

На правах рукописи



НГУЕН ВАН АНЬ

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

Специальность 02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Воронеж – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном автономного образовательном учреждении высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Научный руководитель: Доктор химических наук, профессор
Дейнека Виктор Иванович

Официальные оппоненты: **Яшкин Сергей Николаевич**, доктор химических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Самарский государственный технический университет», химико-технологический факультет, кафедра аналитической и физической химии, доцент
Карпов Сергей Иванович, кандидат химических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», химический факультет, кафедра аналитической химии, доцент

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», г. Саратов

Защита состоится «13» мая 2020 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.038.19 по химическим наукам при Воронежском государственном университете по адресу: 394018 г. Воронеж, Университетская пл., 1, химический факультет, ауд. 365.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Воронежского государственного университета и на сайте <http://www.science.vsu.ru>.

Автореферат разослан «18» марта 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



Столповская Н.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. 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). 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 обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ).

Успехи направления исследования биологических активных веществ связывают не только с их обнаружением и созданием, но и с оптимизацией их применения. В свете развития современных технологий направление для оптимизации применения высоко гидрофобных соединений - липидов является получение их супрамолекулярных комплексов с циклодекстринами для увеличения растворимости субстанций, улучшения физической и химической стабильности активных субстанций и повышения их биодоступности.

Цель настоящего исследования. Определение ТАГ, 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, жирных кислот и ТАГ - с циклодекстринами.

Для достижения поставленной цели решались следующие основные задачи:

- разработка способа экстракции, концентрирования и очистки масел, исключая разрушение или изомеризацию лабильных полиеновых соединений;
- подбор хроматографических условий для разделения ТАГ и жирных кислот с сопряженными двойными связями;
- установление закономерностей разделения ТАГ и жирных кислот в условиях ОФ ВЭЖХ, определение параметров относительного удерживания, включая построение карты разделения, и объяснение полученных закономерностей;
- создание аналитического обеспечения для контроля процесса обогащения октадекатриеновыми кислотами гидролизата соответствующих масел за счет образования тубулатоклатратов с мочевиной;
- создание способов аналитического обеспечения для контроля комплексообразования сквалена, некоторых масел и жирных кислот с сопряженными двойными связями с циклодекстринами.

Научная новизна работы.

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 (СОК) 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 работы. 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 ТАГ, содержащих радикалы сопряженных октадекатриеновых кислот, введена в курс «Хроматографические и ионообменные методы». Внедрение предлагаемой системы индексаций позволит расширить аналитические возможности лабораторий при определении ТАГ, содержащих радикалы с сопряженными двойными связями, 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 *n*-гексаном.

2. Способ определения видового состава ТАГ, содержащих радикалы кислот с сопряженными двойными связями в растительных маслах в условиях 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, включая ОФ ВЭЖХ и хроматографию на Ag⁺-фазе.

Апробация результатов работы. Основные результаты исследований были представлены на: 7-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2018» (г. Воронеж 2018), XV Международной научно-практической конференции «Иониты-2017» (г. Воронеж 2018), 7-ой Международной научно-практической конференции «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), II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 20-летию образования Ботанического сада НИУ «БелГУ» (г. Белгород 2019), IV Всероссийской студенческой научно-практической конференции «Химия: достижения и перспективы». (г. Ростов-на-Дону 2019), Международном симпозиуме «Innovations in life sciences» (г. Белгород 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 журналов, рекомендованных ВАК РФ, из которых 7 в международных журналах, индексируемых в SCOPUS и WoS, 16 материалов в сборниках трудов конференций и всероссийских журналах.

Объем и структура 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Особенность работы состоит в том, что объекты исследования содержат хромофоры (сопряженные двойные связи), позволяющие использовать УФ-детектирование, т.е. одновременно детектировать при маленькой концентрации и регистрировать электронные спектры разделенных ТАГ.

Во *введении* показана актуальность проблемы исследования, определены цель и задачи диссертационной работы, представлены положения, выносимые на защиту, новизна и практическая значимость, описана структура диссертации и приведены сведения о публикациях.

Первая глава посвящена обзору литературы. Рассмотрен обзор по маслам, содержащим радикалы сопряженных жирных кислот (СЖК), включая классификацию жирных кислот в составе ТАГ растительных масел, виды жирных кислот с сопряженными двойными связями (СДС), особенности их свойств и их источники. Приведены методы анализа растительных масел. В обзоре показаны особенности электронных и колебательных спектров (УФ и ИК), использованные для определения СЖК. Сделан обзор по хроматографическим методам при определении ТАГ, а также кислот и их производных, содержащих СДС. Описан обзор методов получения и аналитического контроля комплексов включения веществ «гостей» в полости циклодекстринов.

Вторая глава содержит описание основных экспериментальных методов, использованных в работе.

В *третьей главе* представлены результаты выбора хроматографических условий для разделения ТАГ, определены влияние состава подвижной фазы (ПФ), стационарной фазы, температуры, скорости ПФ на разделение ТАГ. Установлено, что удобными хроматографическими условиями для разделения ТАГ методом ОФ

ВЭЖХ являются: колонка марки Kromasil 100-5C18 (250×4.6 мм, 250×4.0 мм и 4.6×75 мм); система подвижной фазы «ИПС - ацетонитрил» (для спектрофотометрического детектирования) и «ацетон – ацетонитрил» (для рефрактометрического детектирования); скорость ПФ: 0.8-1.0 мл/мин (для обычной колонки) и 100 мкл/мин (для микроколонок). Для разработанного способа стандартное отклонение повторяемости факторов удерживания ТАГ не хуже 0.002 единиц, а относительное стандартное отклонение определения площадей пиков (с использованием программы Magicplot) не превышает 1% для основного компонента и для суммы площадей пиков не превышает 0.5%.

Таблица 1. Параметры удерживания ТАГ базовых масел

ТАГ ^a	Логарифмы факторов удерживания ТАГ масел семян растений (S=0.002)					
	трихозант	жакаранда	катальпа	момордика	календула	кентрантус
X ₃	0.703	0.733	0.753	0.761	0.775	0.827
X _{2Л}	0.820	0.841	0.854	0.858	0.867	0.899
XЛ ₂	0.939	0.950	0.955	0.956	0.961	0.976
X _{2О}	0.962	0.983	0.995	0.998	1.007	1.040
X _{2П}	0.993	1.014	-	1.030	1.039	-
XЛО	1.080	1.091	1.096	1.097	1.101	1.117
XЛП	1.112	1.124	1.127	1.128	1.133	1.149
X _{2С}	1.128	1.148	-	1.164	1.174	-
XО ₂	1.221	1.234	1.237	1.237	-	-
XЛС	1.246	1.258	1.261	1.263	-	1.284
Инкременты для переходов Δ(i→j) ^b						
X→Л	0.118	0.109	0.101	0.098	0.093	0.076
Л→О	0.141	0.142	0.141	0.140	0.141	0.140
О→П	0.032	0.032	0.032	0.031	0.032	0.032
П→С	0.135	0.135	0.134	0.135	0.135	0.134
X	9Z,11E,13Z Пу – пуни- ковая к-та	8Z,10E,12Z Ж – жака- рандовая	9E,11E,13Z Кт – ката- льповая	9Z,11E,13E αЭ – α-эле- остеарино- вая	8E,10E,12E Кл - календовая	9E,11E,13E βЭ – β-эле- остеарино- вая

^a Триацилглицерины обозначали по общепринятой схеме, указывая буквами радикалы кислот без дифференциации их положения в молекуле. Буквенные обозначения радикалов кислот: Л – Линолевая, О – Олеиновая, П – Пальмитиновая, С – Стеариновая и X – сопряженная октадекатриеновая (C18:3) кислоты.

^b Δ(i→j) - Инкремент для замены одного радикала i на радикал j.

Отметим, что при определении видового состава ТАГ в ОФ ВЭЖХ возможно использование инкрементного подхода¹. В данном методе используются вклады функциональных групп для расчета изменения удерживания вещества при замене радикалов двух жирных кислот в соответствующих парах ТАГ, если при этом остальные два радикала в каждой из молекул остаются неизменными: Δ(i→j) = lgk(j) – lgk(i). В настоящей работе была показана эффективность инкрементного подхода и анализа относительного удерживания для определения видового состава

¹ Дейнека В.И. [и др.]. Инкрементный подход при определении состава триглицеридов, *Хим.-Фарм. Ж.* - 2002 - Т. 36. - С.44–47.

ТАГ (табл. 1 и рис 1.). Показано, что одинаковое изменение структуры радикалов кислот в молекуле ТАГ приводит к идентичному изменению инкрементов, а величины инкрементов не зависят от типа масла.

В работе сопоставлены параметры удерживания однотипных ТАГ в зависимости от структуры сопряженных октадекатриеновых кислот. Установлено, что для одного и того же положения сопряженных двойных связей (по углеродной цепи) при замене *цис*-двойной связи на *транс*-конфигурацию удерживание увеличивается, а при перемещении метиленовых групп из внешней части во внутреннюю удерживание уменьшается. Полный порядок удерживания радикалов СОК постоянен при всех составах ПФ (рис. 2):

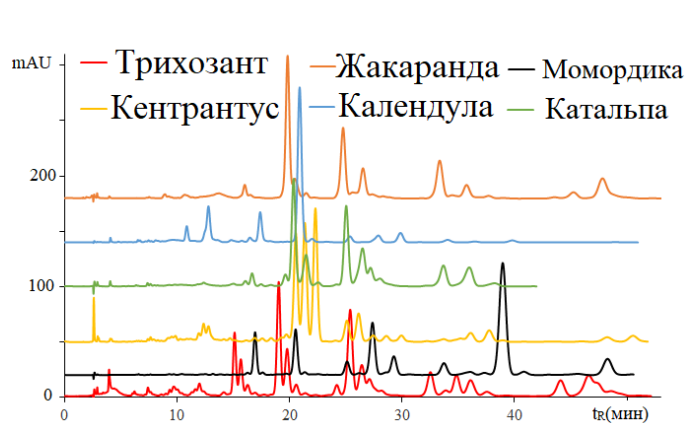
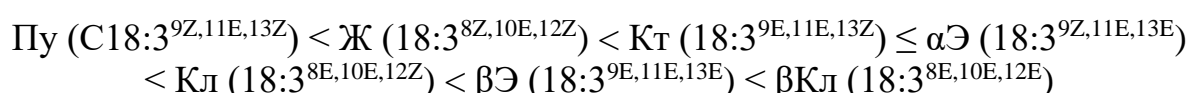


Рис 1. Разделение ТАГ базовых масел в ОФ ВЭЖХ; колонка Кромасил С18, ПФ: 35% ИПС и 70% АЦН

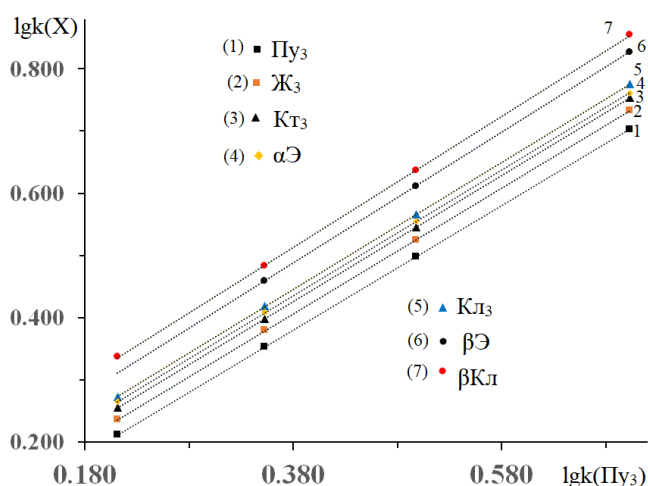


Рис 2. Карта разделения ТАГ, содержащих СОК, Элюент: ИПС и ацетонитрил

Разница между временами удерживания ТАГ с радикалами катальповой 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. Найденные закономерности разделения ТАГ, содержащих радикалы сопряженных октадекатриеновых кислот, подобны результатам разделения самих жирных кислот. Таким образом, в обращенно-фазовой хроматографии пуниковая кислота (Пу) удерживается слабее, а β -календовая кислота (β КЛ) – сильнее.

На основе анализа литературных данных по строению привитых обращенных фаз и нормальных (*n*-) алканов в твердом состоянии была предложена модель строения стационарной обращенной фазы:

- Сорбционно активные силанольные группы кремнекислородного тетраэдра $\{SiO_4\}$ появляются на ориентированных вверх чередующихся кремнекислородных тетраэдрах в порядке: «вершиной вверх – вершиной вниз».

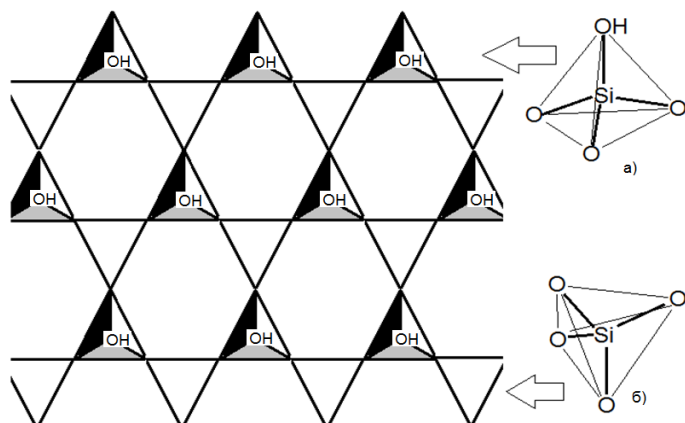


Рис. 3. Сетка кремнекислотродных тетраэдров с чередующейся ориентацией вверх-вниз со свободной силанольной группой на вершине для орторомбической структуры кристобалита тетраэдра

без стерических напряжений поместиться алкильные радикалы молекул-сорбатов. т.е. *n*-алкильные радикалы сорбатов могут беспрепятственно проникать внутрь привитой фазы, обеспечивая распределительный механизм.

Предложенная и обоснованная выше схема позволяет объяснить закономерности удерживания ТАГ и самих жирных кислот как функции их строения (Рис. 4). Так, поскольку при *цис*-конфигурации двойной связи в непредельных кислотах проникновение радикалов в глубину привитой связи затрудняется по стерическим причинам, то удерживание непредельных жирных кислот и их производных должно быть тем выше, чем дальше от конца алкенильной части кислотного радикала находится двойная связь. «Линейная» конформация *транс*-изомеров напоминает конфигурацию насыщенных цепей, поэтому для проникновения *транс*-изомеров в глубь привитой фазы стерических затруднений практически нет, поэтому удерживание изомеров с *цис*-связями, при сорбции которых возникают стерические препятствия, всегда меньше, чем для *транс*-изомеров.

- По стерическим причинам дериватизации алкилдиметилхлорсиланом подвергается лишь половина этих поверхностных силанольных групп. Таким образом, химически модифицируется только один из четырех последовательно соединенных кремнекислородных тетраэдров.

Из анализа строения *n*-алканов в твердом состоянии следует, что между привитыми алкильными группами могут

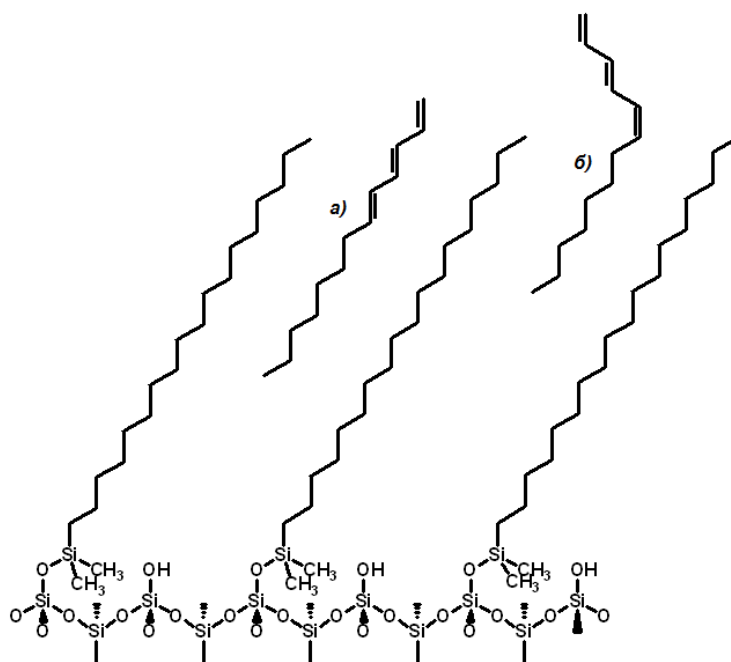


Рис. 4. Модель проникновения в привитой слой химически модифицированного силикагеля алкильных (а) и алкенильных (б) радикалов сорбатов

проникновения *транс*-изомеров в глубь привитой фазы стерических затруднений практически нет, поэтому удерживание изомеров с *цис*-связями, при сорбции которых возникают стерические препятствия, всегда меньше, чем для *транс*-изомеров.

Для подтверждения правильности отнесения пиков, были использованы параметры электронных спектров поглощения и масс-спектров (ионов – аддуктов иона аммония с молекулами ТАГ). Отличительной особенностью электронных спектров сопряженных полиеновых соединений является их электронно-колебательная структура, полосы в которой соответствуют вертикальным переходам электрона из основного колебательного состояния и основного электронного состояния одновременно на несколько различных колебательных состояний возбужденного электронного состояния (рис.5).

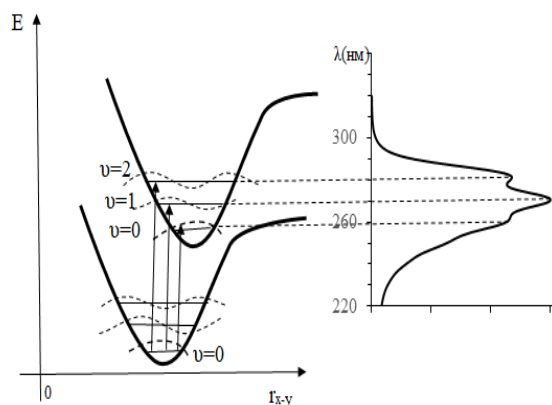


Рис 5. Схема электронно-колебательных переходов сопряженных полиеновых соединений

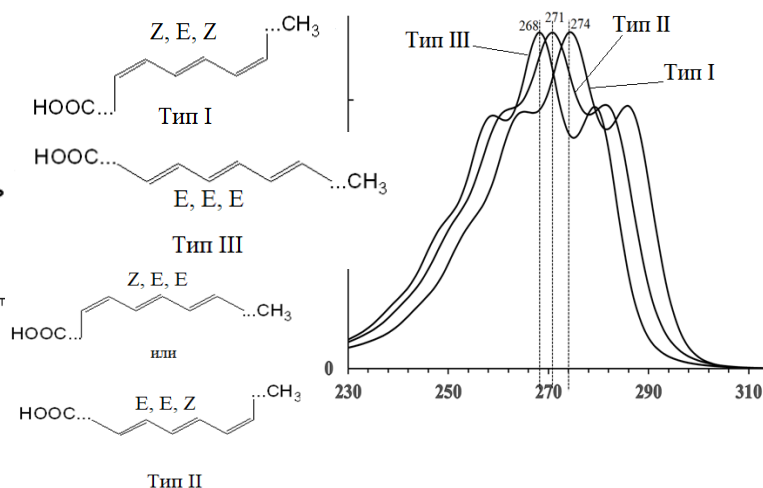


Рис 6. Три типа конфигураций цис/транс в природных СОК и их электронные спектры

Известно, что сопряжение вызывает батохромный сдвиг полосы поглощения, пропорциональный числу двойных связей, находящихся в сопряжении в хромофоре молекулы. Но не только число двойных связей, находящихся в сопряжении, имеет значение для положения максимума светопоглощения, но и стереохимия двойной связи. Так, самой короткой длиной волны максимума поглощения обладают спектры кислот в полной *транс*-конфигурации. Поэтому при замене *цис*-конфигурации на *транс*-конфигурацию наблюдается гипсохромный сдвиг максимумов абсорбции. Это можно видеть при сопоставлении спектров изомерных октадекатриеновых кислот (рис. 6). При этом для известных природных источников найдено только три варианта конфигурации боковых С=С-связей и соответственно три конфигурации имеют три типа электронных спектров. Но, тем не менее, сравнение электронных спектров каждого пика является ценным инструментом дифференциации структуры ТАГ.

При использовании выше представленных методов в нашей работе впервые получены данные о накоплении масла семян с сопряженными октадекатриеновыми двойными связями в большом числе объектов Российской и Вьетнамской флоры (табл. 2). В работе были проанализированы не только масла с октадекатриеновыми кислотами, но и масла, в состав которых входили радикалы октадекадиеновых и октадекатетраеновых кислот.

Таблица 2. Расчеты состава основных ТАГ масел с сопряженными триеновыми радикалами при УФ детектировании

X	Масло семян	Содержание видов ТАГ, моль % (S=0.2, n=3)								
		X ₃	X ₂ L	XL ₂	X ₂ O	X ₂ П	XL _O	XLП	X ₂ C	XLС
αЭ	М. кохинхинская	5.3	8.0	5.3	10.0	3.7	5.3	2.5	49.3	10.2
αЭ	М. харантия	9.9	11.5	2.5	28.8	3.1	3.6	-	37.9	2.84
Пу	М. бальзамин	3.9	2.2	-	6.3	6.9	4.6	4.6	3.7	4.4
αЭ		2.4	1.7	-	4.0	5.7	2.9	4.6	3.1	2.9
αЭ	М. Subangulata	0.8	0.5	0.4	1.5	-	1.9	0.7	91.3	2.0
αЭ	Тунг масло	54.5	15.4	2.7	14.2	3.0	3.7	1.4	3.3	0.8
αЭ	Валериана	0.6	13.1	56.1	1.7	0.8	12.1	8.2	0.6	4.5
αЭ	Манкетти	1.6	11.5	24.1	7.1	4.3	20.1	12.6	3.8	10.3
αЭ	Кентрантус	-	16.4	7.7	1.4	-	1.6	4.6	-	3.5
βЭ		-	20.7	10.3	1.5	-	2.0	6.0	-	4.5
Ж	Жакаранда	1.4	22.5	24.8	6.3	0.4	18.0	6.4	0.7	15.7
Пу	Гранат	69.2	9.2	-	7.5	8.8	-	1.5	3.8	-
Пу	Трихозант	6.2	18.4	3.0	17.2	4.3	10.3	8.1	4.3	20.2
Пу	(T. nudiflora)	1.0	6.4	7.7	1.6	1.1	2.6	6.0	1.0	2.0
αЭ		1.6	8.6	8.2	2.1	1.9	5.9	5.4	1.2	4.2
Пу	(T. dubia)	1.1	29.1	27.8	4.6	17.2	12.3	-	-	6.7
Кт	Катальпа	1.1	12.0	42.2	2.3	-	7.7	5.4	-	2.3
Кл	Календула	6.6	55.6	5.2	4.1	4.8	3.3	1.3	1.3	-
Кт	Хилопсис	1.6	11.9	6.7	4.4	0.7	2.8	6.2	2.2	3.2
Пу	(Diplocyclos palmatus)	-	4.5	37.7	-	-	23.5	21.4	-	12.1
αЭ	(Gynostemma pentaphyllum)	55.2	13.8	1.5	6.5	4.8	1.2	2.5	3.2	-
Пу	(Ecballium elaterium)	-	1.0	20.6	-	-	32.0	14.1	-	12.5

Использование спектрофотометрического детектора при маленькой концентрации масла ($0.2 \div 0.5$ мг/мл) в анализируемой пробе позволяет применять и микроколоночную хроматографию с использованием хроматографа марки Милихром. Одна из проблем при количественном определении ТАГ растительных масел методом ОФ ВЭЖХ – существование так называемых проблемных пар ТАГ, - соединений с близкими временами удерживания, полное (на уровне базовой линии) разделение которых труднодостижимо. Понятно, что при переходе к микроколоночной хроматографии проблема не исчезает, а усугубляется. Но решение может быть получено использованием специальных программ, способных сумму неразделенных пиков представить в виде набора индивидуальных составляющих. Одной из таких программ является бесплатно распространяемая программа MagicPlot Student 2.0 (<https://magicplot.com/downloads.php>), использованная в настоящей работе. Такая программа позволяет разложить неразделенные пики со степенью разделения R_s не менее 0.4 с погрешностью 1 %.

На рис. 7 сопоставлены хроматограммы эстолидов масла сапиума на Милихроме (условие 1) и на обычной колонке (условие 2). Несмотря на то, что эффективность разделения пиков заметно снизилась, определение основных

компонентов масла не вызывает проблем, и с

использованием программы *MagicPlot* удается детектировать все компоненты.

Для количественного анализа видового состава ТАГ при спектрофотометрическом детектировании использовали площади пиков с поправкой на число радикалов октадекатриеновой кислоты в молекуле ТАГ. Для масла семян, содержащего один радикал из набора возможных сопряженных кислот, хроматограмму можно регистрировать при длине волны максимального поглощения. А для масла, содержащего более одного радикала изомерных

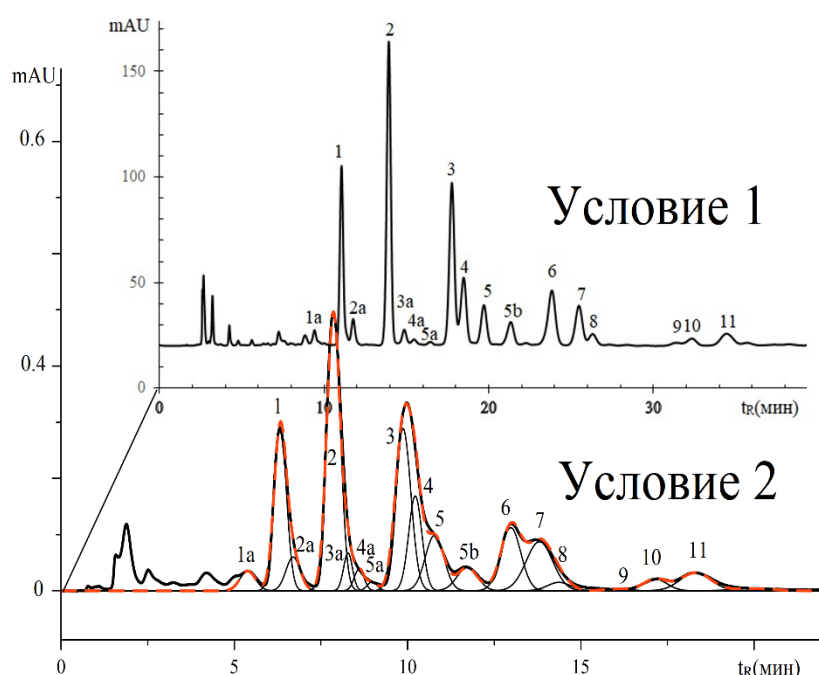


Рис. 7. Разделение эстолидов масла семян *Camellia* при 266 нм и результат применения программы *Magicplot*. 1. АХЛн₂, 2. АХЛн₁Л, 3. АХЛ₂, 4. АХЛнО, 5. АХЛнП, 6. АХЛО, 7. АХЛП, 8. АХЛнС, 9. ЛнЛ₂, 10. АХО₂, 11. АХЛС + АХОС. Где: А – 8-гидроксиокта-5,6-диеновая, Х – (2Е,4Z)-дека-2,4-диеновая, Лн – α-линоленовая кислоты

сопряженных кислот, возникает проблема количественного определения из-за различия коэффициентов экстинкции. Но она может быть решена регистрацией хроматограммы при длине волны аналогичной изобестической точке, т.е. при равенстве молярных коэффициентов светопоглощения, без введения поправок на различие в коэффициентах экстинкции. В настоящей работе предложен уникальный для ТАГ способ определения такой длины волны. Так, например, для определения ТАГ масел с любыми комбинациями радикалов известных изомерных сопряженных октадекатриеновых кислот следует использовать универсальную длину волны - 278 нм. Для ТАГ масел, содержащих радикалы сопряженных октадекадиеновой и октадекатриеновой кислот изобестическая точка находится при 243 нм, а для тетраеновых (α и β-паринаровой) – при 310 нм.

По результатам проведенных исследований были определены уравнения относительного удерживания ТАГ, содержащих радикалы СОК. Для определения уравнений относительного удерживания ТАГ обрабатывали хроматограммы базовых масел, используя в качестве соединения сравнения трипункат (Пу₃) (основной компонент масла граната) в системе элюентов ИПС - ацетонитрил с различными концентрациями ИПС, табл.3.

$$\lg k_i = a_1 \times \lg k(\text{Пу}_3) + a_0 \quad (1)$$

Установлено, что уравнение (1) при анализе ТАГ при переходе от колонок марки Kromasill к колонкам марок Lichrosphere 100-5C18; Nucleosil 100-5C18 и Diasfer 100-5C18 остается практически неизменным, что позволило их использовать при анализе масел с СОК в другой лаборатории (Лаборатория

аналитической химии института природных соединений Вьетнамской академии наук) и на другой стационарной фазе - Hypersil ODS C18, 5мкм. Таким образом, внедрение предлагаемой системы индексаций позволит расширить аналитические возможности лабораторий при определении ТАГ, содержащих СОК, 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.

Таблица 3. Параметры уравнения (1) относительного удерживания для ТАГ, содержащих СОК, относительно трипунктата (Пу₃)

TG	Коэф.*	**	X – сопряженные жирные кислоты						
			Пу	Ж	Кт	αЭ	Кл	βЭ	βКл
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 _{2Л}	a ₁	± 0.014	1.042	1.048	1.052	1.047	1.054	1.062	н.о.
	a ₀	± 0.008	0.089	0.104	0.116	0.123	0.127	0.154	н.о.
ХЛ ₂	a ₁	± 0.028	1.091	1.086	1.090	1.085	1.092	1.087	н.о.
	a ₀	± 0.013	0.174	0.187	0.190	0.195	0.195	0.212	н.о.
X _{2О}	a ₁	± 0.028	1.101	1.106	1.112	1.104	1.115	1.120	н.о.
	a ₀	± 0.013	0.189	0.206	0.215	0.224	0.225	0.255	н.о.
X _{2П}	a ₁	± 0.039	1.105	1.103	н.о.	1.107	1.118	н.о.	н.о.
	a ₀	± 0.020	0.218	0.239	н.о.	0.253	0.256	н.о.	н.о.
ХЛО	a ₁	± 0.037	1.147	1.144	1.151	1.144	1.152	1.135	н.о.
	a ₀	± 0.018	0.276	0.281	0.289	0.295	0.294	0.317	н.о.
ХЛП	a ₁	± 0.044	1.148	1.146	1.155	1.146	1.156	1.146	н.о.
	a ₀	± 0.022	0.307	0.319	0.318	0.325	0.323	0.346	н.о.
X _{2С}	a ₁	± 0.037	н.о.	1.170	н.о.	1.171	1.183	н.о.	н.о.
	a ₀	± 0.018	н.о.	0.327	н.о.	0.343	0.345	н.о.	н.о.
ХО ₂	a ₁	± 0.054	1.209	1.206	1.213	1.200	н.о.	н.о.	н.о.
	a ₀	± 0.026	0.374	0.387	0.387	0.396	н.о.	н.о.	н.о.
ХЛС	a ₁	± 0.050	1.216	1.210	1.218	1.214	н.о.	1.216	н.о.
	a ₀	± 0.026	0.394	0.408	0.408	0.412	н.о.	0.434	н.о.

* в уравнении (1); ** стандартное отклонение; н.о. – не определены

В работе нами был приложен метод ОФ ВЭЖХ для определения подлинности сыров и молока. Для установления фальсификации сыров и молока может быть использован метод отпечатков пальцев, по которому визуально, или прямым наложением хроматограмм можно оценивать идентичность хроматографических профилей. Более строгий количественный метод предполагает выбор характеристических пиков ТАГ, площади которых используются для построения векторной модели. В таком случае выбор базиса зависит от предполагаемого типа фальсификации, а различие между образцами характеризуется углом между вектором для исследуемого образца и реперным вектором (рис. 8).

При анализе 23 марок сыра было установлено, что большая часть из них изготовлена из натурального коровьего молока. Но для 7 марок получены большие

значения характеристических углов, а сопоставление полученных для этих марок сыров хроматограмм позволило определить и характер фальсификации: за счет замены коровьего жира на пальмовое или линолево-олеиновое масла. Также были проанализированы 23 марки коровьего молока. Для экстракции жиров молока, нами предложен новый метод с использованием лиофильной сушки. Установлено, что характеристический угол для 21 марки молока не превышал 2.5 градусов, и в образце №22 к молочным жирам была сделана добавка стороннего масла.

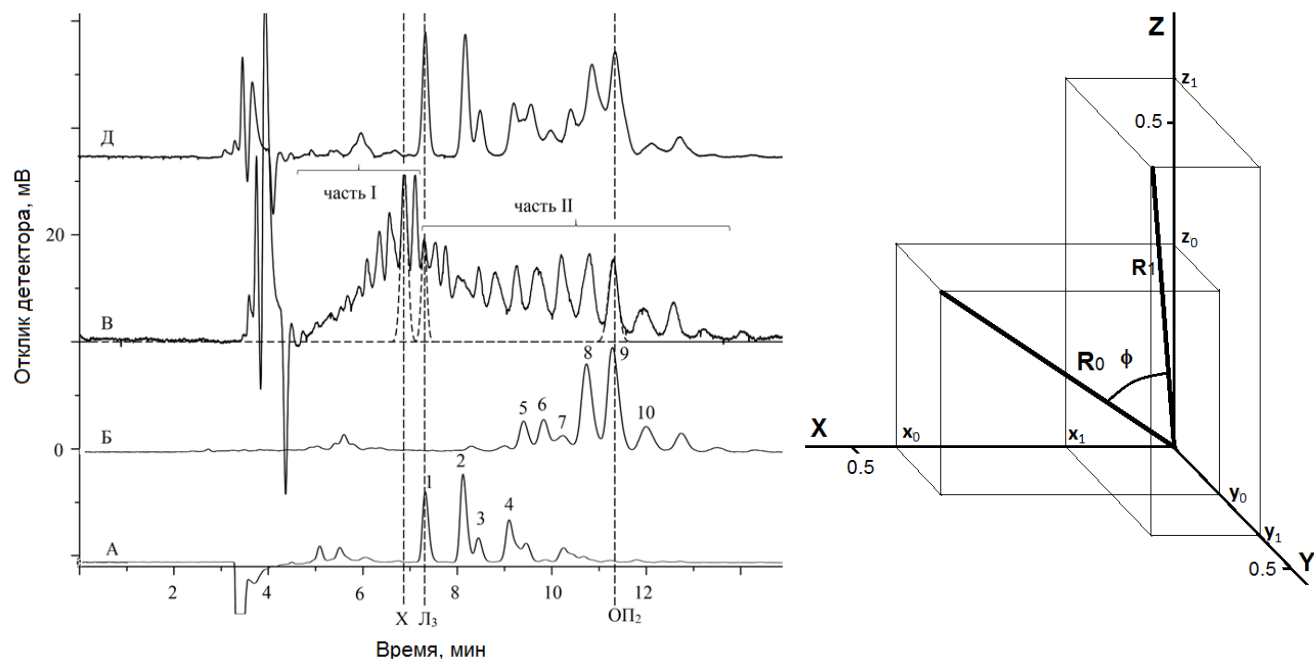


Рис. 8. Хроматографический профиль подсолнечного (А) и пальмового (Б) масел, жира молока «Белый город» (В) и сыра №17 (Д) и векторная модель для оценки фальсификации сыра ТАГ: 1 - Л₃, 2 - Л₂О, 3 - Л₂П, 4 - ЛО₂, 5 - ЛОП, 6 - ЛП₂, 7 - О₃, 8 - О₂П, 9 - ОП₂, 10 - О₂С; R₀ – реперный вектор для жира молока «Белый город»; R₁ – вектор для сыра №17

Во второй части работы была решена проблема получения водно-дисперсной формы масла и жирных кислот в виде супрамолекулярных комплексов с циклодекстринами для увеличения биологической доступности. Была разработана оригинальная технология, которая позволяет получить комплексы в виде порошков. Также разработаны методы контроля процесса комплексообразования и состава полученных продуктов: липидный состав определен методом ОФ ВЭЖХ после разрушения комплексов ацетоном (табл. 4). Образование комплекса включения подтверждено методами ИК и УФ-спектроскопии, рентгенофазового анализа, дифференциально-термического анализа и ¹H-ЯМР.

Таблица 4. Содержание и выход комплексов

Комплекс	Содержание «гостя» (масс. %)	Выход комплекса (%)
Сквален - βЦД	10.5 ± 0.2	60.1 ± 0.6
Сквален - метил-βЦД	30.1 ± 0.3	-
Масло момордики - βЦД	35.0 ± 0.3	-
Жирные кислоты - βЦД	20.1 ± 0.2	31.5 ± 0.5

Результаты показали, что во всех комплексах молекула «гостя» была успешно введена в полость циклодекстрина. Выводы подтверждаются компьютерным моделированием с оптимизацией геометрии комплекса методом МРЗ. Было показано, что растворимость и стабильность «гостя» значительно увеличились.

В работе был найден способ обогащения сопряженными жирными кислотами с использованием комплексов включения с мочевиной. Мочевина при наличии подходящих молекул «гостя» способна образовывать сложные тубулатоклатраты, диаметр полости в которых равен 5\AA , что соответствует поперечному диаметру линейных алканов. При появлении двойной связи возникают стерические затруднения, поэтому такие вещества хуже образуют клатраты. Но если молекулы имеют *транс*-двойные связи, то это благоприятствует образованию таких соединений. Следовательно, существует возможность разделения сложных смесей кислот за счет образования тубулатоклатратов, реализованная в настоящей работе. При обработке таким способом гидролизата масла момордики в осадок клатратов уходят насыщенные кислоты и раствор обогащается α -элеостеариновой кислотой. В случае смеси *цис*- и *транс*-изомеров в комплекс переходят вещества с *транс*-конфигурацией, а в растворе остается в основном *цис*-изомер. Показано, что способность образования комплексов жирных кислот с мочевиной уменьшается в ряду: стеариновая > пальмитиновая > β -элеостеариновая > олеиновая > α -элеостеариновая > линолевая кислоты. Это согласуется с изменением диаметров поперечных сечений молекул жирных кислот, рассчитанных с помощью программы MarvinSketch.

Для контроля процессов образования, сохранности и растворимости жирных кислот были разработаны способы их определения методом традиционной ОФ жидкостной хроматографии и другим способом – хроматографии на Ag^+ -катионообменниках. Последний способ известен как специфический для разделения полиеновых соединений по образованию π -комплексов между ионом серебра и непредельной кислотой. В этом методе используется специальная катионообменная колонка в Ag^+ -форме и разделение кислот осуществляется по степени непредельности в элюентах системы «уксусная кислота – ацетонитрил – *n*-гексан». Нами были найдены условия разделения. Были получены результаты, при которых достигается разделение, но, по сравнению с ОФ ВЭЖХ, меняется порядок элюирования полиненасыщенных жирных кислот.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Предположены методы экстракции масел из семян растений, содержащих высоко химически лабильные соединения (с сопряженными $\text{C}=\text{C}$ -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 ОФ ВЭЖХ в элюентах системы «ацетонитрил – ИПС», обеспечивающий достаточную для дифференциации изомерных октадекатриеновых кислот и их

производных селективность и стабильность. Для объяснения селективности разделения предложена модель строения «мономерной» C18-стационарной фазы.

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

4. Разработан способ количественного анализа видового состава ТАГ, образованных радикалами изомерных сопряженных полиненасыщенных 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 ОФ ВЭЖХ и хроматографию на Ag^+ -фазе.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Нгуен Ван Ань.** Определение триацилглицеринов масла манкетти методом обращенно-фазовой ВЭЖХ / Ань Ван Нгуен, А.А. Попова, В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека // Журнал аналитической химии. - 2016. - Т. 72. – Вып. 9. – С. 854-860.

2. **Nguyen Anh Van.** Определение эстолидов и триацилглицеринов масла семян *sarium discolor*: сопоставление разделения веществ в условиях традиционной и микроколоночной (милихром a-02) хроматографии / Anh Van Nguyen, V.I. Deineka, L.Q. Pham [и др.] // Аналитика и контроль. – 2018. – Т. 22. – Вып. 6. – С. 20-27.

3. **Нгуен Ван Ань.** Спектрофотометрическое определение масел с радикалами сопряженных октадекатриеновых кислот / Ван Ань Нгуен, В.И. Дейнека., Л.А. Дейнека // Журнал прикладной спектроскопии. – 2018. – Т. 85. – Вып. 3. – С. 474-479.

4. **Nguyen Anh Van.** Comparison of Separation of Seed Oil Triglycerides Containing Isomeric Conjugated Octadecatrienoic Acid Moieties by Reversed-Phase HPLC / Van Anh Nguyen, V. Deineka, L. Deineka, A.V.T. Ngoc // Separations. – 2017. – Т. 4. – P. 1-37.

5. **Nguyen Anh Van.** Determination of triacylglycerols and fatty acid composition of *Chilopsis linearis* seed oil by reverse-phase high-performance liquid chromatography / Anh Van Nguyen, V. Deineka, L. Deineka, A.V.T. Ngoc // Turkish Journal of chemistry. – 2019. - V.43(3) - P. 881-889.

6. Дейнека В.И. Модели привитой обращенной фазы на основе силикагеля / Дейнека В.И., Ань Ван Нгуен, ЛА Дейнека // Журнал физической химии. – 2019. – Т. 93(12). – С. 1860 – 1864.

7. **Нгуен Ань Ван.** Определение триацилглицеринов и жирнокислотного состава масла семян *Momordica cochinchinensis* и некоторых других растений данного рода / Ань Ван Нгуен, В.И. Дейнека, Лонг Куок Фам [и др.] // Химия растительного сырья. – 2019. – Т. 3. – С. 53-60.

8. **Нгуен Ван Ань.** Определение триацилглицеринов масла семян валерианы лекарственной с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ с двумя способами детектирования / Ань Ван Нгуен, В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2017. – Т. 17. – Вып. 4. – С. 616-623.

9. **Нгуен Ван Ань.** Установление подлинности сыров методом обращенно-фазовой ВЭЖХ / Ань Ван Нгуен, В.И. Дейнека, Хиен Чан Тхао Нгуен [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2018. – Т. 18. – Вып. 6. – С. 816-824.

10. **Нгуен Ван Ань.** Определение триацилглицеринов масла семян *Calendula officinalis* / Нгуен Ван Ань, В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2019. – №. 1. – С. 20-26.

11. Дейнека В.И. Количественная взаимосвязь между структурой и удерживанием в обращенно-фазовой ВЭЖХ: расширенный инкрементный подход для предсказания удерживания триацилглицеринов / В.И. Дейнека, **Ань Ван Нгуен**, Л.А. Дейнека // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2019. – Т. 19. – Вып. 3. – С. 280-288.

12. **Дейнека В.И.** Особенности пробоподготовки при анализе масла с радикалами жирных кислот, содержащих сопряженные двойные связи: масло момордики кохинхинской / В.И. Дейнека, Нгуен Ван Ань, Л.А. Дейнека // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2018. – Т. 81. – Вып. 2. – С. 18-22.

13. **Нгуен Ван Ань.** Сорбционная очистка масла семян момордики кохинхинской / Ань Ван Нгуен, В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека // Физико-химические основы ионообменных и хроматографических процессов «ИОНИТЫ-2017». Сборник трудов. – Воронеж, 2017. – С. 283-285.

14. **Нгуен Ван Ань.** Строение привитого слоя химически модифицированных силикагелей и селективность разделения веществ с линейными алкенильными / Ань Ван Нгуен, В.И. Дейнека // Восьмой Всероссийский симпозиум и Школу-конференцию молодых ученых «Кинетика и динамика обменных процессов» фундаментальные проблемы separation science. Сборник трудов. – Москва, 2019. – С. 241-242.

15. **Нгуен Ван Ань.** Анализ триацилглицеринов масла *jacaranda mimosifolia* методом ОФ ВЭЖХ / Ань Ван Нгуен, В.И. Дейнека // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств «Фармобразование». Сборник трудов. – Воронеж, 2018. – С. 365-368.

16. **Нгуен Ван Ань.** Определение триацилглицеринов масла семян *impatiens balsamina* методом обращенно-фазовой ВЭЖХ / Нгуен Ван Ань, В.И. Дейнека // Достижения молодых ученых: химические науки. Сборник трудов. – Уфа, 2018. – С. 286-290.

17. **Нгуен Ван Ань.** Определение триацилглицеринов с сопряженными двойными связями масла семян валерианы методом микроколоночной жидкостной хроматографии / Ань Ван Нгуен // Естественнонаучные, инженерные и экономические исследования в технике, промышленности, медицине и сельском хозяйстве. Сборник трудов. – Белгород, 2017. – С. 540-543.

18. **Нгуен Ван Ань.** Определение триацилглицеринов с сопряженными двойными связями масла семян *Chilopsis linearis* методом ОФ ВЭЖХ / Ань Ван Нгуен, В.И. Дейнека // Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства. Сборник трудов. – Белгород, 2018. - С. 82-84.

19. Доронин А.Г. Об устойчивости сопряженных полиеновых соединений, адсорбированных на силикагеле / А.Г. Доронин, **Ань Ван Нгуен**, В.И. Дейнека // II Всероссийской научной конференции «Актуальные проблемы адсорбции и катализа». Сборник трудов. – Плёс, 2017. – С. 66-68.

20. **Нгуен Ван Ань.** Установление качества молока методом ОФ ВЭЖХ с использованием векторной модели / Ань Ван Нгуен, В.И. Дейнека // Фундаментальная математика и ее приложения в естествознании. Сборник трудов. – Уфа, 2018. – С. 315-316.

21. **Нгуен Ван Ань.** Использование программы magicplot при определении триацилглицеринов методом ОФ ВЭЖХ / Ань Ван Нгуен, В.И. Дейнека // Современные информационные технологии в образовании и научных исследованиях: ИНФОТЕХ -2018. Сборник трудов. – Уфа, 2018. – С. 174-175.

22. **Нгуен Ван Ань.** Определение кислород-содержащих конъюгированных жирных кислот в масле семян диморфотеки / Ань Ван Нгуен, В.И. Дейнека // Проблемы и достижения химии кислород- и азотсодержащих биологически активных соединений. Сборник трудов. – Уфа, 2018. – С. 154-155.

23. **Нгуен Ван Ань.** Метод экстракции масел, образованных радикалами сопряженных кислот / Ань Ван Нгуен, В.И. Дейнека // Экстракция и мембранные методы в разделении веществ. Сборник трудов. – Москва, 2018. – С. 84-85.

24. **Нгуен Ван Ань.** Моделирование супрамолекулярных комплексов жирных кислот с циклодекстринами / Ань Ван Нгуен, В.И. Дейнека // Химия: достижения и перспективы. Сборник трудов. – Ростов-на-Дону, 2019. – С. 570-573.

25. **Нгуен Ван Ань.** Супрамолекулярные комплексы β -циклодекстрина с сопряженными жирными кислотами: получение и стабильность / Ань Ван Нгуен, А.А. Дудина, В.И. Дейнека // Innovations in life sciences: сборник материалов Международного симпозиума. Сборник трудов. – Белгород, 2019. – С. 152-154.

26. **Нгуен Ван Ань.** Семена растений семейства cucurbitacea как источники растительных масел с сопряженными жирными кислотами / Ань Ван Нгуен, В.И. Дейнека. Лонь Куок Фам, А.К. Мамонтов // II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 20-летию образования Ботанического сада НИУ «БелГУ». Сборник трудов. – Белгород, 2019. - С. 113-117.

27. **Нгуен Ван Ань.** Метод получения супрамолекулярных соединений бетациклодекстрина с маслом семян момрдики / Ань Ван Нгуен, В.И. Дейнека // X всероссийская школа - конференция молодых ученых «Теоретическая и

экспериментальная химия жидкофазных систем». Сборник трудов. – Иваново, 2019. - С. 160-161.

28. **Nguyen Anh Van.** Supramolecular Complexes of β -Cyclodextrin with Conjugated Fatty Acids: Synthesis and Stability / Anh Van Nguyen, A. Dudina, V. Deineka [и др.] // *Advances in Biological Sciences Research. Proceedings of the 1st International Symposium Innovations in Life Sciences (ISILS 2019)* – Belgorod, 2019. - V.7. - P. 219-222.

Работы № 1-12 опубликованы в рекомендованных ВАК РФ рецензируемых научных изданиях.