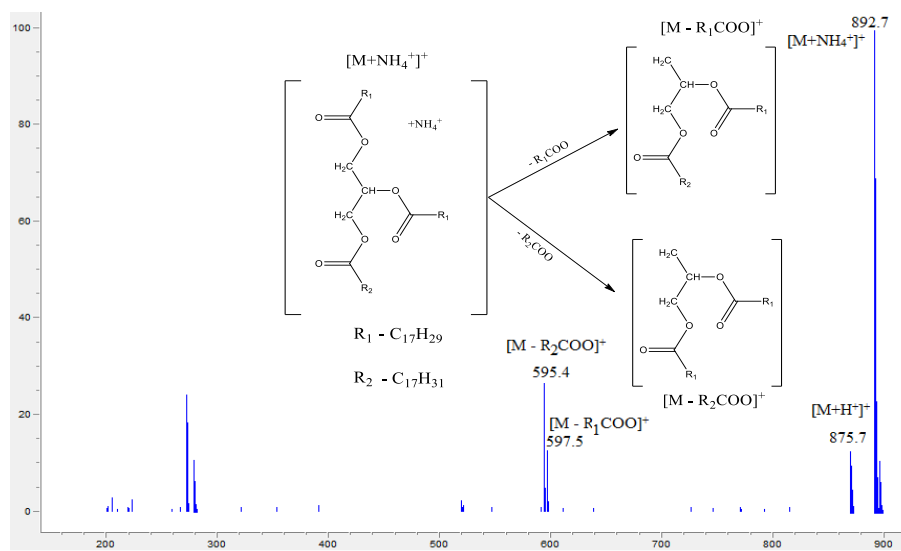


Рис. 3.13. Масс-спектр ТАГ дижакарандат-линолеата

3.2. Установление качественного и количественного состава ТАГ растительных масел

В настоящем работе мы комбинировали инкрементный подход и анализ электронных спектров и масс-спектров для определения видовой состава ТАГ, а даже эстолидов (тетраацилглицеринов), содержащих радикалы с сопряженными двойными связями более 20 масел, содержащих радикалы кислот с сопряженными двойными связями: сопряженные диеновые, триеновые и тетраеновые варианты.

3.2.1. Разделение ТАГ масла семян момордики кохинхинской

Момордика кохинхинская относится к числу экономически важных пищевых растений в ряде регионов Юго-Восточной Азии. Масло семян одного из видов этого растения, момордики харангия, отличается высоким содержанием триацилглицеринов, образованных с участием α -элеостеариновой кислоты. А в масле семян момордики кохинхинской в работе [209] триеновая кислота вообще не была обнаружена. В настоящей работе методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии исследованы масла семян момордики кохинхинской, собранные в 15 регионах Вьетнама. Установлено, что триацилглицерины всех масел содержат радикалы одной доминирующей кислоты – α -элеостеариновой, поэтому семена растения являются ценным сырьем для получения фармакологически важного масла.

Для анализа видового состава ТАГ масла момордики кохинхинской вначале мы использовали рефрактометрическое детектирование, позволяющее детектировать все виды ТАГ. После этого нами были разработаны условия для разделения ТАГ со спектрофотометрическим детектированием. Две хроматограммы масла семян момордики кохинхинской, записанные в двух различных подвижных фазах при спектрофотометрическом и рефрактометрическом детектировании, представлены на рисунке 3.14.

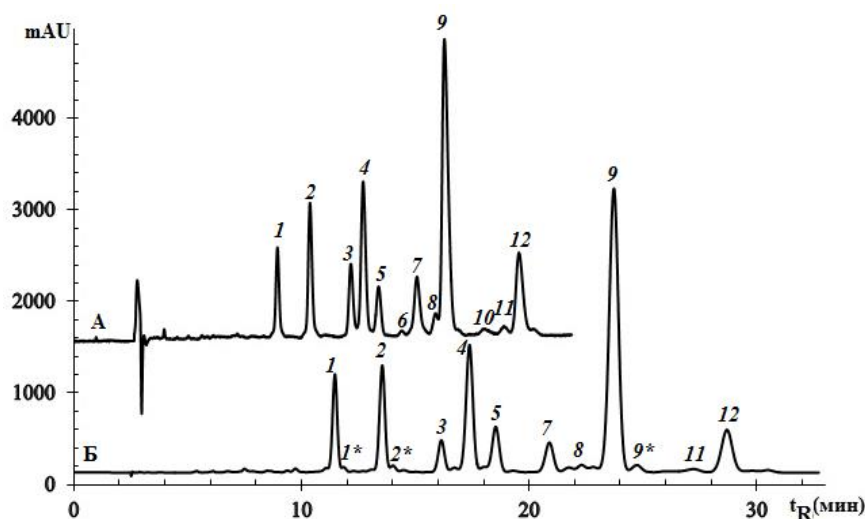


Рис. 3.14. Хроматограммы масла семян момордики кохинхинской при спектрофотометрическом (Б) и рефрактометрическом (А) детектировании.

Условия записи хроматограмм: колонка 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18; температура термостата колонок 30°C: А – ПФ: 45 об.% пропан-2-ол и 55 об.% CH₃CN, 1.0 мл/мин. ($\lambda = 278$ нм); Б – ПФ: 70 об.% ацетона и 30 об.% CH₃CN, 1.0 мл/мин.

Несмотря на различие в высотах пиков обе хроматограммы масла семян момордики кохинхинской (А и Б) в значительной степени похожи друг на друга. Очевидно, что порядок удерживания основных компонентов практически не изменяется при переходе от одной элюентной системы к другой. Полный анализ был выполнен с использованием инкрементного подхода, подтверждая правильность отнесения пиков по параметрам масс-спектров. При спектрофотометрическом детектировании некоторые пики, отсутствующие радикалы с СОК, не проявляется (пик №10, № 6).

Таблица 3.6.

Параметры удерживания триглицеридов масла момордики кохинхинской и их отнесение при рефрактометрическом детектировании

№	ТАГ	t _R , мин	lgk	Инкременты (±0.002)				M/z [M+H] ⁺	Мол. % (n=3)
				αЭ→Л	Л→О	О→П	П→С		
1	αЭ ₃	8.91	0.409					873.7	5.10 ± 0.18
2	αЭ ₂ Л	10.37	0.498	0.089				875.7	7.86 ± 0.15
3	αЭЛ ₂	12.17	0.587	0.089				877.7	5.07±0.17
4	αЭ ₂ О	12.71	0.611		0.113			877.8	9.68±0.18
5	αЭ ₂ П	13.38	0.639			0.028		851.7	3.62±0.15
6	Л ₃	14.41	0.678	0.090				873.7	0.78±0.12
7	αЭЛО	15.07	0.701	0.090				879.7	5.22±0.17
8	αЭЛП	15.87	0.728	0.090				853.7	2.23±0.18
9	αЭ ₂ С	16.28	0.741				0.103	879.7	48.45±0.2
10	Л ₂ О	17.97	0.792	0.090	0.114			881.7	0.90±0.13
11	αЭО ₂ +Л ₂ П	18.91	0.817			0.026		881.7 +855.7	0.59±0.14
12	αЭЛС	19.49	0.832	0.091			0.104	881.7	10.5±0.16
Среднее значение				0.090	0.113	0.027	0.103	-	-

Их представленных данных следует, что одинаковым изменениям структуры ТАГ соответствуют одинаковые инкременты – при рефрактометрическом детекторе (табл. 3.6) для замены α-элеостеариновой кислоты на линолевою (0.090 логарифмических единиц), линолевой на олеиновую (0.113), олеиновой на пальмитиновую (0.027) и пальмитиновой на стеариновую (0.103) и при спектрофотометрическом детектировании (Табл. 3.7) для замены α-элеостеариновой кислоты на линолевою (0.092 логарифмических единиц)

линолевой на олеиновую (0.130), олеиновой на пальмитиновую (0.032) и пальмитиновой на стеариновую (0.121).

Таблица 3.7.

Параметры удерживания триглицеридов масла момордики кохинхинской и их отнесение при спектрофотометрическом детектировании

№*	ТАГ	Мол. % (n=3)	t _R мин	lgk	Инкременты (±0.002)			
					αЭ→Л	Л→О	О→П	П→С
1	αЭ ₃	5.31 ± 0.16	11.47	0.555				
2	αЭ ₂ Л	8.01 ± 0.15	13.55	0.645	0.091			
3	αЭЛ ₂	5.31 ± 0.16	16.14	0.737	0.092			
4	αЭ ₂ О	10.04 ± 0.17	17.38	0.775		0.129		
5	αЭ ₂ П	3.74 ± 0.14	18.53	0.807			0.032	
7	αЭЛО	5.30 ± 0.15	20.89	0.867	0.092			
8	αЭЛП	2.50 ± 0.16	22.31	0.899	0.092		0.032	
9	αЭ ₂ С	49.34 ± 0.21	23.72	0.929				0.122
11	αЭО ₂ +Л ₂ П	0.27 ± 0.13	27.37	0.998		0.131		
12	αЭЛС	10.18 ± 0.20	28.69	1.020	0.091			0.121
Среднее значение					0.092	0.130	0.032	0.121

* - номера пиков на хроматограмме на рисунке 3.14

Для определения количественных соотношений между видами ТАГ при спектрофотометрическом детектировании можно использовать площади пиков с поправкой на число радикалов α-элеостеариновой кислоты в ТАГ, а при рефрактометрическом детектировании необходимо проводить расчет по площадям пиков с поправкой на коэффициенты преломления видов ТАГ [163]. При этом идентификация пиков по инкрементному подходу хорошо выполняется как при рефрактометрическом, так и при спектрофотометрическом детектировании. Результаты представлены в таблицах 3.6 и 3.7, а результаты количественного определения, представленные в таблице 3.8, свидетельствуют о том, что оба метода дают сходимые результаты. Таким образом, использование расчетных значений коэффициентов преломления видов ТАГ позволяет достаточно надежно выполнять количественный анализ.

Показано, что октадекатриеновая кислота в количестве 59 – 61% мол. входит в состав триглицеридов большинства исследованных масел. Причем октадекатриеновая кислота представлена в основном α -элеостеариновой и небольшими примесями β -элеостеариновой (менее 1 мол. %).

Таблица 3.8.

Расчеты жирнокислотного состава масла момордики кохинхинской при УФ и рефрактометрическом детектировании

Кислота	Содержание радикалов кислот в составе ТАГ (по площадям пиков), моль % *	
	РФ	УФ
(α Э) C18:3	59.38 \pm 0.32	60.58 \pm 0.30
(Л) C18:2	13.36 \pm 0.22	12.20 \pm 0.15
(О) C18:1	5.66 \pm 0.13	5.29 \pm 0.11
(П) C16:0	1.95 \pm 0.08	2.08 \pm 0.07
(С) C 18:0	19.65 \pm 0.09	19.84 \pm 0.10

* - погрешность связана с невозможностью надежного разделения площадей пары ТАГ: Л₂П и ЭО₂.

3.2.2. Масло семян кентрантуса красного

Масло семян кентрантуса отличается накоплением триацилглицеринов, содержащих радикалы двух изомерных сопряженных октадекатриеновых кислот – α - и β -элеостеариновых в сопоставимых количествах. Хроматограммы масла семян кентрантуса красного, записанные в двух различных подвижных фазах при спектрофотометрическом и рефрактометрическом детектировании представлены на рисунке 3.15.

По анализу двух характеристик пиков - времен удерживания на хроматограммах масел кентрантуса и электронных спектров можно сделать отнесение пиков ТАГ (Табл. 3.10). На хроматограмме А не виден только пик №9 на рисунке 3.15, состав которого не удалось определить. Масло является интересным примером сопоставимых количеств изомерных октадекатриеновых кислот.

Изомерный характер этих пиков следует из различия в их электронных спектрах. Полученные результаты подтверждают литературные данные о том, что в масле семян кентрантуса содержатся и α - и β -элеостеариновые кислоты. В таком случае в пиках 1 – 2

– 3 два радикала α -элеостеариновой кислоты последовательно заменяются радикалами β -элеостеариновой кислоты: 1 – ди- α -элеостеарат-линолеат, $(\alpha\text{Э})_2\text{Л}$, 2 – α -элеостеарат- β -элеостеарат-дилинолеат, $\alpha\text{Э}\beta\text{ЭЛ}$, и 3 – ди- β -элеостеарат-линолеат, $(\beta\text{Э})_2\text{Л}$.

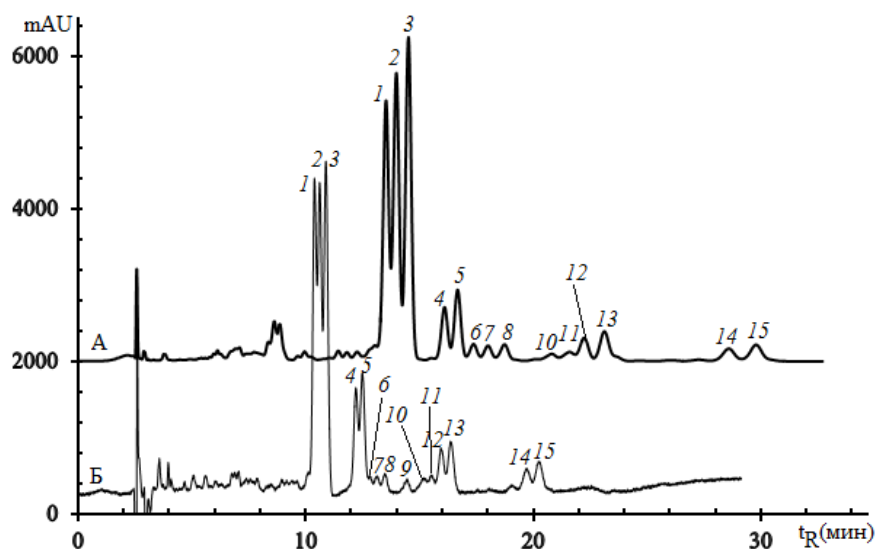


Рис. 3.15. Хроматограммы масла семян кентрантуса красного при спектрофотометрическом (А) и рефрактометрическом (Б) детектировании
Условия записи хроматограмм: колонка 4.6×250 мм Kromasil 100-5С18; температура термостата колонок 30°С, А – подвижная фаза 45 об.% ИПС и 55 об.% CH_3CN , 1.0 мл/мин ($\lambda = 278$ нм), концентрация: 1 мг/мл; Б – подвижная фаза 70 об.% ацетона и 30 об.% CH_3CN , 1.0 мл/мин.

Поскольку в этом масле присутствуют радикалы не одной, а двух изомерных октадекатриеновых кислот, то при различии их спектральных характеристик затрудняет количественное определение их содержания в образцах по площадям пиков, записанных с использованием спектрофотометрического детектора. Но в нашем случае проблема может быть решена проще: существует возможность найти эквивалентную изобестическую точку (точку в которой который абсорбции обоих типов радикалов одинаковы); тогда, записывая хроматограммы при этом длине волны (в этом случае $\lambda = 278$ нм, см. далее), можно использования площади пиков без введения каких-либо поправочных коэффициентов. Рассчитанный по найденному видовому составу масла и жирнокислотный состав представлены в таблице 3.10.

Таблица 3.9.

Параметры удерживания триглицеридов масла семян кентрантуса красного и их отнесение при рефрактометрическом и спектрофотометрическом детектировании

№ пиков*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Виды ТАГ	α Э ₂ Л	α ЭβЭЛ	βЭ ₂ Л	α ЭЛ ₂	βЭЛ ₂	α Э ₂ О	α ЭβЭО	βЭ ₂ О	Л ₃	α ЭЛО	βЭЛО	α ЭЛП	βЭЛП	α ЭЛС	βЭЛС
При рефрактометрическом детектировании															
t _R (мин)	10.39	10.62	10.89	12.21	12.49	12.79	13.13	13.49	14.47	15.19	15.56	15.94	16.39	19.70	20.28
$\Delta(i \rightarrow j)$	α Э→βЭ		0.012	0.014		0.012		0.014	0.014			0.012		0.014	
	α Э→Л				0.090	0.090				0.091					
	Л→О						0.115	0.117	0.117						
	О→П													0.025	0.027
	П→С														0.107
%ТАГ	17.49	18.23	21.02	7.55	8.94	1.83	1.46	1.93	1.51	1.99	1.71	4.31	5.21	2.89	3.92
±S**	0.25	0.21	0.27	0.19	0.20	0.12	0.11	0.14	0.13	0.12	0.13	0.18	0.13	0.14	0.12
При спектрофотометрическом детектировании															
t _R (мин)	13.50	13.99	14.52	16.10	16.68	17.38	18.01	18.74	-	20.82	21.60	22.24	23.13	28.60	29.79
$\Delta(i \rightarrow j)$	α Э→βЭ		0.019	0.020		0.018		0.018	0.020		0.018		0.019		
	α Э→Л				0.092	0.091									
	Л→О						0.131	0.131	0.131						
	О→П												0.032	0.033	
	П→С														0.121
%ТАГ	16.38	18.49	20.74	7.71	10.28	1.37	1.30	1.48	-	1.56	2.03	4.58	6.04	3.45	4.50
±S	0.19	0.21	0.19	0.20	0.18	0.14	0.18	0.20	-	0.14	0.15	0.15	0.13	0.16	0.21
M/z; [M+H] ⁺	875.8			877.8		877.7			873.8	879.7		853.7		881.7	

* номер пиков на рисунке 3.15; ** n=3

Таблица 3.10.

Расчеты состава масла кентрантуса красного при УФ и рефрактометрическом детектировании после поправок

№	Кислота	Содержание радикалов кислот мол. %	
		РФ	УФ
1	(α Э) C18:3	24.79 \pm 0.23	24.23 \pm 0.21
2	(β Э) C18:3	28.61 \pm 0.24	29.03 \pm 0.23
3	(Л) C18:2	38.37 \pm 0.26	37.94 \pm 0.25
4	(О) C18:1	2.76 \pm 0.09	2.58 \pm 0.12
5	(П) C16:0	3.20 \pm 0.07	3.54 \pm 0.07
6	(С) C 18:0	2.29 \pm 0.06	2.69 \pm 0.09

3.2.3. Масло семян жакарнды мимозолистной

Масло жакарнды мимозолистной – субтропического растения, родиной которого является Южная Америка, но которое выращивается в настоящее время во многих регионах мира с подходящим климатом, в том числе и во Вьетнаме. Из семян растения добывают масло, проявившее антиканцерогенную активность благодаря биосинтезу одной из шести природных сопряженных октадекатриеновых кислот, жакарндовой, 8Z,10E,12Z-октадекатриеновой. Для анализа видового состава ТАГ масла жакарнды вначале использовали рефрактометрическое детектирование, позволяющее детектировать все виды ТАГ. Хроматограммы масла семян жакарнды мимозолистной записаны при спектрофотометрическом и рефрактометрическом детектировании представлены на рисунке 3.16.

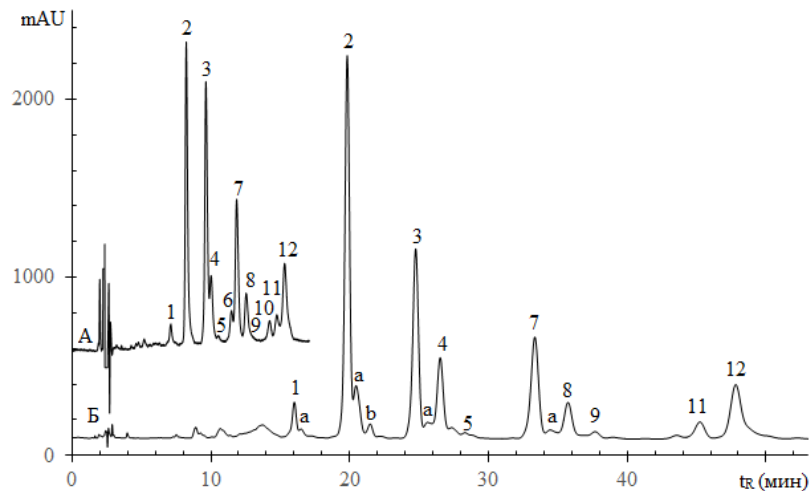


Рис. 3.16. Хроматограммы масла семян жакарнды мимозолистной при спектрофотометрическом (Б) и рефрактометрическом (А) детектировании

Условия записи хроматограмм: колонка 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18; температура термостата колонок 30°C; Б – подвижная фаза 35 об.% ИПС и 65 об.% CH₃CN, 1.0 мл/мин, λ = 278 нм; А – подвижная фаза 70 об.% ацетона и 30 об.% CH₃CN, 1.0 мл/мин.

Таблица 3.11.

Параметры удерживания ТАГ масла жакаранды мимозолистной и их отнесение при рефрактометрическом детектировании

№	ТАГ	t _R мин	lgk	Инкременты (±0.002)				m/z [M+H ⁺]	Моль %
				Ж_Л	Л_О	О_П	П_С		
1	Ж ₃	7.12	0.267					873.7	1.94 ± 0.15
2	Ж ₂ Л	8.23	0.360	0.094				875.7	24.32 ± 0.23
3	ЖЛ ₂	9.65	0.456	0.096				877.7	23.20 ± 0.26
4	Ж ₂ О	10.03	0.479		0.119			877.7	7.15 ± 0.21
5	Ж ₂ П	10.53	0.507			0.028		851.6	1.06 ± 0.15
6	Л ₃	11.39	0.551	0.095				873.7	3.04 ± 0.18
7	ЖЛО	11.9	0.575	0.096				879.7	15.99 ± 0.23
8	ЖЛП	12.52	0.603			0.028		853.7	5.41 ± 0.20
9	Ж ₂ С	12.77	0.614				0.107	879.7	0.99 ± 0.11
10	Л ₂ О	14.2	0.670		0.119			881.7	2.75 ± 0.13
11	ЖО ₂	14.85	0.694		0.119			883.7	3.70 ± 0.13
12	ЖЛС	15.32	0.710	0.096			0.107	881.7	10.45 ± 0.21
Среднее				0.096	0.119	0.028	0.107		

Отметим, что и в данном случае переход от рефрактометрического к спектрофотометрическому детектированию позволил примерно на порядок увеличить чувствительность детектирования и в несколько раз снизить фоновый шум, что позволяет записывать хроматограммы в подвижных фазах с относительно слабой элюирующей силой. Полный анализ может быть выполнен только с использованием метода относительного анализа удерживания. Для удобства сопоставления нумерация пиков, предложенная на хроматограмме, сохранена. При этом некоторые из них, не содержащие радикалы октадекатриеновой кислоты, не видны на хроматограмме (пик №10, № 6).

Состав ТАГ легко рассчитывается по инкрементному подходу (Табл. 3.11 и Табл. 3.12); он был подтвержден анализом масс-спектров. Значения инкрементов, полученные для данной подвижной фазы в таблице 3.12 (30% CH₃CN, 70% CH₃COCH₃), составили: Δ(Ж→Л)= 0.096, Δ(Л→О)= 0.119, Δ(О→П)= 0.028, Δ(П→С)= 0.107

Таблица 3.12.

Параметры удерживания триглицеридов масла жакаранды мимозолистной и их отнесение при спектрофотометрическом детектировании

№	ТАГ	t _R мин	lgk	Инкременты (± 0.002)				Моль %
				Ж_Л	Л_О	О_П	П_С	
1	Ж ₃	16.02	0.733					1.36 \pm 0.16
2	Ж ₂ Л	19.83	0.841	0.108				22.50 \pm 0.23
3	ЖЛ ₂	24.76	0.950	0.109				24.78 \pm 0.25
4	Ж ₂ О	26.52	0.983		0.142			6.25 \pm 0.21
5	Ж ₂ П	28.31	1.014			0.031		0.42 \pm 0.12
7	ЖЛО	33.34	1.091	0.108	0.142			18.01 \pm 0.22
8	ЖЛП	35.73	1.124	0.110		0.032		6.42 \pm 0.21
9	Ж ₂ С	37.69	1.148				0.135	0.75 \pm 0.11
11	ЖО ₂	45.33	1.234		0.143			3.83 \pm 0.12
12	ЖЛС	47.82	1.258	0.110			0.135	15.67 \pm 0.14
Среднее значение				0.109	0.142	0.032	0.135	

При смене состава элюента изменяются инкременты. Так для подвижной фазы (40% CH₃CH(OH)CH₃, 60% CH₃CN), составили: $\Delta(\text{Ж} \rightarrow \text{Л}) = 0.109$, $\Delta(\text{Л} \rightarrow \text{О}) = 0.142$, $\Delta(\text{О} \rightarrow \text{П}) = 0.032$, $\Delta(\text{П} \rightarrow \text{С}) = 0.135$. Октадекатриенная кислота представлена в основном жакарандовой и небольшими примесями календовой (5.81 моль %) кислот. Расчет жирнокислотного состава масла жакаранды представлен в таблице 3.13.

Таблица 3.13.

Расчет жирнокислотного состава масла жакаранды мимозолистной при УФ и рефрактометрическом детектировании после поправок

№	Кислота	Содержание радикалов кислот, моль %	
		РФ	УФ
1	(Ж) C18:3	43.86 \pm 0.19	44.30 \pm 0.18
2	(Л) C18:2	39.07 \pm 0.30	37.17 \pm 0.21
3	(О) C18:1	11.10 \pm 0.14	10.58 \pm 0.13
4	(П) C16:0	2.16 \pm 0.08	2.27 \pm 0.08
5	(С) C 18:0	3.81 \pm 0.08	5.69 \pm 0.06

3.2.4. Масло семян трихозанта змеевидного

Согласно литературным данным [39], масло семян *Trichosanthes kirilowii* состоит из ТАГ, обазованных линоленовой (38,2%), пуниковой (38,0%) и олеиновой (11,8%) кислотами. В случае масла семян *Trichosanthus anguina* мы можем увидеть пять групп пиков на хроматограмме (Рис. 3.17). Состав десяти основных пиков с одинаковыми электронными спектрами типа пуниковой кислоты определен в таблице 3.14.

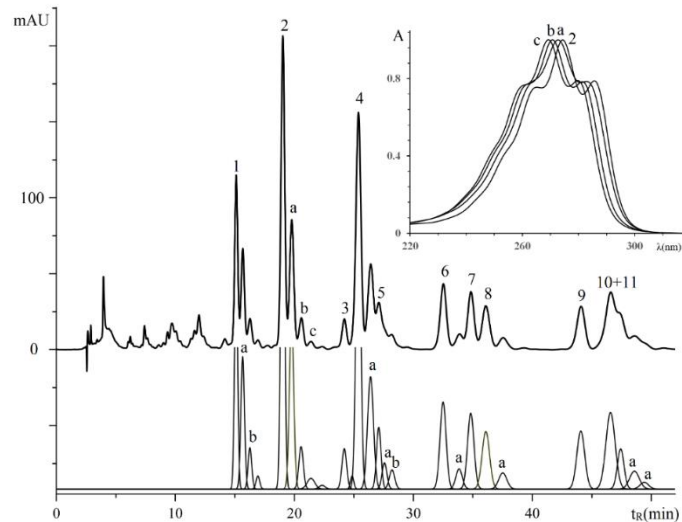


Рис. 3.17. Хроматограммы масла семян трихозанта змеевидный при спектрофотометрическом.

Условия записи хроматограмм: колонка 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18; температура термостата колонок 30°C, подвижная фаза 45 об.% ИПС и 55 об.% CH₃CN, 1.0 мл/мин.

На рисунке 3.17 знаком *a*, *b* отмечены соединения, в которых вместо радикала пуниковой кислоты в соединении присутствуют один или два радикала α -элеостеариновой кислоты. Используя инкрементный подход, мы выполнили расчёт видового состава ТАГ исследуемого масла. Были рассчитаны инкременты для замены обычных кислот - линолевой на олеиновую (0.142), олеиновой на пальмитиновую (0.031), и пальмитиновой на стеариновую (0.135). На хроматограмме масла семян трихозанта имеются еще дополнительные пики (*a*, *b* и *c*), отделяемые от трипуниката в слабом элюенте, что обычно наблюдается при присутствии в образце близких по строению изомеров. Анализом электронных спектров и инкрементов показано, что масло трихозанта содержит не только пуниковую кислоту, но и позднее элюирующиеся ТАГ с одной или двумя заменами пуниковой кислоты на α -элеостеариновую (*a*, *b*).

Таблице 3.14.

Параметры удерживания триглицеридов масла трихозанта и их отнесение по инкрементному подходу при спектрофотометрическом детектировании

№	ТАГ	t _R (мин)	lgk	Инкременты (±0.002)				m/z [M+H ⁺]	Доля %
				Пу_Л	Л_О	О_П	П_С		
1	Пу ₃	15.11	0.703					873.8	6.18 ± 0.22
2	Пу ₂ Л	19.04	0.820	0.118				875.8	18.43 ± 0.25
3	ПуЛ ₂	24.20	0.939	0.118				877.7	2.96 ± 0.13
4	Пу ₂ О	25.39	0.962		0.141			877.7	17.18 ± 0.21
5	Пу ₂ П	27.10	0.993			0.031		851.8	4.33 ± 0.20
6	ПуЛО	32.52	1.080	0.118				879.8	10.25 ± 0.15
7	ПуЛП	34.84	1.112			0.032		853.7	8.14 ± 0.19
8	Пу ₂ П	36.09	1.128				0.135	879.8	4.26 ± 0.26
9	ПуО ₂	44.09	1.221		0.142			881.8	7.39 ± 0.22
10 +11	ПуЛС+ ПуОП	46.59	1.246	0.118			0.135	881.7 +855.7	20.24 ± 0.21
Среднее значение				0.118	0.142	0.031	0.135		

По всем обнаруженным ТАГ был определен и жирнокислотный состав масла: на октадекатриеновую кислоту приходится 51.70 ± 0.35 моль % (большая для внутренней нормировки погрешность связана в основном с невозможностью надежного разделения площадей проблемной пары ТАГ - ХЛС с ХОП), на линолевую - 11.90 ± 0.15 моль %, олеиновую - 15.1 ± 0.17 моль %, пальмитиновую - 9.5 ± 0.14 моль % и стеариновую кислоты - 12.51 ± 0.14 моль %. Октадекатриеновая кислота представлена в основном пуниковой и примесями α -элеостеариновой (16.9 моль %) и небольшим количеством β -элеостеариновой (< 0.3%) кислот. Результаты подтверждены анализом спектров, полученных при масс-спектрометрическом детектировании и результатом определения с использованием рефрактометрического детектора.

3.2.5. Масло семян катальпы бигнониевидной

Хроматограмма масла семян катальпы бигнониевидной, записанная при спектрофотометрическом детектировании представлена на рисунке 3.18, знаком * отмечены соединения, в которых вместо одного радикала катальпавой кислоты в соединении присутствуют радикалы β -элеостеариновой кислоты. Используя

инкрементный подход, мы выполнили расчёт видового состава исследуемого масла (Табл. 3.15).

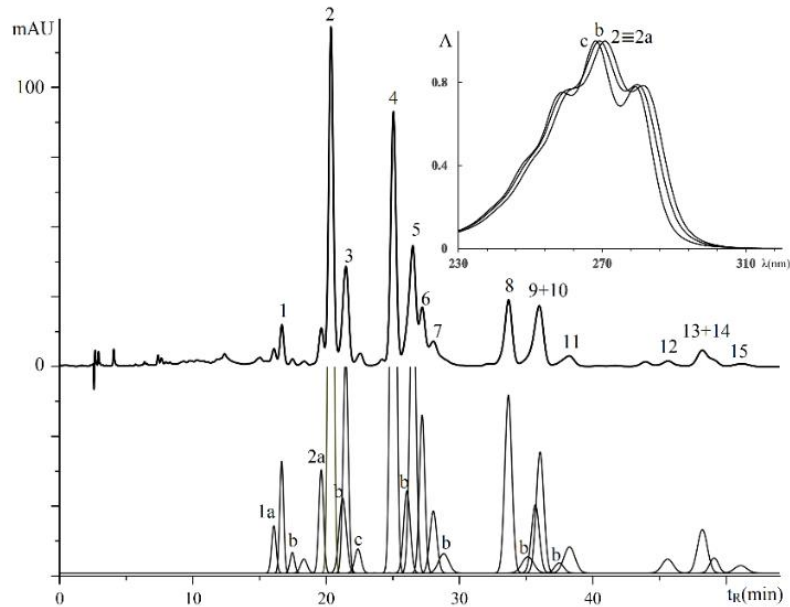


Рис. 3.18. Хроматограммы масел семян катальпы при спектрофотометрическом детектировании.

Условия записи хроматограмм: колонка 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18, температура термостата колонок 30°C. Подвижная фаза 35 об.% ИПС и 55 об.% CH₃CN, 1.0 мл/мин.

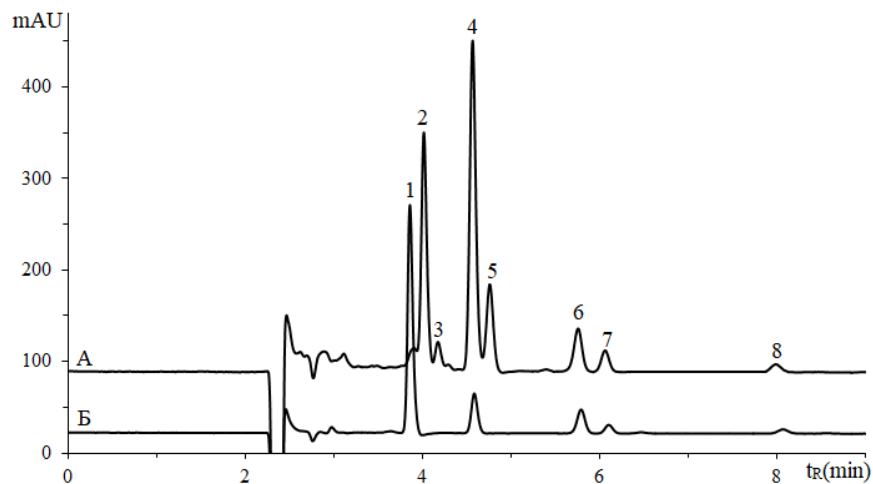


Рис. 3.19. Разделение жирных кислот масла катальпы (А) на фоне кислот масла льняного (Б). 1- Лн, 2-Ж, 3-βЭ, 4-Л, 5- У, 6- О, 7- П, 8-С.

Условие записи хроматограмм: при РФД; ПФ: 29.5 об. % ацетон, 0.5% уксусная кислота и 70% ацетонитрил. Скорость ПФ: 0.8 мл/мин. Температура колонки: 30°C

При гидролизе масел катальпы в мягких условиях (раствор 15% NaOH в спирте при комнатной температуре в течение суток) в гидролизате обнаруживаются семь кислот. По

характеристическим УФ-спектрам сопряженные октадекатриеновые кислоты представляют собой смесь катальповой с небольшим количеством β -элеостеариновой. По сравнению хроматограммы гидролизата данного масла с гидролизатом масла льняного обнаруживаем диеновую кислоту Y, элюирующуюся после линолевой кислоты. В соответствии с литературными данными необычной октадекадиеновой кислотой Y является (9E,12E)-октадекадиеновая кислота.

Таблица 3.15.

Параметры удерживания триглицеридов масла катальпы и их отнесение по инкрементному подходу

№	ТАГ	t _R мин	lgk	Инкременты (± 0.002)					M/z	Мол. % *
				КТ→Л	Л→У	Л→О	О→П	П→С		
1a	ЛнКТ ₂	16.08	0.735						873.7	0.56
1	КТ ₃	16.67	0.753							1.08
2a	ЛнКТЛ	19.63	0.836						875.8	2.56
2	КТ ₂ Л	20.36	0.854	0.100						12.02
3	КТ ₂ У	21.50	0.881		0.027					2.87
4	КТЛ ₂	25.04	0.955	0.101					877.8	42.24
5	КТУЛ	26.50	0.982		0.027				877.8	9.74
6	КТ ₂ О	27.19	0.995			0.141			877.8	2.28
7	КТУ ₂	28.05	1.009		0.027				877.8	4.62
9	КТЛО	33.67	1.096	0.101					879.7	7.69
10	КТУО	35.69	1.123		0.027					2.84
11	КТЛП	36.03	1.127				0.032		853.7	5.40
12	КТУП	38.20	1.155		0.027					1.56
13	КТО ₂	45.63	1.237			0.141			881.7	0.84
14	КТЛС	48.11	1.261					0.134	881.7	2.31
15	КТОП	48.91	1.269				0.032		855.8	0.87
16	КТУС	51.10	1.289		0.028				881.7	0.5
Среднее значение				0.101	0.027	0.141	0.032	0.134	-	-

* Погрешность: $\pm 0.20 \div 0.35$

Дифференциацию кислоты γ и линолевой в условии ОФ хроматографии можно привести по изменению времен удерживания. В первом случае удерживание больше, чем во втором. Вычисленный таким же образом состав жирной кислоты показывает, что преобладающей кислотой является катальповая (в виде суммы всех октадекатриеновых кислот) (42.22 ± 0.45 мол.%); затем - линолевая ($40.65 \% \pm 0.33$), изомерная ей также диеновая (C18:2) γ ($9.18\% \pm 0.56$), олеиновая ($4.30\% \pm 0.22$), пальмитиновая ($2.69\% \pm 0.15$) и стеариновая кислоты ($0.96\% \pm 0.09$). Масло содержит рано элюируемые ТАГ с радикалами линоленовой (а) (2.54% от суммы октадекатриеновой) и более поздними - с β -элеостеариновой (с) кислот (5.97%). При этом и соотношение площадей пиков индивидуальных кислот в гидролизате масла катальпы согласуется с выше приведенными результатами.

3.2.6. Масло семян календулы лекарственной

Семена календулы лекарственной представляют собой уникальный источник одного из изомеров октадекатриеновых кислот: (8E,10E,12Z)-октадека-8,10,12-триеновой кислоты (календовой - Кл) и небольшое количество необычной 9-ОН-(10E, 12Z)-октадека-10,12-диеновой кислоты. Хроматограммы масла семян записаны при спектрофотометрическом и рефрактометрическом детектировании представлены на рисунке 3.20.

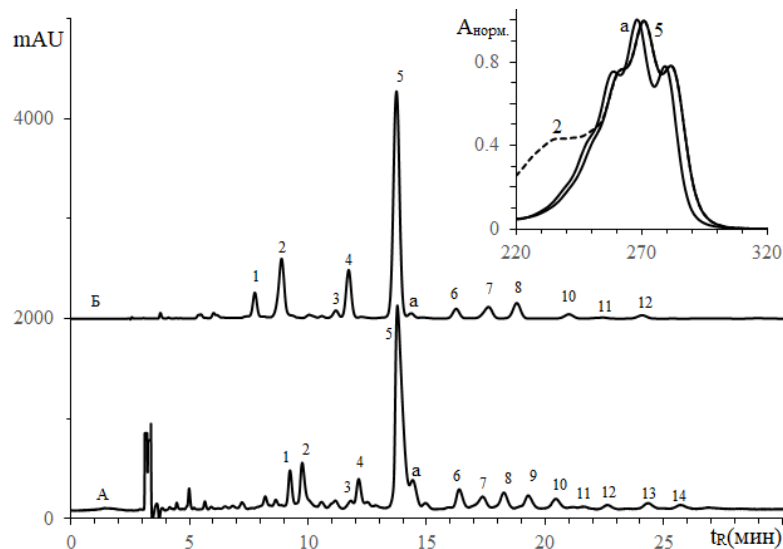


Рис. 3.20. Хроматограммы масел семян календулы при спектрофотометрическом (Б) и рефрактометрическом (А) детектировании.

Условия записи хроматограмм: колонка 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18; температура термостата колонок 30°C , Б – ПФ: 45 об.% ИПС и 55 об.% CH_3CN , 1.0 мл/мин, ($\lambda = 270$ нм), концентрация: 1 мг/мл; А – ПФ: 65 об.% ацетона и 35 об.% CH_3CN , 0.8 мл/мин.

Легко идентифицируются составы всех ТАГ масла семян календулы, содержащие радикалы календовой кислоты при использовании инкрементного подхода (Табл. 3.16 и Табл. 3.17). Хроматограмма образца масла семян календулы указывает, что единственным преобладающим пиком является ТАГ Кл₂Л. На хроматограмме Б некоторые ТАГ, не содержащие радикалы октадекатриеновой кислоты не видны (пик № 9, 13 и 14). Все основные пики (на хроматограмме Б) имеет одинаковой электронный спектр, соответствующий спектру календовой кислоты. Но при этом для пиков № 1, 2 и 3 получены спектры с максимумами не только в диапазоне 250-300 нм, но и в более коротковолновом диапазоне (около 230 нм), характерном для сопряженных диеновых кислот. Меньшие времена удерживания для этих пиков (по сравнению ТАГ, содержащими радикалы октадекатриеновых кислот) указывают на большую гидрофильность ТАГ, например, за счет присоединения воды по двойной связи в положении 8 календовой кислоты с образованием 10E,12Z-9-гидроксо-10,12-октадекадиеновой кислоты [48].

Таблица 3.16.

Параметры удерживания ТАГ масла календулы при спектрофотометрическом детектировании

№	ТАГ	t _R мин	lgk	Инкременты				M/z [M+H ⁺] ⁺	Моль %
				Кл_Л	Л_О	О_П	П_С		
1	Кл ₂ Х	7.76	0.323					891.6	5.93 ± 0.21
2	КлХЛ	8.92	0.410	0.087				893.6	9.96 ± 0.22
3	КлХО	11.17	0.540		0.130			895.6	1.86 ± 0.14
4	Кл ₃	11.71	0.566					873.6	6.59 ± 0.22
5	Кл ₂ Л	13.73	0.653	0.086				875.5	55.60 ± 0.31
6	КлЛ ₂	16.25	0.740	0.088				877.7	5.20 ± 0.18
7	Кл ₂ О	17.61	0.781		0.129			877.7	4.05 ± 0.21
8	Кл ₂ П	18.81	0.814			0.033		851.7	4.83 ± 0.23
10	КлЛО	21.00	0.869	0.088				879.5	3.31 ± 0.16
11	КлЛП	22.44	0.902			0.032		853.7	1.32 ± 0.07
12	Кл ₂ С	24.09	0.936				0.122	879.5	1.34 ± 0.09
Среднее значение				0.088	0.129	0.032	0.122	-	-

X - 10E,12Z-9-гидроксо-10,12-октадекадиеновой кислоты

Таблица 3.17.

Параметры удерживания триглицеридов масла календулы при рефрактометрическом детектировании

№	ТАГ	t _R мин	lgk	Инкременты (± 0.002)				Моль%
				КЛ_Л	Л_О	О_П	П_С	
1	КЛ ₂ Х	8.69	0.251					5.24 ± 0.22
2	КЛХЛ	9.88	0.335	0.084				9.76 ± 0.21
3	КЛХО	11.95	0.451		0.116			1.75 ± 0.12
4	КЛ ₃	12.06	0.456					5.35 ± 0.25
5	КЛ ₂ Л	14.02	0.542	0.086				52.12 ± 0.32
6	КЛЛ ₂	16.38	0.628	0.085				4.78 ± 0.17
7	КЛ ₂ О	17.36	0.659		0.116			4.24 ± 0.21
8	КЛ ₂ П	18.26	0.685			0.027		4.75 ± 0.18
9	Л ₃	19.28	0.713	0.086				4.09 ± 0.20
10	КЛЛЮ	20.45	0.744	0.085	0.116			2.83 ± 0.18
11	КЛЛП	21.61	0.772			0.028		1.38 ± 0.12
12	КЛ ₂ С	22.61	0.795				0.110	0.37 ± 0.12
13	Л ₂ О	24.22	0.829	0.086	0.116			1.91 ± 0.12
14	Л ₂ П	25.57	0.856	0.084				1.43 ± 0.16
Среднее значение				0.086	0.116	0.028	0.110	

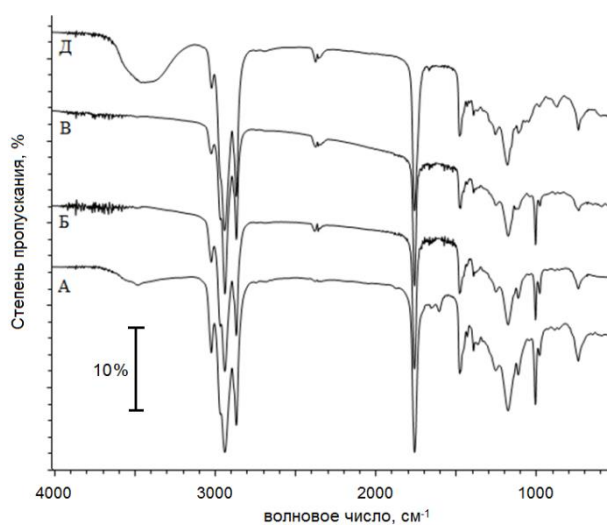


Рис. 3.21. ИК-спектры масел семян в тонкой пленке. Масла: А – семян календулы, Б – масла семян момордики, В – масла семян катальпы, Д – касторового масла.

Такое предположение было подтверждено записью ИК-спектров масла семян календулы и масел сравнения (семян момордики и катальпы как образцов, не содержащих гидроксикислоты, и касторового масла, как образца, образованного в основном гидроксикислотой). Оценку проводили по появлению характеристической широкой полосы поглощения валентных колебаний ОН-групп, связанных водородной связью (при записи в тонкой пленке), в диапазоне 3300 – 3100 см⁻¹ (Рис. 3.21). Отнесение было подтверждено анализом спектров, полученных при масс-спектрометрическом детектировании

Данные в таблице 3.18 показывают, что календовая кислота распределена между типами ТАГ, по-видимому, не статистически, потому что, например, отношение площадей пиков (S) трех ТАГ, составленных из радикалов календовой (Кл) и линолевой (Л) кислот: S(Кл₃):S(Кл₂Л):S(КлЛ₂) составляет 0.50: 1.00: 0.08 для экспериментальных данных вместо рассчитанных для статистического распределения как 0,97: 1,00: 0,25. Между тем, это масло также содержит изомерную (α-) календовой кислоту с большими временами удерживания соответствующих ТАГ с явным гипохромным сдвигом спектральных максимумов, что позволяет отнести кислоту к β-календовой (8E, 10E, 12E)-октадека-8,10,12-триеновой (1,56%) кислоте.

Таблица 3.18.

Расчеты состава масла календулы при УФ и РФ детектировании после поправок

№	Кислота	Содержание радикалов кислот, моль %	
		РФ	УФ
1	(X) C18:2-ОН	5.58 ± 0.11	5.92 ± 0.11
2	(Кл) C18:3	56.67 ± 0.43	61.64 ± 0.41
3	(Л) C18:2	31.53 ± 0.30	26.87 ± 0.18
4	(О) C18:1	3.58 ± 0.11	3.07 ± 0.10
5	(П) C16:0	2.52 ± 0.09	2.05 ± 0.08
6	(С) C 18:0	0.12 ± 0.04	0.45 ± 0.03

3.2.7. Масло семян *Sapium discolor*

Разделение компонентов масла *Sapium discolor* представляет интерес, во-первых, тем, что в отличие от большинства обычных растительных масел, образованных

триацилглицеринами (ТАГ), это масло может содержать в качестве основных компонентов эстолиды (estolides), - производные глицерина, содержащие четыре радикала жирных кислот. Такое возможно в том случае, когда «начальный» ТАГ содержит один радикал кислоты (для другого вида рода *Sapium* – *S. sebiferum* только в положении *sn*-3 [210]), заканчивающийся ОН-группой, по которой происходит дополнительное ацилирование. Во-вторых, один из радикалов эстолида (как и в масле *S. sebiferum* и в масле еще одного представителя семейства Euphorbiaceae - *Sebastiania commersoniana* [211]) может содержать две сопряженные С=C-связи, дополнительно находящиеся в сопряжении с карбонильной (из карбоксильной) группой, что приводит к появлению максимума абсорбции в УФ-диапазоне (266 нм).

Для анализа видового состава ТАГ масла *Sapium discolor* вначале использовали рефрактометрическое детектирование, позволяющее детектировать все виды ТАГ (хроматограмма А, рис. 3.22 и таблица 3.19). Хроматографический профиль ТАГ масла (порядок элюирования видов ТАГ, но не их степень разделения) практически не зависит от состава подвижной фазы и определяется ростом эквивалентных углеродных чисел. На хроматограмме А видно, что масло семян *S. discolor* содержит компоненты, быстрее элюирующиеся по сравнению даже с три- α -линоленоатом (ЛнЗ-пик №5).

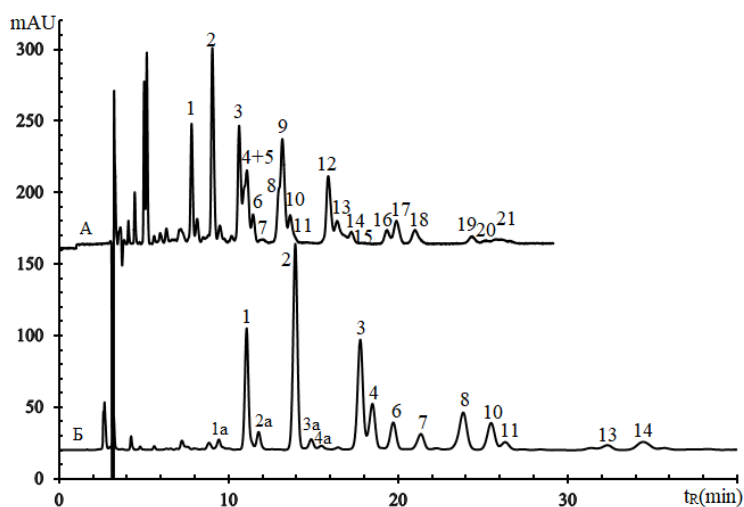


Рис. 3.22. Хроматограммы масла семян *Sapium discolor* при РФ (А) и УФ (Б) детектировании

Условия записи хроматограмм: колонка 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18; 30°C; А – ПФ: 70 об.% ацетона и 30 об.% CH₃CN, 1.0 мл/мин. Б – ПФ: 35 об.% ИПС и 65 об.% CH₃CN, 1.0 мл/мин, λ = 266 нм, концентрация: 0.8мг/мл

Эстолидный характер масла семян *S. discolor* подтвержден записью электронных спектров соединений в кювете детектора (на хроматограмме Б, Рис. 3.22 и таблица 3.20), имеющих максимум абсорбции в диапазоне, соответствующем литературным данным

(266 нм), хорошей распознаваемостью состава компонентов по инкрементному подходу при полной согласованности с параметрами масс-спектров.

Таблица 3.19.

Параметры удерживания ТАГ масла *Sapium dicolor* и их отнесение при рефрактометрическом детектировании

№	ТАГ	t _R мин	lgk	Инкременты				% ТАГ*
				Л _{Н_Л}	Л_О	О_П	П_С	
1	ЕЛН ₂	7.82	0.177					8.08
2	ЕЛНЛ	9.04	0.277	0.100				16.59
3	ЕЛ ₂	10.62	0.380	0.103				11.60
4	ЕЛНО	10.9	0.396		0.119			5.57
5	ЛН ₃	11.08	0.406					5.44
6	ЕЛНП	11.44	0.425			0.029		4.29
7	αЭ ₃	11.95	0.451					1.20
8	ЕЛО	12.94	0.497		0.117			5.45
9	ЛН ₂ Л	13.24	0.510	0.104				9.92
10	ЕЛП	13.630	0.527			0.030		0.03
11	ЕЛНС	13.91	0.538				0.113	0.95
12	ЛНЛ ₂	15.92	0.612	0.102				8.74
13	ЕО ₂ +ЛН ₂ О	16.41	0.629			0.131		4.05
14	ЕЛС	16.82	0.642	0.104				1.58
15	ЛН ₂ П	17.31	0.657			0.028		1.90
16	Л ₃	19.33	0.715	0.103				2.18
17	ЛНЛО	19.91	0.730	0.102				4.33
18	ЛНЛП	21.02	0.758			0.028		2.97
19	Л ₂ О	24.29	0.831		0.116			1.67
20	ЛНО ₂	25.1	0.847		0.117			0.97
21	Л ₂ П	25.74	0.860			0.029		1.06
	ЛНОП	26.16	0.868			0.020		0.83
	ЛНЛС	26.65	0.877				0.119	0.59

* Погрешность: ± 0.45 ÷ 0.85 - связана с невозможностью надежного разделения площадей пар: ЕЛО с ЛН₂Л, ЕО₂ с ЛН₂О.

Это позволяет легко рассчитать ТАГ состав масла семян *S. discolor* и установить, что оно образовано набором обычных кислот (α-линоленовой, линолевой, олеиновой, пальмитиновой и стеариновой) и двух необычных, строение которых не может быть

доказано использованными в работе методами и поэтому принято соответствующим литературным данным [211].

Очевидно и то, что детектирование при 266 нм в несколько раз более чувствительно по сравнению с рефрактометрическим детектированием для эстолидов. Заметным отличием между составами масел двух видов *Sapium* является появление еще одной группы пиков, что может быть объяснено только увеличением степени ненасыщенности сопряженной 2,4-декадиеновой кислоты, причем эта дополнительная С=С-связь не находится в сопряжении с предыдущим хромофором. Такая гипотеза была подтверждена анализом кислот, образующихся при низкотемпературном гидролизе масла этанольным раствором щелочи – перед определяемой детектированием при 266 нм декадиеновой кислотой обнаруживается другая кислота, со спектром, от нее отличающимся только в более коротковолновой области.

Таблиц 3.20.

Параметры удерживания ТАГ масла *Sapium discolor* и их отнесение при спектрофотометрическом детектировании

№	ТАГ	t _R (мин)	lgk	Инкременты (±0.002)				M/z [M+H] ⁺
				Лн_Л	Л_О	О_П	П_С	
1	ЕЛн ₂	11.06	0.535					901.5
2	ЕЛнЛ	13.94	0.660	0.126				903.5
3	ЕЛ ₂	17.77	0.786	0.125				905.5
4	ЕЛнО	18.48	0.806		0.145			905.7
6	ЕЛнП	19.71	0.838			0.032		879.5
7	αЭ ₃	21.34	0.877					873.6
8	ЕЛО	23.84	0.931	0.126	0.145			907.7
10	ЕЛП	25.48	0.963			0.032		881.5
11	ЕЛнС	26.31	0.979				0.141	907.7
13	ЕО ₂	32.34	1.077		0.146			909.5
14	ЕЛС +ЕОС	34.45	1.107	0.128			0.143	909.5
								911.6
Среднее значение				0.128	0.146	0.032	0.143	-

В работе [212] указывалось, что в гидролизате масла семян *S. discolor* в отличие от гидролизата масла семян *S. sebiferum* находят небольшое количество α-элеостеариновой кислоты, что подтверждается и в настоящей работе: пик №7 (Рис. 3.22) приобретает

спектр сопряженной триеновой кислоты, и по удерживанию совпадает с пиком $(\alpha\text{-}\Delta)_3$. Из-за неразделенности некоторых пиков строгое количественное соотношение между долями, приходящимися на ТАГ и эстолиды, в нашем случае определить затруднительно, но доля ТАГ, не превышает 30- 40 моль.%.

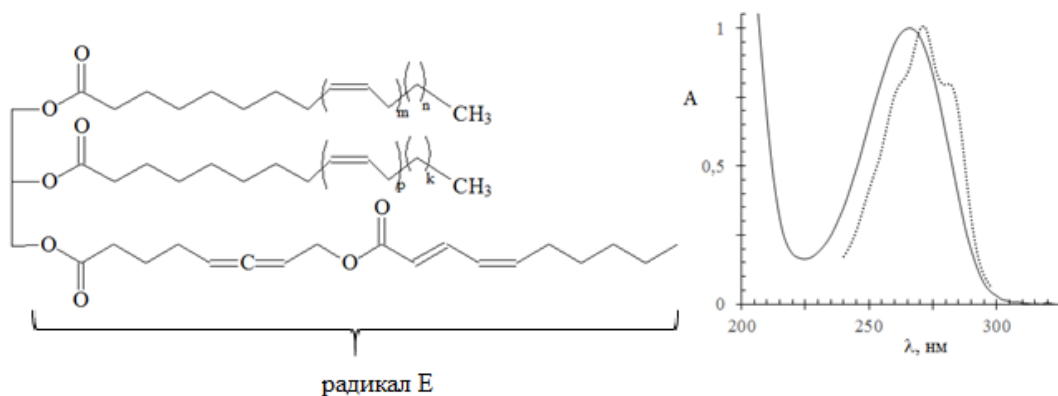


Рис. 3.23. Структура и электронные спектры эстолидов (и три- α -элеостеарата)

Количественные соотношения между видами эстолидов и ТАГ при рефрактометрическом детектировании можно рассчитать по площадям пиков при использовании расчетных значений коэффициентов преломления компонентов. Результаты представлены в таблице 3.20. По всем обнаруженным эстолидам и ТАГ был определен и жирнокислотный состав масла: на 8-гидрокси-5,6-октадиеновую приходится 9.7 ± 0.5 моль % (большая для внутренней нормировки погрешность связана в основном с невозможностью надежного разделения площадей проблемных пар ЕЛНО с ЛН₃; ЕЛС с ЕОС), и на *транс*-2, *цис*-4-декадиеновую - 9.7 ± 0.5 моль %; на линоленовую - 34.0 ± 0.6 моль; на линолевую - 31.4 ± 0.6 моль %, на олеиновую - 9.3 ± 0.4 моль %, на пальмитиновую - 3.7 ± 0.3 моль % и стеариновую кислоты - 11.5 ± 0.4 моль %.

3.2.8. Масла семян некоторых растений

Масло семян бальзамина садового

Масло семян бальзамина садового интересно тем, что содержит в составе ТАГ радикалы уникальной сопряженной октадекатетраеновой кислоты. Хроматограмма масла семян бальзамина, представлена на рисунке 3.24, а отнесение пиков – в таблицах 3.21 и 3.22.

Таблица 3.21.

Параметры удерживания ТАГ масла бальзамина и их отнесение при спектрофотометрическом детектировании

№	ТАГ	t _R мин	lgk	Инкременты, Δ(i→j) (±0.002)					M/z	Моль %
				Pr_Лн	Лн_Л	Л_О	О_П	П_С		
1	Pr ₃	6.81	0.276						867.6	0.3
2	Pr ₂ Лн	7.79	0.362	0.086					869.7	19.5
3	PrЛн ₂	8.96	0.446	0.085					871.7	13.4
4	Pr ₂ Л	9.51	0.481		0.120				871.7	10.7
5	PrЛнЛ	11.04	0.566	0.084	0.119				873.6	10.2
7	Pr ₂ О	12.19	0.620			0.138			873.6	6.4
9	PrЛ ₂	13.75	0.684		0.118				875.7	2.1
10	PrЛнО	14.26	0.703	0.083		0.137			875.7	9.1
11	PrЛнП	15.25	0.737				0.035		850.8	7.9
13	PrЛО	17.96	0.820		0.118				877.7	4.7
14	PrЛП	19.29	0.856		0.118		0.036		852.8	2.7
15	PrЛнС	19.72	0.867					0.129	877.7	5.6
18	PrО ₂	23.69	0.956			0.136			879.6	3.9
19	PrЛС	25.12	0.984		0.118				879.6	1.7
20	PrОП	6.81	0.276						856.7	2.0
Средние значения				0.081	0.119	0.135	0.027	0.137		

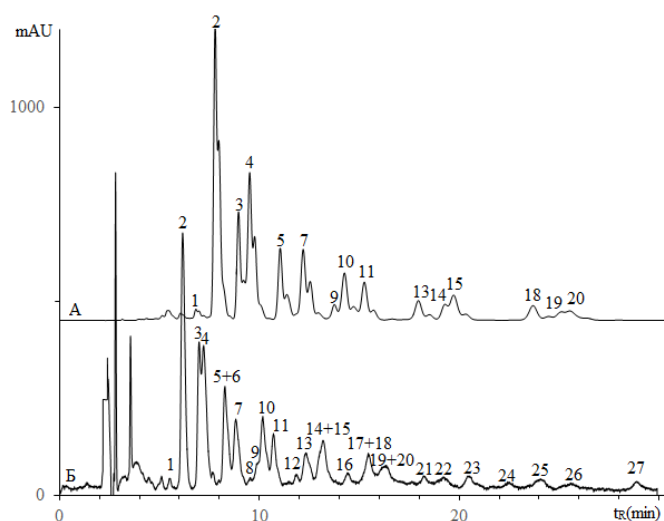


Рис. 3.24. Хроматограммы масла семян бальзамина садового при спектрофотометрическом (А) и рефрактометрическом (Б) детектировании

Условия записи хроматограмм: колонка 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18; температура термостата колонок 30°C. А - подвижная фаза 45 об.% ИПС и 55 об.% CH₃CN, 1.0 мл/мин, λ = 320 нм; Б - подвижная фаза 70 об.% ацетона и 30 об.% CH₃CN, 1.0 мл/мин,

Таблица 3.22.

Параметры удерживания ТАГ масла бальзамина и их отнесение при РФ детектировании

№**	ТАГ	t _R (мин)	lgk	Инкременты, Δ(i→j) (±0.002)					Моль %
				Pr_Лн	Лн_Л	Л_О	О_П	П_С	
1	Pr ₃	5.7	0.151						0.4
2	Pr ₂ Лн	6.4	0.233	0.083					17.1
3	PrЛн ₂	7.26	0.317	0.084					8.6
4	Pr ₂ Л	7.5	0.338		0.105				12.5
5+6	PrЛнЛ	8.6	0.422	0.084	0.105				9.0
	Лн ₃	8.31	0.402	0.084					
7	Pr ₂ О	9.16	0.460			0.122			7.0
8	Лн ₂ Л	9.91	0.505	0.083	0.103				0.6
9	PrЛ ₂	10.28	0.526		0.104				1.7
10	PrЛнО	10.57	0.541	0.082		0.119			6.7
11	PrЛнП	11.17	0.572				0.031		5.0
12	Лн ₂ О	12.3	0.624			0.119			0.7
13	PrЛО	12.77	0.645			0.119			4.0
14+15	PrЛП	13.49	0.674				0.029		6.7
	PrЛнС	13.77	0.684					0.112	
16	ЛнЛО	14.96	0.727	0.083	0.103				1.1
17+18	ЛнЛП	15.79	0.755				0.028		3.9
	PrО ₂	16.05	0.763			0.119			
19+20	PrЛС	16.73	0.785					0.111	4.2
	PrОП	16.95	0.791			0.118			
21	ЛнО ₂	18.92	0.846			0.119			0.8
22	ЛнОП	19.98	0.873	0.082			0.027		1.5
23	ЛнП ₂	21.29	0.904				0.031		2.5
24	ЛО ₂	23.29	0.948		0.102				0.8
25	ЛнОС	25.02	0.982					0.109	2.5
26	ЛнПС	26.58	1.011				0.029		1.3
27	О ₃	30.00	1.069			0.121			1.5
Средние значения				0.083	0.104	0.120	0.028	0.110	

Таблица 3.23.

Расчеты состава масла бальзамина при УФ и РФ детектировании после поправок

№	Кислота	Содержание радикалов кислот, моль %	
		РФ	УФ
1	(Pr) C18:4	39.19 ± 0.87	45.69 ± 0.48
2	(Ln) C18:3	27.17 ± 0.43	26.35 ± 0.33
3	(L) C18:2	11.43 ± 0.25	11.38 ± 0.24
4	(O) C18:1	12.39 ± 0.31	9.99 ± 0.21
5	(П) C16:0	6.75 ± 0.13	4.17 ± 0.12
6	(С) C 18:0	3.07 ± 0.11	2.41 ± 0.13

Масло содержит не только α -паринаровую кислоту, но и более элюирования ТАГ β - паринаровой кислоты (22.27 моль % сопряжённых октадекатетраеновых кислот).

Масло семян хилопсиса линейного

Масло семян *Chilopsis linearis* интересно для настоящего исследования из-за биосинтеза одного изомера октадекатриеновой кислоты: катальповой кислоты и двух необычных - октадекадиеновой(10E,12E)-октадека-2,4-диеновой и (9E,12E)-октадека-9,12-диеновой кислот. Хроматограммы масла семян хилопсиса представлены на рисунке 3.25

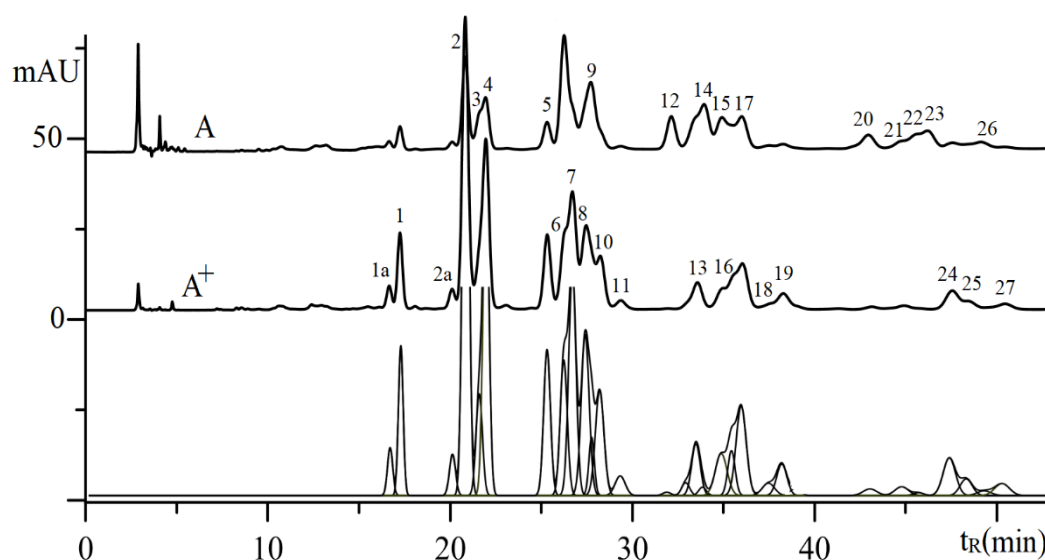


Рис. 3.25. Хроматограммы масла семян *Chilopsis linearis* при двух длин волн.

Условие записи хроматограмм: колонка 4.6 × 250 мм Kromasil 100–5C18, температура термостата колонок 30°C, ПФ: 60 об.% CH₃CN + 40 об.% ИПС, расход 0.8 мл/мин. А- при 230 нм и А⁺ - при 270 нм

При детектировании на длине волны 270 нм (на хроматограмме А) видны только пики ТАГ, в состав которых входят радикалы сопряженной октадекатриеновой кислоты. А

при детектировании на длине волны 230 нм (хроматограмма А⁺) обнаруживаются ТАГ, в состав которых входят радикалы сопряженной октадекадиеновой кислоты.

Таблица 3.24.

Параметры удерживания ТАГ масла семян *Chilopsis linearis*

№	ТАГ	t _R мин	lgk	Инкременты Δ(j→i) (S = 0.002)						M/z
				К _T _Л	Л_Д	Д_У	Л_О	О_П	П_С	
1	КТ ₃	17.25	0.655							873.7
2	КТ ₂ Л	20.83	0.753	0.098						875.8
3	КТ ₂ Д	21.57	0.771		0.018					
4	КТ ₂ У	21.96	0.780			0.009				
5	КТЛ ₂	25.33	0.852	0.098						877.8
6	КТЛД	26.26	0.869		0.018					
7	КТЛУ	26.72	0.878			0.009				
8	КТ ₂ О	27.46	0.891				0.138			877.8
9	КТДУ	27.72	0.896		0.018					877.8
10	КТУ ₂	28.24	0.905			0.009				
11	КТ ₂ П	29.36	0.924					0.033		
12	Л ₂ Д	32.14	0.968	0.098						879.8
13	КТЛЮ	33.57	0.989				0.137			
14	ЛДУ	33.93	0.994	0.098						
15	КТДО	34.92	1.007		0.019					879.7
16	КТУО	35.50	1.015			0.008				
17	КТЛП	36.03	1.022					0.034		
18	КТДП	37.51	1.041		0.019			0.034		853.6
19	КТУП +КТ ₂ С	38.29	1.051			0.010			0.127	853.7+ 881.7
20	ЛДО+	42.95	1.105	0.098			0.138			881.7
21	КТО ₂	44.91	1.126				0.137			
22	УДО	45.53	1.133				0.139			
23	ЛДП	46.32	1.141					0.035		855.7
24	КТЛС	47.55	1.153						0.130	881.7
25	КТОП	48.48	1.162					0.036		-
26	УДП	49.13	1.168					0.035		-
27	КТУС	50.45	1.180		0.027				0.129	-
Среднее значение				0.098	0.019	0.008	0.138	0.035	0.128	-

В соответствии с литературными данными необычные октадекадиеновые кислоты представлены (10E,12E)-октадекадиеновой и (9E,12E)-октадекадиеновой с различными группами хромофора. Дифференциацию этих радикалов в условии ОФ хроматографии можно привести по изменению времен удерживания. Кроме этого на хроматограмме (А) появляются дополнительные пики (пик № 1а и 2а), которые элюируются ранее основных пиков. Электронные спектры всех упомянутых пиков одинаковы, как и их масс-спектры. Таким образом, такая кислота может быть несопряженной α -линоленовой, (9Z, 12Z, 15Z) - октадека-9,12,15-триеновой кислоты, Лн (0.95 моль %).

В случае масла хилопсиса аналогичная изобестическая точка находится при 243 нм. На основании полученных результатов рассчитан жирнокислотный состав этого масла.

Таблица 3.25.

Состав основных ТАГ масла семян *Chilopsis linearis*

№	ТАГ	Доля мол. ТАГ (%)	№	ТАГ	Доля мол. ТАГ (%)
1	КТ ₃	1.62 ± 0.15	14	ЛДУ	3.05 ± 0.12
2	КТ ₂ Л	11.90 ± 0.21	15	КТДО	3.34 ± 0.15
3	КТ ₂ Д	2.21 ± 0.11	16	КТУО	2.26 ± 0.11
4	КТ ₂ У	6.74 ± 0.22	17	КТЛП	6.24 ± 0.21
5	КТЛ ₂	6.72 ± 0.21	18	КТДП	1.04 ± 0.08
6	КТЛД	6.43 ± 0.18	19	КТУП+КТ ₂ С	2.20 ± 0.09
7	КТЛУ	11.34 ± 0.20	20	ЛДО	1.26 ± 0.12
8	КТ ₂ О	4.40 ± 0.22	21	КТО ₂	0.64 ± 0.06
9	КТДУ	2.15 ± 0.18	22	УДО	1.81 ± 0.14
10	КТУ ₂	6.22 ± 0.22	23	ЛДП	1.29 ± 0.15
11	КТ ₂ П	0.69 ± 0.10	24	КТЛС	3.20 ± 0.21
12	Л ₂ Д	2.42 ± 0.21	25	КТОП	1.38 ± 0.12
13	КТЛО	2.82 ± 0.09	26	УДП	2.81 ± 0.18
-	-	-	27	КТУС	1.22 ± 0.14

Рассчитанный по найденному видовому составу масла жирнокислотный состав: катальповая 39.09% ± 0.37, линолевая – 22.16% ± 0.26, 10E,12E-октадекадиеновая - 9.61% ± 0.17, 9E,12E-октадекадиеновая - 15.34% ± 0.22, олеиновая 6.18% ± 0.13, пальмитиновая – 4.73% ± 0.12 и стеариновая кислоты - 1.42% ± 0.08. Полученный результат согласуется с результатами, приведенными в литературе по прямому определению жирнокислотного состава.

Масло семян *Thladiantha nudiflora*

Тладианта (*Thladiantha*) - род цветковых растений семейства тыквенные (Cucurbitaceae). Состав жирнокислотный этого масла семян не был изучен до нашей работы. В настоящей работе мы показали, что в этом масле содержится смесь сопряженных октадекатриеновых кислот (Табл. 3.26 и Рис. 3.26).

Таблица 3.26.

Параметры удерживания ТАГ масла *Thladiantha nudifolia* и их отнесение по инкрементному подходу

№	ТАГ	t _R мин	lgk	Инкременты (S = 0.002)					%ТАГ *
				Пу_αЭ	Пу_Л	Л_О	О_П	П_С	
1	Пу ₃	10.54	0.539						1.0
2	Пу ₂ αЭ	10.91	0.559	0.019					3.6
3	ПуαЭ ₂	11.31	0.578	0.020					4.1
4	αЭ ₃	11.72	0.598	0.020					1.6
5	Пу ₂ Л	13.01	0.654		0.114				6.4
6	ПуαЭЛ	13.50	0.673	0.020					15.5
7	αЭ ₂ Л	14.01	0.693	0.020					8.6
8	ПуЛ ₂	16.23	0.769		0.115				7.7
9 +10	αЭЛ ₂ +Пу ₂ О	16.89	0.789	0.020		0.135			9.8
11	ПуαЭО	17.57	0.809	0.020					4.2
12 +13	αЭ ₂ О +Пу ₂ П	18.24	0.827	0.019			0.039		3.2
14	ПуαЭП	18.84	0.843				0.035		2.7
15	αЭ ₂ П	19.59	0.863	0.019					1.9
16	ПуЛО	21.32	0.905			0.136			2.6
17	αЭЛО	22.20	0.924	0.020					5.9
18	ПуЛП	22.92	0.940				0.035		6.0
19	Пу ₂ С	23.62	0.954						1.0
20	αЭЛП	23.85	0.959	0.019					5.4
21	ПуαЭС	24.50	0.972	0.018					1.7
22	αЭ ₂ С	25.50	0.991	0.019					1.2
23	ПуЛС	29.94	1.067		0.113			0.128	2.0
24	αЭЛС	31.20	1.087	0.019				0.128	4.3
Среднее значение				0.018	0.113	0.135	0.035	0.128	-

* Погрешность: ± 0.2 ÷ 0.6 - проблемных погрешность связана с невозможностью надежного разделения площадей пар: αЭЛ₂ с Пу₂О; αЭ₂О с Пу₂П

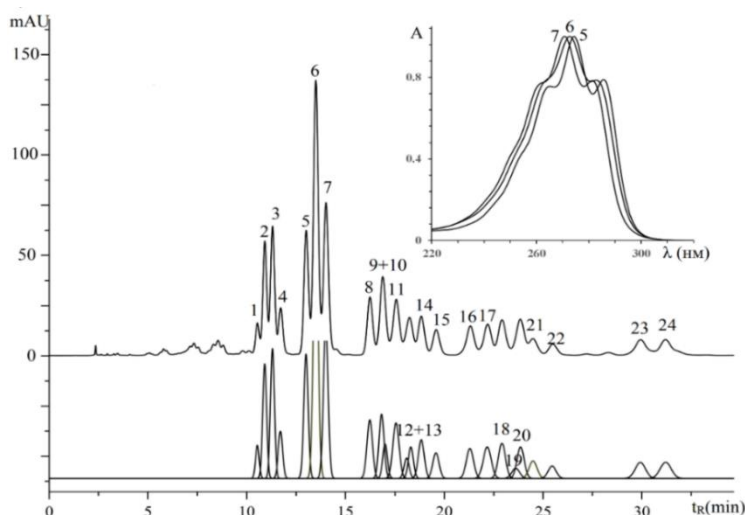


Рис. 3.26. Хроматограммы масел семян *Thladiantha nudifolia* при УФ детектировании.

Условия записи хроматограммы: Kromasil 100-5C18 250×4.6 мм, температура термостата колонок 30°C, ПФ: 40 об.% ИПС и 60 об.% CH₃CN, 1.0 мл/мин; $\lambda = 278$ нм,

Хроматограмм записаны при изобестической точке ($\lambda=278$ нм) для прямого расчета соотношения количеств различных видов ТАГ. Жирнокислотный состав масла: на пуниковую кислоту приходится 25.8 моль % ± 0.4 , на α - элеостеариновую - 30.24 моль % ± 0.4 , на линолевую - 29.2 ± 0.2 моль %, на олеиновую 5.5 ± 0.2 моль %, на пальмитиновую - 5.74 ± 0.3 моль % и на стеариновой кислоты - 3.32 ± 0.3 моль %.

Масло семян момордики бальзамина

Масло семян момордики бальзамина отличается одновременным биосинтезом и α -элеостеариновой и пуниковой кислот.

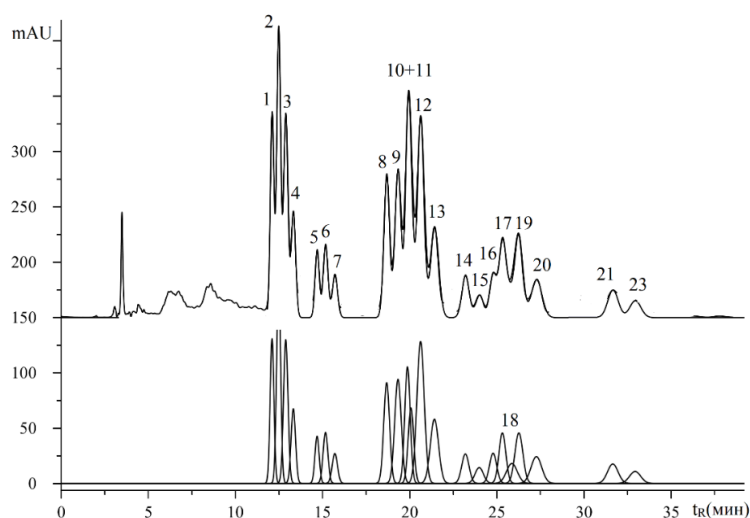


Рис. 3.27. Хроматограммы масел семян момордики бальзамина при УФ детекторе.

Условие записи хроматограммы: Kromasil 100-5C18 250×4.6 мм, температура термостата колонок 30°C, ПФ: 40 об.% ИПС и 60 об.% CH₃CN, 1.0 мл/мин; $\lambda = 278$ нм,

Таблица 3.27.

Параметры удерживания ТАГ масла момордики бальзамина и их отнесение по инкрементному подходу

№**	ТАГ	t _R мин	lgk	Инкременты (± 0.002)					Моль %,*
				Пу_αЭ	Пу_Л	Л_О	О_П	П_С	
1	Пу ₃	12.11	0.459						3.9
2	Пу ₂ αЭ	12.49	0.476	0.018					5.9
3	ПуαЭ ₂	12.89	0.495	0.018					4.6
4	αЭ ₃	13.33	0.514	0.019					2.4
5	Пу ₂ Л	14.69	0.568		0.110				2.2
6	ПуαЭЛ	15.18	0.586	0.018					2.7
7	αЭ ₂ Л	15.70	0.605	0.019					1.7
8	Пу ₂ О	18.68	0.697			0.129			6.3
9	ПуαЭО	19.33	0.715	0.018					7.4
10	Пу ₂ П	19.87	0.729						6.9
11	αЭ ₂ О	20.08	0.734	0.020			0.037		4.0
12	ПуЭП	20.63	0.748	0.019					11.2
13	αЭ ₂ П	21.42	0.767	0.019					5.7
14	ПуЛО	23.20	0.808		0.111				4.6
15	αЭЛО	24.03	0.825	0.018					2.9
16	ПуЛП	24.79	0.841		0.112		0.033		4.6
17	Пу ₂ С	25.34	0.852					0.123	3.7
18	αЭЛП	25.90	0.863				0.037		4.6
19	ПуαЭС	26.27	0.870	0.018					4.4
20	αЭ ₂ С	27.27	0.888	0.018					3.1
21	ПуЛС	31.71	0.961		0.109				4.4
22	αЭЛС	32.94	0.980	0.018					2.9

* Погрешность: ± 0.2 ÷ 0.7 - проблемных погрешность связана с невозможностью надежного разделения площадей пар: αЭЛ₂ с Пу₂О; Пу₂О с αЭЛП и ПуαЭС

** Номер пиков на рисунке 3.27.

Хроматограмм записаны в изобестической точке ($\lambda=278$ нм) для прямого расчета соотношения количеств различных видов ТАГ. Жирнокислотный состав масла: на пуниковую кислоту приходится 35.2 моль % ± 0.5 , на α -элеостеариновую - 29.1 моль % ± 0.3 , на линолевую - 15.8 ± 0.2 моль %, на олеиновую - 8.4 ± 0.2 моль %, на пальмитиновую - 5.4 ± 0.2 моль % и на стеариновую кислоты - 6.2 ± 0.2 моль %.

Масло семян валерианы лекарственной

Масло семян валерианы отличается от рассмотренных выше тем, что в нем большая часть ТАГ не содержит радикалы сопряженной октадекатриеновой кислоты (Рис. 3.28). На пики ТАГ, не содержащих сопряженную триеновую кислоту, приходится менее 4% суммарной площади пиков (при расчетах учитывали поправочные коэффициенты, учитывающие изменение отклика рефрактометрического детектора при изменении состава ТАГ).

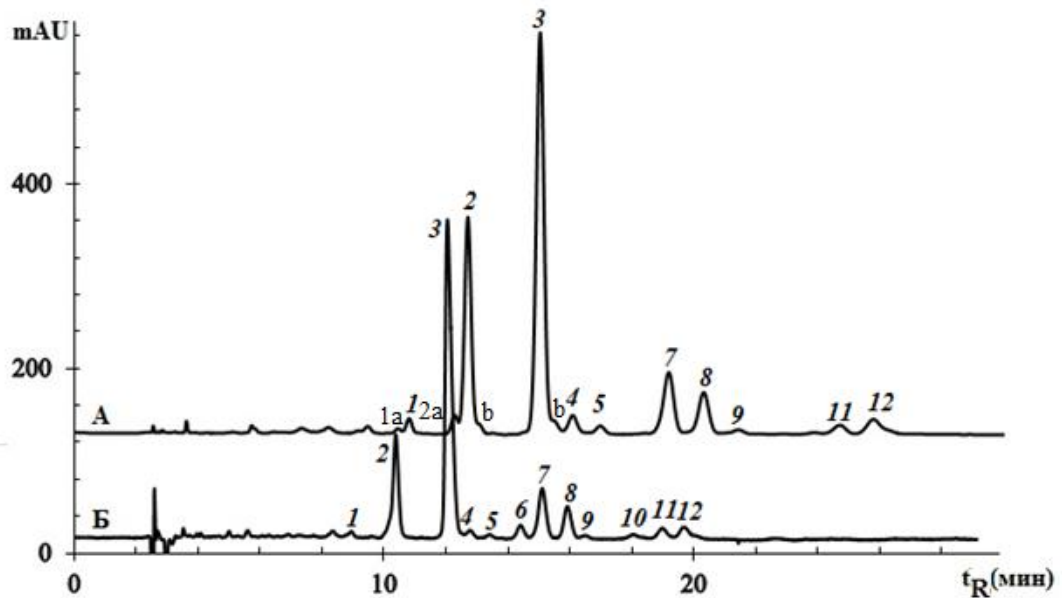


Рис. 3.28. Хроматограммы масла семян валерианы лекарственной при УФ (А) и РФ (Б) детектировании

Условия записи хроматограмм: колонка 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18; температура термостата колонок 30°C , при УФ детекторе: ПФ: 45 об.% ИПС и 55 об.% CH_3CN , 1.0 мл/мин; $\lambda = 270$ нм; при РФ детекторе: ПФ: 70 об.% ацетона и 30 об.% CH_3CN , 1.0 мл/мин, *a* - несопряженная α -линоленовая (9Z, 12Z, 15Z) - октадека-9,12,15-триеновой кислоты, Лн (0.4 моль %); *b* - β -элеостеариновая кислота (0.7 моль %).

Таблица 3.28.

Расчеты состава масла валерианы лекарственной при спектрофотометрическом и рефрактометрическом детектировании

№	ТАГ	m/z [M+H ⁺]	Рефрактометрический Детектор		Спектрофотометрический детектор	
			t _R (МИН)	мол. доля %	t _R (МИН)	мол. доля %
1	αЭ ₃	837.6	8.95	0.77 ± 0.06	10.81	0.60 ± 0.07
2	αЭ ₂ Л	875.6	10.38	16.46 ± 0.18	12.71	13.12 ± 0.15
3	αЭЛ ₂	877.6	12.16	54.40 ± 0.23	15.04	56.12 ± 0.25
4	αЭ ₂ О	877.6	12.76	1.32 ± 0.11	16.09	1.66 ± 0.12
5	αЭ ₂ П	851.7	13.42	0.53 ± 0.08	16.98	0.79 ± 0.04
6	Л ₃	837.6	14.41	2.52 ± 0.18	-	-
7	αЭЛО	879.6	15.11	10.48 ± 0.21	19.19	12.15 ± 0.20
8	αЭЛП	853.6	15.92	6.60 ± 0.19	20.32	8.19 ± 0.19
9	αЭ ₂ С	899.6	16.52	0.64 ± 0.06	21.44	0.60 ± 0.07
10	Л ₂ О	881.6	18.05	1.05 ± 0.12	-	-
11	αЭО ₂	881.6	18.98	2.13 ± 0.05	24.72	2.24 ± 0.12
12	αЭЛС	881.6	19.69	3.10 ± 0.14	25.80	4.52 ± 0.19
№	Кислота	Содержание радикалов кислот в составе ТАГ (по площадям пиков), моль %				
1	(αЭ) С18:3	38.97 ± 0.20			н/о	
2	(Л) С18:2	51.70 ± 0.28			н/о	
3	(О) С18:1	5.70 ± 0.09			н/о	
4	(П) С16:0	2.38 ± 0.07			н/о	
5	(С) С 18:0	1.25 ± 0.05			н/о	

Масло семян манкетти

По совпадению удерживаний основных пиков масла манкетти с пиками масла кентрантуса и масла жакаранды можно сделать вывод о том, что в масле манкетти основная кислота – α-элеостеариновая, но имеются также производные β-элеостеариновой кислоты и небольшая примесь ТАГ, содержащих радикалы жакарандовой кислоты (Рис. 3.29 и Табл. 3.29).

По всем обнаруженным ТАГ был определен и жирнокислотный состав масла: на октадекатриеновые кислоты приходится 33.65 моль % ± 0.81 (большая для внутренней нормировки погрешность связана в основном с невозможностью надежного разделения площадей проблемных пар ТАГ: Л₂П с ХО₂ и ХЛС с ХОП), на линолевую - 38.41 ± 0.70

моль %, на олеиновую - 14.33 ± 0.43 моль %, на пальмитиновую - 7.01 ± 0.31 моль % и на стеариновую - 6.61 ± 0.29 кислоты.

Таблица 3.29.

Расчеты состава масла манкетти при УФ и рефрактометрическом вариантах детектирования

№	ТАГ	m/z [M+H ⁺]	Рефрактометрический детектор		Спектрофотометрический детектор	
			t_R (мин)	Моль %*	t_R (мин)	Моль %
1	$\alpha\text{Э}_3$	873.7	10.88	1.39	19.93	1.57 ± 0.12
2	$\alpha\text{Э}_2\text{Л}$	875.8	12.94	8.38	24.28	11.45 ± 0.21
3	$\alpha\text{ЭЛ}_2$	877.7	15.49	16.32	29.7	24.05 ± 0.24
4	$\alpha\text{Э}_2\text{О}$	877.7	16.46	5.54	33.77	7.06 ± 0.20
5	$\alpha\text{Э}_2\text{П}$	851.7	17.41	3.39	37.14	4.30 ± 0.16
6	Л_3	879.7	18.70	4.16	-	-
7	$\alpha\text{ЭЛО}$	879.7	19.88	14.48	41.64	20.10 ± 0.23
8	$\alpha\text{ЭЛП}$	853.8	21.11	9.33	45.91	12.59 ± 0.20
9	$\alpha\text{Э}_2\text{С}$	879.7	22.18	3.63	51.43	3.84 ± 0.19
10	$\text{Л}_2\text{О}$	881.8	24.19	5.12	-	-
11	$\text{Л}_2\text{П}$ $+\alpha\text{ЭО}_2$	855.8 +881.7	25.75	5.91	58.99	2.96 ± 0.09
12	$\alpha\text{ЭЛС}$ $+\alpha\text{ЭОП}$	889.8 +855.8	27.09	9.57	63.84 65.1	10.29 ± 0.22
13	ЛО_2	883.7	31.69	2.22	-	-
14	ЛОП	861.7	33.61	5.59	-	-
+15	$+\text{Л}_2\text{С}$	883.7				
16	$\alpha\text{ЭОС}$	883.8	35.69	2.29	90.97	1.79 ± 0.12
17	ЛОС	885.7	43.78	1.34	-	-
18	ЛПС	859.8	46.74	1.35	-	-
№	Кислота	Содержание радикалов кислот в составе ТАГ (по площадям пиков), моль %				
1	($\alpha\text{Э}$) C18:3	33.65 ± 0.81		43.26 ± 0.21		
2	(Л) C18:2	38.41 ± 0.79		34.18 ± 0.24		
3	(О) C18:1	14.33 ± 0.43		11.62 ± 0.15		
4	(П) C16:0	7.01 ± 0.31		5.63 ± 0.11		
5	(С) C 18:0	6.61 ± 0.29		5.31 ± 0.09		

* Погрешность: $\pm 0.43 \div 0.92$ - проблемных погрешность связана с невозможностью надежного разделения площадей пар: $\text{Л}_2\text{П}$ с $\alpha\text{ЭО}_2$; $\alpha\text{ЭЛС}$ с $\alpha\text{ЭОП}$ и ЛОП с $\text{Л}_2\text{С}$

Можно сделать вывод о перспективности использования масла монгонго в качестве источника, богатого незаменимыми кислотами, включая α -элеостеариновую кислоту.

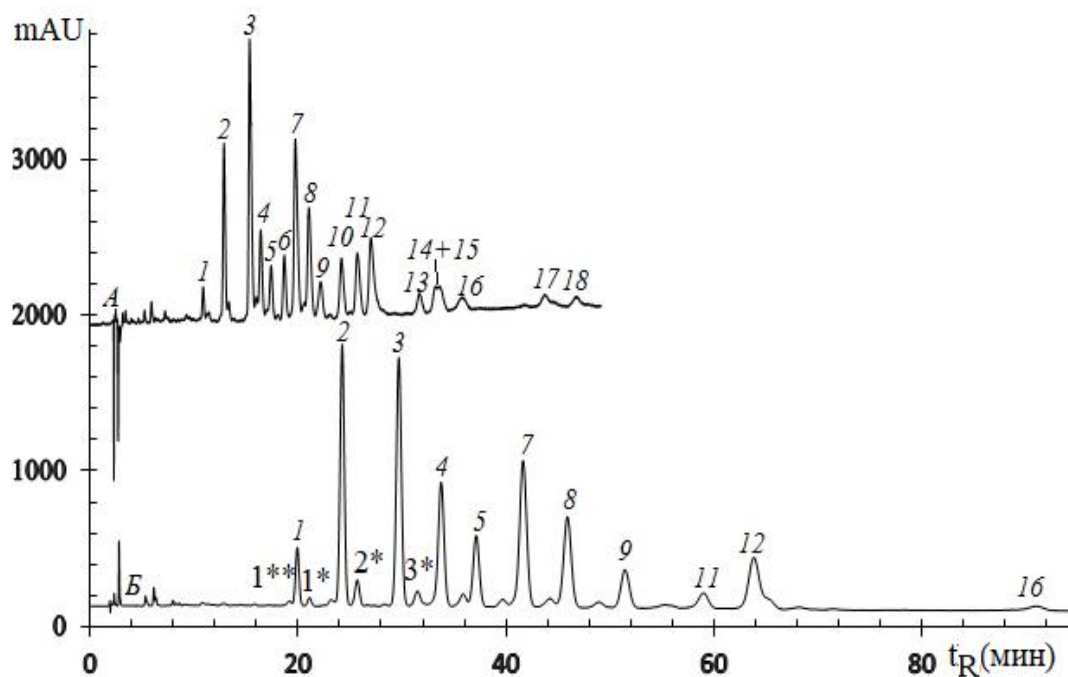


Рис. 3.29. Хроматограммы масла семян манкетти при спектрофотометрическом (Б) и рефрактометрическом (А) детектировании. Знаком * и ** отмечены соединения, в которых вместо одного радикала α -элеостеариновой кислоты в соединении присутствуют радикалы β -элеостеариновой кислоты и жакарандовой кислоты.

Условия записи хроматограмм: колонка 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18, температура термостата колонок 30°C. При УФ- ПФ: 30 об.% ИПС и 70 об.% CH₃CN, 1.0 мл/мин; $\lambda = 278$ нм,
При РФ - ПФ: 60 об.% CH₃COCH₃ и 40 об.% CH₃CN, 0.8 мл/мин

Масло семян момордики харантия и тунговое масло

Масла семян момордики харантия и тунговое масло были известны, как богатые источники α -элеостеариновой кислотой. В этой работе наличие этих кислот подтверждено методом ОФ ВЭЖХ. Две хроматограммы масла семян момордики харантия и тунгового масла, записанные в двух различных подвижных фазах при спектрофотометрическом представлены на рисунке 3.30 и рисунке 3.31

На хроматограмме тунгового масла видно, что единственным преобладающим пиком является три- α -элеостеарат. Принимая во внимание величины времен удерживание не основных пиков, можно сделать вывод, что масло *Vernicia montana* содержит не только радикалы α -элеостеариновой кислоты, но и радикалы β -элеостеариновой кислоты (5.08 моль %).

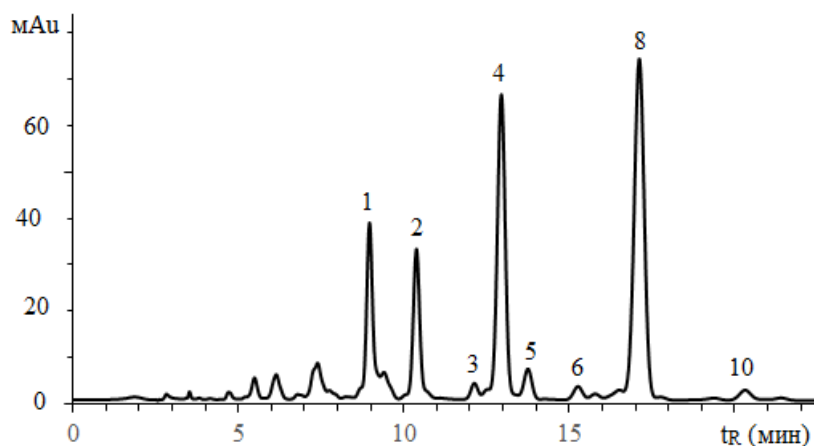


Рис. 3.30. Хроматограмма масла семян момордики харангия при УФ детектировании. Условия записи хроматограмм: колонка 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18, температура термостата колонок 30оС; ПФ: 45 об.% ИПС и 55 об.% СН₃CN, 1.0 мл/мин; λ = 270 нм

Таблица 3.30.

Параметры удерживания ТАГ масла момордики харангия и тунгового масла

№	ТАГ	момордики		тунговое масло		<i>m/z</i> [M+H ⁺]
		<i>t_R</i> , мин	Моль, %	<i>t_R</i> , мин	Моль, %	
1	αЭ ₃	8.96	9.91 ± 0.18	11.74	54.51 ± 0.25	873.7
2	αЭ ₂ Л	10.38	11.49 ± 0.20	13.81	15.43 ± 0.21	875.6
3	αЭЛ ₂	12.13	2.51 ± 0.08	16.33	2.73 ± 0.09	875.6
4	αЭ ₂ О	12.95	28.78 ± 0.23	17.07	14.18 ± 0.12	877.7
5	αЭ ₂ П	13.75	3.05 ± 0.15	17.99	3.03 ± 0.10	851.8
6	αЭЛО	15.26	3.56 ± 0.15	20.4	3.71 ± 0.07	879.7
7	ЭЛП	-	-	21.5	1.43 ± 0.05	
8	Э ₂ С	17.12	37.86 ± 0.25	22.25	3.28 ± 0.10	879.7
9	ЭО ₂	-	-	25.68	0.88 ± 0.03	
10	ЭЛС	20.32	2.84 ± 0.20	26.76	0.80 ± 0.05	881.7

На основании полученных данных был рассчитан состав триацилглицеринов и жирнокислотный состав масла семян момордики и тунга. Результаты состав ТАГ и жирнокислотных представлены в таблицах 3.30 и 3.31.

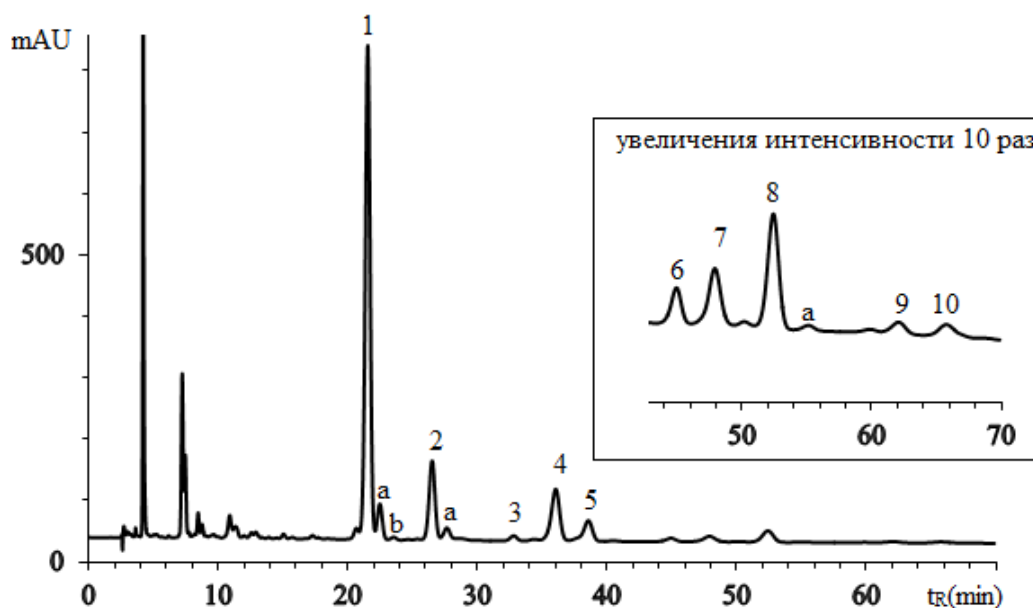


Рис. 3.31. Разделение ТАГ масла семян тунгового масла при УФ детектировании.
Условия записи хроматограмм: колонка 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18, температура термостата колонок 30°C; ПФ: 34 об.% ИПС и 64 об.% CH₃CN, 1.0 мл/мин.

Таблица 3.31.

Жирнокислотный состав масел момордики харангия и тунгового масла

№	Кислота	Содержание радикалов кислот, моль %	
		момордики харангия	тунговое масло
1	(αЭ) C18:3	67.13 ± 0.35	81.65 ± 0.32
2	(Л) C18:2	7.72 ± 0.11	8.64 ± 0.09
3	(О) C18:1	10.78 ± 0.09	6.51 ± 0.05
4	(П) C16:0	1.03 ± 0.05	1.32 ± 0.04
5	(С) C 18:0	13.35 ± 0.11	1.57 ± 0.04

Масла семян trichosanthes pilosa u diplocyclos palmatus

Хроматограммы двух масел (Рис. 3.32) и состав ТАГ, рассчитанный по инкрементному подходу (Табл. 3.32) показывают, что эти масла содержатся одну сопряженную кислоту - пуниковую кислоту.

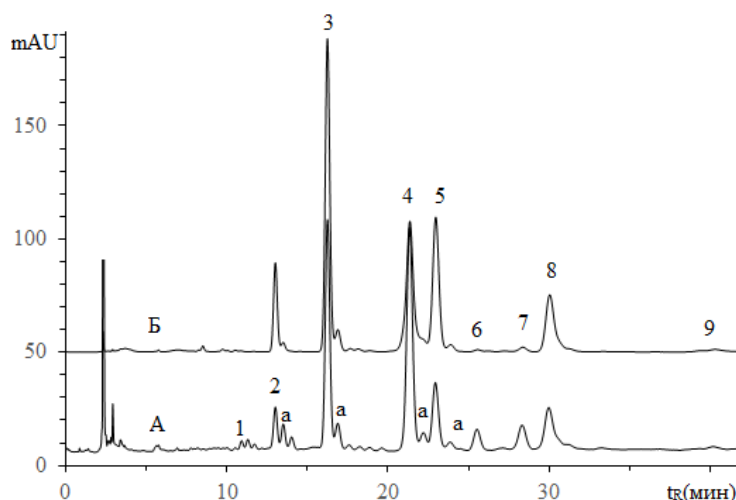


Рис. 3.32. Хроматограммы масел семян *Trichosanthes pilosa* (А) и *Diplocyclos palmatus* (Б) при спектрофотометрическом детектировании.

Условия записи хроматограмм: колонка 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18, температура термостата колонок 30°C; Подвижная фаза: 45 об.% ИПС и 55 об.% CH₃CN, 0.8 мл/мин; λ = 274 нм

Таблица 3.32.

Параметры удерживания ТАГ масел семян *Trichosanthes pilosa* и *Diplocyclos palmatus*

№	ТАГ	t _R , мин	Мол. доля, %		m/z [M+H ⁺]
			<i>Diplocyclos palmatus</i>	<i>Trichosanthes pilosa</i>	
1	Пу ₃	10.77	-	0.49 ± 0.04	873.7
2	Пу ₂ Л	13.02	4.1 ± 0.18	2.86 ± 0.18	875.6
3	ПуЛ ₂	16.25	40.02 ± 0.28	28.9 ± 0.23	875.6
4	ПуЛО	21.36	21.18 ± 0.21	33.7 ± 0.28	879.7
5	ПуЛП	22.97	20.18 ± 0.24	12.1 ± 0.22	853.7
6	Пу ₂ С	25.61	0.32 ± 0.04	2.55 ± 0.08	879.7
7	ПуО ₂	28.52	0.67 ± 0.05	6.77 ± 0.17	881.6
8	ПуЛС	30.03	13.02 ± 0.13	10.4 ± 0.22	881.7
9	ПуОС	40.32	0.51 ± 0.05	2.27 ± 0.15	883.7

Масло семян гранат обыкновенный

Масло семян граната можно считать достаточно доступным, поскольку его несложно экстрагировать из семян плодов, практически круглый год предлагающихся на рынке. Ценность этого масла состоит в том, что оно содержит одну из наиболее

биологически активных сопряженных кислот – пуниковую (Пу), доля которой составляет 70%.

Таблица 3.33.

Жирнокислотный состав масел семян *Trichosanthes pilosa* и *Diplocyclos palmatus*

№	Кислота	Содержание радикалов кислот в составе ТАГ (по площадям пиков), моль %	
		<i>Diplocyclos palmatus</i>	<i>Trichosanthes pilosa</i>
1	(Пу) C18:3	34.81 ± 0.19	35.46 ± 0.22
2	(Л) C18:2	46.17 ± 0.23	38.94 ± 0.22
3	(О) C18:1	7.68 ± 0.08	16.48 ± 0.16
4	(П) C16:0	6.73 ± 0.08	4.03 ± 0.07
5	(С) C18:0	4.62 ± 0.05	5.09 ± 0.09

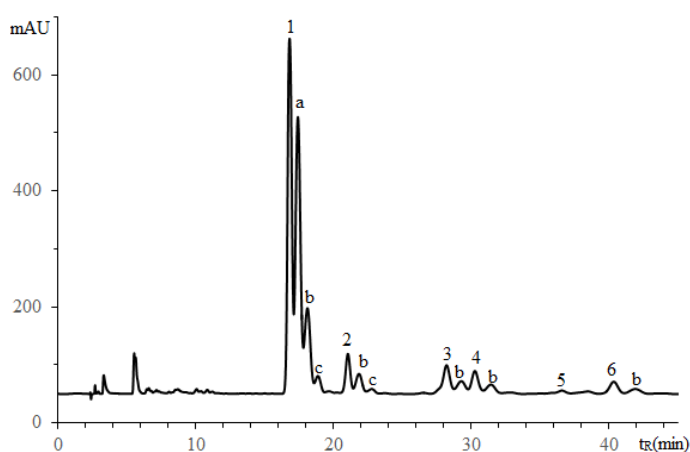


Рис. 3.33. Хроматограммы масла семян граната при спектрофотометрическом детектировании. Знаком *a*, *b* и *c* отмечены соединения, в которых вместо радикала пуниковой кислоты в соединении присутствуют одни, два или три радикалов α -элеостеариновой кислоты.

Условия записи хроматограмм: колонка 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18; температура термостата колонок 30°C; ПФ: 32 об.% CH₃CH(OH)CH₃ и 68 об.% CH₃CN, 1.0 мл/мин.

Детектирование $\lambda = 278$ нм,

Расчеты, выполненные по площадям пиков, показали, что суммарное содержание сопряженных октадекатриеновых кислот, составляет 89.20 % мол. ± 0.25, а доля остальных высших жирных кислот меньше 12 мол. %: линолевая - 3.57 моль % ± 0.18, олеиновая - 2.48 моль % ± 0.11, пальмитиновая - 3.42 моль % ± 0.13 и стеариновая - 1.28 ±

0.06 моль % кислоты. А даже октадекатриеновая кислота представлена в основном пуниковой и примесями α -элеостеариновой (23.15 моль %) кислоты.

Таблица 3.34.

Параметры удерживания ТАГ масла граната и их отнесение по инкрементному подходу

№	ТАГ	t_R (мин)	lgk	Инкременты (± 0.002)				% ТАГ
				Х_Л	Л_О	О_П	П_С	
1	Пу ₃	16.85	0.759					69.22 \pm 0.29
2	Пу ₂ Л	21.04	0.870	0.111				9.22 \pm 0.17
3	Пу ₂ О	28.23	1.012		0.142			7.45 \pm 0.15
4	Пу ₂ П	30.02	1.042			0.029		8.78 \pm 0.14
5	ПуЛП	37.90	1.151	0.109				1.49 \pm 0.07
6	Пу ₂ С	40.37	1.180				0.139	3.83 \pm 0.17

Масло семян *Gynostemma*

Основная кислота масла – α -элеостеариновая с основным ТАГ три- α -элеостеаратом, что выводит масло в число наиболее обогащенных сопряженными октадекатриеновыми кислотами (Рис. 3.34). Состав ТАГ: 1 – Пу α Э₂ - 2.92%; 2 – α Э₃ - 55.21%; α Э₂βЭ - 6.09%; α ЭβЭ₂ - 1.12%; α Э₂Л - 13.8%; α ЭβЭЛ - 1.27%; α ЭЛ₂ - 1.54%; α Э₂О - 6.51%; α Э₂П - 4.75%; α ЭЛО - 1.16%; α ЭЛП - 2.46%; α Э₂С - 3.18%.

Жирнокислотный состав: Пу – 0.97%; α Э – 82.56%; βЭ – 3.2%; Л – 7.25%; О – 2.56%; П – 2.4%; С – 1.06%.

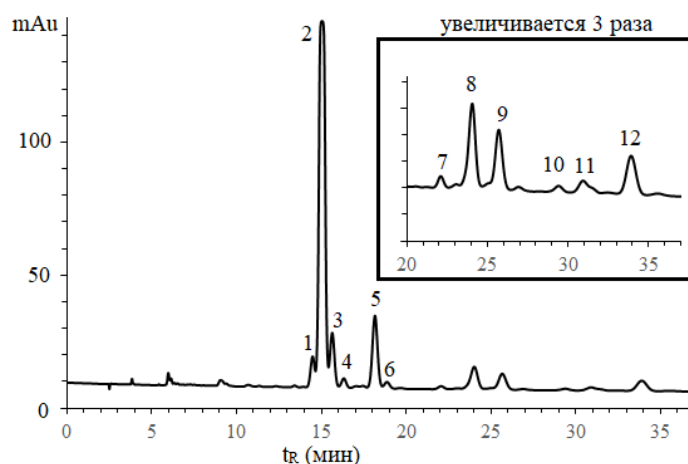


Рис. 3.34. Хроматограмма масел семян *Gynostemma* при УФ детектировании.

Условия записи хроматограмм: колонка 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18; температура термостата колонок 30°C; ПФ: 38 об.% ИПС и 62 об.% CH₃CN, 1 мл/мин. Детектирование $\lambda = 278$ нм.

Масло семян *Ecballium elaterium*

Данное масло оказалось немногим менее ненасыщенным с преобладание среди радикалов кислот пуниковой кислоты. Состав ТАГ: 1- Пу₂Л 1.04%; 2- ПуЛ₂ 20.62%; αЭЛ₂ 3.54%; ПуЛО 31.97%; αЭЛО 4.14%; ПуЛП 14.1%; αЭЛП 1.83%; ПуО₂ 7.6%; ПуЛС 12.47%; ПуОС 2.69%.

Жирнокислотный состав: Пу – 30.51%; αЭ-3.17%; Л-37.96%; О- 18.00%; П-5.31%; С- 5.05%.

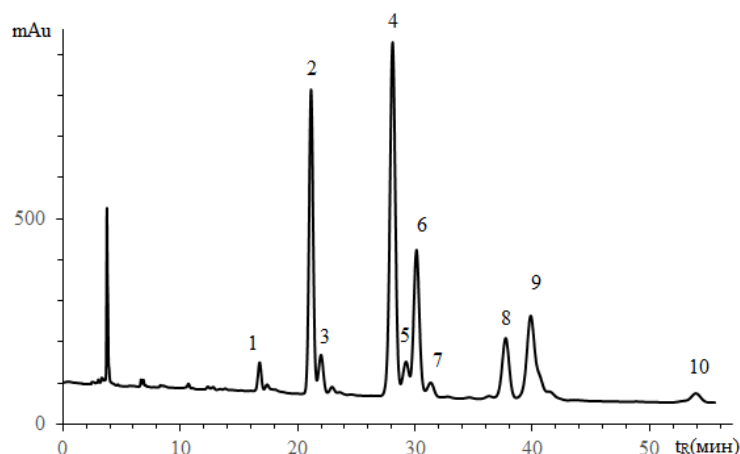


Рис. 3.35. Хроматограммы масел семян *Ecballium elaterium* при УФ детектировании.

Условия записи хроматограмм: колонка 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18; температура термостата колонок 30°C; ПФ: 38 об.% ИПС и 62 об.% СН₃CN, 1 мл/мин; λ = 278 нм.

3.3. Уравнение относительного удерживания ТАГ

В реальной хроматографической практике иногда приходится сталкиваться со сложными смесями, в которых при изменении состава подвижных фаз происходит инверсия удерживания некоторых пар веществ. Это создает определенные трудности при исследовании многокомпонентных систем по традиционным методам представления результатов в координатах «свойство элюента - удерживание сорбатов» вследствие нелинейности данной зависимости. Кроме этого основная проблема хроматографии состоит в том, что для установления присутствия определяемого вещества в пробе необходимо использование стандартных образцов. Более того, даже совпадение времен удерживания двух веществ не является доказательством их идентичности, - необходим ортогональный контроль других свойств веществ. В случае многокомпонентных смесей проблематично и малоэффективно использование большого количества стандартных веществ вследствие больших временных затрат. Для решения этих проблем мы предлагаем использовать двухпараметрическую индексацию удерживания по методу анализа относительного удерживания.

По результатам проведенных исследований были определены индексационные уравнения удерживания триацилглицеринов, содержащих радикалы сопряженных двойных связей. Для определения уравнений относительного удерживания мы записывали хроматограммы базовых масел в качестве соединений сравнения с использованием трипуникат – основной компонент в масла граната в системе элюентов ИПС в ацетонитриле с различными концентрациями ИПС:

$$lgk(i) = a_0 + a_1 \times lgk(Пу_3), \quad (3.2)$$

где $lgk(i)$ и $lgk(Пу_3)$ – логарифмы факторов удерживания компонента i и ТАГ состава $Пу_3$, а a_0 и a_1 – экспериментально определяемые коэффициенты.

Для построения карт разделения и определения параметров уравнений относительного удерживания в настоящей работе были использованы базовые масла:

- масло семян момордики кохинхинской, как масло содержащие радикалы α -элеостеариновой кислоты (Рис. 3.14)
- масло семян жакаранды, как масло содержащие радикалы жакарандовой кислоты (Рис. 3.16)
- масло семян катальпы, содержащее радикалы катальповой кислоты (Рис. 3.18)
- масло семян календулы с радикалами календовой кислоты (Рис. 3.20)
- масло семян трихозанта с радикалами пуниковой кислоты (Рис. 3.17)
- масло семян кентрантуса, содержащее радикалы не только α -элеостеариновой, но и β -элеостеариновой кислот (Рис. 3.15)

Трипуникат ($Пу_3$) масла гранта был выбран в качестве реперного соединения, поскольку:

- (а) фрукты граната доступны круглый год на рынке, и таким образом, масло может быть легко приготовлено;
- (б) имеется только один главный пик на хроматограмме семян масла (пик $Пу_3$), при этом другие имеют значительно меньшие площади пиков, что не влияет на удерживание реперного вещества.

Относительное удерживание определяли для четырех различных подвижных фазовых составов для системы элюирования «ИПС – ацетонитрил». Все эксперименты проводили в изократическом режиме при равновесии хроматографической системы. Последнее контролировалось полным совпадением двух последовательных хроматограмм образца.

Найденные в работе коэффициенты индексационных уравнений всех ТАГ в базовых маслах представлены в таблице 3.35.

Таблица 3.35.

Параметры уравнений для всех триацилглицеринов, содержащих радикалы сопряженных жирных кислот относительно трипуниката

ТАГ	Коэф.*	**	X – сопряженные жирные кислоты						
			Пу	Ж	Кт	α Э	Кл	β Э	β Кл
X ₃	a ₁	± 0.008	1.000	1.011	1.014	1.010	1.021	1.035	1.054
	a ₀	± 0.004	0.000	0.022	0.041	0.052	0.058	0.100	0.113
X ₂ Л	a ₁	± 0.014	1.042	1.048	1.052	1.047	1.054	1.062	n.d.
	a ₀	± 0.008	0.089	0.104	0.116	0.123	0.127	0.154	n.d.
XЛ ₂	a ₁	± 0.028	1.091	1.086	1.090	1.085	1.092	1.087	n.d.
	a ₀	± 0.013	0.174	0.187	0.190	0.195	0.195	0.212	n.d.
X ₂ О	a ₁	± 0.028	1.101	1.106	1.112	1.104	1.115	1.120	n.d.
	a ₀	± 0.013	0.189	0.206	0.215	0.224	0.225	0.255	n.d.
X ₂ П	a ₁	± 0.039	1.105	1.103	n.d.	1.107	1.118	n.d.	n.d.
	a ₀	± 0.020	0.218	0.239	n.d.	0.253	0.256	n.d.	n.d.
XЛЮ	a ₁	± 0.037	1.147	1.144	1.151	1.144	1.152	1.135	n.d.
	a ₀	± 0.018	0.276	0.281	0.289	0.295	0.294	0.317	n.d.
XЛП	a ₁	± 0.044	1.148	1.146	1.155	1.146	1.156	1.146	n.d.
	a ₀	± 0.022	0.307	0.319	0.318	0.325	0.323	0.346	n.d.
X ₂ С	a ₁	± 0.037	n.d.	1.170	n.d.	1.171	1.183	n.d.	n.d.
	a ₀	± 0.018	n.d.	0.327	n.d.	0.343	0.345	n.d.	n.d.
XО ₂	a ₁	± 0.054	1.209	1.206	1.213	1.200	n.d.	n.d.	n.d.
	a ₀	± 0.026	0.374	0.387	0.387	0.396	n.d.	n.d.	n.d.
XЛС	a ₁	± 0.050	1.216	1.210	1.218	1.214	n.d.	1.216	n.d.
	a ₀	± 0.026	0.394	0.408	0.408	0.412	n.d.	0.434	n.d.

* при уравнении (1); ** максимальная погрешность; n.d. – не определены.

В работе [165] показано, что индексационные уравнения не привязаны к составу подвижной фаз, и в ряде случаев могут быть общими для различных марок стационарных фаз, что подтверждается и нами данными. Для оценки возможности применения относительного уравнения при анализе ТАГ мы использовали эти уравнения для различных колонок и подвижных фаз. Параметры удерживания ТАГ масла момордики кохинхинской при переходе от одной марки колонки С18 к другим маркам представлены на рисунке 3.36.

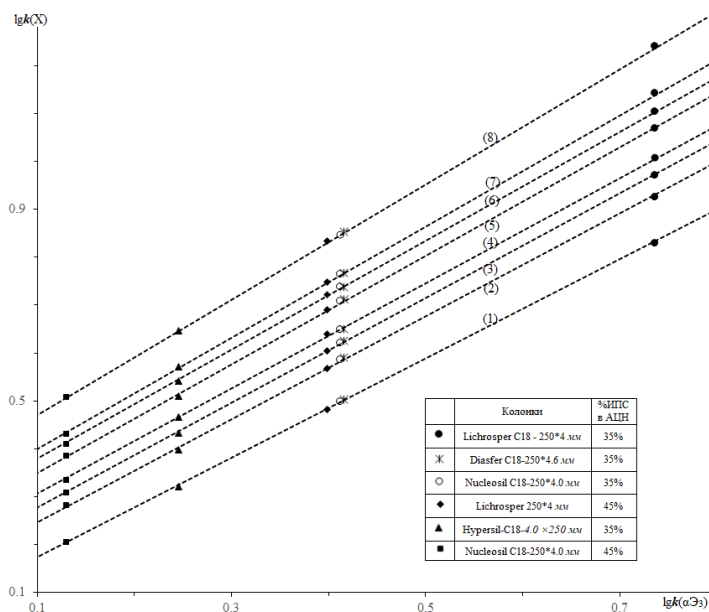


Рис. 3.36. Карта разделения ТАГ масла момордики кохинхинской на разных колонках.

Элюент: ИПС в ацетонитриле; X: (1) – α Э₂Л; (2) – α ЭЛ₂; (3) – α Э₂О; (4) – α Э₂П;
(5) – α ЭЛО; (6) – α ЭЛП; (7) – α Э₂С; (8) – α ЭЛС.

3.4. Закономерности удерживание триацилглицеринов

Построение и обоснование модели

Несмотря на то, что поверхность структуры аморфного силикагеля может отличаться от поверхности кристаллических модификаций диоксида кремния (кварца, кристобалита и тридимита), определенные закономерности в целом должны соблюдаться. Так, силанольная группа появляется на одной или нескольких вершинах кремнекислородного тетраэдра $\{\text{SiO}_4\}$, как основного структурного звена всех кристаллических и аморфной модификаций SiO_2 . При этом следует учитывать, что для химии силикатов смежные тетраэдры направлены вершинами в одну и ту же сторону только в особых случаях, например, в кристаллической структуре монтмориллонита [213]. Это обусловлено тем, что в данном минерале все вершины двух тетраэдрических (кремнекислородных) слоев совмещены с частью атомов кислорода октаэдрического (алюминий-гидроксидного) слоя. В случае аморфного силикагеля нет причин для одинаковой направленности кремнекислородных тетраэдров (кроме случайных флуктуаций в аморфной структуре), поэтому наиболее вероятно чередование кремнекислородных тетраэдров в порядке: «... вершиной вверх – вершиной вниз ...», (Рис. 3.37).

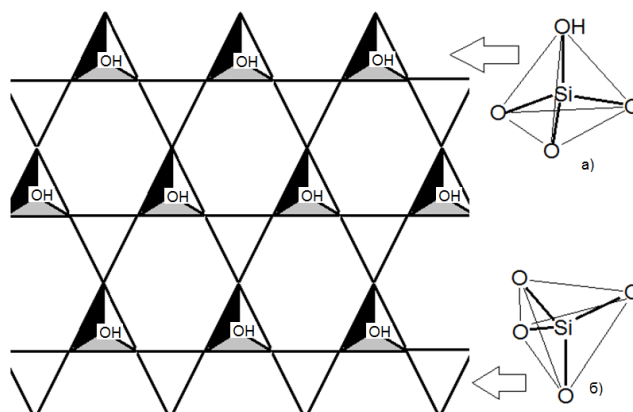


Рис. 3.37. Сетка сопряженных друг с другом кремнекислотродных тетраэдров с чередующейся ориентацией вверх-вниз по свободной силанольной группой на вершине тетраэдра

Это принципиально отличается от часто используемых схематических рисунков с одинаковой ориентацией соседних кремнекислородных тетраэдров [214]. Удобной идеализированной моделью реальной структуры поверхности может служить упаковка тетраэдров $\{\text{SiO}_4\}$, представленная на рисунке 3.27, для орторомбической структуры кристобалита [215]. При среднем размере ребра тетраэдра $\{\text{SiO}_4\}$ 0.263 нм [216] на 1 нм^2 поверхности содержатся 4.2 силанольные группы, а для произвольно ориентированной поверхности – 4.6 групп [217], что близко к экспериментальному значению 4.9 [218] для силикагеля.

Если учесть, что в лучшем случае (для силилирования поверхности триметилхлорсиланом) удастся привить лишь 2.33 группы на нм^2 [217], то примерно половина силанольных групп остается немодифицированной. В этом случае корректным изображением привитой поверхности должен быть рисунок, на котором остается незамещенной каждая вторая силанольная группа (Рис. 3.38). Таким образом, химически модифицируется только один из четырех последовательно соединенных кремнекислородных тетраэдров. При регулярной структуре привитой фазы закрытие остаточных силанольных групп за счет эндкеппинга триметилхлорсиланом маловероятно, поскольку проекция триметилсилильной и алкилтриметилсилильной групп (при ориентации алкильного радикала вверх от поверхности сорбента) одинаковы. Впрочем, эндкеппинг возможен вследствие кривизны реальной поверхности силикагеля, при которой соответствующие стерические напряжения могут быть уменьшены. При статистическом силилировании силанольных групп не исключена вероятность появления двух силанольных групп между привитыми радикалами. В данном случае дополнительное

силилирование одной из этих двух групп молекулой триметилхлорсилана может оказаться предпочтительным из-за меньших пространственных напряжений в месте прививки, поскольку для длинных алкильных цепей свобода конформационных изменений будет существенно уменьшенной. Наконец, силилирование триметилхлорсиланом более вероятно в узких местах порового пространства силикагеля. Отметим, что полученные простым методом результаты согласуются с выводами работы [219] по компьютерному моделированию поверхности силикагеля, химически модифицированного алкилдиметоксихлорсиланом.

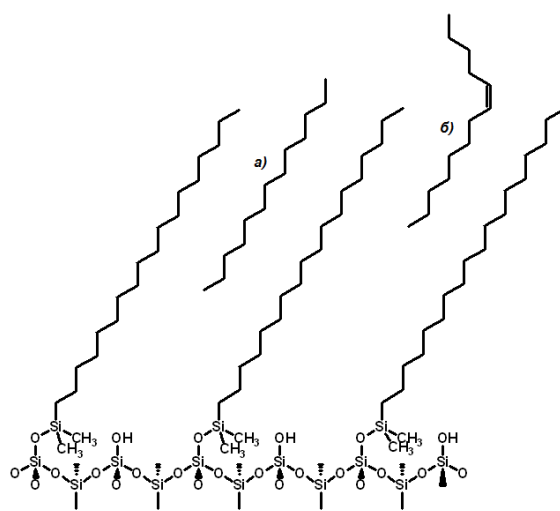


Рис. 3.38. Схематическое строение поверхности кремнезема по цепи сопряженных кремнекислородных тетраэдров после модификации алкилдиметилхлорсиланом и внедрение алкильных радикалов сорбатов в пространство между привитыми радикалами

С другой стороны, в кристаллической фазе алканов молекулы с полностью *транс*-конформацией укладываются параллельно друг другу, образуя элементарную кристаллическую решетку от моноклинной до орторомбической (в зависимости от взаимной ориентации метиленовых групп соседних молекул [220]). При этом расстояние между центрами молекул алканов в проекции, перпендикулярной длинной оси *c*, вдоль которой укладываются цепи атомов углерода, равно от 0.450 до 0.490 нм, что лишь немногим меньше расстояния между соседними силанольными группами на поверхности силикагеля. Следовательно, существует теоретическая возможность химической модификации силикагеля по всем силанольным группам поверхности, например, по гидридной схеме [221]. Но при химическом модифицировании алкилдиметилхлорсиланом из-за стерических препятствий, связанных с наличием в якорной группировке двух метильных групп, замещению подвергается лишь половина силанольных групп. Следовательно, идеализированная модель химически модифицированного силикагеля

такова, что между привитыми алкильными группами могут поместиться алкильные радикалы молекул-сорбатов (Рис. 3.38). Предложенная и обоснованная выше схема позволяет объяснить ряд закономерностей, обнаруженных при исследовании удерживания триацилглицеринов как функции строения радикалов высших жирных кислот.

Сравнение удерживания ТАГ, содержащих радикалы различных сопряженных октадекатриеновых кислот

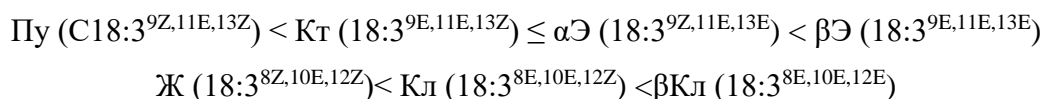
Не ограничивая общности, из полученных результатов для разделения ТАГ в подвижной фазе, содержащей 35% ИПС и 65% ацетонитрила, можно построить финальную таблицу инкрементов похода (Табл. 3.36).

Таблица 3.36.

Инкременты $\Delta(\text{top} \rightarrow \text{bottom}) \pm 0.001$ для ТАГ, содержащих радикалы сопряженных октадекатриеновых кислот в ПФ: 35% ИПС и 65% ацетонитрила

		Пу	Ж	Кт	α Э	Кл	β Э	β Кл
Пу	9Z,11E,13Z							
Ж	8Z,10E,12Z	0.009						
Кт	9E,11E,13Z	0.017	0.008					
α Э	9Z,11E,13E	0.020	0.011	0.003				
Кл	8E,10E,12Z	0.025	0.016	0.008	0.005			
β Э	9E,11E,13E	0.041	0.032	0.024	0.021	0.016		
β Кл	8E,10E,12E	0.049	0.040	0.032	0.029	0.024	0.010	

Видно, что для одного и того же положения сопряженных двойных связей (например, 9,11,13 или 8,10,12) по углеродной цепи последовательность времен элюирования одинакова:



При замене *цис*-двойной связи на *транс*-конфигурацию удерживание радикала увеличивается (Рис. 3.39). Разница между временами удерживания ТАГ с радикалами катальной и α -элеостеариновой кислоты небольшая, но достаточная, для дифференциации ТАГ с двумя или тремя такими радикалами. Существуют некоторые проблемы в дифференциации ТАГ с одним радикалом этих кислот.

При перемещении части метиленовых групп из внешней части во внутреннюю удерживание радикала уменьшается. Замена позиций двойных связей с положений 9,11,13

до положений 8,10,12 соответствует движению одной CH_2 -группы от внутренней части молекулы во внешнюю.

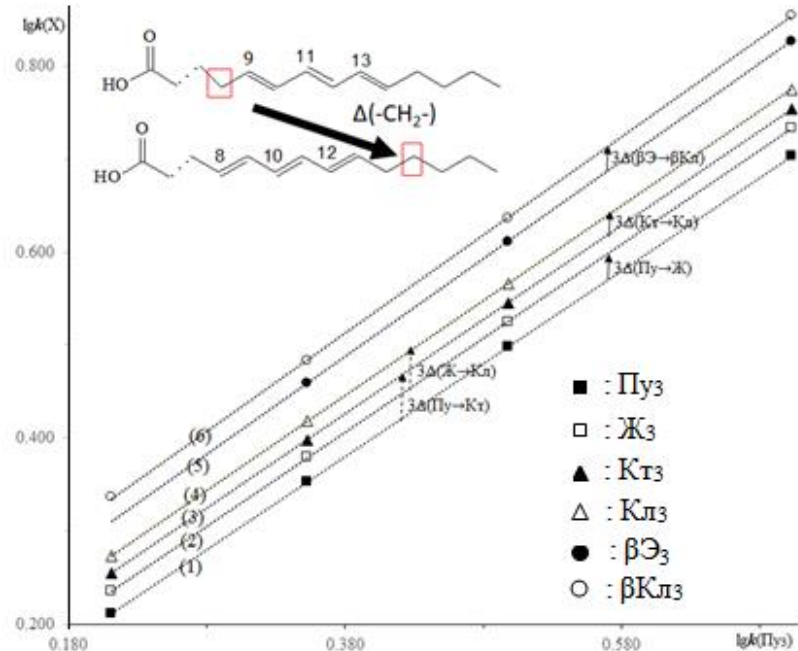
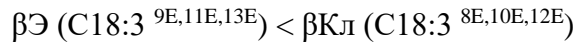
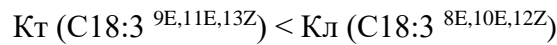
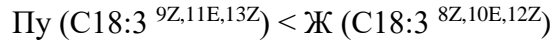


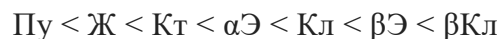
Рис. 3.39. Карта разделения ТАГ с радикалами трех одинаковых сопряженных октадекатриеновых кислот

ТАГ, Хз: (1) – Пуз; (2) – Жз; (3) – Ктз; (4) – Клз; (5) – βЭз; (6) – βКлз

При подвижной фазе 35% ИПС и 65% ацетонитрила, при замене радикала пуниковой кислоты на радикал жакарановой, а также - β-элеостеариновой на β-календовую, и – катальпавой на календовую инкременты не изменяются (с погрешностью 0.001).

$$\Delta(\text{Пу} \rightarrow \text{Ж}) = 0.009; \Delta(\beta\text{Э} \rightarrow \beta\text{Кл}) = 0.010 \text{ и } \Delta(\text{Кт} \rightarrow \text{Кл}) = 0.008$$

Таким образом, полная последовательность элюирования соответствующих соединений имеет вид:



Найденные закономерности удерживания кислот как функция их строения могут быть объяснены с использованием выше предложенной модели строения привитой фазы. Без стерических препятствий в такую фазу (Рис. 3.38), проникают радикалы неразветвленных алкильных цепей. Замена двух метиленовых групп на $\text{C}=\text{C}$ -связь всегда приводит к уменьшению удерживания, но конформация *транс*-изомеров напоминает конфигурацию насыщенных цепей, поэтому проникновение *транс*-изомера в глубину

привитой связи менее затруднено по сравнению с радикалами с *цис*-связью. В случае удерживания ТАГ с радикалами пуниковой, α -элеостеариновой и β -элеостеариновой удерживание должно возрастать с увеличением числа *транс*-двойных связей в молекуле. Поскольку при *цис*-конфигурации двойной связи в непредельных кислотах проникновение радикалов в глубину привитой связи затрудняется по стерическим причинам: необходимы конформационные изменения в структуре привитого слоя, то удерживание непредельных жирных кислот и их производных должно быть тем выше, чем дальше от конца алкильной части кислотного радикала находится двойная связь.

Следовательно, удерживание производных пуниковой (9-*цис*,11-*транс*,13-*цис*-октадекатриеновой) кислоты должно быть меньше, чем, например, производных жакарандовой кислоты (8-*цис*,10-*транс*,12-*цис*-октадекатриеновой), как и для пары катальповая и календовая кислоты. В случае замены конфигурации 8Z,10E,12E на 8E,10E,12Z удерживания также должно уменьшиться.

3.5. Особенности УФ-спектров кислот с сопряженными двойными связями

Отличительной особенностью электронных спектров сопряженных полиеновых соединений является их электронно-колебательная структура [222], полосы в которой соответствуют переходам электрона из основного колебательного состояния основного электронного состояния вследствие «вертикальности» (т.е. запаздывания изменения ядерной конфигурации при изменении электронной конфигурации) переходов одновременно на несколько различных колебательных состояний первого возбужденного электронного состояния (Рис. 3.40).

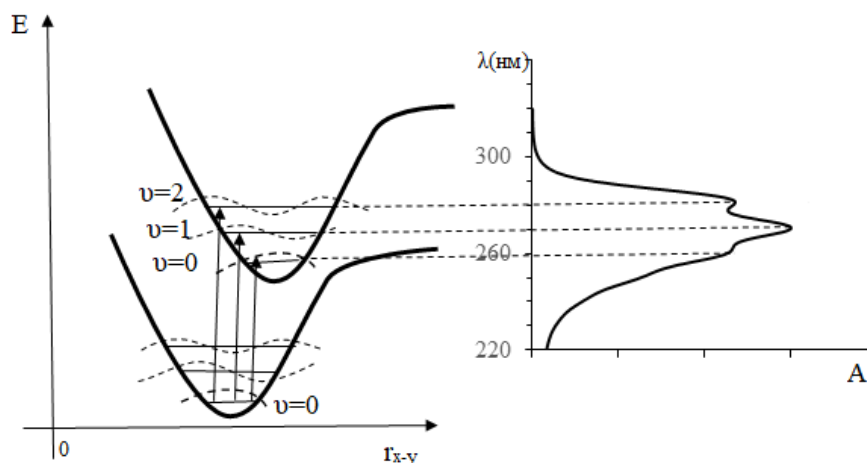


Рис. 3.40. Форма полосы поглощения в электронном спектре сопряженных октадекатриеновых кислот.

При этом существует приблизительно зависимость между длиной волны максимума поглощения и длиной цепи сопряжения. Теоретически существует много изомеров сопряженных октадекатриеновых кислот с различным положением двойных связей по цепи атомов углерода, и с различной *цис-транс*-конфигурацией этих связей. Но в растительных источниках было обнаружено только ограниченное число изомеров. Во-первых, в изомерах средняя C=C-связь имеет только *транс*-конфигурацию. При *транс*-конфигурации центральной (из трех сопряженных) связи возможны три варианта конфигурации боковых C=C-связей (Рис 3.41). В соответствие с эмпирическими правилами [223] при замене *цис*-связи на *транс*-конфигурацию должен наблюдаться гипсохромный сдвиг максимумов абсорбции, т.е. в случае соединений с сопряженными триеновыми связями возможно появление трех типов электронных спектров (Рис. 3.41). Но параметры электронных спектров, во-первых, не зависят от того, к какой части кислоты (к карбоксильной группе или к концевой метильной группе) ориентирована несимметричная система из трех сопряженных связей. На рисунке 3.41 указаны три типа спектров природных октадекатриеновых кислот: тип I (пуниковая и жакарановая); тип II: (катальповая, α -элеостеариновая и календовая); и тип III (β -элеостеариновая и β -календовая).

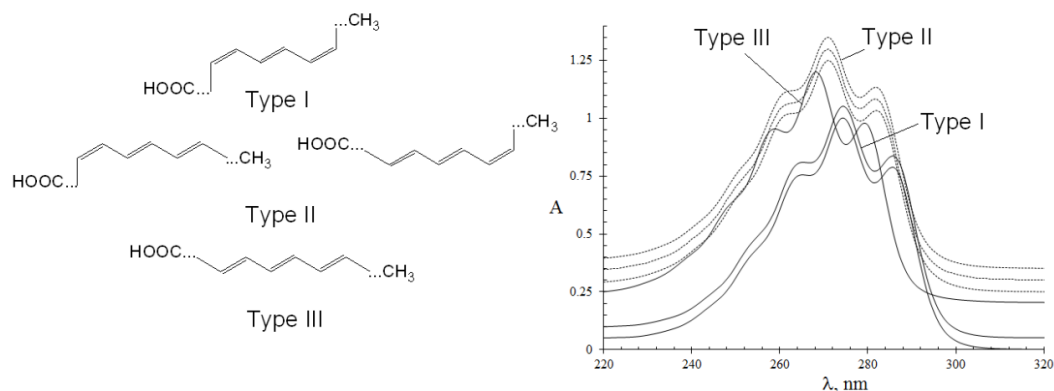


Рис. 3.41. Три типа конфигураций *цис/транс* в природных конъюгированных октадекатриеновых жирных кислотах и их электронные спектры.

Во-вторых, положение этих связей по длине кислотного радикала может быть различным. По этой причине трем типам электронных спектров может соответствовать большое число жирнокислотных радикалов различного строения. Но в семенах растений синтезируются только два позиционных изомера: октадека-9,11,13-триеновые и октадека-8,10,12-триеновые кислоты. Поэтому в природных объектах обнаружено только семь (из восьми) изомерных сопряженных октадекатриеновых кислот: 1) жакарандовая, 2) пуниковая, 3) календовая, 4) катальповая, 5) α -элеостеариновая и 6) β -элеостеариновая и 7) β -календовая. В настоящем исследовании было показано, что отсутствуют

сольватохромные эффекты электронных спектров сопряженных октадекатриеновых кислот для полного диапазона подвижных фазовых составов, подходящих для разделения ТАГ, - по крайней мере для элюентов, содержащих 30-60 об. % ИПС в ацетонитриле.

В случае октадекатетраеновых кислот электронные спектры, записанные в кювете детектора (Рис. 3.42) имеют характерную для сопряженных тетраеновых соединений электронно-колебательную структуру, причем для радикала положение максимумов абсорбции свидетельствует о присутствии веществ с четырьмя сопряженными С=C-связями.

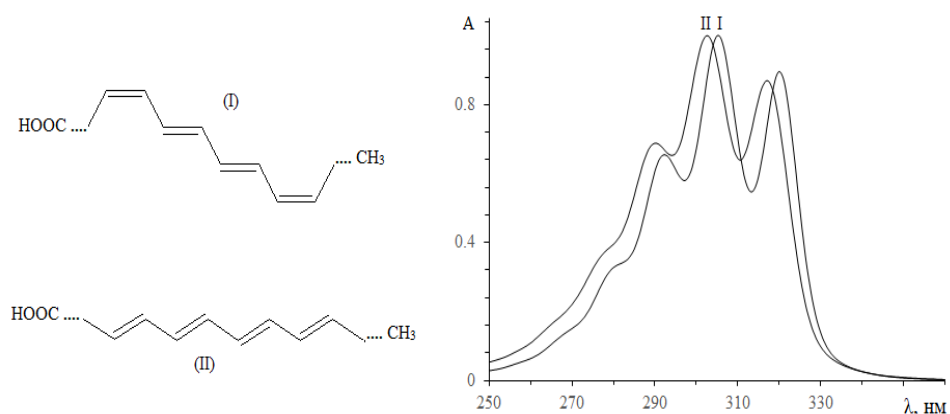


Рис. 3.42. Электронные спектры ТАГ состава ХЛ₂

Радикал Х: I – α - паринаровой и II – β -паринаровой, кислот. Растворитель: 35 об.% ИПС и 75 об.% CH_3CN .

Некоторое гипсохромное смещение максимумов абсорбции соответствует замене одной из *цис*-связей на *транс*-связь. Это связано с тем, что замена *цис*- на *транс*-конфигурацию приводит к более эффективному π - π -перекрыванию и приводит к большей копланарности π -системы в *транс*-конфигурации, чем в *цис*-конфигурации. В *цис*-изомере возникают стерические напряжения, схема 3.1.

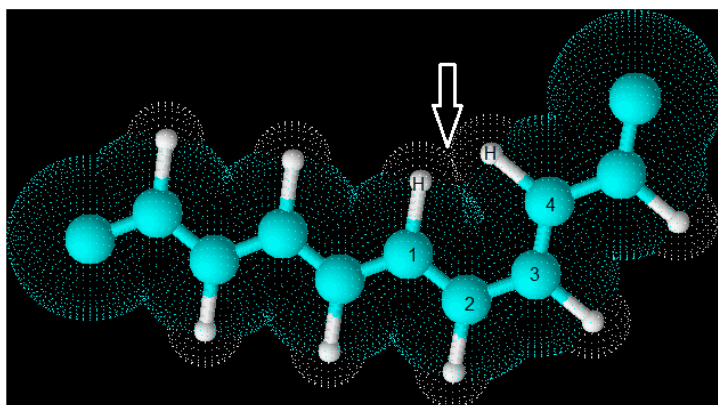


Схема 3.1. Стерическое напряжение между атомами водорода в положении 1,4 *цис*-двойной связи

Не только стереохимия двойной связи имеет значение для положения максимума сорбции, но и число двойных связей, находящихся в сопряжении (Рис. 3.43). По литературным данным [224] сопряжение вызывает батохромный сдвиг полосы поглощения, пропорциональный числу двойных связей, находящихся в сопряжении в хромофоре молекулы. Между квадратами длин волн максимумов поглощения и числом двойных связей, находящихся в сопряжении существует такая зависимость:

$$\lambda_{\max}^2 = A + B \times n$$

где n - число двойной связей, находящихся в сопряжении в хромофоре молекулы

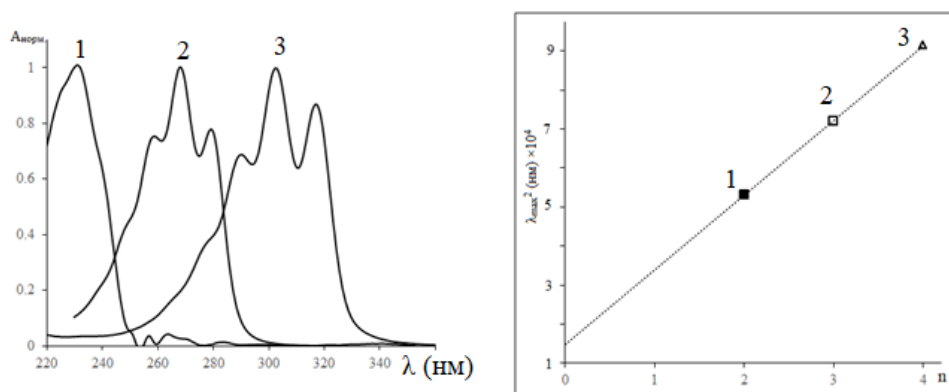


Рис. 3.43. Зависимость квадратов длин волн максимумов поглощения от числа двойных связей, находящихся в сопряжении.

1- спектры поглощения радикала 10E,12E-октадека-10,12-диеновой; 2- спектры β -элеостеариновой кислоты C18:3^{9E,11E,13E} (в масле семян кентрантуса); 3- спектры β -паринаровой кислоты C18:4^{9E,11E,13E,15E} (в масле Бальзамине).

Определение соотношения между коэффициентами экстинкции изомеров, с различающимися хромофорами

При хроматографическом разделении веществ с различающимися хромофорами со спектрофотометрическим детектированием возникает проблема, а точнее, проблема обычно просто игнорируется по определению количества веществ вследствие недоступности (или труднодоступности) стандартных образцов. Поэтому в настоящей работе мы использовали метод установления количественного состава ТАГ с использованием площадей под пиками в точке, аналогичной изобестической точке.

В случае семи сопряженных октадекатриеновых кислот для определения изобестических точек трех типов спектров мы определили соотношения коэффициентов экстинкции между α -элеостеариновой и β -элеостеариновой кислотами, а также между α -элеостеариновой и пуниковой кислотами. Благодаря наличию двух типов ТАГ, различающихся тем, что один имеет в составе радикал α -элеостеариновой, а другой – β -

элеостеариновой кислот и смешанный ТАГ этих двух радикалов с заведомо точным соотношением 1:1 (в масле кентрантуса), появляется возможность определить соотношение коэффициентов экстинкции двух изомерных радикалов. Если нормированный спектр $(\alpha\text{Э})_2\text{Л}$, $\mathbf{F}_{\alpha\text{Э}}(\lambda)$, сложить с нормированным спектром $(\beta\text{Э})_2\text{Л}$, $\mathbf{F}_{\beta\text{Э}}(\lambda)$, с корректирующим коэффициентом g_1 то после нормировки мы должны получить спектр, который должен совпасть с нормированным экспериментально полученным спектром $\alpha\text{Э}\beta\text{ЭЛ}$. Необходимое при этом для нормировки положение максимума абсорбции, (λ_{max}) , определяется по экспериментальному спектру $\mathbf{F}_{\alpha\text{Э}\beta\text{Э}}(\lambda)$:

$$\mathbf{F}_{\alpha\text{Э}\beta\text{Э}(\text{теор.})}(\lambda) \equiv [\mathbf{F}_{\alpha\text{Э}}(\lambda) + g_1 \cdot \mathbf{F}_{\beta\text{Э}}(\lambda)] / [\mathbf{F}_{\alpha\text{Э}}(\lambda_{\text{max}}) + g_1 \cdot \mathbf{F}_{\beta\text{Э}}(\lambda_{\text{max}})]. \quad (3.3)$$

Коэффициент g_1 подбирали по наименьшему среднеквадратичному отклонению между расчетным и экспериментальным спектрами $\mathbf{F}(g)$, в котором суммирование проводили по всем длинам волн:

$$\mathbf{F}(g) = \Sigma [\mathbf{F}_{\alpha\text{Э}\beta\text{ЭЛ}(\text{экс.})}(\lambda) - \mathbf{F}_{\alpha\text{Э}\beta\text{ЭЛ}(\text{теор.})}(\lambda)]^2. \quad (3.4)$$

Расчет по нескольким различным наборам спектров (при различных составах подвижных фаз) показал, что минимуму функции $\mathbf{F}(g)$ соответствует β , равный 1.005 ± 0.002 .

Соотношение коэффициентов экстинкции для ТАГ с пуниковой и α -элеостеариновой кислотами находили подобным же методом. Для этого использовали хроматограмму масла семян граната (Рис. 3.33), на которой первый пик соответствует трипуникату, Пу₃, а второй пик – смешанному ТАГ: Пу₂($\alpha\text{Э}$). Вместе со спектрами этих соединений использовали спектр пика $(\alpha\text{Э})_2\text{С}$ из хроматограммы масла момордики (Рис. 3.44). Только в данном случае расчетные формулы несколько изменены с учетом числа радикалов кислот: нормированный спектр Пу₃, $\mathbf{F}_{\text{Пу}_3}(\lambda)$, умноженный на два, складывали с нормированным спектром $(\alpha\text{Э})_2\text{С}$, $\mathbf{F}_{(\alpha\text{Э})_2\text{С}}(\lambda)$, с корректирующим коэффициентом g ; после нормировки мы должны получить спектр, который должен совпасть с нормированным экспериментально полученным спектром Пу₂($\alpha\text{Э}$).

Необходимое при этом для нормировки положение максимума абсорбции, (λ_{max}) , также определяли по экспериментальному спектру $\mathbf{F}_{\text{Пу}_2(\alpha\text{Э})}(\lambda)$:

$$\mathbf{F}_{\text{Пу}_2(\alpha\text{Э})}(\lambda) \equiv [2\mathbf{F}_{\text{Пу}_3}(\lambda) + g_2 \cdot \mathbf{F}_{(\alpha\text{Э})_2\text{С}}(\lambda)] / [2\mathbf{F}_{\text{Пу}_3}(\lambda_{\text{max}}) + g_2 \cdot \mathbf{F}_{(\alpha\text{Э})_2\text{С}}(\lambda_{\text{max}})] \quad (3.5)$$

Коэффициент g_2 подбирали по наименьшему суммарному среднеквадратичному отклонению между абсорбцией в расчетных и экспериментальных спектрах, в котором суммирование проводили по всем длинам волн:

$$\mathbf{F}(g_2) = \Sigma [\mathbf{F}_{\text{Пу}_2(\alpha\text{Э})}(\lambda) - \mathbf{F}_{\text{Пу}_2(\alpha\text{Э})}(\lambda)]^2. \quad (3.6)$$

В данном случае получено неожиданно относительно большое значение параметра g_2 (1.15 ± 0.05).

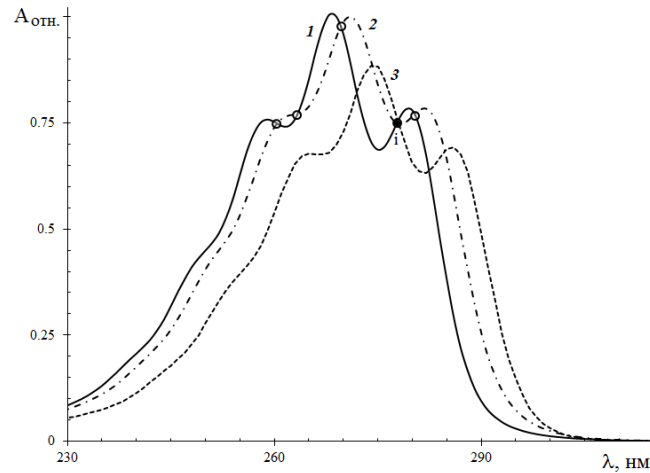


Рис. 3.44. Сопоставление спектров ТАГ, содержащих радикалы α -(2) и β -(1) элеостеариновых и пуниковой (3) кислот с поправочными коэффициентами

Затем на одном графике построили нормированный спектр ТАГ с радикалами только α -элеостеариновой кислоты и спектр ТАГ с радикалами только β -элеостеариновой кислоты, но с найденным ранее коэффициентом g_1 . К спектрам добавили спектр ТАГ с радикалами только пуниковой кислоты, с полученным коэффициентом g_2 . В таком случае на рисунке можно обнаружить точки, эквивалентные изобестическим (Рис. 3.44). Так была обнаружена универсальная длина волны (278 нм), пригодная для анализа масел с любыми комбинациями радикалов известных изомерных сопряженных октадекатриеновых кислот для прямых расчетов по площадям пиков без введения поправочных коэффициентов.

По аналогии с приведенным выше примером при одновременном присутствии в масле радикалов сопряженной октадекадиеновой и сопряженной октадекадиеновой кислот, также можно обнаружить изобестическую точку, в которой абсорбции обоих типов радикалов одинаковы. Благодаря наличию трех типов ТАГ, различающихся тем, что в одном имеется в составе только радикал сопряженной диеновой кислоты, в другом – только радикал триеновой кислоты, и существованию ТАГ, содержащий оба таких радикала с точным соотношением 1:1, возможно применение предложенного выше алгоритма. Если взять нормированный спектр компонента календат-дилинолеат (КлЛ₂) и нормированный спектр компонента ди-10Е,12Е-октадекадиеноат-линолеат (Д₂Л) и построить сумму этих спектров с корректирующим коэффициентом g , то после нормировки должен получиться спектр, совпадающий с нормированным экспериментальным спектром смешанного ТАГ календат-10Е,12Е-октадекадиеноат – линолеат (КлДЛ) (Рис. 3.45).

$$F_{\text{Кл}_\text{Д}(\text{теор.})}(\lambda) \equiv \frac{F_{\text{Кл}}(\lambda) + g_3 * F_{\text{Д}}(\lambda)}{F_{\text{Кл}}(\lambda_{\text{max}}) + g_3 * F_{\text{Д}}(\lambda_{\text{max}})} \equiv F_{\text{Кл}_\text{Д}(\text{экпер.})}(\lambda) \quad (3.7)$$

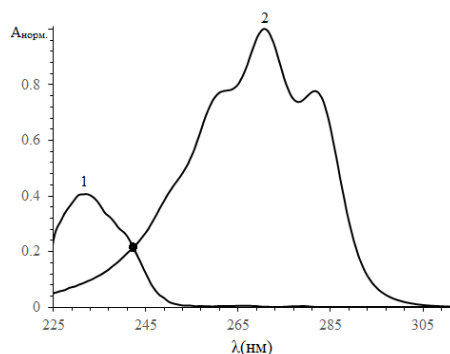


Рис. 3.45. Сопоставление спектров ТАГ, содержащих радикалы 10Е,12Е-октадекадиеновой (1) и календовой (3) кислот с поправочными коэффициентами g_3

Коэффициент g_3 определен по наименьшему среднеквадратичному отклонению между расчетным и экспериментальным спектрами $F(g)$, в котором суммирование проводили по всем длинам волн ($g_3 = 0.406 \pm 0.005$).

Аналогично для откадекатетраеновых кислот благодаря наличию трех типов ТАГ, различающихся тем, что один ТАГ имеет в составе радикалы только α -паринаровой, другой – только β -паринаровой кислоты, а третий - смесь α - и β -паринаровой кислот с точным соотношением 1:1, был найден поправочный коэффициент, и положение изобестической точки (Рис. 3.46).

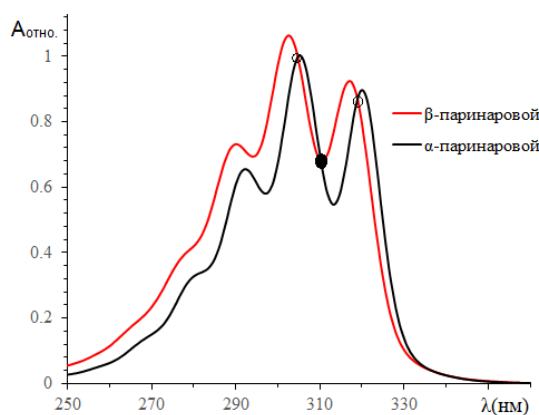


Рис. 3.46. Сопоставление спектров ТАГ, содержащих радикалы α -паринаровой и β -паринаровой кислот с поправочными коэффициентами

Соотношение коэффициентов экстинкции для α и β -паринаровых радикалов определено $g_4 = 1.065 \pm 0.004$ и изобестические точки находятся при 306, 310 и 319 нм.

3.6. Разделение жирных кислот, содержащих сопряженные двойные связи

В работе были изучены закономерности разделения изомеров сопряженных октадекатриеновых кислот на ОФ ВЭЖХ. Показано, что в порядке удерживания этих кислот сохраняются закономерности, найденные при разделении соответствующих ТАГ (Рис. 3.47 – Рис.3.49).

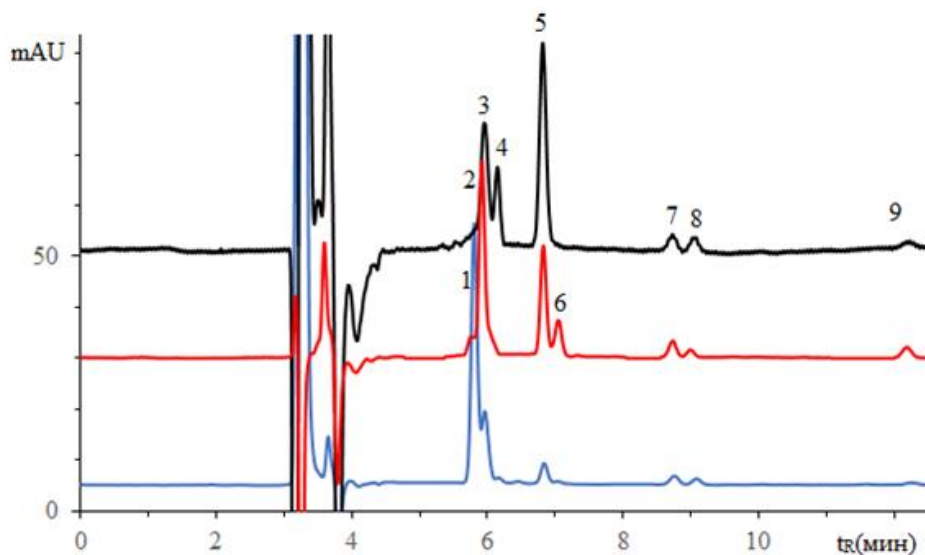


Рис. 3.47. Разделение жирных кислот масел семян граната, катальпы и кендрантуса (снизу вверх). Кислоты: 1 – Пу, 2 – Кт, 3 – α -Э, 4 – β -Э, 5 – Л, 6 – У, 7 – О, 8 – П, 9 – С. Условия: РФ детектор, ПФ: 80% ацетонитрила, 20% ацетона и 1% уксусная кислота, 0.8 мл/мин.

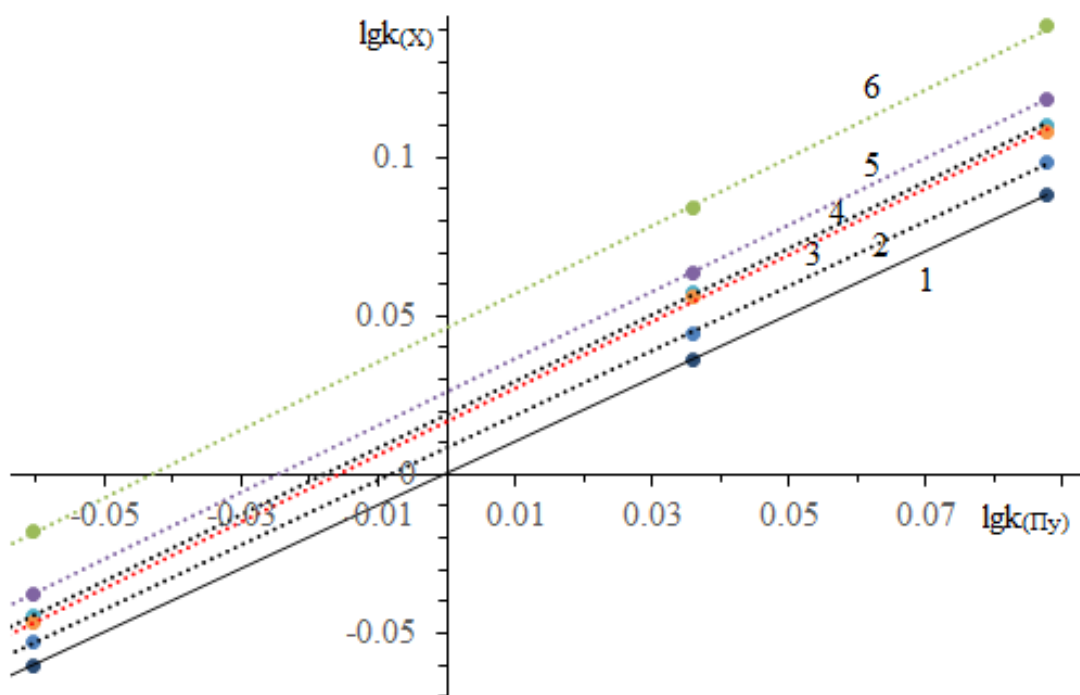


Рис. 3.48. Карта разделения сопряженных октадекатриеновых жирных кислот 1 – Пу, 2 – Ж, 3 – Кт, 4 – α Э, 5 – Кл, 6 – β Э.

На карте разделения для каждого компонента прямая линия практически параллельна друг другу. Это говорит о том, что порядок удерживание компонентов не зависит от состав подвижной фазы и определяется стационарной фазой.

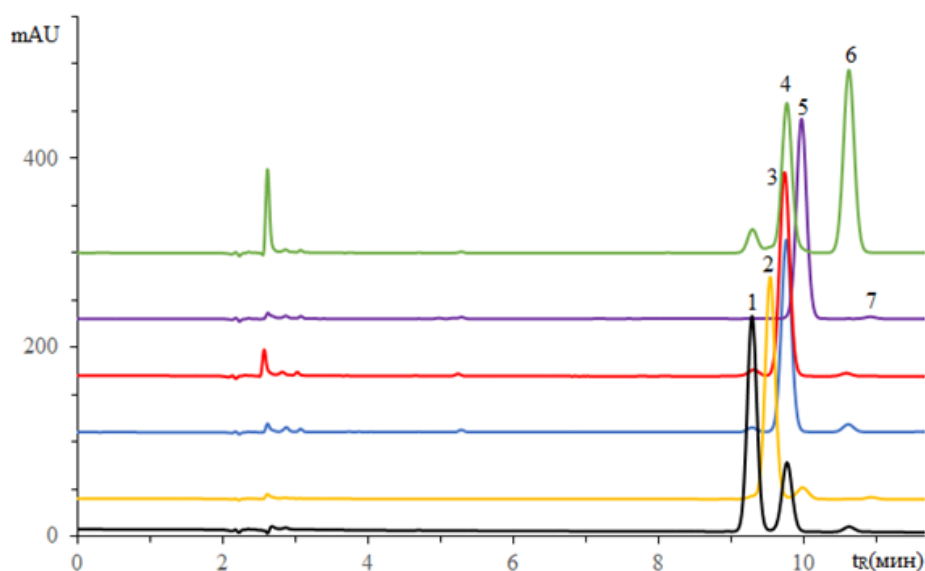


Рис 3.49. Разделение сопряженных октадекатриеновых кислот гидролизатов масел (снизу вверх) граната, жакаранды, моморддики, катальпы, календулы, кентрантуса. Кислоты: 1 – Пу, 2 – Ж, 3 – Кт, 4 – α Э, 5 – Кл, 6 – β Э, 7 – β Кл.

Условия: ПФ: 90% ацетонитрила, 10% H_2O и 1% уксусной кислоты, колонка: Kromsil C18. Детектор спектрофотометрический, 270 нм.

Нами было исследовано разделение изомерных жирных кислот на «полимерной» колонке С30. Однако, полученные результаты показали лишь то, что на этой стационарной фазе хорошо разделяются α - и β -элеостеариновые кислоты, а разделения остальных изомеров добиться практически не удается.

Наконец, в работе исследована возможность разделения изомеров октадекатриеновых кислот в методе «серебряной» хроматографии - как специфического для разделения полиеновых соединений метода - на ионообменных колонках в Ag^+ -форме.

Состав подвижной фазы был выбран с учетом механизма удерживания непредельных кислот на серебряной колонке. В соответствии с литературными данными [115, 225 – 227] существует два типа адсорбции на поверхности неподвижной фазы: двойных связей соединений на ионах Ag^+ и на поверхностных силанольных группах - в случае химически модифицированных силикагелей, и два типа сорбционно активных функциональных групп жирных кислот – двойных связей и карбоксильных групп. Понятно, что в этом случае существует, по меньшей мере, четыре типа возможных адсорбционных взаимодействий между ними.

Для подавления неспецифического для разделения взаимодействия карбоксильной группы с остаточными силанольными группами в подвижную фазу включают кислоты, например, уксусную. В случае химически модифицированных полимерных матриц этот

вариант взаимодействия отсутствует, но возможно образование водородных связей с атомами кислорода карбонильной группы в Ag^+ -форме.

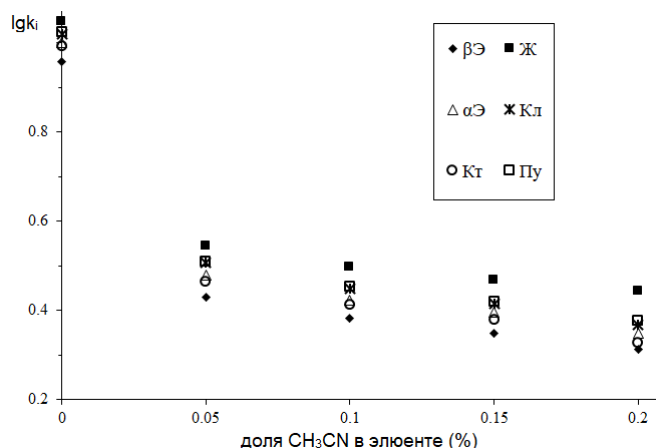


Рис. 3.50. Зависимость удерживания октадекатриеновых сопряженных кислот от содержания ацетонитрила в подвижной фазе (1.5% CH_3COOH в гексане) в Ag^+ - ВЭЖХ

Предполагается, что ацетонитрил должен составлять конкуренцию кислотам за счет образования π -комплексов с ионом Ag^+ . Экспериментально было установлено, что наиболее сильно концентрация ацетонитрила сказывается на удерживании кислот при введении ацетонитрила от 0 до 0.05 об.% к гексану, содержащему 1.5 об.% уксусной кислоты (Рис. 3.50).

Влияние уксусной кислот на разделение кислот оказалось наиболее значительным, - сильно уменьшается при росте концентрации кислоты, но селективность разделения кисло практически не изменяется (Рис. 3.51).

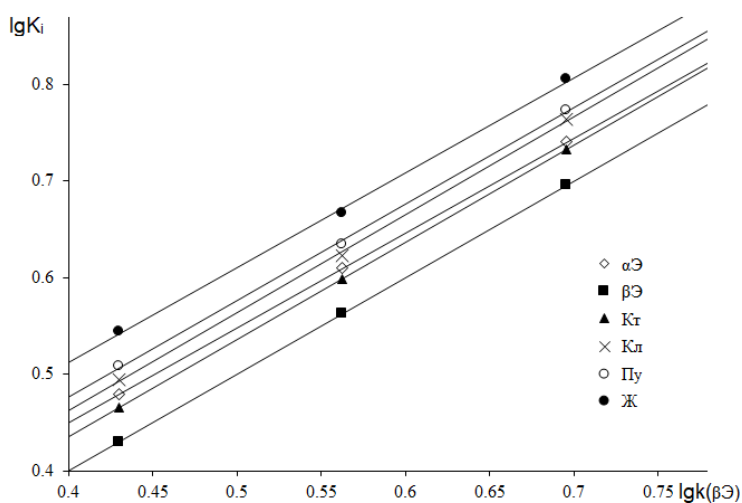


Рис. 3.51. Карта разделения октадекатриеновых сопряженных кислот в Ag^+ - ВЭЖХ; элюент уксусная кислота (от 0.5% до 2%) в элюенте (0.05% ацетонитрила и гексане)

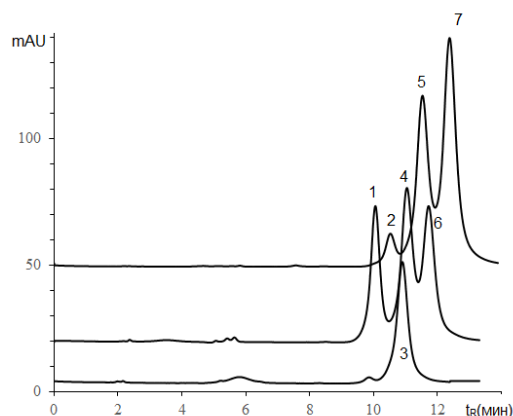
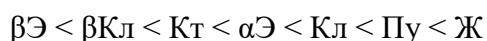


Рис. 3.52. Хроматограммы октадекатриеновых сопряженных кислот в условиях Ag^+ -ВЭЖХ. Подвижная фаза: 1% уксусной кислоты и 0.03% ацетонитрила в гексане.

Кислоты: 1 – $\beta\text{Э}$, 2 – $\beta\text{Кл}$, 3 – Кт , 4 – $\alpha\text{Э}$, 5 – Кл , 6 – Пу , 7 – Ж .

При этом порядок элюирования сопряженных октадекатриеновых кислот на Ag^+ -ВЭЖХ составляет:



Т.е. в данном случае удерживание усиливается для *цис*-изомеров в сравнении с *транс*-аналогами. Полученные результаты показывают, что по сравнению с обращенно-фазовой хроматографией изменяется порядок элюирования сопряженных кислот, хотя улучшения разделения не достигнуто (Рис. 3.52).

3.7. Исследование комплексов включения липидов

3.7.1. Комплексы включения мочевины с жирными кислотами

Для увеличения пищевой ценности продуктов переработки растительных масел при их переводе в набор жирных кислот оправданной становится обогащение кислот ценными сопряженными кислотами за счет отделения обычных насыщенных кислот, всегда присутствующих в гидролизате. При этом принципиально важны методы фракционирования с использованием приемов «зеленой химии», в том числе получение комплексов включения с жирными кислотами мочевиной.

При получении комплексов включения жирных кислот с мочевиной для фракционирования жирных кислот наиболее важным переменным, влияющим на степень кристаллизации, является соотношение мочевины/жирные кислоты. Мы исследовали способность фракционирования смеси жирных кислот (36.7 моль % пуниковая, 9.1 % линолевая, 21.9 % олеиновая, 23.5 % пальмитиновая и 8.9 % стеариновая) с различным количеством мочевины. При этом масса жирных кислот поддерживалась постоянной на уровне 110 ± 1 мг (≈ 0.4 ммоль), но масса мочевины варьировалась (от 2 ммоль до 25

ммоль). Комплексы были выкристаллизованы при -20°C в течение 12 часов. Концентрация мочевины в спирте (1:15 по массе) была выбрана на основе ее растворимости в этаноле. Результаты определения жирных кислот в твердой фазе и в фильтрате представлены в таблице 3.37.

В таблице 3.37 приведены составы жирных кислот фильтратов и комплексов для ряда экспериментов. Результаты фракционирования отражают ожидаемые тенденции в фильтратах, в том числе значительное снижение содержания насыщенных кислот (стеариновой и пальмитиновой) и увеличение относительной доли полиненасыщенных жирных кислот (линолевой и пуниковой). Количество насыщенных кислот в комплексе в 1.5 – 3 раза больше, чем в исходных растворах, и в 5 – 30 раз больше, чем в образцах фильтрата. Как и ожидалось, для серии насыщенных (C16:0 и C18:0) жирных кислот комплексообразование усиливается с ростом длины цепи. Таким образом, комплексообразование кислот с мочевиной (образование «тубулатоклатратов») значительно снижало содержание насыщенных кислот в их смеси в растворах.

При увеличении соотношения мочевины/жирные кислоты выход насыщенных жирных кислот в фильтрате уменьшается, а выход насыщенных кислот в комплексе увеличивается. Суммарный выход (в фильтрате и комплексной форме) для всех случаев составляет более 95 % (т.е. потери кислот в методе не выше 5%).

Таблица 3.37.

Состав ЖК (% мол.) в фильтрате (р-р) и в осадка (О-к) комплекса как функции соотношения ЖК и мочевины

	Исход.	Масса мочевины (мг) ^a									
		121.5		363.2		726.6		968.1		1500.3	
		Р-р	О-к	Р-р	О-к	Р-р	О-к	Р-р	О-к	Р-р	О-к
Пу ^b	36.7 (± 0.2)	50.1 (± 0.8)	0.6 (±0.1)	47.9	9.5	41.2	6.4	48.0 (±0.7)	22.6 (±0.5)	49.5	35.6
Л	9.1 (± 0.1)	13.3 (± 0.4)	1.7 (±0.3)	13.1	1.6	10.8	1.0	12.3 (±0.4)	4.4 (±0.2)	14.2	8.4
О	21.9 (± 0.1)	29.0 (± 0.5)	3.9 (±0.3)	27.9	6.8	23.6	10.0	23.9 (±0.3)	19.3 (±0.4)	21.7	21.7
П	23.5 (± 0.2)	6.7 (± 0.3)	64.3 (±0.9)	9.3	57.5	18.6	54.0	12.0 (±0.2)	38.1 (±0.8)	12.6	24.4
С	8.9 (± 0.2)	1.0 (± 0.4)	29.5 (±0.8)	1.8	24.6	5.8	28.7	3.7 (±0.2)	15.5 (±0.2)	1.9	9.9
Н%	100	84.9 (± 1.5)	11.3 (±0.9)	81.2	15.8	78.9	18.2	54.2 (±0.7)	42.1 (±0.5)	37.4	59.2

^a Мочевина: этанол = 1:15 (по массе) и масса ЖК = 110 мг, ^b пуниковая кислота была получена из масла семян граната; Н% - суммарный выход.

Склонность к образованию комплексов включения ненасыщенными кислотами зависит от стереохимии двойной связи в них. Благодаря наличию одновременно двух радикалов α - и β -элеостеариновых кислот в масле кентрантуса мы использовали их смесь для исследования селективности комплексообразования мочевины с различными конфигурациями жирных кислот.

Результаты представлены в таблице 3.38. Кроме уменьшения количества насыщенных кислот в фильтрате, молярная доля α -элеостеариновой кислоты в фильтрате в 1.2 раз более чем в исходном образце, а и доля β -элеостеариновой кислоты, наоборот, - в 1.5 раз меньше, т.е. существует селективность в процессе комплексообразования изомеров кислот с мочевиной. Однако эта селективность фракционирования является относительно более низкой по сравнению с зависимостью степени фракционирования от длины углеродной цепи.

В работе были исследованы изменения во фракционировании кислот в несколько этапном процессе. Для этого на первом этапе к раствору 97.5 мг жирных кислот в 20 мл этанола, полученных гидролизом масла кентрантуса, добавили 0.15 г мочевины. При охлаждении произошло первое фракционирование. На втором этапе к оставшимся 67.9 мг кислот в фильтрате от первой стадии, также растворенным в 20 мл этанола, также добавили 0.15 г мочевины; и процесс был повторен 3 раза. Полученные результаты представлены в таблице 3.38.

В целом в выбранных условиях в комплекс переходит примерно треть содержащихся в растворе кислот. При этом селективность их связывания в комплекс не одинакова, хотя полного удаления, или полного отсутствия склонности к комплексообразованию не обнаружено. Вначале в маточном растворе возрастает доля α -элеостеариновой кислоты, но еще в большей степени – линолевой кислоты. При этом доля насыщенных кислот уменьшается наиболее значительно. Это свидетельствует о том, что стерические ограничения (по размеру полости и размеру сечения радикалов кислот) играют определяющую роль. Неизменность доли олеиновой кислоты может указывать на то, что ω -9 кислота имеет достаточное количество метиленовых групп на конце алкенильного радикала для образования комплекса включения, что подтверждается выводами, полученными в работе [228]. Более того, для линолевой (ω -6) кислоты число таких групп меньше на 3, что приводит к наихудшей способности к комплексообразованию. Если олеиновая (и другие кислоты) могут образовывать комплекс

вхождением только части молекулы кислоты в комплекс, то остающаяся часть кислоты может быть причиной вовлечения в осадок других кислот, не образующих или образующих менее устойчивые комплексы включения.

Таблица 3.38.

Состав ЖК (% мол.) в фильтрате (Р-р), и в комплексе (О-к) на различных стадиях фракционирования

	Исход.	0.15 г мочевины в 20 мл этанола*					
		1-ая стадия		2-ая стадия		3-ая стадия	
		Р-р	О-к	Р-р	О-к	Р-р	О-к
αЭ	23.0 (±0.2)	28.1 (±0.3)	14.1 (±0.3)	26.9	14.5	25.6	31.9
βЭ	37.2 (±0.4)	25.4 (±0.4)	60.4 (±0.6)	26.5	31.7	8.9	27.9
Л	30.7 (±0.3)	40.1 (±0.2)	7.3 (±0.2)	40.8	18.8	63.7	31.8
О	3.9 (±0.1)	3.8 (±0.1)	4.9 (±0.2)	3.7	10.4	1.8	4.2
П	3.1 (±0.2)	1.7 (±0.1)	7.4 (±0.2)	1.7	14.3	<0.5	2.6
С	2.1 (±0.1)	1.0 (±0.1)	5.8 (±0.1)	0.5	10.3	<0.5	1.5
Н%	100	69.6 (±0.5)	26.4 (±0.2)	71.9	23.5	72.7	24.9

* масса ЖК = 0.0975г; при -20°C; Н% - суммарный выход.

Комплексы включения образующиеся при кристаллизации при температуре -20°C в течении 12 часов, при охлаждении смеси до +2°C за то же время выдержки не образовывались вообще. Это говорит о том, что работа по отделению комплекса от маточного раствора должна проводиться возможно более быстро для исключения разложения комплекса при нагревании при комнатной температуре.

Полученные результаты могут быть представлены в виде диаграмм (Рис. 3.53).

Из представленных данных видно, что во всех этапах фракционирования способность к образованию комплекса включения жирных кислот с мочевиной уменьшается порядке:

стеариновая > пальмитиновая > β-элеостеариновая > олеиновая > α-элеостеариновая > линолевая.

Таким образом, *транс*-изомеры образуют более стабильные комплексы, чем соответствующие *цис*-изомеры. Полученный результат частично согласуется с

известными данными [188]. Для объяснения найденных соотношений мы воспользовались возможностью расчета поперечных размеров кислот с использованием расчетных возможностей программы *Marvin sketch* (интерактивно, в тестовом режиме) (Табл. 3.39).

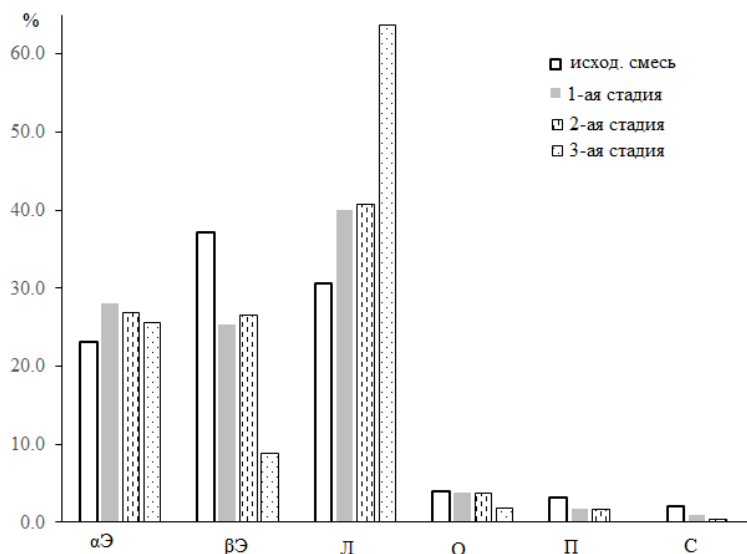


Рис. 3.53. Доля жирных кислот в фильтрате в многоэтапном фракционирования

Таблица 3.39.

Критические размеры проекций кислот

Кислота	Минимальный радиус проекции кислоты ^a (Å°)	Молекулярная «ширина», нм [228]
Пальмитиновая	3.26	0.372
Стеариновая	3.26	-
Олеиновая	3.51	0.516
Линолевая	3.91	0.766
α-элеостеариновая	3.58	-
β-элеостеариновая	3.50	-

^a рассчитанный программой *Marvin sketch*

В таблице представлены минимальные радиусы проекции кислот, рассчитанные в ПО *Marvin Sketch* (*ChemAxon*) для молекул в «вытянутой» конформации; для сравнения приводятся результаты квантово-химических расчетов для оптимизированных структур в вакууме с характерным складчатым строением [228]. Но следует учесть, что склонность к образованию комплексов зависит от большого сила параметров, включая число атомов углерода, способных проникнуть внутрь полостей гексагональной структуры кристаллической мочевины. При этом полная проекция молекулы может уже и не иметь

решающего значения, а складывание радикалов [228] не имеет смысла, поскольку части молекулы кислоты уже стабилизированы дисперсионными взаимодействиями с атомами стенок тубулатоклатратов.

3.7.2. Комплексы включения липидов с циклодекстринами

3.7.2.1. Оптимизация условий комплексообразования

Выбор оптимальных условий получения комплексов включения «гость-хозяин» зависит от свойств молекул гостей и свойств молекул хозяев. В настоящей работе при получении комплексов включения высоко липофильных соединений, находящихся при нормальных условиях в жидком состоянии мы воспользовались техникой диспергирования высокоскоростным диспергатором жидкой субстанции гостя в водном растворе хозяина (циклодекстрина). Процесс проводили без нагревания с учетом высокой химической лабильности некоторых соединений. Контролировали выход комплекса в зависимости от соотношения гость / хозяин и от времени диспергирования. Получаемый комплекс включения анализировали на содержание гостя, остаток пересчитывали на содержание хозяина. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 3.40.

В вариантах 1 и 4 (Табл. 3.40) образующийся комплекс включения выпадал в осадок, который отделяли центрифугированием и лиофильно высушивали с последующим определением состава осадка. В случаях 2 и 3 получалась устойчивая суспензия, отделение комплекса из которой центрифугированием было невозможным. Поэтому в данных случаях всю смеси лиофильно высушивали, с последующим определением состава остатка.

Сопоставляя примеры 1 и 2, можно сделать вывод о том, что основной причиной выпадения осадка является склонность молекул β -циклодекстрина к агрегации, которая и приводит к относительно более низкой растворимости β -циклодекстрина по сравнению с α - и γ -циклодекстринами. Изменение внешней структуры β -циклодекстрина метилирование ОН-групп приводит к резкому увеличению растворимости несмотря на формальный рост липофильности внешней оболочки за счет метилирования ОН-групп. Отметим, что возрастание размеров полости в молекулах хозяина нивелирует пространственные характеристики молекул жирных кислот, поэтому комплексы легко образуют и элеостеариновые кислоты, как их другие изомерные сопряженные октадекатриеновые кислоты. Это приводит к возможности создания водно-диспергируемых комплексов с ценными биологически активными соединениями.

Таблица 3.40.

Параметры комплексообразования липидов с циклодекстринами

№	Комплекс	Содержание «гостя» (%)	Выход комплекса (%)	Оптимальная масса «гостя» ^a
1	Сквален – β -циклодекстрин	10.5 ± 0.2	60.1 ± 0.6	0.068 мг
2	Сквален - метил- β -циклодекстрин	30.1 ± 0.3	-	0.343 мг
3	Масло момордики кохинхинксой – β -циклодекстрин	35.0 ± 0.3	-	57.3 мг
4	Жирные кислоты – β -циклодекстрин	20.1 ± 0.2	31.5 ± 0.5	18.5 мг

^c В работе использовали постоянное количество (20 мл) 10 мМ циклодекстринов в воде.

3.7.2.2. Подтверждение комплекса включения липидов с циклодекстринами

3.7.2.2.1. ИК спектроскопия

ИК-спектрометрический анализ выполнен путем сравнения полос, соответствующих колебаниям молекул гостя и циклодекстрина с полосами колебаний образующегося комплекса. При комплексообразовании интенсивность некоторых колебаний и их частота могут изменяться или полосы могут даже исчезать. В ИК спектре β -ЦД (Рис. 11 В, Приложение) наблюдаются полосы в области $2800-3040 \text{ см}^{-1}$, характерные для С-Н валентных колебаний; деформационные колебания групп С-О-С циклического эфира в области $1025 - 1158 \text{ см}^{-1}$ ($1028, 1076, 1153 \text{ см}^{-1}$), в области $1480 - 1190 \text{ см}^{-1}$ - полосы поглощения деформационных колебаний связей С – Н и в области $3000-3400 \text{ см}^{-1}$ - полосы валентных колебаний группы ОН.

В ИК спектрах полученных комплексов сохраняются все характеристические полосы β -циклодекстрина и добавляются полосы молекул «гостей». При образовании комплекса наблюдается увеличение интенсивности полосы поглощения в области $2800-3000 \text{ см}^{-1}$ и в области $1480-1190 \text{ см}^{-1}$ полосы поглощения - С-Н-групп, расположенных во внутренней части молекулы, которая и заполняется молекулами гостей, что заметно отличает спектр комплекса от спектра β -ЦД. В случае комплекса масло – β -циклодекстрин при образовании комплекса появляются новые полосы поглощения (по сравнению ИК-спектром β -циклодекстрина), соответствующие поглощению С=О-группы сложноэфирной группировки (1724 см^{-1}). В ИК-спектре комплекса жирных кислот полоса колебаний С=О-

группы смещена до 1689.6 см^{-1} и ее интенсивность уменьшается (по сравнению со спектром жирных кислот), что указывает на ее участие в межмолекулярных взаимодействиях.

Таблица 3.41.

Характеристические частоты колебаний групп молекул гостя и хозяина

Соединение	Частота колебания, см^{-1}				
	$\delta(\text{C-H})$ $\text{CH}_2\text{-C=C}$	$\nu \text{ C=O}$	$\nu \text{ C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$	$\nu \text{ C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$	$\nu \text{ OH}$
β -ЦД	-	-	2937.5	-	3000 - 3690 3365.7 макс.
метил β -ЦД	-	-	2927.9 2839.2	-	3000 - 3690 3392.8 макс.
сквален	1444.7	-	2854.6 2914.4 2937.6	3032.0	-
Карбоксильная группа	1473.6	1714.7 1695.4	2856.6 2924.1 2945.3	3018.6	2720 - 3292 3105.4 макс.
Масло момордики	1458.2	1745.6	2854.6 2924.1 2945.3	3008.9	-
Сквален – β -циклодекстрин	1435.0	-	2864.3 2924.1	-	3000 - 3690 3383.6 макс.
Сквален – метил- β -циклодекстрин	1446.6	-	2852.7 2924.1 2947.2	3012.8	3000 - 3690 3383.1 макс.
Жирные кислоты – β -циклодекстрин	1465.9	1689.6	2848.8 2918.3 2945.3	2974.2	3000 - 3690 3365.7 макс.
Масло – β -циклодекстрин	1458.1	1745.6	2854.6 2922.1	2974.2	3000 - 3690 3360.0 макс.

3.7.2.2.2. Рентгенофазовой анализ

Образование именно комплекса включения, а не механической смеси β -циклодекстрина (β ЦД) и гостя подтверждали анализом рентгеновских дифрактограмм. В спектрах комплекса появляются новые пики, поэтому перестройка структуры при образовании комплекса очевидна. Дифрактограмма β -ЦД (Рис. 3.54, А) указывает на высокую кристалличность, из-за характерных узких интенсивных пиков для межплоскостных расстояний (041), (141), (180), (042), (162), (222), (223), и (044), которым соответствуют пики при 2θ : 12.41° , 15.28° , 17.60° , 18.68° , 26.96° , 34.7° и 39.66° .

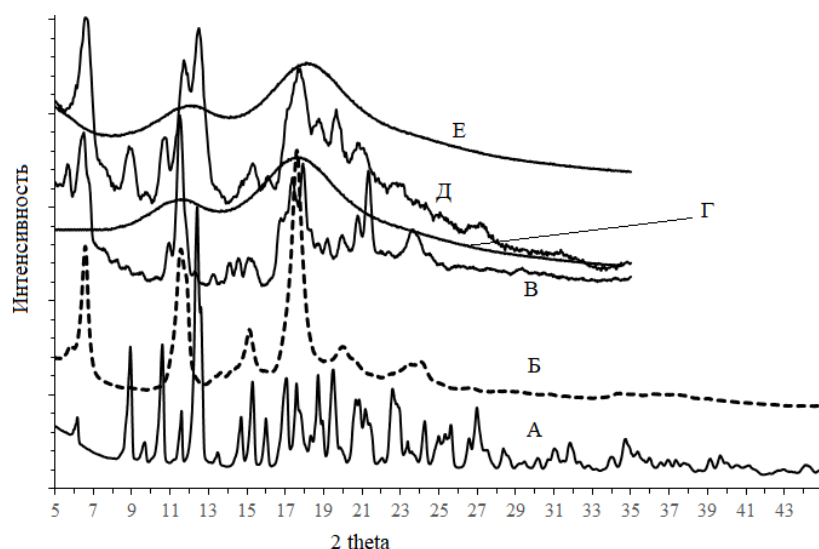


Рис. 3.54. Дифрактограмма кристаллов β -ЦД (А); метил- β -ЦД (Е), и комплексов включения: Б – сквален- β -ЦД; В – жирные кислоты- β -ЦД; Г – сквален-метил- β -ЦД и Д – масло момордики- β -ЦД.

Дифракционные картины комплексов включения существенно отличаются от таковых для β -ЦД. Включение молекулы "гостя" в полость β -ЦД приводит к появлению новых интенсивных, но размытых (вследствие некоторой аморфизации) дифракционных пиков в области 6.54° , 11.94° , 15.12° , 17.62° для комплекса «сквален – β -ЦД», (Рис. 3.54, Б); в области 5.74° , 6.52° , 11.52° , 17.42° , 17.94° , 21.36° и 23.76° для комплекса «жирные кислоты – β -ЦД» (Рис. 3.54, В); и в 6.71° , 9.0° , 10.7° , 11.7° , 12.5° , 17.8° и 19.7° для комплекса «масло – β -ЦД» (Рис. 3.54, Д). В случае комплексов включения сквалена в метил- β -циклодекстрин размытые, характерные для аморфных структур, рефлексы на дифрактограммах похожи на дифрактограмму исходного метил- β -циклодекстрина, хотя некоторое смещение полос (в диапазоне 11.74° и 17.74°) заметно – в сторону увеличения расстояний между молекулами хозяина (дифрактограммы Г и Д на рисунке 3.54). Заметны также изменения положения пиков отражения для комплекса включения масла момордики в β -ЦД (Рис. 3.54, Д), что подтверждает образование комплекса, хотя осадок в этом случае невозможно было отделить от смеси.

3.7.2.2.3. Дифференциально-термический анализ

Дифференциальный сканирующий калориметрический (ДСК) анализ и термогравиметрия (ТГ) используются для описания процессов плавления или разрушения β -ЦД и комплекса включения при нагревании. Если молекула гостя внедряется в полость β -ЦД, то этот сигнал может быть сдвинут или даже исчезнуть (Рис. 3.55 – Рис. 3.57).

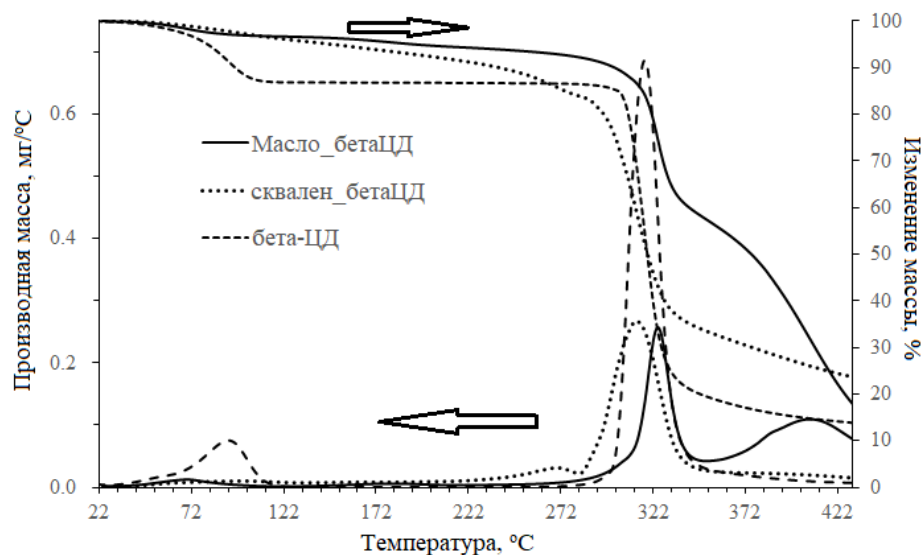


Рис. 3.55. Термогравиметрический анализа (ТГ) и дифференциальный ТГ β -ЦД и их комплексов.

На термограмме β -ЦД (Рис. 3.55) присутствует эндотермический пик при температуре 106.2°C, связанный с процессом дегидратации циклодекстрина и со снижением массы β -ЦД и характерный эндотермический пик, возникающий при температуре ~ 317°C, соответствующий температуре разложения β ЦД. Для комплекса включения «сквалена – метил- β ЦД» температура разложения (с эндотермическим эффектом) даже уменьшена (до 220 – 310°C), что может быть следствием наноразмерности комплексов, которые, как указывалось выше, невозможно выделить из смеси центрифугированием; падение массы при дальнейшем нагревании сопровождается экзотермическим эффектом и может указывать на одновременно протекающие процессы разложения циклодекстрина и окисления сквалена. Для комплекса включения масла момордики этот эффект более сложный с экзотермическими (в средней части) и эндотермическими эффектами (при более высоких температурах) интерпретация которых затруднена их комплексностью, но факт образования комплекса включения очевиден.

В случае метил- β -циклодекстрина температура разложения заметно выше, чем для β -циклодекстрина (до 337°C). Для комплекса включения сквалена в метил- β -циклодекстрин снижение массы начинается с начала нагрева, причем в диапазоне 140 – 300°C) наблюдаются слабые экзотермические эффекты (наиболее вероятно - окисление сквалена) и экзотермические – разложение циклодекстрина в наноразмерных частицах комплексов включения. Интенсивный экзотермический процесс начинается при немногим большей температуре, соответствующей температуре разложения метил- β -циклодекстрина, но на него накладывается еще один эндотермический процесс (вероятно, испарения сквалена и его продуктов окисления).

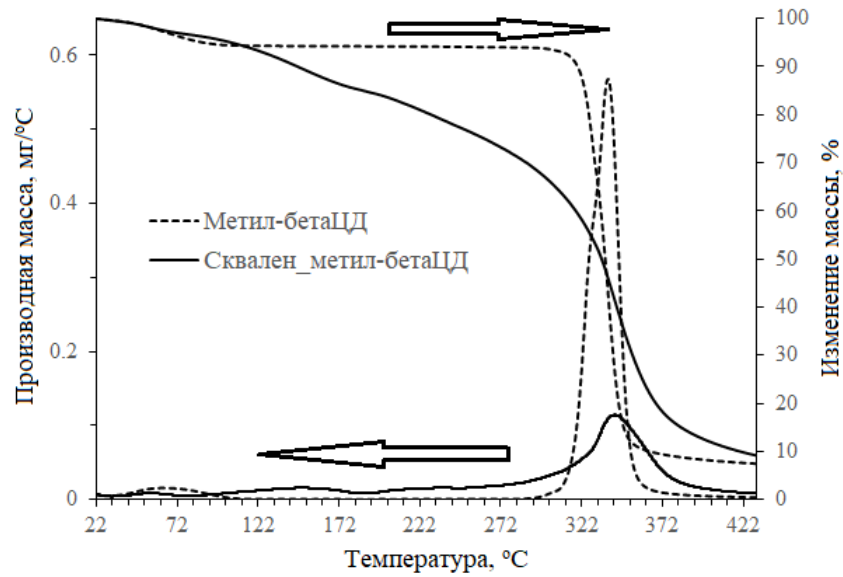


Рис. 3.56. Термогравиметрического анализа (ТГ) и производная массы от ТГ-сигнала (ДТГ) метил- β -ЦД и их комплекса с скваленом.

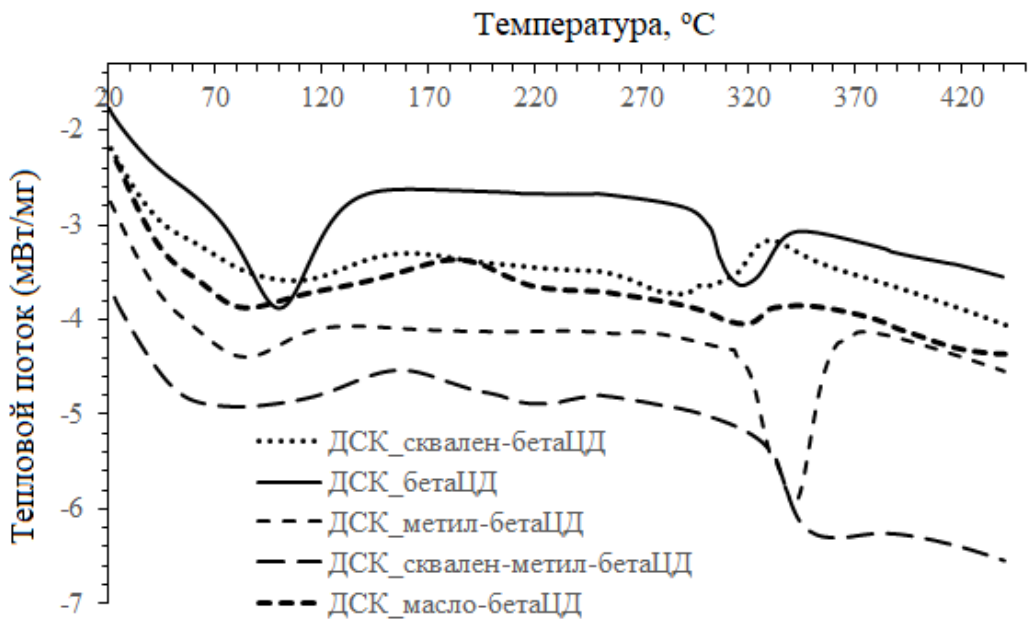


Рис. 3.57. Дифференциальная сканирующая калориметрия

3.7.2.2.4. ^1H -ЯМР анализ

Метод ^1H -ЯМР для подтверждения комплексообразования используют, сравнивая смещение резонансных сигналов в растворах в D_2O как самого циклодекстрина, так и его комплексов включения. При этом изменение в полости циклодекстрина в наибольшей степени должно сказаться на химических сдвигах протонов, ориентированных внутрь кольца - Н-3 и Н-5 (Рис. 3.58).

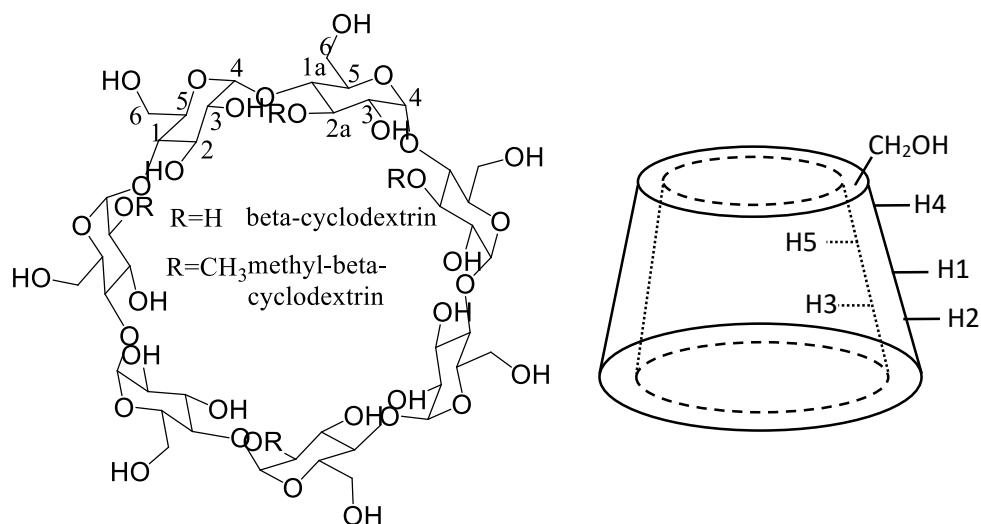


Рис. 3.58. Схематическое изображение β -ЦД и метил- β -ЦД (Crysmeb).

И действительно, химические сдвиги именно этих протонов наиболее отчетливо изменились в ^1H -ЯМР-спектре при образовании комплекса со скваленом (Рис. 3.59) и (Табл. 3.42), что подтверждает образование комплекса в растворе в D_2O и соответствует литературным данным [230].

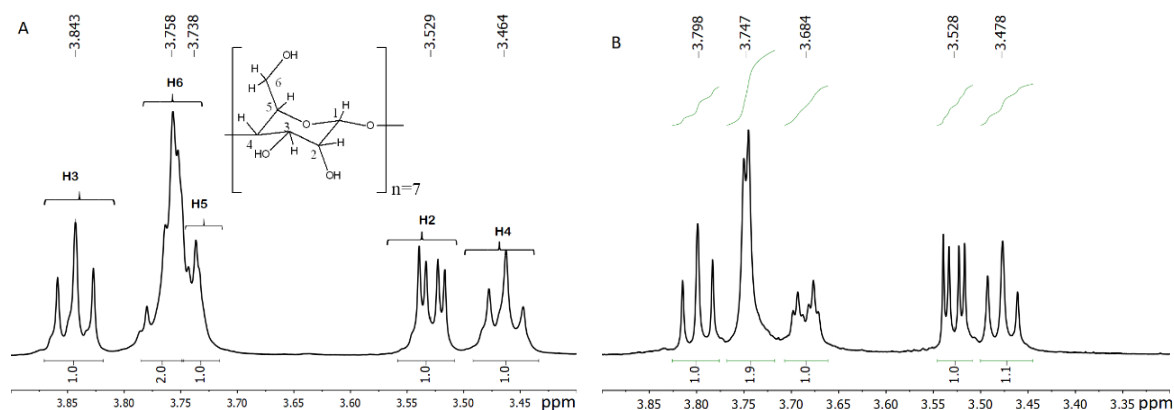


Рис. 3.59. Спектры ^1H -ЯМР 600 мГц β -ЦД (А) и комплекса включения сквалена с β -ЦД (В) в D_2O в диапазоне от 3.35 до 4.0 м.д.

Таблица 3.42.

Химические сдвиги δ (м.д.) β -ЦД, сквалена и комплекса в ^1H ЯМР

Протон	δ (β ЦД)	δ (squalene - β CD)	$\Delta\delta_1 = \delta_{\text{complex}}(\text{squalene-}\beta\text{CD}) - \delta(\beta\text{CD})$
H-1	4.949	4.944	-0.005
H-3	3.843	3.798	-0.045
H6, H6'	3.758	3.747	-0.011
H-5	3.738	3.684	-0.054
H-2	3.529	3.528	-0.001
H-4	3.464	3.478	0.014

Геометрическая структура гостя не препятствует вхождению этого фрагмента в полость β -циклодекстрина, что было подтверждено компьютерным моделированием образования комплекса в программной среде HyperChem при оптимизации геометрии комплекса методом РМЗ (Рис. 3.60).

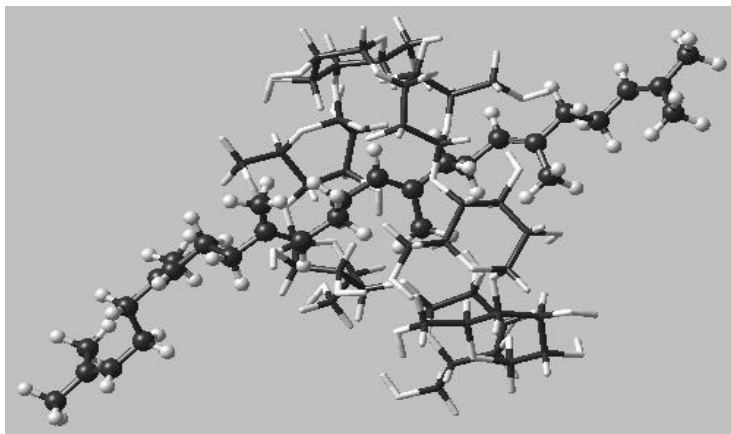


Рис. 3.60. Геометрический структур супрамолекулярных комплексов сквалена и β ЦД

3.7.2.3. Особенность свойств комплексов включения жирных кислот

Для исследования продукта комплексообразования спектрофотометрическим методом к небольшой порции осадка добавляли 10 мл воды и смесь встряхивали в течение 6 часов при 25°C для получения раствора комплекса в воде. Раствор отделяли от не растворившейся части комплекса фильтрованием через насадочный фильтр РТФЕ НР 0.45 мкм, и записывали электронные спектры поглощения полученных растворов в кварцевых кюветах (Рис. 3.61).

Как следует из представленных результатов, УФ-спектр комплекса включения « α Э- β ЦД» заметно отличается от спектра α -элеостеариновой кислоты в истинном растворе в этаноле с одной стороны и от спектра насыщенного раствора кислот в воде после отстаивания взвеси их смеси. Спектр в этаноле имеет характеристичную для сопряженных полиенов электронно-колебательную структуру (с максимумами абсорбции при 282, 271 и 263 нм), которая исчезает при комплексообразовании, но появляется две широкие полосы с гипсохромным и батохромным сдвигами (232 и 283 нм). Увеличение интенсивности абсорбции по сравнению со спектром взвеси без добавок циклодекстрина указывает на предполагавшееся повышение растворимости в воде, т.е. – на образование комплексов включения. Наконец, образование двух новых полос указывает на ассоциацию молекул α -элеостеариновой по двум типам – с образованием Н-агрегатов (с гипсохромным сдвигом) и J-агрегатов (с батохромным сдвигом).

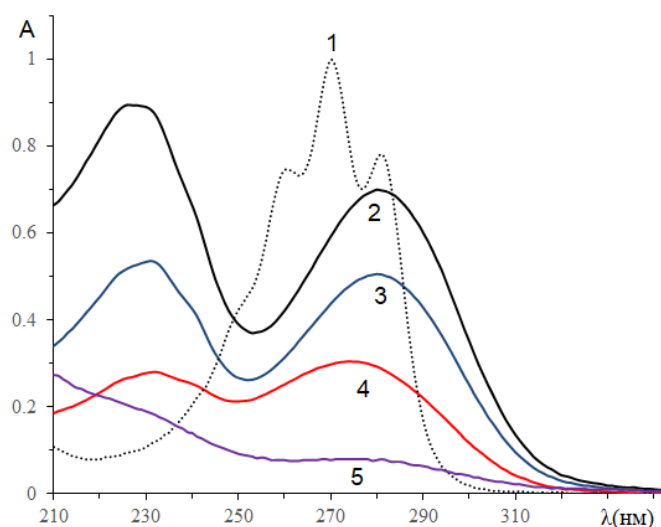


Рис. 3.61. УФ спектр поглощения: 1- α -элеостеариновой кислоты (в спирте), 2 (12 мМ), 3 (10 мМ), 4 (6 мМ), 5 (0 мМ) - комплексов α Э- β -ЦД с уменьшением содержания β -ЦД в воде (концентрация указана в скобках) при синтезе.

По модели молекулярного экситона [233] при H-ассоциации хромофоров α -элеостеариновой кислоты хромофоры располагаются параллельно друг над другом с небольшим смещением (или без смещения), что приводит к гипсохромному сдвигу полосы поглощения, а J-ассоциация (выстраивание по типу «голова к хвосту») этих же хромофоров приводит к батохромному сдвигу полос поглощения.

Для оценки возможности реализации различных вариантов ассоциации в комплексах включения в настоящей работе выполнено компьютерное моделирование при оптимизации геометрии методом MM+ в среде программы HyperChem (Рис. 3.62).

Используемые для расчета геометрии структур исходные варианты взаимной ориентации молекул создавали в программе Chem3D с последующим импортом в HyperChem. В результате моделирования установлено, что в одну полость циклодекстрина могут войти три молекулы жирной кислоты. Если использовать две молекулы кислоты и одну молекулу β ЦД, то оптимизация геометрии приводила к структурам, близким к H-ассоциатам, что хорошо согласуется с появлением широкой полосы с гипсохромным сдвигом. Поэтому для моделирования J-ассоциатов необходимо построение более сложных структур с оптимизацией геометрии непосредственно в нескольких полостях циклодекстринов.

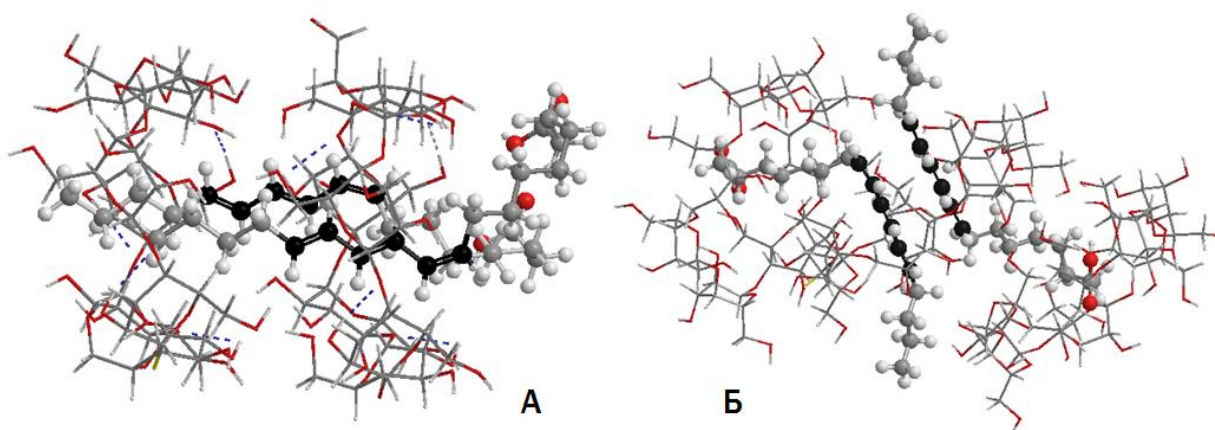


Рис. 3.62. Геометрические структуры супрамолекулярных комплексов α -Э- β -ЦД с различным отношением: А - 2:2, Б - 2:3

Стабильность α -олеостеариновой кислоты в комплексе состояния

Для исследования стабильности жирных кислот в комплексах включения полученный порошок помещали в холодильник, через заданное время 15 мг комплекса разрушали ацетоном и кислоты определяли методом ОФ ВЭЖХ. Физическая смесь (с таким же отношения жирных кислот и β ЦД) приготовлена и анализируется как образец сравнения.

Как следует из представленных на рисунке 3.63, включение α -олеостеариновой кислоты в полость циклодекстрина заметно увеличивает стабильность кислоты - через 96 часов после сушки исчезает меньше 5% кислоты. Таким образом, при образовании комплекса включения растворимость и стабильность сопряженных кислот увеличиваются.

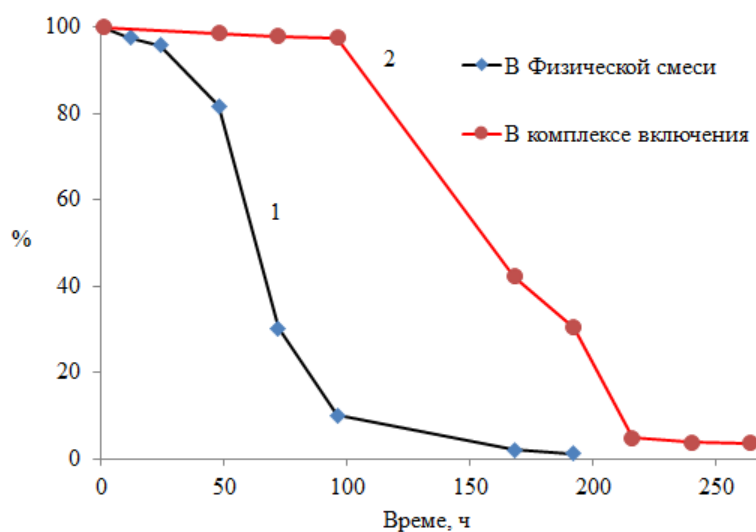


Рис. 3.63. Стабильность α -олеостеариновой в физической смеси (1) и в комплексах включения (2)

Однако результат показал, что α -олеостеариновая кислота разрушается почти полностью после 250 часов хранения. Эта нестабильность конъюгированных жирных кислот в полости циклодекстрина, по-видимому, связана с их ассоциацией, которая благоприятна для полимеризации в присутствии карбоксильных групп. Это было подтверждено значительным ростом стабильности за счет превращения кислот в соли кальция. По нашим данным, это приводит к потере α -олеостеариновой кислоты только на 10% даже после 23 дней хранения в холодильнике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Предположены методы экстракции масел из семян растений, содержащих высоко химически лабильные соединения (с сопряженными С=C-связями), *n*-гексаном при комнатной температуре и очистки с использованием твердофазной экстракции масел на патронах, заполненных силикагелем с обязательным контролем силикагеля на каталитическую активность. Полученные масла характеризуются гомогенностью и хорошей устойчивостью при хранении.

2. Разработан способ определения видового состава ТАГ, содержащих радикалы кислот с сопряженными двойными связями в растительных маслах в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ в элюентах системы «ацетонитрил – 2-пропанол», обеспечивающий достаточную для дифференциации изомерных октадекатриеновых кислот и их производных селективность и стабильность. Для объяснения селективности разделения предложена модель строения «мономерной» С18-стационарной фазы.

3. Разработан способ разделения проблемных пиков ТАГ с использованием программы MagicPlot, позволяющий определять состава ТАГ в условиях микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

4. Разработан способ количественного анализа видового состава ТАГ с радикалами изомерных сопряженных кислот с использованием детектирования при длине волны, соответствующей аналогичной изобестической точке с универсальной длиной волны, и разработан метод ее определения. Для изомерных октадекатриеновых кислот найдена аналитическая длина волны ($\lambda_{\max}=278$ нм). Для масел, содержащих сопряженные радикалы и октадекадиеновой и октадекатриеновой кислот – изобестическая точка находится при 243 нм, а для тетраеновых (α и β -паринаровой) – при 310 нм.

5. Разработан метод обогащения продуктов омыления масел жирными кислотами с сопряженными двойными связями за счет образования тубулатоклатратов мочевины. Получены и изучены супрамолекулярные комплексы сквалена, масел и жирных кислот с β -циклодекстрином и метил- β -циклодекстрином. Для контроля указанных процессов разработано соответствующее аналитическое сопровождение (ИК, УФ и ЯМР спектроскопии и др.), которое включает обращенно-фазовую ВЭЖХ и хроматографию на Ag+-фазе.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

β -ЦД – бета-циклодекстрин

Me- β -ЦД – метил-бета-циклодекстрин

СЖК – сопряженная жирная кислота

СОК – сопряженная октадекатриеновая кислота

ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная хроматография

ПФ – подвижная фаза

НФ – стационарная фаза

ТСХ – тонкослойная хроматография

ВЖК – высшие жирные кислоты

УФД – спектрофотометрический детектор

РФД – рефрактометрический детектор

ИПС – изопропиловый спирт

АЦН – ацетонитрил

АЦЕ – ацетон

ТАГ – триацилглицерин

ЕСN - эквивалентные углеродные числа

ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Valenzuela R. Overview About Lipid Structure / R. Valenzuela, A. Valenzuela // *Lipid Metabolism*. – 2013. - P. 3 – 20.
- [2] Lobb K. Fatty Acids in Foods and Their Health Implications / K. Lobb, C. K. Chow // *Food Science and Technology*. Ed. C. K. Chow - University of Kentucky Lexington. – 2000. – P. 1 – 17.
- [3] Laposata M. Fatty Acids: Biochemistry to Clinical Significance / M. Laposata // *American Journal of Clinical Pathology*. – 1995. - V. 104. - №. 2. – P. 172 – 179.
- [4] Smith C. R. Occurrence of unusual fatty acids in plants / C. R. Smith // *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*. - 1971. - V. 11. - P. 137 – 177.
- [5] Hennessy A. A. Sources and Bioactive Properties of Conjugated Dietary Fatty Acids / A. A. Hennessy, P. R. Ross, G. F. Fitzgerald, C. Stanton // *Lipids*. – 2016. – V. 51. - №. 4. - P. 377 –397, 2016.
- [6] Solodovnik V. D. Chemistry of natural aliphatic acids containing a conjugated system of double bonds / V. D. Solodovnik // *Russian Chemical Reviews*. – 1967. - V. 36. - №.10. – P. 1188 – 230.
- [7] Benjamin S. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits / S. Benjamin and F. Spener // *Nutrition & Metabolism*, - V. 6, - №, 1, - P. 36–49, 2009.
- [8] Hopkins. C. Y. A survey of the conjugated fatty acids of seed oils / C. Y. Hopkins, M. J. Chisholm // *Journal of the American Oil Chemists' Society* – 1968. V. 45. - №. 3. – P. 176 – 182.
- [9] Takagi T. Occurrence of mixtures of geometrical isomers of conjugated octadecatrienoic acids in some seed oils: Analysis by open-tubular gas liquid chromatography and high performance liquid chromatography / T. Takagi, Y. Itabashi // *Lipids* – 1981. V. 16. - №. 7. – P. 546 – 551.
- [10] Crombie L. The Biosynthesis of Calendic Acid, Octadeca-(8E,10E, 12Z)-trienoic Acid, by Developing Marigold Seeds: Origins of (E,E,Z) and (Z,E,Z) Conjugated Triene Acids in Higher Plants / L. Crombie, S. J. Holloway // *J. Chem. Soc. Perkin Trans* – 1985. - V.1. - №. 3. - P. 2425 –2434.
- [11] Hopkins C. Y. Isolation of a Natural Isomer of Linoleic Acid from a Seed Oil / C. Y. Hopkins, M. J. Chisholm // *The Journal Of The American Oil Chemists' Society* – 1962. - №.7592. – P. 42 – 44.
- [12] Badami R. C. The Oxygenated Fatty Acid of Calendula Seed Oil / R. C. Badami, L. I. Morris, B. College, W. London // *The Journal Of The American Oil Chemists' Society* – 1965. - V.42. - №. 12. – P. 1119–1121.

- [13] Shahidi F. *Nutraceutical and Specialty Lipids and their Co-Products* / Ed. F. Shahidi. CRC Press. 2006.
- [14] Badami R.C. Structure and occurrence of unusual fatty acids in minor seed oils / R.C. Badami, K.B. Patil // *Prog. Lipid Res.* – 1981. -V. 19. – P. 119–153.
- [15] Minquan H. A C18 conjugated tetraenoic acid from *Ixora chinensis* seed oil / H. Minquan // *Phytochemistry* -1990. – V. 29. - №. 4. – P. 1317 – 1319.
- [16] Gaullier J.-M. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans / J.M. Gaullier, J. Halse, K. Høye [et al.] // *The American Journal of Clinical Nutrition.* - 2004. - V. 79. - №.6. – P. 1118 – 1125.
- [17] Kim N. D. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer / N. D. Kim, R. Mehta, W. Yu [et al.] // *Breast cancer research and treatment.* – 2002. -V. 71. - №. 3. – P. 203 – 217.
- [18] Albrecht M. Pomegranate Extracts Potently Suppress Proliferation, Xenograft Growth, and Invasion of Human Prostate Cancer Cells / M. Albrecht, W. Jiang, J. Kumi-Diaka [et al.] // *Journal of Medicinal Food* - 2004. - V. 7. - №. 3. - P. 274 – 283.
- [19] Shinohara N. Jacaric acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, has a strong antitumor effect in vitro and in vivo / N. Shinohara, T. Tsuduki, J. Ito. [et al.] // *J Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* – 2012. – V. 1821. - №. 7. – P. 980 – 988.
- [20] Arao K. Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 9cis, 11trans, 13cis conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese, hyperlipidemic OLETF rats / K. Arao, Y. M. Wang, N. Inoue [et al.] // *Lipids in health and disease* – 2004. - V. 3. - P. 24.
- [21] Roche H. M. Conjugated linoleic acid: a novel therapeutic nutrient / H. M. Roche, E. Noone, A. N. Gibney // *Nutrition research reviews* – 2001. – V. 14. - №. 1. – P. 173 – 188.
- [22] Rudel L. L. Atherosclerosis and conjugated linoleic acid / L. L. Rudel // *British Journal of Nutrition.* – 1999. – V. 81. - №. 3. – P. 177–179.
- [23] O’Shea M. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid / M. O’Shea, J. Bassaganya-Riera, I. C. Mohede // *The American Journal of Clinical Nutrition* – 2004. – V. 79. - №. 6. – P. 1199S -1206S.
- [24] Suzuki R. Cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on mouse tumor and human monocytic leukemia cells / R. Suzuki, R. Noguchi, T. Ota [et al.] // *Lipids* – 2001. – V. 36. - №. 5. – P. 477 – 482.
- [25] Pariza M. W. Conjugated linoleic acid and the control of cancer and obesity / M. W. Pariza, Y. Park, M. E. Cook // *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* – 1999. – V. 52. - №. 2. – P. 107–110.

- [26] Kohno H. Dietary seed oil rich in conjugated linolenic acid from bitter melon inhibits azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis through elevation of colonic PPAR γ expression and alteration of lipid composition / H. Kohno, Y. Yasui, R. Suzuki [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2004. - V. 110. - №. 6. – P. 896 – 901.
- [27] Igarashi M. Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on cultured human tumor cells / M. Igarashi, T. Miyazawa // *Cancer letters*. – 2000. – V. 148. - №. 2. – P. 173 –182.
- [28] Tsuzuki T. Tumor growth suppression by α -eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via lipid peroxidation / T. Tsuzuki, Y. Tokuyama, M. Igarashi, T. Miyazawa // *Carcinogenesis*. – 2004. - V. 25. - №. 8. - P. 1417–1425.
- [29] Yasui Y. Growth inhibition and apoptosis induction by all-trans-conjugated linolenic acids on human colon cancer cells / Y. Yasui, M. Hosokawa, H. Kohno [et al.] // *Anticancer research* – 2006. – V. 26. - №. 3A. – P. 1855–1860.
- [30] Tsuzuki T. α -Eleostearic Acid (9Z11E13E-18:3) Is Quickly Converted to Conjugated Linoleic Acid (9Z11E-18:2) in Rats / T. Tsuzuki, Y. Tokuyama, M. Igarashi [et al.] // *The Journal of Nutrition*. – 2004. – V. 134. - №. 10. – P. 2634 – 2639.
- [31] Yuan G.-F. Conjugated linolenic acids and their bioactivities: a review / G.-F. Yuan, X.-E. Chen, D. Li // *Food & Function*. – 2014. – V. 5. - №. 7. – P. 1360–1368.
- [32] Hedley G. A study of the mechanical and surface properties of oil paint films treated with organic solvents and water / G. Hedley, M. Odlyha, A. Burnstock [et al.] // *Journal of Thermal Analysis*. -1991. – V. 37. - №. 9. – P. 2067 – 2088.
- [33] Mooney B. P. The second green revolution? Production of plant-based biodegradable plastics / B. P. Mooney // *Biochemical Journal*. – 2009. - V. 418. - №. 2. – P. 219 – 232.
- [34] Özgül-Yücel S. Determination of conjugated linolenic acid content of selected oil seeds grown in Turkey / S. Özgül-Yücel // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 2005. – V. 82. - №. 12. – P. 893 – 897.
- [35] Matthaus B. FA and tocopherol composition of Vietnamese oilseeds / B. Matthaus, K. Vosmann, L. Q. Pham, K. Aitzetmüller // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2003. – V. 80. - №. 10. – P. 1013 – 1020.
- [36] Chang M.-K. Chinese melon (*Momordica charantia* L.) seed: Composition and potential use / M.-K. Chang, E. J. Conkerton, D. C. Chapital [et al.] // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 1996. – V. 73. - №. 2. – P. 263 – 265.
- [37] Chisholm M. J. Conjugated fatty acids in some *Cucurbitaceae* seed oils / M. J. Chisholm, C. Y. Hopkins // *Canadian Journal of Biochemistry*. – 1967. V. 45. - №. 7. – P. 1081–1086.

- [38] Gaydou E. M. Analysis of conjugated octadecatrienoic acids in *Momordica balsamina* seed oil by GLC and ^{13}C NMR Spectroscopy / E. M. Gaydou, J. Miralles, V. Rasoazanokolona // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 1987. – V. 64. - №. 7. – P. 997 – 1000.
- [39] Joh Y.-G. The structure of the triacylglycerols, containing punicic acid, in the seed oil of *Trichosanthes kirilowii* / Y.-G. Joh, S.-J. Kim, W. W. Christie // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 1995. V. 72. - №. 9. – P. 1037 – 1042.
- [40] Gowrikumar G. *Diplocyclos palmatus* L.: A new seed source of punicic acid / G. Gowrikumar, V. V. S. Mani, T. C. Rao [et al.] // Lipids. – 1981. - V. 16. - №. 7. – P. 558 – 559.
- [41] Zou C. Conjugated linolenic acids and nutraceutical components in Jiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum*) seeds / C. Zou, H. Shia, X. Liua [et al.] // LWT - Food Science and Technology. – 2016. – V. 68. – P. 111 – 118.
- [42] Tulloch A. P. Analysis of the conjugated trienoic acid containing oil from *Fevillea trilobata* by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy / A. P. Tulloch, L. Bergter // Lipids. - 1979. – V. 14. - №. 12. – P. 996 – 1002.
- [43] Дейнека В. И. Масла растений с конъюгированными жирными кислотами // В. И. Дейнека, В. Н. Сорокопудов, Л. А. Дейнека // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья. – 2005. – P. 636 – 639.
- [44] Conacher H. B. S. Glyceride studies: Part IX: Intraglyceride distribution of vernolic acid and of five conjugated octadecatrienoic acids in seed glycerides / B. S. Conacher, F. D. Gunstone, G. M. Hornby, F. B. Padley // Lipids. – 1970. – V. 5. - №. 4. - P. 434 – 441.
- [45] Tulloch A. P. ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of seed oils containing conjugated unsaturated acids / A. P. Tulloch // Lipids. 1982. - V. 17. - №. 8. - P. 544 – 550.
- [46] Chisholm M. J. Fatty Acids of *Catalpa Bignonioides* and Other *Bignoniaceae* Seed Oils / M. J. Chisholm, C. Y. Hopkins // Canadian Journal of Chemistry. - 1965. - V. 43, - №. 9. - P. 2566 – 2570.
- [47] Hopicins C. Y. Identification of conjugated triene fatty acids in certain seed oils / C. Y. Hopicins, M. J. Chisholm, C. Y. Hopkins, M. J. Chisholm // Canadian Journal of Chemistry. - 1962. - V. 40. - №. 11. - P. 2078 – 2082.
- [48] Barclay A. S. The Search for New Industrial Crops. V. The South African *Calenduleae* (*Compositae*) as a Source of New Oil Seeds / A. S. Barclay and F. R. Earle // Economic Botany. – 1965. - V. 19. Springer New York Botanical Garden Press - P. 33–43.
- [49] Chisholm M. J. Calendic acid in seed oils of the genus *Calendula* / M. J. Chisholm, C. Y. Hopkins // Canadian Journal of Biochemistry. – 1967. - V. 45, - №. 2. - P. 251 – 254.

- [50] Chisholm M. J. Conjugated fatty acids of tragopogon and calendula seed oils / M. J. Chisholm, C. Y. Hopkins // *Canadian Journal of Chemistry*. – 1960. - V. 38. - №. 12. - P. 2500 – 2507.
- [51] Spitzer V. Structure analysis of fatty acids by gas chromatography - Low resolution electron impact mass spectrometry of their 4,4-dimethyloxazoline derivatives - A review / V. Spitzer // *Progress in Lipid Research*. - 1996. - V. 35, - №. 4. - P. 387 – 408.
- [52] Sbihi H. M. Characterization of White Mahlab (*Prunus mahaleb* L.) Seed Oil: A Rich Source of α -Eleostearic Acid / H. M. Sbihi, I. A. Nehdi, S. I. Al-Resayes // *Journal of Food Science*. - 2014. - V. 79. - №. 5. - P. 795 – 801.
- [53] Comes F. Fatty acids and triacylglycerols of cherry seed oil / F. Comes, M. Farines, A. Aumelas, J. Soulier // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 1992. - V. 69. - №. 12. - P. 1224 – 1227.
- [54] Chisholm M. J, Kamolonic acid and other conjugated fatty acids in certain seed oils / M. J. Chisholm, C. Y. Hopkins // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1966. - V. 43. - №. 6. - P. 390 – 392.
- [55] Spitzer V. Occurrence of α -Eleostearic Acid in the Seed Oil of *Parinari montana* (*Chrysobalanaceae*) / V. Spitzer, F. Marx, J. G. S. Maia, [et al.] // *Fat Science Technology*. 1992. - V. 94. - №. 2. - P. 58 – 60.
- [56] Cornelius J. A. New tropical seed oils. III.—Component acids of leguminous and other seed oils (continued) / J. A. Cornelius, T. W. Hammonds, J. B. Leicester [et al.] // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1970. - V. 21. - №. 1. - P. 49 – 50.
- [57] Gunstone F. D. New tropical seed oils. Part I. conjugated trienoic and tetraenoic acids and their oxo derivatives in the seed oils of *Chrysobalanus icaco* and *Parinarium laurinum* / F. D. Gunstone, R. Subbarao // *Chemistry and Physics of Lipids*. - 1967. - V. 1. - №. 4. - P. 349 – 359.
- [58] Bagby M. O. Stereochemistry of α -parinaric acid from *Impatiens edgeworthii* seed oil / M. O. Bagby, C. R. Smith, I. A. Wolff // *Lipids*. – 1966. - V. 1. - №. 4. - P. 263–267.
- [59] Туртыгин А. В. Масла с конъюгированными двойными связями: масла косточек вишен и родственных родов семейства *Rosaceae* / А. В. Туртыгин, И. П. Анисимович, Л. А. Дейнека и др. // *Научные ведомости БелГУ. Сер. Естественные науки*. – 2010. - V. 21, - №. 92, - P. 135 – 142.
- [60] Sassano G. Analysis of pomegranate seed oil for the presence of jacaric acid / G. Sassano, P. Sanderson, J. Franx [et al.] // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2009. - V. 89. - №. 6, - P. 1046 – 1052.

- [61] Topkafa M. Evaluation of the Triglyceride Composition of Pomegranate Seed Oil by RP-HPLC Followed by GC-MS / M. Topkafa, H. Kara, S. T. H. Sherazi // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 2015. - V. 92, - №. 6, - P. 791–800.
- [62] Turtygin A. V. Determination of the triglyceride composition of pomegranate seed oil by reversed-phase HPLC and spectrophotometry / A. V. Turtygin, V. I. Deineka, and L. A. Deineka // Journal of Analytical Chemistry. - 2013. - V. 68, - №. 6. - P. 558 – 563.
- [63] Radunz A. Analysis of the Seed Lipids of *Aleurites montana* / A. Radunz, P. EH, G. H. Schmid // Zeitschrift fuer Naturforschung Section C Journal of Biosciences. – 1998. - V. 53. - №. 30. - P. 305–310.
- [64] Smith M. A. Characterization of Novel Triacylglycerol Estolides from the Seed Oil of *Mallotus philippensis* and *Trewia nudiflora* / M. A. Smith, H. Zhang, L. Forseille, R. W. Purves // Lipids. - 2013. - V. 48. - №. 1. - P. 75 – 85.
- [65] Hopkins C. Y. Identity and configuration of conjugated fatty acids in certain seed oils / C. Y. Hopkins, M. J. Chisholm, J. A. Orgodnik // Lipids. - 1969. - V. 4. - №. 2 - P. 89 – 92.
- [66] Spitzer V. The seed oil of *Bernardia pulchella* (*Euphorbiaceae*) —A rich source of vernolic acid / V. Spitzer, K. Aitzetmüller, K. Vosmann // Journal of the American Oil Chemists' Society. - 1996. - V. 73. - №. 12. - P. 1733 – 1735.
- [67] Rao K. S. New source of α -eleostearic acid: *Ricinocarpus bowmanii* and *Ricinocarpus tuberculatus* seed oils / K. S. Rao, C. Kaluwin, G. P. Jones // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 1991. - V. 57. - №. 3. - P. 427 – 429. 1991.
- [68] Byrdwell W. C. Analysis of triglycerides using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry / W. C. Byrdwell, E. A. Emken // Lipids. - 1995. - V. 30. - №. 2. - P. 173 – 175.
- [69] Platt J. R. Absorption Spectra of Some Organic Solutions in the Vacuum Ultraviolet / J. R. Platt, I. Rusoff, H. B. Klevens // The Journal of Chemical Physics. - 1943. - V. 11. - №. 12. - P. 535 – 544.
- [70] Pitt G. A. J. Ultra-violet spectrophotometry of fatty acids / J. R. Platt, I. Rusoff, H. B. Klevens // Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids. - 1957. - V. 4 - P. 227 – 278.
- [71] Nichols P. L. Isomers of Conjugated Fatty Acids. I. Alkali-isomerized Linoleic Acid / P. L. Nichols, S. F. Herb, R. W. Riemenschneider // Journal of the American Chemical Society. - 1951. - V. 73. - №. 1. - P. 247 – 252.
- [72] Crombie L. Amides of vegetable origin. Part V. Stereochemistry of conjugated dienes / L. Crombie // Journal of the Chemical Society. - 1955. – P. 1007.
- [73] Crombie L. Total synthesis of α - and β -elæostearic and punicic (trichosanic) acid / L. Crombie, A. G. Jacklin // J. Chem. Soc. – 1957. - P. 1632–1646.

- [74] Hopkins C. Y. Identification of conjugated triene fatty acids in certain seed oils / C. Y. Hopkins, M. J. Chisholm // *Canadian Journal of Chemistry*. - 1962. - V. 40. - №. 11. - P. 2078 – 2082.
- [75] Crombie L. Constitution and stereochemistry of the kamlolenic acids / L. Crombie and J. L. Tayler // *Journal of the Chemical Society*. – 1954. – P. 2816.
- [76] Sklar L. A. Conjugated polyene fatty acids as fluorescent probes: spectroscopic characterization / L. A. Sklar, B. S. Hudson, M. Petersen, J. Diamond // *Biochemistry*. - 1977. - V. 16. - №. 5. - P. 813 – 819.
- [77] Angioni E. UV spectral properties of lipids as a tool for their identification / E. Angioni, G. Lercker, N. G. Frega // *European Journal of Lipid Science and Technology*. - 2002. - V. 104. - №. 1 - P. 59 – 64.
- [78] Rasmussen R. S. Infra-Red Absorption Spectra of Some Octenes / R. S. Rasmussen, R. R. Brattain, P. S. Zucco // *The Journal of Chemical Physics*. - 1947. - V. 15. - №. 3. - P. 135 – 140.
- [79] Jackson J. E. Isomers of linoleic acid. Infrared and ultraviolet properties of methyl esters / J. E. Jackson, R. F. Paschke, W. Tolberg [et al.] // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. - 1952. - V. 29. - №. 6. - P. 229 – 234.
- [80] Ahlers N. H. E. An infra-red study of the cis- and trans-isomers of some C18 fatty acids / N. H. E. Ahlers, R. A. Brett, N. G. McTaggart // *Journal of Applied Chemistry*. - 2007. - V. 3. - №. 10. - P. 433 – 443.
- [81] Chisholm M. J. Isolation and Structure of a New Conjugated Triene Fatty Acid / M. J. Chisholm, C. Y. Hopkins // *The Journal of Organic Chemistry*. - 1962. - V. 27. - №. 9. - P. 3137 – 3139.
- [82] Wu Z. Comparison of critical methods developed for fatty acid analysis: A review / Z. Wu, Q. Zhang, N. Li [et al.] // *J. Sep. Sci.* - 2017. - V. 40. - P. 288 – 298.
- [83] Christie W.W. Preparation of Ester Derivatives of Fatty Acids for Chromatographic Analysis / W.W. Christie // *Advances in Lipid Methodology*. Ed. W.W. Christie. – 1993. - P. 69 – 111.
- [84] Christie W. W. A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid (CLA) / W. W. Christie, J. L. Sébédio, P. Juanéda // *Inform.* – 2001. - V. 152. - P. 147 – 152.
- [85] Park S.J. Methylation Methods for the Quantitative Analysis of Conjugated Linoleic Acid (CLA) Isomers in Various Lipid Samples / S. J. Park, C. W. Park, S. J. Kim [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. - 2002. - V. 50. - №. 5. - P. 989 – 996.
- [86] Nuernberg K. Comparison of Different Methylation Methods for the Analysis of Conjugated Linoleic Acid Isomers by Silver Ion HPLC in Beef Lipids / K. Nuernberg, D.

- Dannenberger, K. Ender, G. Nuernberg // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. - V. 55. - №. 3. - P. 598–602, 2007.
- [87] Kramer J. K. G. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids / J. K. G. Kramer, V. Fellner, M. E. R. Dugan [et al.] // *Lipids.* – 1997. - V. 32, - №. 11, - P. 1219–1228, Nov. 1997.
- [88] Chen J. Isomerization of conjugated linolenic acids during methylation / J. Chen, Y. Cao, H. Gao, L. Yang, Z.-Y. Chen // *Chemistry and Physics of Lipids.* - 2007. - V. 150. - №. 2. - P. 136 – 142.
- [89] Yeonhwa P. Comparison of Methylation Procedures for Conjugated Linoleic Acid and Artifact Formation by Commercial (Trimethylsilyl) diazomethane / P. Yeonhwa, J. A. Karen, Z. Y. Cai, M. W. Pariza // *J. Agric. Food Chem.* – 2001. - V. 49. - №. 3. - P. 1158 - 1164.
- [90] Ostrowska E. Comparison of silver-ion high-performance liquid chromatographic quantification of free and methylated conjugated linoleic acids / E. Ostrowska, F. R. Dunshea, M. Muralitharan, R. F. Cross // *Lipids.* - 2000. - V. 35. - №. 10. - P. 1147–1153.
- [91] Kramer J. K. Distributions of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in tissue lipid classes of pigs fed a commercial CLA mixture determined by gas chromatography and silver ion-high-performance liquid chromatography / J. K. Kramer, N. Sehat, M. E. Dugan [et al.] // *Lipids.* - 1998. - V. 33. - №. 6. - P. 549–558.
- [92] Roach J. A. G. Analysis of CLA derivatives by GC/MS / J. A. G. Roach // *European Journal of Lipid Science and Technology.* – 2001. - V. 103. - №. 9. - P. 621 – 624.
- [93] Ratnayake W. M. N. Temperature-sensitive resolution of cis- and trans-fatty acid isomers of partially hydrogenated vegetable oils on SP-2560 and CP-Sil 88 capillary columns / W. M. N. Ratnayake, L. J. Plouffe, E. Pasquier, C. Gagnon // *Journal of AOAC International.* - 2002. - V. 85. - №. 5. - P. 1112–1118.
- [94] Mossoba M. M. Identification of minor C18 triene and conjugated diene isomers in hydrogenated soybean oil and margarine by GC-MI-FT-IR spectroscopy / M. M. Mossoba, R. E. McDonald, D. J. Armstrong, S. W. Page // *Journal of chromatographic science.* - 1991. - V. 29. - №. 8. - P. 324–330.
- [95] Ratnayake W. M. Determination of trans unsaturation by infrared spectrophotometry and determination of fatty acid composition of partially hydrogenated vegetable oils and animal fats by gas chromatography/infrared spectrophotometry: collaborative study / W. M. Ratnayake // *Journal of AOAC International.* – 1995. - V. 78. - №. 3. - P. 783 – 802.

- [96] Roach J. A. Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers / J. A. Roach, M. M. Mossoba, M. P. Yurawecz, J. K. Kramer // *Analytica Chimica Acta*. - 2002. - V. 465. - №. 2. - P. 207 – 226.
- [97] Mossoba M. M. Application of gas chromatography – infrared spectroscopy to the confirmation of the double bond configuration of conjugated linoleic acid isomers / M. M. Mossoba // *European Journal of Lipid Science and Technology*. – 2001. - V. 103. - №. 9. - P. 624 – 627.
- [98] Dobson G. Identification of conjugated fatty acids by gas chromatography-mass spectrometry of 4-methyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione adducts / G. Dobson // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. - 1998. - V. 75. - №. 2. - P. 137 – 142.
- [99] Fay L. Location of double bonds in polyunsaturated fatty acids by gas chromatography-mass spectrometry after 4,4-dimethyloxazoline derivatization / L. Fay, U. Richli // *Journal of Chromatography A*. - 1991. - V. 541, - P. 89–98, Jan. 1991.
- [100] Spitzer V. Occurrence of conjugated fatty acids in the seed oil of *Couepia longipendula* (*Chrysobalanaceae*) / V. Spitzer, F. Marx, J. G. S. Maia, K. Pfeilsticker // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 1991. - V. 68. - №. 6. - P. 440 – 442.
- [101] Spitzer V. Electron impact mass spectra of the oxazoline derivatives of some conjugated diene and triene C18 fatty acids / V. Spitzer, F. Marx, and K. Pfeilsticker // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. - 1994. - V. 71. - №. 8. - P. 873 – 876.
- [102] Andrikopoulos N. K. Triglyceride species compositions of common edible vegetable oils and methods used for their identification and quantification / N. K. Andrikopoulos // *Food Reviews International*. – 2002. - V. 18. - №. 1. - P. 71 – 102.
- [103] Philp R. P. High temperature gas chromatography for the analysis of fossil fuels: A review / R. P. Philp // *Journal of High Resolution Chromatography*. – 1994. - V. 17. - №. 6. - P. 398 – 406.
- [104] Mayer B. X. A fused silica capillary column coated with a medium polar stationary phase for HTGC / B. X. Mayer, E. Lorbeer // *Journal of High Resolution Chromatography*. - 1995. - V. 18. - №. 8. - P. 504 – 506.
- [105] Andrikopoulos N.K. Analysis of Olive Oil and Seed Oil Triglycerides by Capillary Gas Chromatography as a Tool for the Detection of the Adulteration of Olive Oil / N.K. Andrikopoulos, I.G. Giannakis, V. Tzamtzis // *Journal of Chromatographic Science*. - 2001. - V. 39, - P. 137–145.
- [106] Wai Lin S. Analysis of Lipids in Palm Oil by On-Column Capillary Gas-Liquid Chromatography / S. Wai Lin, N. Wee Lam // *Journal of Chromatographic Science*. 1994. - V. 32. - №. 5. - P. 185 – 189.

- [107] Mayer B. X. Triacylglycerol mixture for testing capillary columns for high-temperature gas chromatography / B. X. Mayer, E. Lorbeer // *Journal of Chromatography A*. - 1997. - V. 758. - №. 2. - P. 235–242, Jan. 1997.
- [108] Ohshima T. Application of selective ion monitoring to the analysis of molecular species of vegetable oil triacylglycerols separated by open-tubular column GLC on a methylphenylsilicone phase at high temperature/ T. Ohshima, H.-S. Yoon, C. Koizumi // *Lipids*. - 1989. - V. 24. - №. 6. - P. 535 – 544.
- [109] Grob K. Degradation of triglycerides in gas chromatographic capillaries: studies by reversing the column / K. Grob // *Journal of Chromatography A*. – 1981. - V. 205. - №. 2. - P. 289–296.
- [110] Dobson G. Silver ion chromatography of lipids and fatty acids / G. Dobson, W. W. Christie, B. Nikolova-Damyanova // *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. - 1995. - V. 671. - №. 2. - P. 197 – 222.
- [111] Morris L. J. Separations of lipids by silver ion chromatography / L. J. Morris // *Journal of lipid research*. - 1966. - V. 7. - №. 6. - P. 717 –732.
- [112] Guha O. K. Charge-transfer complexes of metals in the chromatographic separation of organic compounds / O. K. Guha, J. Janák // *Journal of Chromatography A*. - 1972. - V. 68. - №. 2 - P. 325 – 343.
- [113] Christie W. W. A stable silver-loaded column for the separation of lipids by high performance liquid chromatography / W. W. Christie // *Journal of High Resolution Chromatography*. - 1987. - V. 10. - №. 3. - P. 148 – 150.
- [114] Neff W. E. Silver ion high-performance liquid chromatography of the triacylglycerols of *Crepis alpina* seed oil / W. E. Neff, R. O. Adlof, M. El-Agaimy // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. - 1994. - V. 71. - №. 8. - P. 853 – 855.
- [115] Cross R. F. Ag⁺-HPLC of conjugated linoleic acids on a silica-based stationary phase. Part I: Introduction, experimental, and retention patterns / R. F. Cross, H. A. Widman // *Journal of Separation Science*. - 2002. - V. 25. - №. 4. - P. 239 – 244.
- [116] Eulitz K. Preparation, separation, and confirmation of the eight geometrical cis/trans conjugated linoleic acid isomers 8,10- through 11,13-18:2 / K. Eulitz, M. P. Yurawecz, N. Sehat // *Lipids*. – 1999. - V. 34. - №. 8. - P. 873–7.
- [117] Müller A. Development of an alternative eluent system for Ag⁺-HPLC analysis of conjugated linoleic acid isomers / A. Müller, K. Düsterloh, R. Ringseis, K. Eder, H. Steinhart // *Journal of separation science*. – 2006. - V. 29. - №. 3. - P. 358–365.
- [118] Cross R. F. Mixed Mode Retention and the Use of Competing Acid for the Ag⁺-HPLC Analysis of Underivatized Conjugated Linoleic Acids / R. F. Cross, E. Ostrowska, M.

- Muralitharan, and F. R. Dunshea // *Journal of High Resolution Chromatography*. – 2000. - V. 23. - №. 4. - P. 317 – 323.
- [119] Cao Y. Identification and Characterization of Conjugated Linolenic Acid Isomers by Ag⁺-HPLC and NMR / Y. Cao, Hong-Li Gao, Jing-Nan Chen // *J. Agric. Food Chem.* – 2006. – V. 54. - №. 24. – P. 9004 - 9009.
- [120] Joh. Y.-G. Analysis of Molecular Species of Triacylglycerols from Vegetable Oils Containing Fatty Acids with Non-Methylene-Interrupted Double Bonds, by HPLC in the Silver-ion Mode / Y.-G. Joh, S.-J. Kim // *Journal of Japan Oil Chemists' Society*. - 1998. - V. 47. - №. 10. - P. 927 - 936.
- [121] R. Adlof. Analysis of triacylglycerol and fatty acid isomers by low-temperature silver-ion high performance liquid chromatography with acetonitrile in hexane as solvent: Limitations of the methodology / R. Adlof // *Journal of Chromatography A*. 2007. - V. 1148. - №. 2. - P. 256 – 259.
- [122] Van der Klift E. J. C. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with ultraviolet, evaporative light scattering and mass spectrometric detection of triacylglycerols in corn oil / E. J. C. van der Klift, G. Vivó-Truyols, F. W. Claassen // *Journal of Chromatography A*. – 2008. - V. 1178. - №. 2. - P. 43 – 55.
- [123] Dugo P. Off-line coupling of non-aqueous reversed-phase and silver ion high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for the characterization of rice oil triacylglycerol positional isomers / P. Dugo, O. Favoino, P. Q. Tranchida [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2004. - V. 1041. - №. 2. - P. 135 – 142.
- [124] Peters S. Development of an algorithm for peak detection in comprehensive two-dimensional chromatography / S. Peters, G. Vivó-Truyols, P. J. Marriott, P. J. Schoenmakers // *Journal of Chromatography A*. – 2007. - V. 1156 - №. 2 SPEC. ISS. - P. 14 – 24.
- [125] Correa R. A. Positional and configurational separation of fatty acid isomers by micro reversed-phase liquid chromatography with an Ag⁺-containing mobile phase / R. A. Correa, V. Ferraz, A. Medvedovici [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 1999. - V. 848. - P. 83 – 93.
- [126] Phelan P. L. Using Reversed-Phase HPLC with AgNO₃ in the Mobile Phase / P. L. Phelan, J. R. Miller // *Journal of Chromatographic Science*. - 1981. - V. 19. - P. 13 – 17.
- [127] Baillet A. Separation of isomeric compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography using Ag⁺ complexation / A. Baillet, L. Corbeau, P. Rafidison, D. Ferrier // *Journal of Chromatography A*. – 1993. - V. 634. - №. 2. - P. 251 – 256.
- [128] Zhang F. Preparative argentation reversed-phase high performance liquid chromatography / F. Zhang, X. Chu, X. Wang [et al.] // *Journal of Chromatography A*. - 2008. - V. 1213. - №. 2. - P. 176 – 180.

- [129] Melis M. P. Characterization of conjugated linoleic acid and its metabolites by RP-HPLC with diode array detector / M. P. Melis, E. Angioni, G. Carta [et al.] // *European Journal of Lipid Science and Technology*. - 2001. - V. 103. - №. 9. - P. 617 – 621.
- [130] Banni S. Characterization of conjugated diene fatty acids in milk, dairy products, and lamb tissues / S. Banni, G. Carta, M. S. Contini [et al.] // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. – 1996. - V. 7. - №. 3. - P. 150 – 155.
- [131] Leskinen H. M. Quantification of triacylglycerol regioisomers by ultra-high-performance liquid chromatography and ammonia negative ion atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry / H. M. Leskinen, J.-P. Suomela, H. P. Kallio // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. - 2010. - V. 24. - №. 1. - P. 1–5.
- [132] Ross K. L. Reversed-phase analysis of triacylglycerols by ultra performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection (UPLC-ELSD) / K. L. Ross, S. L. Hansen, T. Tu // *Lipid Technology*. – 2011. - V. 23. - №. 1. - P. 14 – 16.
- [133] Ruiz-Gutiérrez V. Methods for the analysis of triacylglycerols / V. Ruiz-Gutiérrez, L. J. R. Barron // *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. - V. 671, - №. 1. - P. 133 – 168.
- [134] Herslöf B. G. HPLC of triglycerides using UV detection / B. G. Herslöf // *Journal of High Resolution Chromatography*. - V. 4. - №. 9. - P. 471 – 473.
- [135] Letter W. S. A Qualitative Method for Triglyceride Analysis by HPLC Using an Evaporative Light-Scattering Detector / W. S. Letter // *Journal of Liquid Chromatography*. - 1993 - V. 16. - №. 1. - P. 225 – 239.
- [136] Holčápek M. Quantitation of triacylglycerols in plant oils using HPLC with APCI-MS, evaporative light-scattering, and UV detection / M. Holčápek, M. Lída, P. Jandera, N. Kabátová // *Journal of Separation Science*. – 2005. - V. 28. - №. 12. - P. 1315 – 1333.
- [137] Byrdwell W. C. Dual parallel electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (MS), MS/MS and MS/MS/MS for the analysis of triacylglycerols and triacylglycerol oxidation products / W. C. Byrdwell, W. E. Neff // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2002. - V. 16. - №. 4, - P. 300–319.
- [138] Hopia A. I. Comparison of the Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) and Refractive Index Detector (RID) in Lipid Analysis / A. I. Hopia, V.-M. Ollilainen // *Journal of Liquid Chromatography*. – 1993. - V. 16. - №. 12. - P. 2469 – 2482.
- [139] Hamilton R. J. Techniques for the detection of lipids in high-performance liquid chromatography / R. J. Hamilton, S. F. Mitchell, P. A. Sewell // *Journal of chromatography*. – 1987. - V. 395. - P. 33–46.

- [140] Parris N. A. Non-aqueous reversed-phase chromatography of glycerides using infrared detection / N. A. Parris // *Journal of Chromatography A.* – 1978. - V. 149. - P. 615 – 624.
- [141] Payne-Wahl K. High-performance liquid chromatographic method for quantitation of free acids, mono-, di- and triglycerides using an infrared detector / K. Payne-Wahl, G. F. Spencer, R. D. Plattner, R. O. Butterfield // *Journal of Chromatography A.* - 1981. - V. 209. - №. 1. - P. 61 – 66.
- [142] Singleton J. A. Optimization of parameters for the analysis of triglyceride by reverse phase HPLC using a UV detector at 210 nm / J. A. Singleton, H. W. Pattee // *Journal of the American Oil Chemists' Society.* - 1984. - V. 61. - №. 4. - P. 761.
- [143] Phillips F. C. Analysis of triglyceride species by high-performance liquid chromatography via a flame ionization detector // F. C. Phillips, W. L. Erdahl, J. D. Nadenicek [et al.] // *Lipids.* - 1984. - V. 19. - №. 2. - P. 142 – 150.
- [144] Mottram H. R. Identification of triacylglycerol positional isomers present in vegetable oils by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry / H. R. Mottram, S. E. Woodbury, R. P. Evershed // *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* – 1997. - V. 11. - №. 12 - P. 1240 – 1252.
- [145] Zeb A. Analysis of triacylglycerols in refined edible oils by isocratic HPLC-ESI-MS / A. Zeb, M. Murkovic // *European Journal of Lipid Science and Technology.* – 2010. - V. 112. - №. 8. - P. 844 – 851.
- [146] Podlaha O. Some new observations on the equivalent carbon numbers of triglycerides and relationship between changes in equivalent carbon number and molecular structure / O. Podlaha, B. Töregård // *Journal of Chromatography A.* – 1989. - V. 482. - №. 1. - P. 215 – 226.
- [147] Deineka V.I. An increment approach to the HPLC analysis of triglycerides / V. I. Deineka, V. M. Staroverov, G. M. Fofanov, L. N. Balyatinskaya // *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal.* – 2002. - V. 36. - №. 7. - P. 50 – 53.
- [148] Tijssen R. Lattice models for the description of partitioning/ adsorption and retention in reversed-phase liquid chromatography, including surface and shape effects / R. Tijssen, P. J. Schoenmakers, M. R. Böhmer [et al.] // *Journal of Chromatography A.* – 1993. - V. 656. - №. 1. - P. 135 – 196.
- [149] Martin M. Comparison of retention mechanisms of homologous series and triglycerides in non-aqueous reversed-phase liquid chromatography / M. Martin, G. Thevenon, A. Tchaplá // *Journal of Chromatography A.* - 1988. - V. 452. - P. 157 – 173.
- [150] Lin J.-T. Gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography of saturated, unsaturated and oxygenated free fatty acids and their methyl esters / J.-T. Lin, T. a. McKeon, A. E. Stafford // *Journal of Chromatography A.* – 1995. - V. 699. - P. 85 – 91.

- [151] Hamdy A. H. High Performance reversed phase chromatography of Natural triglyceride mixtures: Critical pair separation / A. H. Hamdy, E. G. Perkins // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 1981. - V. 58. - №. 9. - P. 867 – 872.
- [152] Wada S. Analysis of Triglycerides of Soybean Oil by High-Performance Liquid Chromatography in Combination with Gas Liquid Chromatography / S. Wada, C. Koizumi, J. Nonaka // *Journal of Japan Oil Chemists' Society*. – 1977. - V. 26. - №. 2. - P. 95 – 99.
- [153] Herslöf B. F. HPLC of Triglycerides / B. F. Herslöf, O. Podlaha, B. Töregård, A. B. Karlshamns *Journal of the American Oil Chemists*. – 1979. - V. 56. - P. 864 – 866.
- [154] Podlaha O. A system for identification of triglycerides in reversed phase HPLC chromatograms based on equivalent carbon numbers / O. Podlaha, B. Töregård // *Journal of High Resolution Chromatography*. – 1982. - V. 5. - №. 10. - P. 553 – 558.
- [155] Sempore J. B. G. Qualitative and quantitative analysis of peanut oil triacylglycerols by reversed-phase liquid chromatography / J. B. G. Sempore // *Journal of Chromatography*. – 1986. - V. 366. - P. 261 – 282.
- [156] Stolyhwo A. Analysis of Triglycerides in Oils and Fats by Liquid Chromatography with the Laser Light Scattering Detector / A. Stolyhwo, H. Colin, G. Guiochon // *Anal. Chem.* 1985. - №. 57. - P. 1342 – 1354.
- [157] Lin J. Prediction of relative retention times of triacylglycerols in non- aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography / J. Lin, L. R. Snyder, T. A. Mckeon // *Journal of Chromatography A*. – 1998. - V. 808. - P. 43 – 49.
- [158] Takahashi K. Mathematical Model for the Prediction of Triglyceride Molecular Species by High Performance Liquid Chromatography / K. Takahashi, K. Zama // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 1985. - V. 62. - №. 10. - P. 1489 – 1492.
- [159] Takahashi K. A new concept for determining triglyceride composition of fats and oils by liquid chromatography / K. Takahashi, T. Hirano, K. Zama // *Journal of the American Oil Chemists Society*. – 1984. - V. 61. - №. 7. - P. 1226 – 1229.
- [160] Deineka V. I. Experimental substantiation of a method of relative analysis of retention in HPLC / V. I. Deineka // *Russian Journal of Physical Chemistry*. – 2006. - V. 80. - №. 3. - P. 425 – 428.
- [161] Deineka V. I. Analysis of Vegetable Oils by High-Performance Liquid Chromatography / V. I. Deineka, L. A. Deineka, N. G. Gabruk [et al.] // *Journal of Analytical Chemistry*. - V. 58. - №. 12. - P. 1160 – 1165.
- [162] Хлебников В. А. Определение триацилглицеринов и жирнокислотного состава растительных масел / В. А. Хлебников, В. Н. Сорокопудов, С. В. Рыбалко, В. И. Дейнека // *научные ведомости*. – 2006. - V. 23. - №. 4 - P. 60 – 64.

- [163] Дейнека В. И. Хроматографические методы в исследовании биологически активных веществ растительных материалов / В. И. Дейнека // Диссертация доктора химических наук. - 2008.
- [164] Дейнека В. И. Метод относительного анализа удерживания: обращено-фазовая ВЭЖХ триглицеридов / В. И. Дейнека, Л. А. Дейнека, А. В. Туртыгин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. - V. 8 - №. 3. - P. 465 – 477.
- [165] Дейнека В. И. Карата хроматографического разделения и инкрементные зависимости в методе относительного анализа удерживания в ВЭЖХ / В. И. Дейнека // Журнал физической химии. – 2006. - V. 80. - №. 3. - P. 1–6.
- [166] Malone M. Determining the relative amounts of positional isomers in complex mixtures of triglycerides using reversed-phase high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry / M. Malone, J. J. Evans // *Lipids*. – 2004. - V. 39. - №. 3. - P. 273 – 284.
- [167] Maniongui C. Determination of bovine butterfat triacylglycerols by reversed-phase liquid chromatography and gas chromatography / C. Maniongui, J. Gresti, M. Bugaut [et al.] // *Journal of chromatography*. – 1991. - V. 543. - №. 1. - P. 81 – 103.
- [168] Chang M. K. Behavior of diglycerides and conjugated fatty acid triglycerides in reverse-phase chromatography / M. K. Chang, E. J. Conkerton, D. Chapital, P. J. Wan // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 1994. - V. 71. - №. 10. - P. 1173 – 1175.
- [169] Cuzner M. L. Quantitative thin layer chromatography of lipids / A. M. L. Cuzner, A. N. Davison // *Journal of Chromatography*. – 1967. - V. 27. - P. 388 – 397.
- [170] Nguyen H. Lipid Classes, Fatty Acids and Triglycerides in Papaya Seed Oil / H. Nguyen, R. Tarandjiiska // *Fat Science Technology*. – 1995. - V. 97. - №. 1. - P. 20 – 23.
- [171] Nikolova-Damyanova B. Separation of triglyceride groups by reversed-phase thin-layer chromatography on silanized kieselguhr / B. Nikolova-Damyanova, B. Amidzhin // *Journal of Chromatography A*. – 1988. - V. 446. - P. 283 – 291.
- [172] Nikolova-Damyanova B. Quantitative thin-layer chromatography of triacylglycerols. Principles and application / B. Nikolova-Damyanova // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. – 1999. - V. 22. - №. 10. - P. 1513 – 1537.
- [173] Demopoulos C. A. Isolation and Complete Separation of Lipids From Natural Sources / C. A. Demopoulos, S. Antonopoulou, N. K. Andrikopoulos, V. M. Kapoulas // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. – 1996. - V. 19. - №. 4. - P. 521 – 535.
- [174] Nikolova-Damyanova B. Lipid classes, fatty acid composition and triacylglycerol molecular species in crude coffee beans harvested in Brazil / B. Nikolova-Damyanova, R. Velikova, G. N. Jham // *Food Research International*. – 1998. - V. 31. - №. 6–7. - P. 479 – 486.

- [175] Aitzetmüller K. Dynamic impregnation of silica stationary phases for the argentation chromatography of lipids / K. Aitzetmüller, L. A. Guaraldo // *Journal of Chromatography A*. - V. 519. - №. 2. - P. 349 – 358.
- [176] Tarandjiiska R. Determination of Molecular Species of Triacylglycerols from Highly Unsaturated Plant Oils by Successive Application of Silver Ion and Reversed Phase TLC / R. Tarandjiiska, I. Marekov, B. Nikolova-Damyanova, B. Amidzhin // *Journal of Liquid Chromatography*. – 1995. - V. 18. - №. 5. - P. 859 – 872.
- [177] Laaksoo P. Combination of silver ion and reversed-phase high-performance liquid chromatography in the fractionation of herring oil triacylglycerols / P. Laaksoo, W. W. Christie // *Journal of the American Oil Chemists Society*. – 1991. - V. 68. - №. 4. - P. 213 – 223.
- [178] Pchelkin V. P. Reversed-phase thin-layer chromatography of diacylglycerols in the presence of silver ions / V. P. Pchelkin, A. G. Vereshchag // *Journal of Chromatography*. – 1992. - V. 603. - P. 213 – 222.
- [179] Nekolova-Damyanova B. Separation of Isomeric Triacylglycerols by Silver Ion Thin-Layer Chromatography / B. Nekolova-Damyanova, D. Chobanov, S. Dimov // *Journal of Liquid Chromatography*. – 1993. - V. 16 - №. 18. - P. 3997 – 4008.
- [180] Tarandjiiska R. B. Determination of Triacylglycerol Classes and Molecular Species in Seed Oils with High Content of Linoleic and Linolenic Fatty Acids / R. B. Tarandjiiska, I. N. Marekov, B. M. Nikolova-Damyanova, B. S. Amidzhin // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 1996. - V. 72. - №. 4. - P. 403 – 410.
- [181] Devi P. S. TLC as a tool for quantitative isolation of conjugated trienoic FA / P. S. Devi // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 2003. - V. 80. - №. 4. - P. 315 – 318.
- [182] Schlenk H. Urea inclusion compounds of fatty acids / H. Schlenk // *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*. 1954. - V. 2 - P. 243 – 267.
- [183] Swern D. Urea and Thiourea Complexes in Separating Organic Compounds / D. Swern *Industrial & Engineering Chemistry*. – 1955. - V. 47 - №. 2. - P. 216 – 221.
- [184] Harris K. D. M. Structural aspects of urea inclusion compounds and their investigation by X-ray diffraction: a general discussion / K. D. M. Harris, J. M. Thomas // *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. – 1990. - V. 86 - №. 17. – P. 2985.
- [185] José J. L. Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds / J. L. José, L. Martinez // *CRC Press*, 2008.
- [186] Hayes D. G. Urea complexation for the rapid, ecologically responsible fractionation of fatty acids from seed oil / D. G. Hayes, L. Martinez // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. - 1998. - V. 75. - №. 10. - P. 1403 – 1409.

- [187] Medina A.R. Concentration and purification of stearidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids from cod liver oil and the marine microalga *Isochrysis galbana* / A. R. Medina, A. G. Giménez, F. G. Camacho [et al.] // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 1995. - V. 72 - №. 5. - P. 575 – 583.
- [188] Schlenk H. Separation and Stabilization of Fatty Acids by Urea Complexes / H. Schlenk, R. T. Holman // *Journal of the American Chemical Society*. -1950. - V. 72. - № 11. - P. 5001 – 5004.
- [189] Haagsma N. Preparation of an ω 3 fatty acid concentrate from cod liver oil / N. Haagsma, C. M. van Gent, J. B. Luten [et al.] // *Journal of the American Oil Chemists Society*. – 1982. - V. 59 - № 3. - P. 117 – 118.
- [190] Wille H. J. Production of polyenoic fish oil fatty acids by combined urea fractionation and industrial scale preparative high performance liquid chromatography / H. J. Wille, H. Traifler, M. Kelly // *Rev. Fr. Corps. Gras*. – 1987. - V. 34. - P. 69 – 74.
- [191] Ackman R. G. The 'basic' fatty acid composition of atlantic fish oils: Potential similarities useful for enrichment of polyunsaturated fatty acids by urea complexation / R. G. Ackman, W. M. N. Ratnayake, B. Olsson // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 1988. - V. 65 - №. 1 - P. 136 – 138.
- [192] Ratnayake W. M. N. Preparation of Omega-3 PUFA Concentrates from Fish Oils via Urea Complexation / W. M. N. Ratnayake, B. Olsson, D. Matthews, R. G. Ackman // *Fett Wissenschaft Technologie/Fat Science Technology*. – 1988. - V. 90. - №. 10. - P. 381 – 386.
- [193] Traifler H. Fractionation of blackcurrant seed oil / H. Traifler, H. J. Wille, A. Studer // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 1988. - V. 65. - №. 5. - P. 755 – 760.
- [194] Cagno M. di. The Potential of Cyclodextrins as Novel Active Pharmaceutical Ingredients: A Short Overview / M. di Cagno // *Molecules*. - V. 22. - № 1. - P. 1.
- [195] Dodziuk H. Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications / H. Dodziuk, John Wiley & Sons // Wiley-VCH, 2006.
- [196] Szejtli J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry / J. Szejtli // *Chem. Rev.* 1998. – V.98. - № . 5. – P. 1743-1754.
- [197] Cabral Marques H. M. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles / H. M. Cabral // *Flavour Fragr. J.* - 2010. - V. 25. – P. 313–326.
- [198] Higuchi T. Phase Solubility Techniques / T. Higuchi, K. A. Connors // *Advanced Analytical Chemistry of Instrumentation*. - 1965. - V. 4. - P. 117 – 212.
- [199] Дворкин В. И., Метрология и обеспечение качества количественного химического анализа / В. И. Дворкин // Москва : Химия. 2001.

- [200] Дерфель К. Статистика в аналитической химии / К. Дерфель // Москва: Москва : Мир. - 1994.
- [201] Гмурман В. Е. Теория вероятностей и математическая статистика : учебное пособие для вузов / В. Е. Гмурман // Москва: Москва : Высшая школа. - 2003.
- [202] Гармаш А. В. Метрологические основы аналитической химии / А. В. Гармаш, Н. М. Сорокина, Т. Н. Шеховцовой // Москва. - 2017.
- [203] Nikolova-Damyanova B. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography: General Principles and Application To the Analysis of Fatty Acids and Triacylglycerols / Woodhead Publishing Limited. - 2012.
- [204] Chou J. T. Computer-Assisted Computation of Partition Coefficients from Molecular Structures Using Fragment Constants / J. T. Chou, P. C. Jurs // Journal of Chemical Information and Modeling. – 1979. - V. 19. - №. 3. - P. 172 – 178.
- [205] Engelhardt H. Bonded Stationary Phases // Handbook of HPLC, CAZES, JAC – 2011. – P. 47.
- [206] Snyder L. R. Classification of the solvent properties of common liquids / L. R. Snyder // Journal of Chromatography A. – 1974. - V. 92. - №. 2. - P. 223 – 230.
- [207] Nájera A. I. A reverse-phase high-performance liquid chromatographic method for analyzing complex mixtures of triglycerides. Application to the fat fraction of an aged cheese / A. I. Nájera, S. Perea, Y. Barcina, M. de Renobales, L. J. R. Barron // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 1999. - V. 76. - №. 3. - P. 399 – 407.
- [208] Henderson M. A. Ionic liquids enable electrospray ionisation mass spectrometry in hexane / M. A. Henderson, J. S. McIndoe // Chemical Communications. – 2006. - V. 0. - №. 27. – P. 2872.
- [209] Ishida B. K. Fatty Acid and Carotenoid Composition of Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) Fruit // B. K. Ishida, T. A. McKeon // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2004. - V. 52 - №. 2 - P. 274–279.
- [210] Christie W. W. The glyceride structure of *Sapium sebiferum* seed oil / W. W. Christie // Biochimica et biophysica acta. – 1969. - V. 187. - №. 1 - P. 1 – 5.
- [211] Spitzer V. Structure analysis of an allene-containing estolide tetraester triglyceride in the seed oil of *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) / V. Spitzer, W. Tomberg, G. Pohlentz // Lipids. – 1997. - V. 32 - №. 5. - P. 549 – 557.
- [212] Crossley A. The component acids of some authentic and commercial *Stillingia* oils / A. Crossley, T. P. Hilditch // Journal of the Science of Food and Agriculture. 1950. - V. 1. - №. 10. - P. 292 – 300.

- [213] Krupskaya V. V. Experimental Study of Montmorillonite Structure and Transformation of its Properties under the Treatment of Inorganic Acid Solutions / V.V. Krupskaya, S. V. Zakusin, E. A. Tyupina [et al.] // Minerals. – 2017. – V. 7. – P. 49.
- [214] Abia J. Surface Characterization of Some Novel Bonded Phase Packing Materials for HPLC Columns Using MAS-NMR Spectroscopy / J. Abia, Abia, Jude // Chromatography. – 2015. - V. 2. - №. 2. - P. 141 – 155.
- [215] Takada A. Molecular dynamics study of tridymite / A. Takada, K. J. Glaser, R. G. Bell, C. R. A. Catlow // International Union of Crystallography. – 2018. - V. 5. - №. 3. - P. 325 – 334.
- [216] Dove. M. T Direct measurement of the Si-O bond length and orientational disorder in the high-temperature phase of cristobalite / M. T. Dove, D. A. Keen, A. C. Hannon, I. P. Swainson // Physics and Chemistry of Minerals. - 1997. - V. 24. - №. 4. - P. 311 – 317.
- [217] Лисичкин Г.В. Химия привитых поверхностных соединений / Под ред. Г.В. Лисичкина // М.: ФИЗМАТЛИТ. - 2003.
- [218] Zhuravlev L. T. The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model / L. T. Zhuravlev // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. - 2000. – V. 173. – P. 1-38
- [219] Hanai T. Simulation of chromatography of phenolic compounds with a computational chemical method / T. Hanai // Journal of chromatography. A. – 2004. - V. 1027. - №. 1–2. - P. 279 – 287.
- [220] Wentzel N. Crystal and rotator phases of n-alkanes: A molecular dynamics study / N. Wentzel, S. T. Milner // The Journal of Chemical Physics. – 2010. - V. 132. - №. 4. – P. 044901.
- [221] Pesek J. J. Hydride-based HPLC stationary phases: a rapidly evolving technology for the development of new bio-analytical methods / J. J. Pesek, R. I. Boysen, M. T. W. Hearn, M. T. Matyska // Anal. Methods. – 2014. - V. 6. - №. 13. - P. 4496 – 4503.
- [222] Rürger R. Vibrationally resolved UV/Vis spectroscopy with time-dependent density functional based tight binding / R. Rürger, T. Niehaus, E. van Lenthe, T. Heine, L. Visscher // The Journal of Chemical Physics. – 2016. - V. 145. - №. 18. – P. 184102.
- [223] Бренд С. А. И. Установление структуры органических соединений физическими и химическими методами / С. А. И. Бренд Дж.К.Д. // Пер. с англ. М.: Химия. - 1967.
- [224] Hammond E. G. The Alkali Isomerization of a Methyl Docosahexaenoate and the Spectral Properties of Conjugated Fatty Acids / E. G. Hammond, W. O. Lundberg // The Journal of the American Oil Chemists' Society. – 1953. - V. 30. - №. 11 - P. 433 – 438.
- [225] Cross R. F. Ag⁺-HPLC of conjugated linoleic acids on a silica-based stationary phase. Part II: Resolution and extrapolations / R. F. Cross, H. A. Widman // Journal of Separation Science. – 2002. - V. 25. - №. 4. - P. 245 – 251.

- [226] Cross R. F. Ag⁺-HPLC of conjugated linoleic acids on a silica-based stationary phase. Part III: Model compounds / R. F. Cross, H. Zackari // *Journal of Separation Science*. – 2002. - V. 25. - №. 14. - P. 897 – 903.
- [227] Cross R. F. Ag⁺-HPLC of conjugated linoleic acids on a silica-based stationary phase. Part IV: A reference stationary phase and retention mechanisms / R. F. Cross and H. Zackari // *Journal of Separation Science*. – 2003. - V. 26. - №. 6–7. - P. 480 – 488.
- [228] Guo W. Separation Mechanism of Fatty Acids from Waste Cooking Oil and Its Flotation Performance in Iron Ore Desiliconization / W. Guo, Y. Zhu, Y. Han, B. Luo, Y. Wei // *Minerals*. – 2017. - V. 7. - №. 12. - P. 244.
- [229] Fernandes L. P. Characterization of *Lippia sidoides* oil extract- β -cyclodextrin complexes using combined thermoanalytical techniques / L. P. Fernandes, Z. Éhen, T. F. Moura [et al.] // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. - 2004. - V. 78. - №. 2. - P. 557 – 573.
- [230] Gomes L. M. M. Inclusion complexes of red bell pepper pigments with β -cyclodextrin: Preparation, characterisation and application as natural colorant in yogurt / L. M. M. Gomes, N. Petitto, V. G. Costa // *Food Chemistry*. – 2014. - V. 148. - P. 428 – 436.
- [231] Johnson J. R. Full assignment of the proton and carbon-13 nmr spectra of 2,3,6 -tri-*o*-methyl- β -cyclodextrin / J. R. Johnson, N. Shankland, I. H. Sadler // *Tetrahedron*. – 1985. - V. 41 - №. 15/ - P. 3147–3152, Jan. 1985.
- [232] Coisne C. β -Cyclodextrins Decrease Cholesterol Release and ABC-Associated Transporter Expression in Smooth Muscle Cells and Aortic Endothelial Cells / C. Coisne, D. Hallier-Vanuxeem, M.- Christine Boucau // *Frontiers in Physiology*. – 2016. - V. 7, - P. 185.
- [233] Boiadjev S. E. Exciton Chirality. (A) Origins of and (B) Applications from Strongly Fluorescent Dipyrinone Chromophores / S. E. Boiadjev, D. A. Lightner // *Monatshefte fur Chemie - Chemical Monthly*. – 2005. - V. 136. - №. 3. - P. 489 – 508.

ПРИЛОЖЕНИЕ

П 1. Определение воспроизводимости метода ОФ ВЭЖХ при разделении ТАГ

Таблица П.1.

Оценка воспроизводимости факторов удерживание ТАГ

Концентрация масла	ТАГ	lg K					S _r (lgk)
		1	2	3	4	5	
0.042 гм/мл	αЭ ₃	0.725	0.724	0.725	0.724	0.722	0.001
	αЭ ₂ Л	0.823	0.822	0.823	0.822	0.820	0.001
	αЭЛ ₂	0.922	0.922	0.923	0.921	0.919	0.002
	αЭ ₂ О	0.963	0.963	0.964	0.964	0.962	0.001
	αЭ ₂ П	1.001	1.001	1.000	0.999	0.996	0.002
	αЭЛО	1.064	1.063	1.063	1.063	1.062	0.001
	αЭ ₂ С	1.134	1.133	1.132	1.132	1.132	0.001
	αЭЛС	1.232	1.232	1.231	1.230	1.231	0.001
0.045 гм/мл	αЭ ₃	0.726	0.726	0.727	0.724	0.726	0.001
	αЭ ₂ Л	0.824	0.821	0.823	0.823	0.821	0.001
	αЭЛ ₂	0.924	0.924	0.921	0.922	0.920	0.002
	αЭ ₂ О	0.964	0.963	0.963	0.962	0.963	0.001
	αЭ ₂ П	1.001	1.001	1.002	1.002	1.000	0.001
	αЭЛО	1.064	1.063	1.063	1.063	1.063	0.000
	αЭ ₂ С	1.133	1.131	1.131	1.132	1.132	0.001
	αЭЛС	1.233	1.232	1.232	1.232	1.232	0.000
0.046 гм/мл	αЭ ₃	0.727	0.724	0.725	0.725	0.726	0.001
	αЭ ₂ Л	0.824	0.823	0.824	0.824	0.827	0.001
	αЭЛ ₂	0.924	0.924	0.923	0.922	0.924	0.001
	αЭ ₂ О	0.965	0.965	0.965	0.966	0.963	0.001
	αЭ ₂ П	1.001	1.000	0.999	1.000	0.999	0.001
	αЭЛО	1.064	1.062	1.064	1.062	1.064	0.001
	αЭ ₂ С	1.132	1.133	1.130	1.132	1.129	0.002
	αЭЛС	1.234	1.233	1.235	1.234	1.234	0.001

Таблица П.2.

Определение воспроизводимости площадей пиков

	ТАГ	Площадь пиков (mAU)					Σ	S	S _R (%)
		1	2	3	4	5			
Концентрация масла 0.042 гм/мл	α Э ₃	32.00	32.85	33.03	32.54	32.51	32.59	0.39	1.21
	α Э ₂ Л	28.29	28.03	27.35	28.03	27.54	27.85	0.39	1.40
	α ЭЛ ₂	7.64	8.14	7.98	7.95	7.71	7.89	0.21	2.60
	α Э ₂ О	47.06	46.75	47.11	47.05	46.12	46.82	0.42	0.89
	α Э ₂ П	15.57	16.14	16.26	15.77	15.93	15.93	0.28	1.73
	α ЭЛО	8.27	8.55	8.71	8.17	8.85	8.51	0.28	3.35
	α Э ₂ С	181.33	184.23	182.59	183.53	183.11	182.96	1.09	0.60
	α ЭЛС	17.70	18.47	17.87	17.66	17.26	17.79	0.44	2.48
	Сумма	337.87	343.17	340.90	340.72	339.02	340.34	2.02	0.59
Концентрация масла 0.045 гм/мл	α Э ₃	30.48	29.99	30.21	30.55	30.04	30.25	0.25	0.84
	α Э ₂ Л	24.52	24.44	24.01	25.01	24.88	24.57	0.39	1.61
	α ЭЛ ₂	7.00	6.81	6.95	6.98	7.06	6.96	0.09	1.33
	α Э ₂ О	40.57	40.13	40.96	40.89	41.32	40.77	0.45	1.10
	α Э ₂ П	14.28	14.12	14.29	14.50	14.83	14.40	0.27	1.90
	α ЭЛО	7.21	7.21	7.10	7.54	7.23	7.26	0.17	2.29
	α Э ₂ С	166.64	166.94	165.20	165.20	166.90	166.18	0.90	0.54
	α ЭЛС	15.81	15.11	15.98	16.05	16.11	15.81	0.41	2.58
	Сумма	306.51	304.75	304.70	306.72	308.37	306.21	1.54	0.50
Концентрация масла 0.046 гм/мл	α Э ₃	35.34	35.23	35.51	35.59	35.29	35.39	0.15	0.43
	α Э ₂ Л	30.00	29.89	30.22	30.65	30.54	30.26	0.33	1.09
	α ЭЛ ₂	8.69	8.61	8.41	8.35	8.49	8.51	0.14	1.65
	α Э ₂ О	48.31	48.39	48.45	48.51	48.71	48.47	0.15	0.31
	α Э ₂ П	17.15	17.01	16.93	17.44	17.33	17.17	0.21	1.24
	α ЭЛО	9.45	9.03	9.81	9.47	9.33	9.42	0.28	2.98
	α Э ₂ С	198.70	198.90	199.30	197.80	196.30	198.20	1.20	0.60
	α ЭЛС	18.99	18.23	18.22	18.06	19.33	18.57	0.56	3.01
	Сумма	366.64	365.29	366.85	365.87	365.32	365.99	0.73	0.20

Пример эффективности использования программы MagicPlotStudent 2.0 представлен на рисунке П.1 и в таблице П.3, где приводятся части хроматограмм с двумя ближайшими пиками и результат их количественного определения. Для получения хроматограмм с хорошо разделенными пиками этих веществ и с не полностью разделенными пиками использовали три состава подвижных фаз с различной концентрацией пропанола-2 (от 20 до 80 об.%) в ацетонитриле.

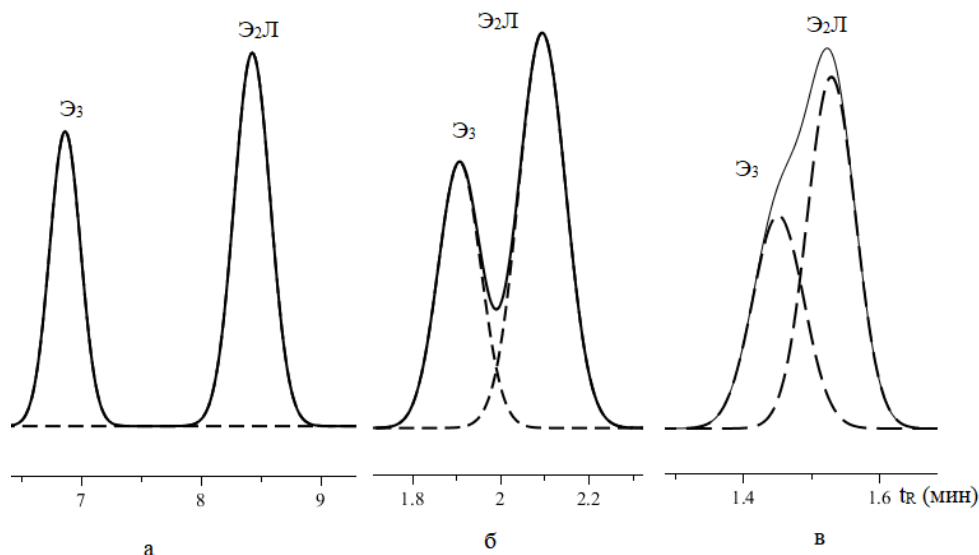


Рис. П.1. Фрагменты хроматограмм с парой пиков с различной степенью разделения Соединения Э₃ – три-α-элеостеарат, Э₂Л – ди-α-элеостеарат-линолеат; Колонка 2 × 75 мм Kromasil 100-5C18; 100 мкл/мин; подвижные фазы системы пропанол-2 – ацетонитрил, содержащие а) - 20, б) – 40 и в) - 80 об.% пропанола 2.

Таблица П. 3.

Результаты разделения пиков в программе MagicPlotStudent 2.0

	Для подвижных фаз, содержащих указанную объемную долю пропанола-2					
	20 %		60 %		80 %	
	Э ₃	Э ₂ Л	Э ₃	Э ₂ Л	Э ₃	Э ₂ Л
Rs	2.12		0.78		0.46	
Метод	Времена удерживания, мин					
«Мультихром 1.5»	6.87	8.43	1.86	1.99	-	1.53
«MagicPlotStudent 2.0»	6.87	8.43	1.86	1.99	1.45	1.53
Метод	Доля в сумме площадей двух пиков					
«Мультихром 1.5»	39.9	60.1	36.1	63.9	-	-
«MagicPlotStudent 2.0»	39.0	61.0	37.9	62.1	39.2	60.8

П 2. Применение относительного удерживания для определения состава ТАГ различных масел

Таблиц П.4.

Экспериментальные параметры удерживания ТАГ масла семян *Thladiantha dubia* по сравнению с расчетами относительного удерживания при 34% пропанол-2 и 66% ацетонитрила.

№ ^a	ТАГ	t _R мин	lg <i>k</i> (i) (±0.002)		% моль.	M/z [M+H] ⁺
			Экспер.	Расчет.		
1	Пу ₃	17.46	0.777	0.777	1.14	873.7
2	Пу ₂ Л	22.18	0.896	0.898	29.14	875.6
3	ПуЛ ₂	28.71	1.021	1.021	27.82	877.5
4	Пу ₂ О	30.08	1.043	1.045	4.56	877.6
5	ПуЛО	38.99	1.164	1.166	17.18	879.7
6	ПуЛП	41.88	1.197	1.199	12.34	853.5
7	ПуО ₂	53.79	1.312	1.313	1.18	881.7
8+9	ПуЛС+ПуОП	56.82	1.337	1.339	6.65	881.7

^a Номер пиков представлены на рисунке П.2.

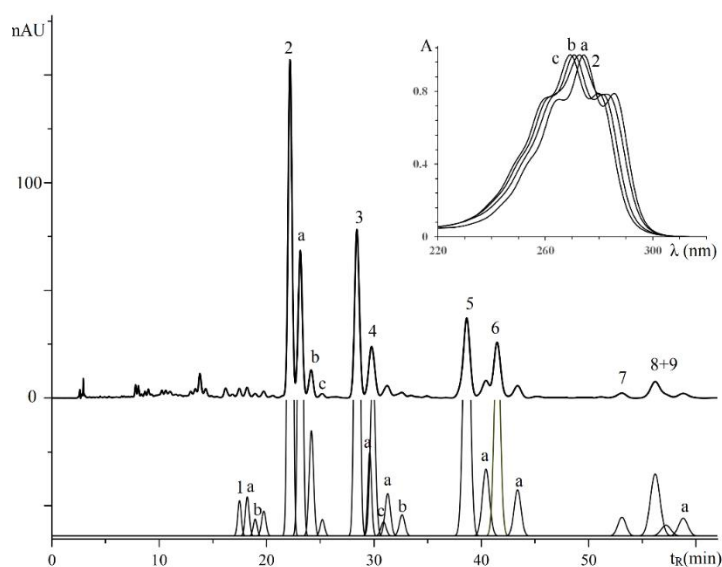


Рис. П.2. Хроматограммы масел семян тладианты сомнительной при спектрофотометрическом.

Кromasil 100-5C18, температура термостата колонок 30°C. При УФ- Детектирование $\lambda = 278$ нм
Подвижная фаза 34 об.% ИПС и 66 об.% CH₃CN, 1.0 мл/мин.

Расхождение между экспериментальными данными и результатами, полученными по уравнениям относительного удерживания, найденными для ТАГ анализируемых масел, не превышает 0.002 логарифмические единицы. Следовательно, уравнения относительного удерживания эффективны в рассмотренном в работе случае и позволяют уверенно определять состав ТАГ. Расчетные времена выхода определяемых триглицеридов сопоставляли с полученными экспериментальными временами удерживания веществ для идентификации пиков и качественного определения триацилглицеридного состава масла.

Таблица П.5.

Экспериментальные параметры удержания для ТАГ масла семян *Momordica subangulata* по сравнению с расчетами относительного удерживания при 41% об. пропанол-2 и 59 % об. ацетонитрила.

№ ^a	ТАГ	tr, мин	log <i>k</i> (i)		Доля мол. %	M/z [M+H] ⁺
			эксперимент	расчет		
1	αЭ ₃	11.71	0.653	0.653	0.81	873.7
2	αЭ ₂ Л	13.98	0.745	0.747	0.50	875.7
3	αЭЛ ₂	16.88	0.840	0.841	0.39	877.7
4	αЭ ₂ О	18.26	0.879	0.881	1.54	877.8
5	αЭЛО	19.60	0.914	0.913	1.86	879.7
6	αЭЛП	22.21	0.974	0.976	0.71	853.7
7	αЭ ₂ С	23.92	1.010	1.008	91.33	879.7
8	αЭЛС	25.51	1.041	1.041	1.99	881.7

^a Номер пиков представлены на рисунке П.3.

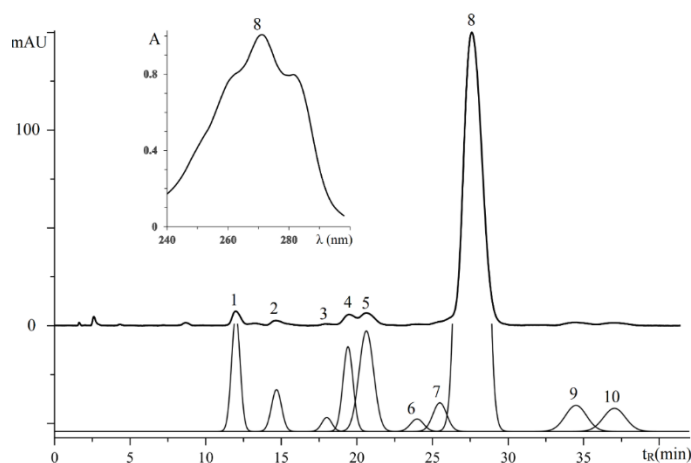


Рис. П.3. Хроматограммы масел семян *Momordica subangulata* при УФ детектировании.

Kromasil 100-5C18, температура термостата колонок 30°C. При УФ-Подвижная фаза 34 об. % CH₃CH(OH)CH₃ и 66 об.% CH₃CN, 1.0 мл/мин. Детектирование λ = 270 нм

Установлено, что масло семян *Thladiantha dubia* содержит одновременно α -элеостеариновую (9.5%), пуниковую (35.5%), β -элеостеариновую (0.3%), линолевую (40.1%), олеиновую (8.3%), пальмитиновую (4.4%) и стеариновую (2.0%) кислоты.

Расчет жирнокислотного состава масла семян *Momordica subangulata* выполнили по доле различных видов ТАГ, определяемых по площадям пиков с учетом числа радикалов сопряженных кислот в них: 64.55 % α -элеостеариновой, 2.37 % линолевой, 0.87 % олеиновой, 3.17 % пальмитиновой и 29.04 % стеариновой кислот.

П 3. Схематическая иллюстрация механизма удержания ТАГ на ОФ ВЭЖХ

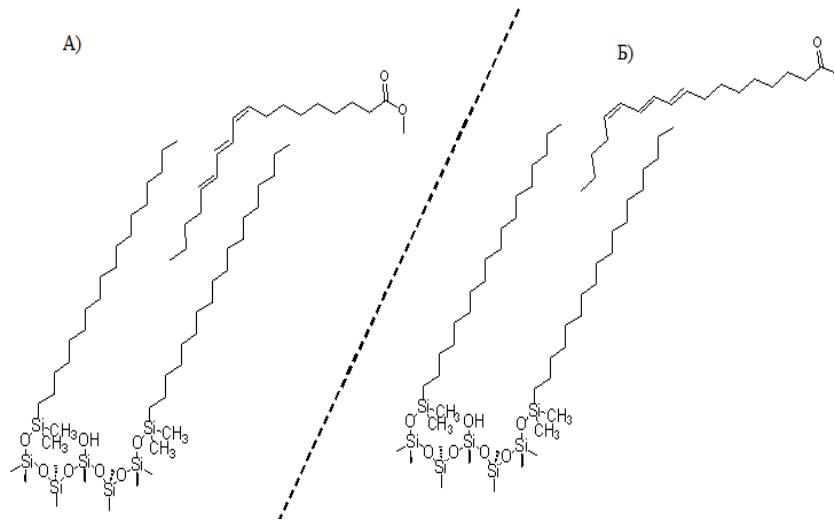


Рис. П.4. Схематическая иллюстрация механизма удержания триглицеридов метода ОФ ВЭЖХ; А- α -элеостеариновой, Б-кательпавой

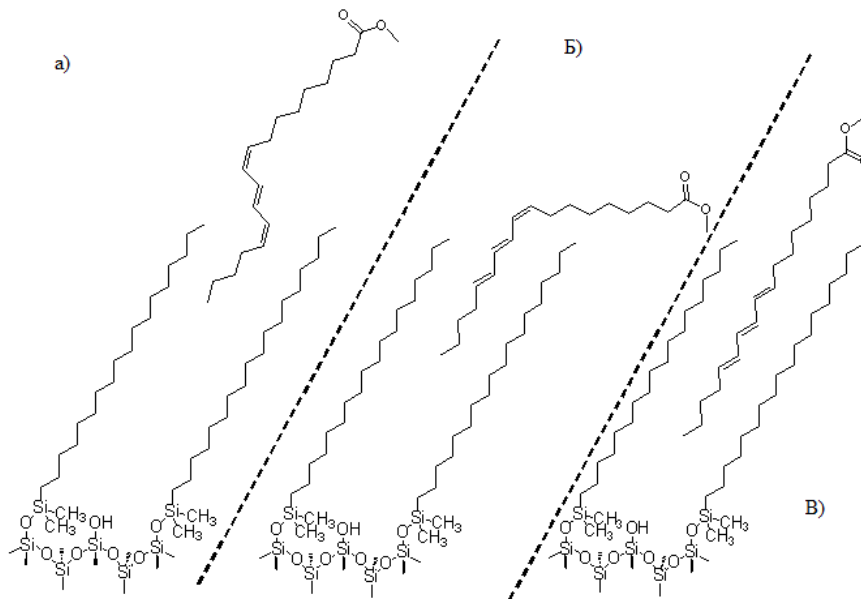


Рис. П.5. Схематическая иллюстрация механизма удержания триглицеридов метода ОФ ВЭЖХ; А- пуниковой; Б- α -элеостеариновой; В- β -элеостеариновой

П 4. Разделение жирных кислот методом ОФ ВЭЖХ

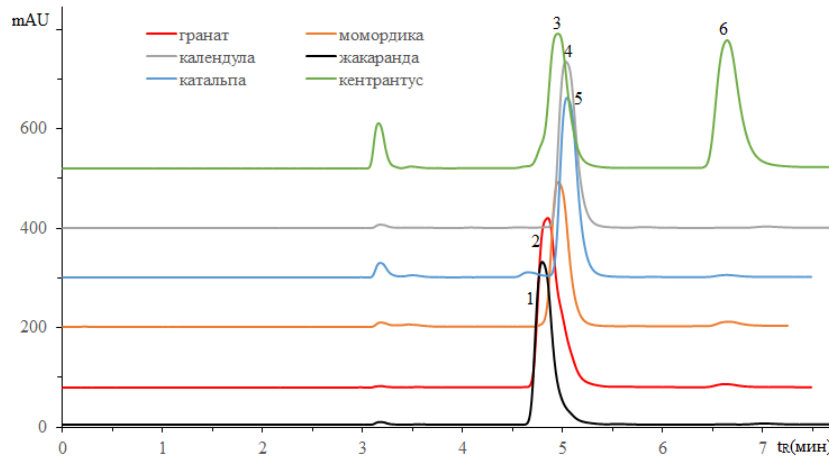


Рис. П.6. Разделение сопряженных октадекатриеновых кислот.

1– Ж, 2 -Пу, 3- αЭ, 4- Кт, 5 – Кл, 6- βЭ.

Условия: ПФ: градиент режима: от 100% элюент А (100% АЦН и 1% уксусная кислота) до 50% элюент А и 50% элюента В (60% АЦН -40% ИПС и 1% уксусная кислота) в течение 20 мин, $\lambda=270$ нм, колонка: YMC-C30-250*4.6.

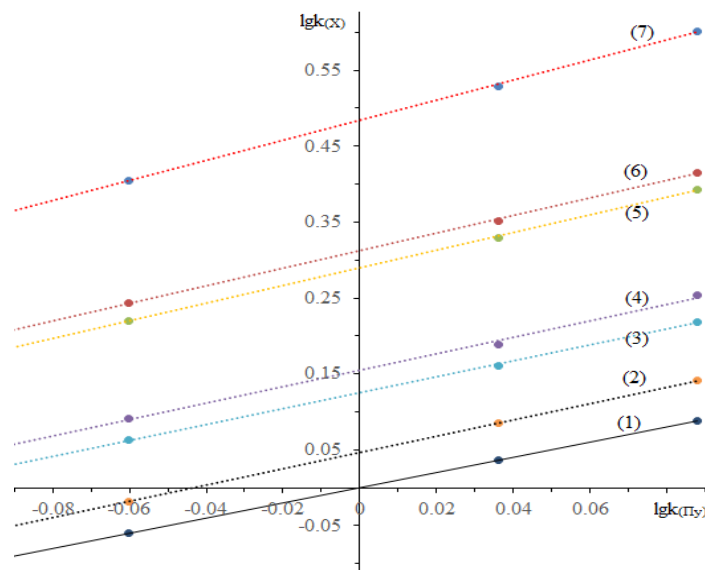


Рис. П.7. Карата разделения жирных кислот

(1) – Пу, (2)- βЭ, (3)-Л, (4)-У, (5)- О, (6)- П, (7)- С.

Система ПФ: ацетонитрил - ацетон и 1% уксусная кислота.

П 5. Оптимальное соотношения гости и ЦД

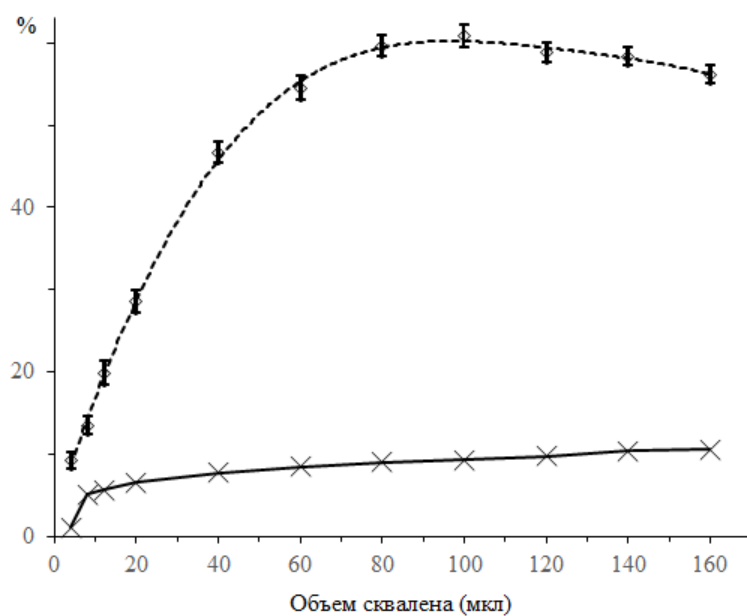


Рис. П.8. Зависимость выхода комплекса сквалена-βЦД (◇) и содержания сквалена в комплексе (×) от объема добавленного сквалена (в 20 мл растворе βЦД 10мМ)

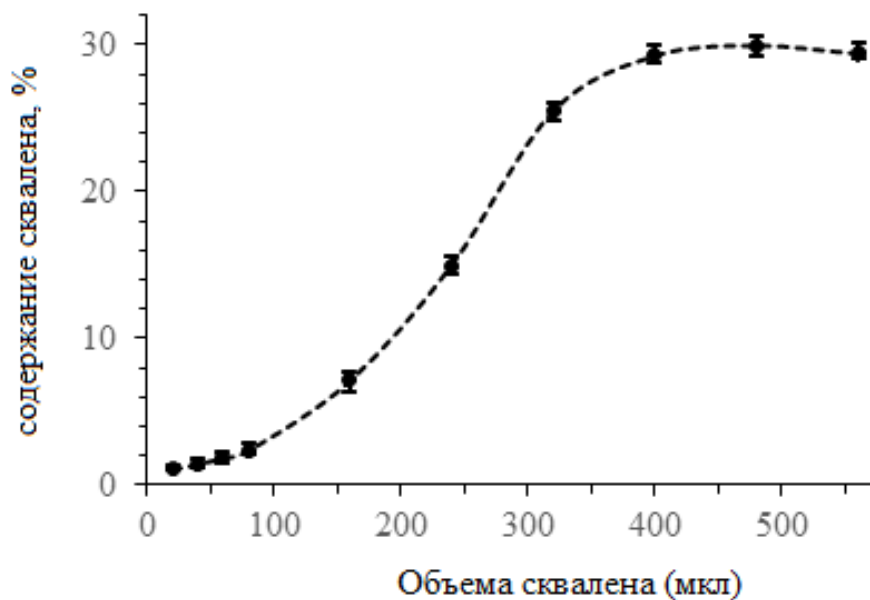


Рис. П.9. Содержание сквалена в комплексе сквален-метил-βЦД

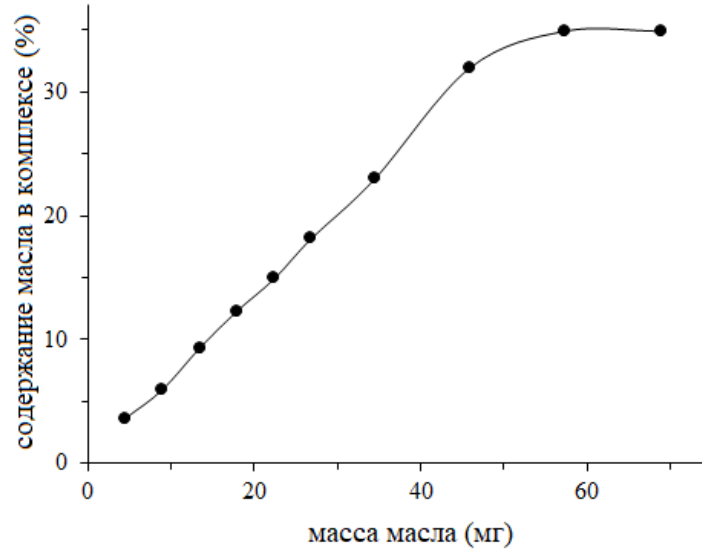


Рис. П.10. Содержание масла семян момордики кохинхинской в комплексе (20 мл раствор β -ЦД 10мМ)

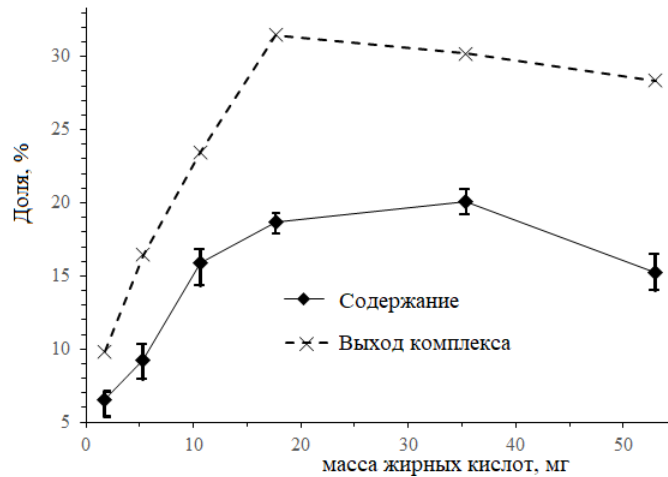


Рис. П.11. Содержание жирных кислот в комплексе и выход комплекса (20 мл раствор β -ЦД 10мМ)

Таблица П.6.

Гради ровочная графика для определения содержание органического состава «гостя» в комплексе

Соединение	Уравнение	R^2	Диапазон (мг/мл)	LOQ (мг/мл)
Сквален	$S = 313.54C_x + 4.8728$	0.9992	0.05-10	0.15
α -элеостеариновая кислота	$S = 221.12C_x + 2.2625$	0.9993	0.03-10	0.11
Масло момордики*	$S = 28.979C_x - 0.1700$	0.9993	0.1 - 15	0.35

* рассчитанный для три- α -элеостеарат

П 6. Подтверждение комплексообразования методом ИК спектроскопии

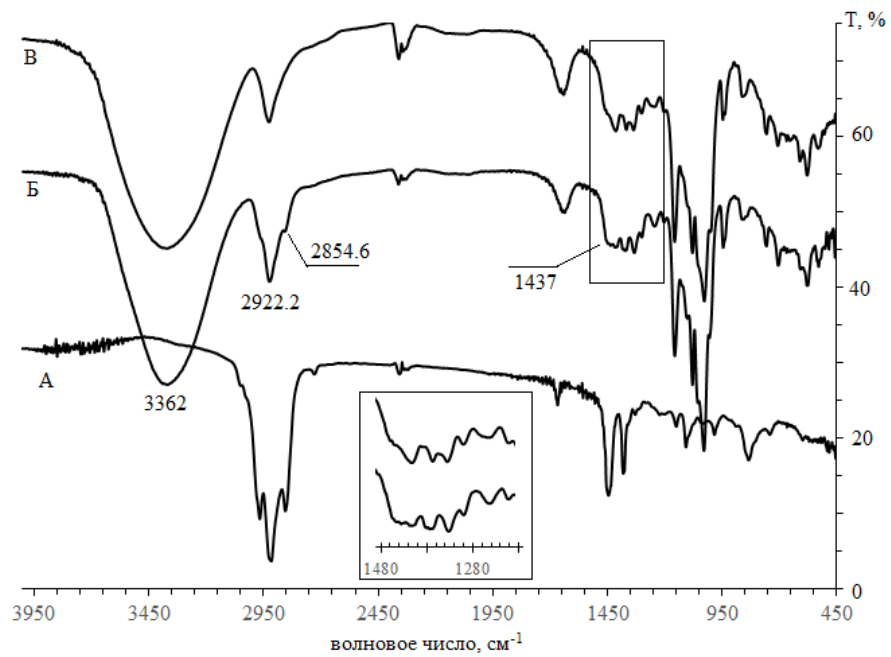


Рис. П.12. ИК-спектры комплекса включения сквалена - β ЦД (Б), сквален (А) и β ЦД (В)

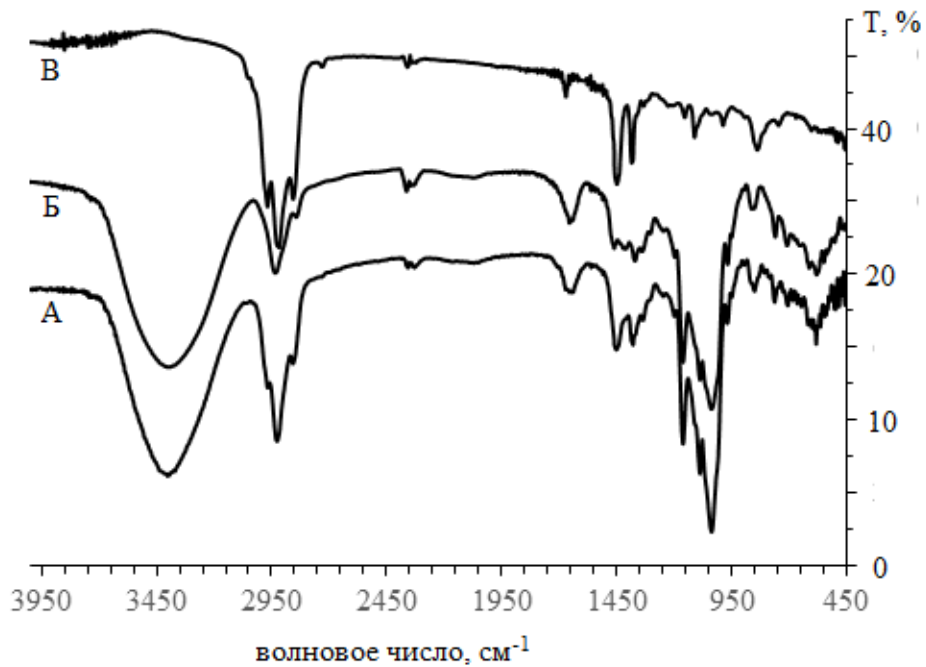


Рис. П.13. ИК-спектры комплекса включения сквалена- метил β -ЦД

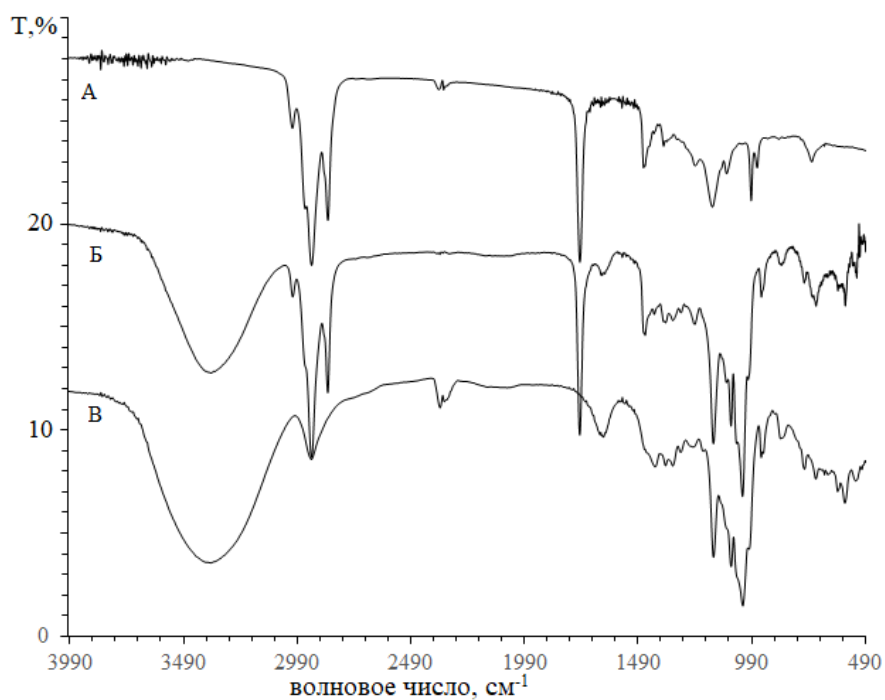


Рис. П.14. ИК-спектры комплекса включения масла момордики- βЦД

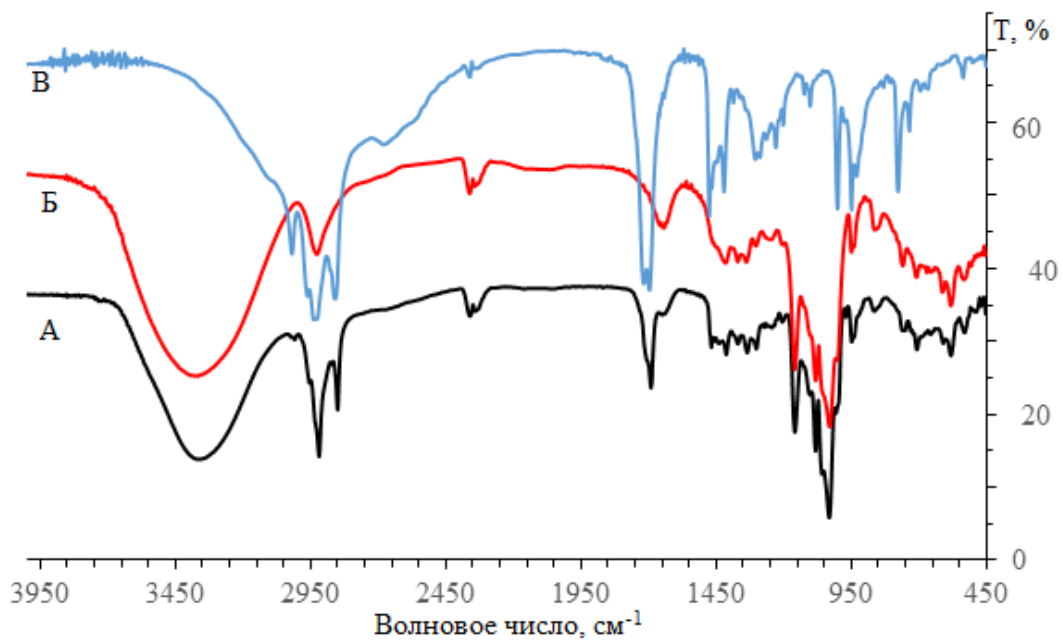


Рис. П.15. ИК-спектры жирных кислот (В), β-ЦД (Б) и их комплекса (А)

П 7. Компьютерное моделирование супрамолекулярных комплексов

Таблица П.7.

Энергетические параметры, рассчитанные в программе PM3 (HyperChem)

Вещества	E (Kcal/mol)
метил- β -циклодекстрин (Метил- β ЦД)	-1428.432
β -циклодекстрин (β ЦД)	-1458.758
сквален	-31.497
α -олеостеариновая кислота (α Э)	-109.385
три – α - олеостеарат (α Э ₃)	-302.109
Комплекс «сквален – метил- β ЦД»	-1484.314
Комплекс «сквален – β ЦД»	-1514.588
Комплекс « α -олеостеариновая кислота – β ЦД»	-1584.169
Комплекс «три- α -олеостеарат _ β ЦД»	-1779.480
Энтальпии комплексообразования, ΔH (Kcal/mol)	
Комплекс «сквален – метил- β ЦД»	-24.385
Комплекс «сквален – β ЦД»	-24.333
Комплекс « α -олеостеариновая кислота – β ЦД»	-16.026
Комплекс «три- α -олеостеарат _ β ЦД»	-18.613

П 8. Установление подлинности молочных жиров

Молочный жир относится к недешевой пище, поэтому производители активно используют современные технологии пищевой промышленности, вытесняя (частично или полностью) молочный жир растительными маслами. По требованиям ГОСТ Р52686-2006 при производстве сыров в качестве основного сырья допустимо использование только молока и некоторых продуктов его переработки. Поэтому при наличии растительных жиров в составе сыра следует указывать, что это не настоящий сыр, а сырный продукт, хотя (и это следует подчеркнуть!) сырный продукт не является вредным или опасным для употребления. А также добавление растительных жиров в молоко считается мошенническим актом.

Установление подлинности сыров

Типичная хроматограмма достоверно молочного жира представлена на рисунке П.16, А. Для записи хроматограммы требуется немногим более 10 мин, но метод не позволяет разделить все пики на хроматограмме.

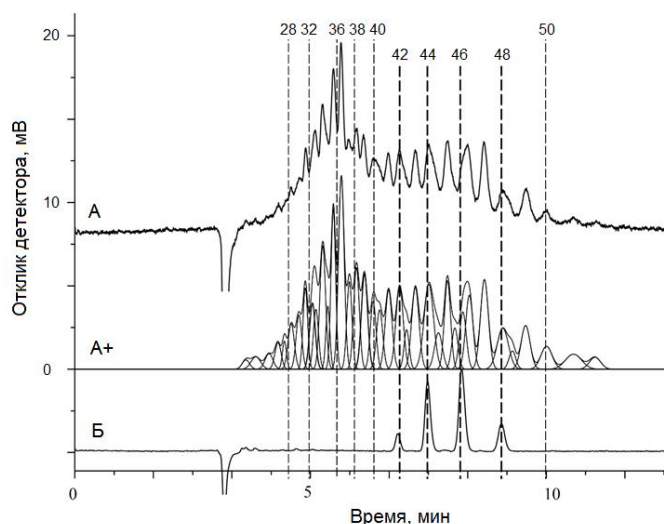


Рис. П.16. Разделение триацилглицеринов молочного жира по эквивалентному углеродному числу

Б - стандартные ТАГ (тримиристинат ECN=42, димиристинат-пальмитат ECN=44, миристинат-дипальмитат ECN=46 и трипальмитат ECN=48), А- молочный жир

Проблема выделения индивидуальных компонентов легко решается за счет обработки хроматограммы программой Magicplot student 2.7.2 (Рис. П.16, А+). На рисунке 16 представлена также хроматограмма синтетических ТАГ (Рис. П.16, Б), полученных этерификацией глицерина смесью миристиновой и пальмитиновой кислот, которая может быть использована для классификации ТАГ по эквивалентным углеродным числам. На рисунке П.17 представлены хроматограммы жиров пяти из 23 исследованных в настоящей

работе марок сыров, на которых представлены и два образца с замененом молочного жира на растительные масла.

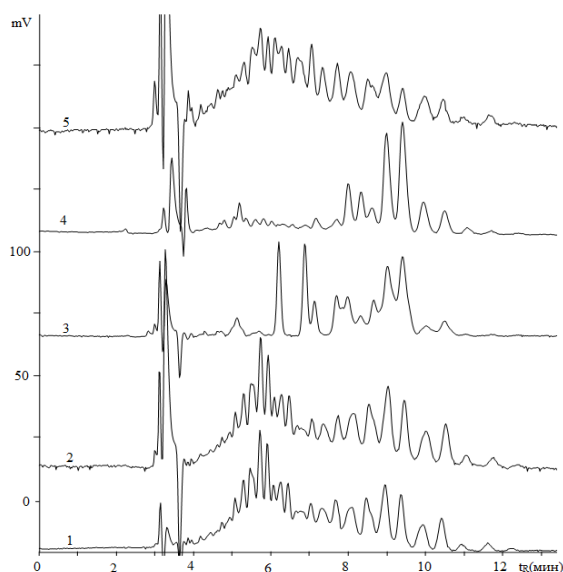


Рис. П.17. Хроматограммы ацетоновых экстрактов некоторых сыров

1 - Сыр №12 (из табл.1), 2 - Сыр №5, 3 - Сыр №17, 4 – Сыр №20, 5- Сыр №14

Из указанных образцов два (№12 и №5) являются настоящими жирами с хроматограммой масла, визуально не отличимой от масла заведомо коровьего молока. Но сыры №17 и №20 по очевидному изменению хроматографического профиля отчетливо отличаются от первых двух. Более того, на основе опыта исследования растительных масел можно предположить, что один (№20) из исследованных образцов изготовлен с использованием в основном пальмового масла, а в образце №17 использована смесь пальмового масла с линолево-олеиновым типа подсолнечного или кукурузного. Следовательно, для установления грубой фальсификации достаточно использовать метод «отпечатков пальцев» с визуальным контролем хроматографического профиля. Отметим, что визуально обнаруживаются различия в хроматографических профилях настоящего молочного жира и жира образца сыра №14 на том же рисунке. Основное отличие в данном случае состоит в том, что средний участок хроматограммы (с ТАГ с ЭУЧ в диапазоне 36 ÷ 44) в образце №14 содержит пики с большей интенсивностью по сравнению с молочным жиром. Но такое изменение следует предполагать в случае использования для приготовления сыра овечьего или козьего молока, содержащих большую долю ТАГ, образованных с участием радикалов кислот со средней длиной углеродной цепи (каприловой, C8, и каприновой, C10).

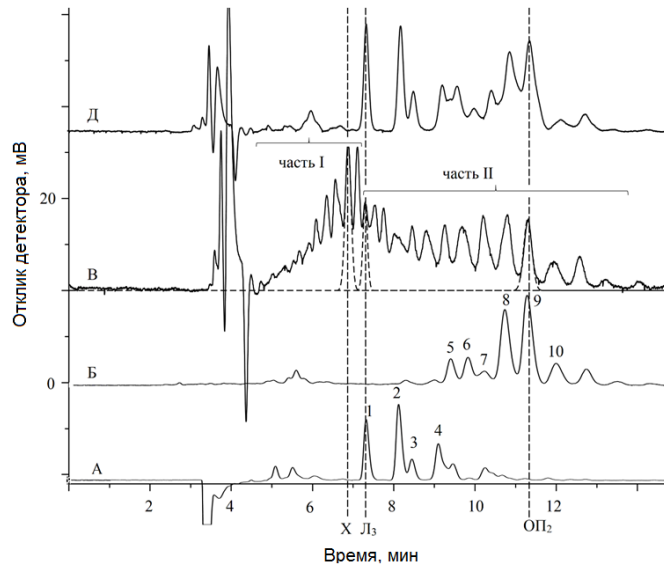


Рис. П.18. Хроматографический профиль подсолнечного (А) и пальмового (Б) масел, жира молока «Белый город» (В) и сыра №17 (Д).

Триацилглицерины: 1 - Л₃, 2 - Л₂О, 3 - Л₂П, 4 - ЛО₂, 5 - ЛОП, 6 - ЛП₂, 7 - О₃, 8 - О₂П, 9 - ОП₂, 10 - О₂С

В спорных ситуациях применение расчетных методов обязательно. Строго говоря, для оценки качества сыра можно было бы использовать многомерный вектор, но привычнее и проще оценивать углы в трехмерном пространстве. При этом выбор векторов будет зависеть от возможного (предположительно основного) характера фальсификации. В настоящее время дешевое пальмовое масло стало доступно для рынка РФ, поэтому его использование и использование традиционных для нашей страны растительных масел (типа подсолнечного) могут считаться наиболее вероятными вариантами фальсификации. На рисунке П.18 представлен один из вариантов таких координат.

По предлагаемому подходу общее содержание масла в сыре определяется гравиметрическим методом, как указано в Экспериментальной части. После записи хроматограммы определяют площади только трех указанных ниже пиков, рассчитывая долю каждого из них в сумме. Найденные доли используют в качестве координат векторной модели:

- координата по оси OX соответствует доле ТАГ с ЭУЧ, равным 35.6; ее величина определяется только содержанием молочного жира. Такого компонента нет ни в пальмовом масле, ни в линолево-олеиновом масле.
- координата по оси OY соответствует доле трилинолеата или иных ТАГ с ЭУЧ, равным или близким к 37.5, такой пик имеется и в молочном жире и в линолево-олеиновом масле, но практически отсутствует в пальмовом масле;
- координата по оси OZ соответствует доле олеата-дипальмитата (ТАГ с ЭУЧ, равным 47.2); этот пик присутствует и в молочном жире и в пальмовом масле.

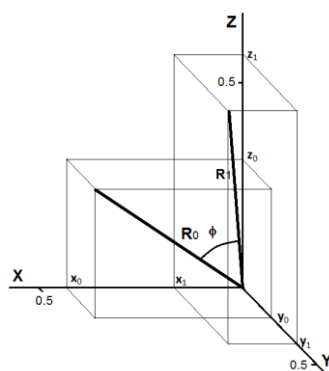


Рис. П.19. Векторная модель для оценки фальсификации сыра пальмовым и подсолнечным маслами; R_0 – реперный вектор; R_1 – вектор для сыра №17.

Таблица П.8.

Результаты применения векторной модели к 23 сортам сыров

Объекты	Масличность, масс % (n=3; ±0.1%)	Координаты, мол. доли			Величина угла ϕ_0 ,град
		x_i	y_i	z_i	
Молочный жир	100	0.446	0.228	0.326	0.00
Сорта сыров					
№1	26.0	0.442	0.22	0.338	1.46
№2	24.1	0.449	0.227	0.324	0.35
№3	26.0	0.467	0.216	0.317	2.39
№4	25.9	0.450	0.212	0.338	1.98
№5	28.0	0.457	0.234	0.309	1.95
№6	26.4	0.447	0.222	0.332	0.84
№7	27.1	0.452	0.229	0.319	0.83
№8	27.2	0.458	0.212	0.330	1.96
№9	28.3	0.445	0.217	0.338	1.55
№10	26.5	0.465	0.213	0.322	2.32
№11	27.1	0.438	0.241	0.321	1.43
№12	32.8	0.430	0.225	0.345	2.36
№13	27.8	0.434	0.233	0.334	1.42
№14	37.3	0.460	0.300	0.241	10.7
№15	33.2	0.434	0.260	0.306	3.7
№16	28.1	0.107	0.194	0.699	43.1
№17	29.5	0.020	0.389	0.591	46.7
№18	24.2	0.037	0.030	0.933	54.1
№19	32.4	0.067	0.103	0.829	49.8
№20	24.3	0.096	0.136	0.769	46.4
№21	27.4	0.023	0.181	0.796	50.5
№22 козий*	28.3	0.436	0.224	0.34	1.67
№23 овечий*	30.9	0.447	0.231	0.322	0.50

* - по словам продавцов.

По представленным данным искомый угол для первых 13 сортов сыра таблицы П.8 не превышает 2.5 градуса, что можно считать свидетельством изготовления сыра из коровьего молока. Относительно большой угол для образца №14 (с учетом хроматографического профиля) может быть связан с тем, что при его приготовлении использовали масло типа козьего или овечьего. Образцы №16 – № 21 были изготовлены из растительного масла, поэтому должны называться сырным продуктом.

В таком случае возможно построение вектора сравнения (R_0) (Рис. П.19), полученного по данным для заведомо молочного жира (реперный вектор). Затем строится другой вектор для исследуемого (i -ого, R_i) сыра и определяют характеристический угол между двумя векторами, Φ_{0i} .

$$R_{0i} = \arccos \frac{x_1 x_0 + y_1 y_0 + z_1 z_0}{\sqrt{(x_0^2 + y_0^2 + z_0^2)(x_1^2 + y_1^2 + z_1^2)}}$$

Результаты применения векторной модели к анализу масел 21 сорта сыра представлены в таблице П.7.

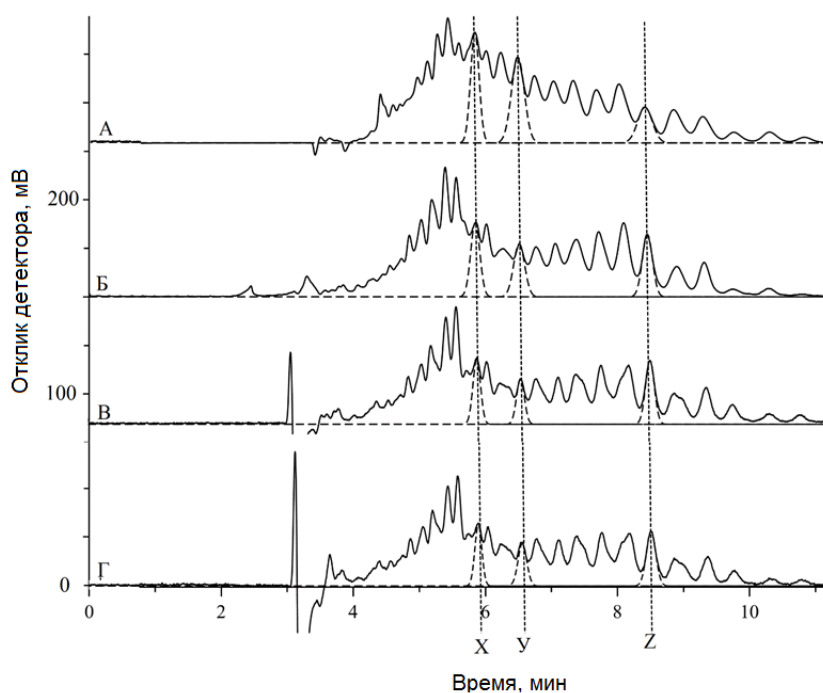


Рис. П.20. Выбор векторов для дифференциации коровьего, козьего и овечьего жира; Хроматограмма жира козьего молока (А), коровьего молока (Б), сыра из фальсификатов козьего (В) и овечьего (Г) жиров

Образцы №22 и №23 по отклонению вектора от реперного вектора неотличимы от коровьего жира, но, по словам продавцов, они были изготовлены из козьего и овечьего молока. Понятно, что дифференциация между такими тремя жирами требует выбора иных базисных векторов, который был произведен так, как указано на рисунке П.20.

В качестве одной из чувствительных к типу жира координат выбрана доля триацилглицеринов со средними значениями ЭУЧ. Результат сопоставления масел сыров по указанным на рисунке 20 координатам представлен в таблице П.9.

Сравнение жира козьего и коровьего молока по векторной модели в данном случае указывает на значительное различие между ними (угол между векторами составляет 22.5 градуса), что указывает эффективность выбранных в данном случае координат к предполагаемой фальсификации.

Таблица П.9.

Результаты применения векторной модели для дифференциации сыров из коровьего и козьего молока

Объекты	Координаты, мол. доли			Величина угла ϕ_{01} , град
	x_i	y_i	z_i	
Жир коровьего молока	0.355	0.244	0.401	0.0
Жир козьего молока	0.400	0.381	0.220	22.5
Сыр №14	0.434	0.342	0.224	21.1
Сыр №14*				4.9
Сыр №22 (козий?)	0.350	0.253	0.398	1.0
Сыр №23 (овечий?)	0.327	0.281	0.392	4.6

* рассчитаны с использованием жир козьего в качестве реперного вектора

В таком случае сыр, изготовленный, по словам продавца, из козьего молока изготовлен на самом деле из коровьего молока, а вот сыр овечьего молока несколько отличается от сыра из коровьего молока, но степень отклонения установить невозможно, поскольку нам было недоступно овечье молоко. Но судя по литературным данным о составе ТАГ овечьего молока в сравнении с козьим [208], фальсификация весьма вероятна и в данном случае. С предложенным выбором координат можно вернуться к анализу образца сыра №14 (Табл. П.8). Характеристический угол этого образца по отношению к коровьему жиру близок к характеристическому углу козьего жира по отношению к тому же реперному вектору. Но если в качестве реперного вектора взять вектор для козьего жира, то характеристический угол для образца сыра №14 уменьшается до примерно 5 градусов. Это не противоречит гипотезе о происхождении жира из молока типа овечьего или козьего.

Установление подлинности молока

Для экстракции молочных жиров сначала, мы высушили заданное количества молоко методом лиофильной сушки. После этого определили количество воды в молоке.

Затем молочный жир был экстрагирован петролейном эфиром 3 раза порциями по 15 мл. Растворитель удержали на вакуумном ротационном испарителе. Результаты определения масличности и количества вода в различных марках молока представлены на таблице

Таблица П.10.

Результаты применения векторной модели к 23 сортам молока

Объекты	влажность (%)	Масличность, масс % (n=3; ±0.14%)	Координаты, мол. доли			Величина угла ϕ_{01} , град
			x_i	y_i	z_i	
Молочный жир			0.446	0.228	0.326	0.00
Сорта молока						
№1	86.91	2.17	0.458	0.214	0.327	1.73
№2	88.06	0.87	0.451	0.218	0.331	1.96
№3	88.35	1.66	0.458	0.215	0.328	1.71
№4	88.25	0.88	0.446	0.223	0.331	0.69
№5	88.50	0.46	0.444	0.229	0.326	0.16
№6	87.74	2.21	0.462	0.222	0.316	1.82
№7	89.04	0.81	0.464	0.222	0.314	2.12
№8	87.85	1.18	0.466	0.217	0.318	2.27
№9	88.06	2.17	0.458	0.218	0.324	1.48
№10	88.9	2.01	0.448	0.227	0.325	0.25
№11	89.01	1.98	0.461	0.222	0.317	1.79
№12	88.99	1.89	0.454	0.230	0.316	1.24
№13	88.28	2.41	0.450	0.231	0.320	0.76
№14	88.01	1.50	0.452	0.216	0.331	1.37
№15	86.92	1.82	0.460	0.232	0.308	2.19
№16	87.76	1.28	0.457	0.212	0.331	1.89
№17	88.69	0.62	0.459	0.219	0.322	1.51
№18	87.32	1.94	0.450	0.231	0.319	0.81
№19	88.08	1.07	0.456	0.217	0.326	1.42
№20	88.36	0.71	0.449	0.226	0.325	0.33
№21	87.66	1.82	0.448	0.218	0.334	1.29
№22	88.88	0.83	0.058	0.220	0.723	46.51
№23 козье	83.71	6.68	0.418	0.405	0.177	22.26

Из представленных данных видно, что в молоке доля воды составляет приблизительно 87-89% и жирность имеет 0.45-2.5%. Более этого в натуральном молоке «козье» содержание жира может достигать 6.8%. Из представленных в таблице П.10

следует, что для образца молока №22 молочные жиры были заменены или что в него введено стороннее масло.

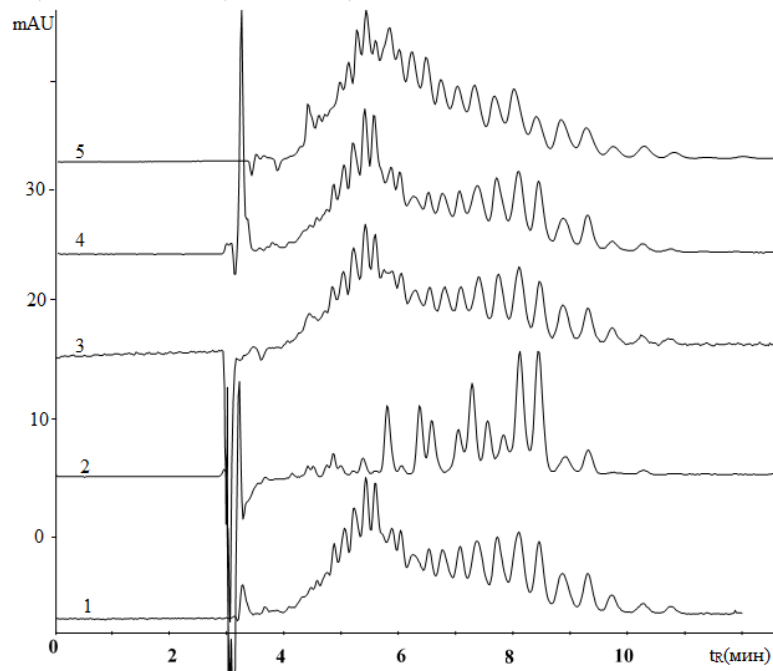


Рис. П.21. Хроматограммы ацетоновых экстрактов некоторых сортов молока
1 - Молоко №1 (из табл. 4.4), 2 - молоко №22, 3 - молоко №3, 4 – молоко №5, 5- молоко №23.