

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

*На правах рукописи*

**Туртыгин Александр Владимирович**

**СКРИНИНГ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА  
ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЛАХ И  
ЖИВОТНЫХ ЖИРАХ В УСЛОВИЯХ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ**

02.00.02 – аналитическая химия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание учёной степени кандидата химических наук

Научный руководитель:  
доктор химических наук, профессор  
Дейнека Виктор Иванович

Белгород – 2020

	Стр.
Введение.....	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	8
1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.....	13
1.1 Общие сведения о липидах. Триацилглицерины .....	13
1.1.1 Общие сведения и классификации липидов.....	13
1.1.2 Жирные кислоты, входящие в состав липидов .....	14
1.1.3 Конъюгированные жирные кислоты в составе липидов .....	21
1.1.4 Общая характеристика состава жиров .....	26
1.2 Методы анализа масел.....	28
1.2.1 Определение показателей качества жиров и масел.....	28
1.2.2 Газовая хроматография .....	29
1.2.3 Тонкослойная хроматография .....	34
1.2.4 Жидкостная хроматография .....	37
1.2.5 Инфракрасная спектроскопия .....	38
1.2.6 Масс-спектрометрия .....	40
1.2.7 Газовая хроматография, сопряженная с масс- спектрометрией (ГХ/МС) .....	42
1.2.8 Высокоэффективная жидкостная хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС).....	43
1.2.9 Ядерный магнитный резонанс.....	44

1.2.10 УФ спектрофотометрия.....	46
1.3. Индексация удерживания .....	48
1.3.1 Индексация удерживания по Ковачу.....	49
1.3.2 Индексация удерживания в ОФ ВЭЖХ.....	51
1.3.3 Индекс связуемости.....	53
1.3.4 Особенности ВЭЖХ ТАГ растительных масел .....	55
1.3.5 Особенности индексации ТАГ методом МОАУ .....	56
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	59
Глава 2. Объекты исследования и методики эксперимента .....	59
2.1 Методики извлечения ТАГ из объектов исследования.....	62
2.1.1 Подготовка образцов ТАГ, извлекаемых из семян растений....	62
2.1.2 Подготовка образцов ТАГ, извлекаемых из плодов растений	63
2.1.3 Подготовка образцов животных жиров .....	63
2.1.4 Пробоподготовка масел в составе шоколада.....	63
2.2 Методика омыления ТАГ растительных масел .....	64
2.3 Методика определение ТАГ методом ОФ ВЭЖХ.....	64
2.4 Спектрофотометрические исследования.....	65
2.5 Методика определение метиловых эфиров жирных кислот методом ГЖХ.....	65
2.6 Расчет мертвого времени для ТАГ в ОФ ВЭЖХ.....	66
2.7 Определение времени удерживания ТАГ	67

2.8	Количественный анализ при рефрактометрическом детектировании	67
2.9	Алгоритм компьютерного моделирования хроматограммы	68
2.10	Статистическая обработка результатов	68
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	70
3.1	Исследование масел с использованием инкрементного подхода	70
3.1.1	Масло семян подсолнечника .....	70
3.1.2	Масло семян льна.....	73
3.1.3	Масла семян некоторых других культур .....	77
3.1.4	Масло грецкого ореха.....	82
3.1.5	Масла с конъюгированными диеновыми двойными связями.	84
3.1.6	Прогностическая функция в инкрементном подходе.....	92
3.2	Индексация удерживания ТАГ по методу относительного анализа удерживания .....	97
3.2.1	Карты хроматографического удерживания ТАГ .....	99
3.2.2	Анализ животных жиров.....	110
3.2.2.1	Определение ТАГ состава гусиного жира.....	111
3.2.2.2	Свиной и говяжий жиры.....	114
3.2.3	Масла с радикалами уксусной кислоты .....	116
3.2.4	Масла с триеновыми двойными связями, сопоставление методов анализа ГЖХ-МС и ВЭЖХ	123

3.2.5 Масла с радикалами эпокси- и гидроксигруппами в ТАГ.....	129
3.2.5.1 Касторовое масло .....	129
3.2.5.2 Масло семян диморфотеки .....	132
3.3. Определение фальсификатов масел.....	137
3.3.1. Исследование подсолнечного масла с добавками оливкового.....	137
3.3.2 Масло мякоти облепихи.....	140
3.3.3 Сливочное масло.....	144
3.3.4 Исследование шоколада и шоколадной продукции.....	150
3.4 Использование компьютерной обработки хроматограмм для определения удерживания неразделенных аналитов.....	159
Выводы.....	162
Список использованной литературы.....	164
Приложение 1.....	190
Приложение 2.....	192
Приложение 3.....	197
Приложение 4.....	201
Приложение 5.....	208

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

КЛК – конъюгированная линолевая кислота

КК – конъюгированные кислоты

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

Л – линолевая кислота

Лн – линоленовая кислота

Э – альфа-элеостеариновая кислота

О – олеиновая кислота

П – пальмитиновая кислота

Пу – пуниковая кислота

Л<sub>2</sub>П – триглицерид, в составе которого два радикала линолевой кислоты и один пальмитиновой

ТАГ - триацилглицерин

ТГ - триацилглицерин

ДАГ – диацилглицерин

МАГ – моноацилглицерин

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Растительные масла представляют смесь триацилглицеринов высших жирных кислот и сопутствующих им веществ, важных для жизнедеятельности человеческого организма, которые не синтезируются *de novo*. Одним из важнейших показателей масел является набор высших жирных кислот (ВЖК), определяющих биодоступность и биоценность.

По данным Росстата, в период с 2013 г. по 2018 г. выработано растительных масел от 4,7 до 6,7 млн. тонн. При этом состав масел, равно как и себестоимость получения продукта (конечная цена), могут существенно различаться. При таком положении и развитии современного рынка возникает вполне очевидная необходимость контроля качества растительных масел, поскольку нельзя полностью исключить возможности появления фальсификации данного продукта. В связи с этим в настоящее время достаточно актуальной является задача по установлению и оперативному выявлению факта фальсификации при помощи современных аналитических методов.

Одним из важных показателей животных жиров и растительных масел является их жирнокислотный состав (ЖКС), определяющий биологическую значимость, которая зависит от набора высших жирных кислот (ВЖК), включая незаменимые. В действующих на территории РФ ГОСТ жирнокислотный состав определяют методом газовой хроматографии после переэтерификации исходных триацилглицеринов (ТАГ) (ГОСТ Р51483-99). При этом теряется важная информация о распределении радикалов ВЖК в триацилглицерине. Анализ видов ТАГ сложен вследствие многокомпонентности. Для упрощения определения состава сложных многокомпонентных смесей вводятся системы индексации, например, система «эквивалентных углеродных чисел» (ЭУЧ). Система ЭУЧ удобна в силу линейности, аддитивности и вытекающей отсюда простоты. Однако, как и все однопараметрические системы индексации она привязана к

конкретному составу подвижной фазы, а в силу неэквивалентности свойств коммерческих обращённых фаз – и к торговой марке стационарной фазы. Более того, как показывают исследования, выполненные в данной работе, параметры ЭУЧ являются функцией состава ПФ, зависят от температуры и могут изменяться при переходе к новой партии сорбента одной и той же марки.

Предлагаемый в настоящей работе двухпараметрический метод индексации удерживания ТАГ в условиях обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) усовершенствованным аналитическим приёмом. Он надежен (результат определения не зависит от составов подвижных фаз, температуры и даже от марки стационарной фазы) при определении ТАГ и жирнокислотного состава масел. Он также существенно более информативен по сравнению с существующими методами, поскольку исключается разрушение исходных ТАГ при сохранении информации о распределении жирных кислот по ТАГ. Это позволило впервые создать и использовать векторную модель для оценки качества масел и установления фальсификации. При этом нет опасности разрушения ТАГ с радикалами химически лабильных жирных кислот.

**Цель диссертационной работы.** Разработать методологию определения состава триацилглицеринов (ТАГ) с применением инкрементного подхода и индексов их относительного удерживания в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ для оценки качества и обнаружения фальсификаций растительных масел и животных жиров.

**Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:**

1. Установление закономерностей хроматографического поведения ТАГ в условиях ОФ ВЭЖХ при изменении состава подвижной фазы, температуры разделения и марки стационарной фазы.
2. Определение ТАГ и жирнокислотного состава масел семян растений в условиях ОФ ВЭЖХ и сопоставление с результатами определения

жирнокислотного состава масел методом ГЖХ метиловых эфиров. Оценка надежности инкрементного подхода.

3. Разработка двухпараметрической системы индексации удерживания ТАГ в условиях ОФ ВЭЖХ по методу анализа относительного удерживания и сопоставление полученных данных с индексацией по эквивалентным углеродным числам.

4. Оценка прогностической функции инкрементного подхода в качественном анализе сложных смесей ТАГ и оценка роли координат точек конвергенции в неразрушающем способе определения жирнокислотного состава ТАГ.

5. Разработка качественных и количественных методов установления качества растительных масел по видовому составу ТАГ и разработка количественного критерия (векторной модели) для установления фальсификации.

#### **Научная новизна:**

1. Впервые разработан двухпараметрический способ индексации удерживания триацилглицеринов в условиях ОФ ВЭЖХ по комбинации метода относительного анализа удерживания и инкрементного подхода, параметры которого учитывают изменение состава подвижных фаз, сохраняются при различных температурах разделения. Показано, что параметры двухпараметрического способа индексации могут быть перенесены с одной марки С18 на другую, что позволяет проводить ретроанализ ранее полученных результатов по разделению ТАГ в условиях изократического элюирования. Определены параметры уравнения относительного удерживания основных ТАГ типовых растительных масел.

2. Предложена схема компьютерного расчета времен удерживания (в среде MSExcel) для 35 ТАГ компонентов масел с заданным жирнокислотным составом и предложено моделирование хроматограмм при статистическом распределении радикалов жирных кислот в ТАГ в условиях ОФ ВЭЖХ.

3. Определен ТАГ состав большого числа растительных масел и животных жиров. Некоторые из полученных результатов вошли в базу данных SOFA (Германия), <http://sofa.mri.bund.de/>. Предложено использование подсолнечного масла в качестве недорогой стандартной смеси: а) содержащей трилинолеат, используемый в качестве реперного ТАГ в предложенной модели б) для определения основных, наиболее часто встречающихся в химии растительных масел, инкрементов.

4. Впервые предложена и экспериментально подтверждена возможность переноса инкрементных соотношений с тренировочного ряда на удерживание ТАГ при сохранении закономерностей их структурных изменений. Показана значимость точек конвергенции на картах разделения для определения строения радикалов жирных кислот – при определении числа двойных связей в составе ТАГ.

5. Впервые предложена многомерная векторная модель, построенная по площадям характеристических для исследуемых масел пиков, для количественной оценки подлинности масел, ее применимость показана на примере продукции, в изготовлении которой используется масло какао.

#### **Практическая значимость.**

Предложен простой и наиболее достоверный способ оценки качества и установления фальсификации растительных масел с использованием ОФ ВЭЖХ нативных ТАГ. Найдены источники ценных пищевых и косметических растительных масел из растений Белгородской флоры и потенциальных интродуцентов.

Разработанные методы введены в практикумы для студентов и магистрантов (и для работ аспирантов) химической и биологической специализации и при обучении студентов по программе «Криминалистические исследования» («Судебная медицина»), в курсах «Хроматографические и ионообменные методы», «Проблемы современной хроматографии», «Естественно-научные методы в судебно-криминалистическом исследовании». Разработанные методы анализа

применяются в работе ООО «Флора-БАВ».

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Уравнения относительного удерживания ТАГ являются наиболее надежными характеристиками для качественного анализа в двухмерной системе индексации удерживания (расхождения между расчетными и экспериментальными значениями  $lgk(i)$  не более 0.004) в условиях ОФ ВЭЖХ. Предложенная система индексации не чувствительна к температуре разделения и может быть без изменений перенесена со стационарных фаз одного производителя на стационарные фазы некоторых других марок.

2. Компьютерный способ расчета времен удерживания ТАГ (в программе MSExcel) позволяет определять времена удерживания ТАГ с заданным жирнокислотным составом с отклонением от экспериментальных данных не более 0.002 логарифмических единиц, вносить поправочные коэффициенты на площади пиков ТАГ для количественного определения их состава.

3. Обычное подсолнечное масло, благодаря постоянству качественного состава, является доступным образцом для использования в качестве стандартной смеси для расчета базовых инкрементов для разработанной системы индексации.

4. Инкрементные соотношения, найденные для использованного «тренировочного» ряда, могут быть распространены на другие соединения с аналогичной закономерностью изменения их структуры. Контроль положения на карте разделения точек конвергенции является единственным неразрушающим хроматографическим методом для определения числа двойных связей в ТАГ и высших жирных кислотах.

5. Векторная модель, построенная по площадям характеристических пиков исследуемого масла, эффективна при определении качества масел по отклонению контрольного вектора от вектора, построенного для заведомо достоверных образцов.

**Апробация работы.** Основные результаты исследований были доложены на следующих конференциях: «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования, образование», Третья международная научно-практическая конференция «Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности», (г. Санкт-Петербург, 2007), Всероссийская конференция «Хроматография – народному хозяйству» (г. Дзержинск, 19-23 апреля 2010 года), Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы химической науки, практики и образования» (г. Курск, 19-21 мая 2009 г.), III Всероссийская научно-практической конференция с международным участием, посвященная 75-летию Курского государственного медицинского университета (г. Курск, 2010), Третий съезд аналитиков России (г. Москва, 8 -13 октября 2017 г.)

**Личный вклад** автора состоит в систематизации литературных данных, подготовке и проведении всех экспериментальных этапов исследования, обработке, интерпретации и оформлении полученных данных, подготовке материалов к публикации и представлению результатов исследования на конференциях. Все исследования, описанные в диссертационной работе, выполнены лично автором или в сотрудничестве с коллегами. Обсуждение результатов проведено совместно с научным руководителем.

**Публикации.** По теме диссертационной работы опубликовано 25 статей, 8 из которых в периодических изданиях, рекомендованных ВАК РФ для опубликования научных трудов, и 9 тезисов и материалов научных конференций.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, 3 глав, списка литературы из 258 источников, 5 приложений. Материал работы изложен на 208 страницах, содержит 77 рисунков, 35 таблиц.

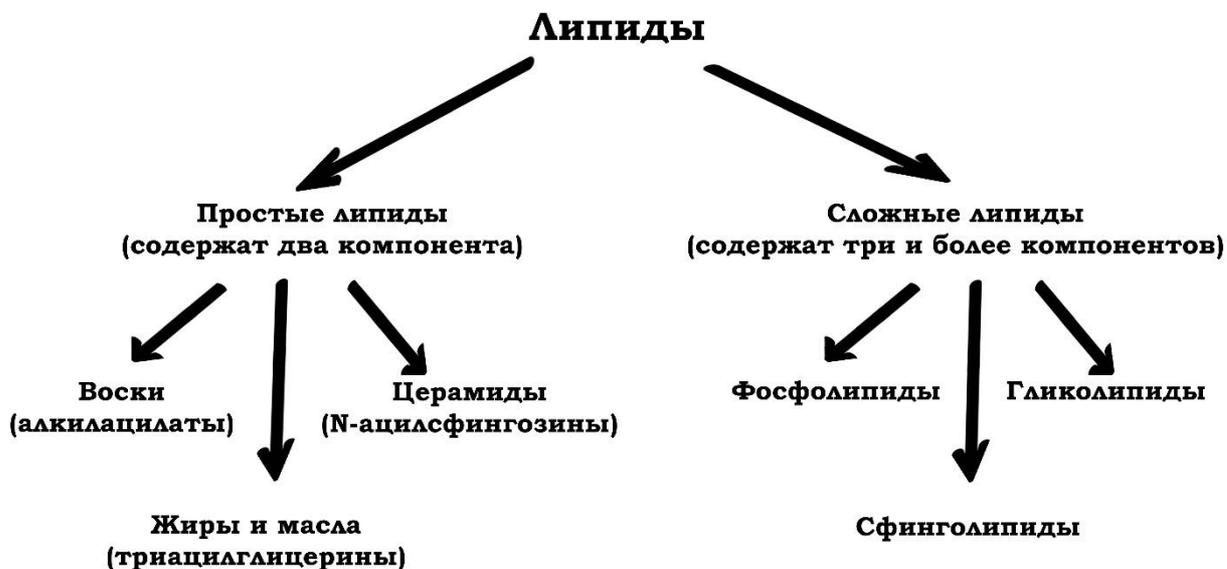
## АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

### 1.1 Общие сведения о липидах. Триацилглицерины

#### 1.1.1 Общие сведения и классификации липидов

Липиды представляют собой неполярные или слабо полярные вещества, которые хорошо растворимы в органических растворителях, таких как этилацетат, пентан, петролейный эфир, и нерастворимы в полярной среде, например, водные растворы [1].

Принципы систематики и номенклатуры липидов «были определены Международным союзом теоретической и прикладной химии, Международным союзом биохимии и молекулярной биологии (IUPAC-IUBMB) и Комиссией по биохимической номенклатуре» [2].



На рис. 1.1 представлена общая классификация липидов [3].

Рис. 1.1 Общая классификация липидов

Липиды по «функциям в организме условно делят на две группы - запасные (резервные) и структурные (протоплазматические)» [4].

«Структурные липиды (в первую очередь, фосфолипиды) образуют сложные комплексы с белками (липопротеины) и углеводами» [5].

В классификации по структуре липиды делятся на гидролизуемые и негидролизуемые. К первой группе относят: воски, триацилглицерины и фосфолипиды. К негидролизуемым липидам относят стероиды, жирорастворимые витамины и эйкозаноиды [6,7]. Из всех липидов наибольшая доля приходится на триацилглицерины (ТАГ), которые могут составлять от 88% до 98 % от массы в растительных жирах от 70% до 95 % от массы в животных жирах [8,9].

### 1.1.2 Триацилглицерины и жирные кислоты, входящие в их состав

Триацилглицерины, которые в научной литературе могут называться триглицеридами, триацилглицеридами, триацилглицеринами и триацилглицеролами (в англоязычной литературе), представляют собой сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот. Если жирными кислотами этерифицированы три гидроксильные группы глицерина, то такие соединения называются триацилглицеринами (ТАГ), если две – диацилглицеринами (ДАГ), а если этерифицирована одна группа – моноацилглицеринами (МАГ) (рис.1.2)

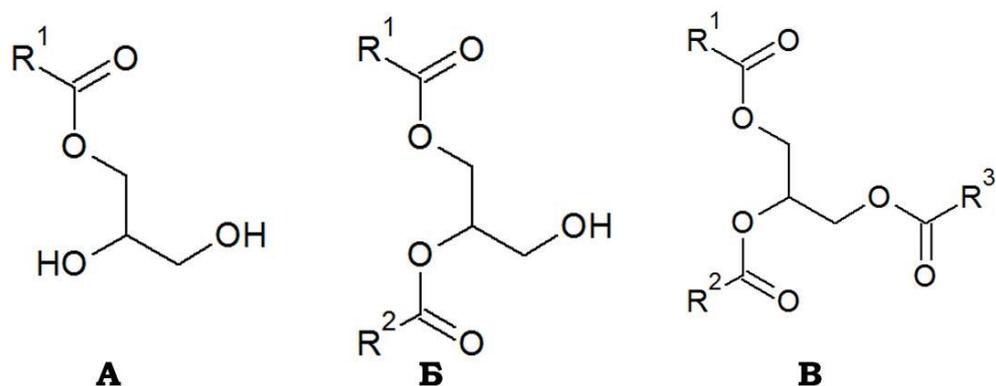


Рис.1.2 Структурные формулы А - моноацилглицерина, Б - диацилглицерина и В - триацилглицерина

В состав ТАГ входят три радикала высших жирных кислот (ВЖК),

которые могут быть насыщенными и ненасыщенными. Если все три кислотных радикала принадлежат одной и той же жирной кислоте, то такие ТАГ называют простыми (например, трипальмитат, тристеарат, триолеат и т.д.), если разным жирным кислотам, то их называют смешанными.

Названия смешанных триацилглицеридов образуются в зависимости от входящих в их состав высших жирных кислот (ВЖК). Цифры 1, 2 и 3 указывают на связь остатка ВЖК с соответствующей гидроксильной группой в молекуле глицерина. Положение крайних атомов в молекуле глицерина не равнозначно, это объясняется тем, что если в структуре триацилглицерида крайние атомы углерода ацилированы разными кислотами, то возможно существование двух энантиомеров. Поэтому применяется система стереохимической нумерации (обозначают *sn* – stereochemical numbering), рис.1.3:

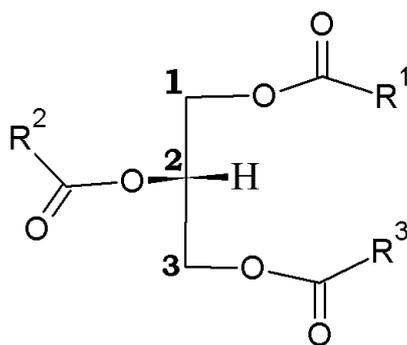


Рис. 1.3 Стереометрическая нумерация в триацил-*sn*-глицерине

По этой системе, если в проекции Фишера гидроксильная группа при втором углеродном атоме глицерина располагается слева, атому углерода, находящемуся над ним, присваивается номер 1, а расположенному под ним – номер 3. Ферменты это различают и всегда специфичны только к одному из трех углеродов глицерина.

Большинство растительных жиров содержат около 80-90% ненасыщенных жирных кислот, которые при комнатной температуре находятся в жидком агрегатном состоянии. В состав ТАГ животных жиров

наоборот входят в основном насыщенные жирные кислоты, что увеличивает их температуру плавления. Насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты могут синтезироваться в организме. Полиненасыщенные жирные кислоты участвуют во многих процессах биосинтеза, они не вырабатываются самостоятельно и должны поступать извне, поэтому их называют эссенциальными (незаменимыми). Основные названия и формулы жирных кислот в составе ТАГ приведены в Приложении 1.

Поскольку у жиров основная глицериновая часть идентична, различие свойств жиров и масел обусловлено жирными кислотами, входящими в состав молекулы. Свойства жирных кислот зависят от длины цепи, количества и положения двойных связей. Насыщенные жирные кислоты менее химически активны и имеют более высокие точки плавления, чем соответствующие жирные кислоты с той же длиной цепи, но имеющие кратные связи. Жирные кислоты, имеющие больше одной двойной связи, называются полиненасыщенными жирными кислотами. *Цис-транс*-изомерия и изомерия положения двойной связи ненасыщенных жирных кислот обуславливают различные физические и физиологические свойства жиров. *Цис*-изомеры являются естественной конфигурацией, в то время как *транс*-изомеры и изомеры по положению двойной связи образуются главным образом при обработке при нагревании [10-15]

В систематическом названии кислот указывают положение двойной связи с началом отсчета от карбонильного атома углерода. Так, например, олеиновая кислота является *цис*-9-октадеценовой кислотой, а  $\alpha$ -линолевая кислота – *цис,цис,цис*-5,9,12-октадекатриеновой кислотой. Если нумерацию проводить с другого конца молекулы кислоты, то при положении первой двойной связи у третьего или шестого атомов углерода «жирные кислоты делят на два семейства  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 кислоты. В состав семейства  $\omega$ -3 кислот входят  $\alpha$ -линоленовая, эйкозапентаеновая и докозагексаеновая жирные кислоты. Линолевая,  $\gamma$ -линоленовая и арахидоновая кислоты входят в семейство  $\omega$ -6 кислот. Биологическая активность жирных кислот различна,

наибольшей активностью обладает арахидоновая кислота, ее активность в 2-3 раза выше активности линолевой и линоленовой кислот. Однако в пищевых продуктах ее мало, но она может образовываться в организме животных и человека из линолевой кислоты. Линоленовая кислота сама малоактивна, но она усиливает биологическую активность линоленовой кислоты» [16].

В последние 20 лет большое число публикаций посвящено изучению  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6-полиненасыщенных жирных кислот: « $\omega$ -3-эйкозапентаеновой, докозагексаеновой и  $\alpha$ -линоленовой жирных кислот, содержащихся в значительных количествах в жирах гидробионтов. Установлено, что эйкозапентаеновая кислота обладает профилактическим и лечебным действием при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, снижает опасность коронарных тромбозов» [17].

Суточные нормы потребления  $\omega$ -6 и  $\omega$ -3 кислот отсутствуют. Однако даны рекомендации департамента по питанию и пище при НА США соблюдать соотношение  $\omega$ -6 и  $\omega$ -3 кислот в пределах 5:1 и 3:1, причем потребление жиров с пищей не должно превышать 30% от общего количества калорий. «Рекомендуемое Институтом питания РАМН соотношение  $\omega$ -6 к  $\omega$ -3 кислотам в рационе составляет для здорового человека 10:1, для лечебного питания - от 3:1 до 5:1, соотношение полиненасыщенных и насыщенных кислот должно приближаться к отношению 2:1, соотношение линолевой и линоленовой кислот должно быть равно соотношению 10:1» [18].

По содержанию полиненасыщенных жирных кислот растительные масла и жиры можно разделить на три группы:

- бараний и говяжий жиры, какао, ши, карите (не превышает 5-10%).
- свиной и птичий жиры (не более 50 %);
- рыбий жир и растительные масла (не менее 70 %);

Высоким содержанием линолевой кислоты отличаются подсолнечное, соевое, хлопковое, маковое и тыквенное масла (более 50 %); линоленовой – льняное масло и рыбий жир. Арахидоновая кислота содержится в небольших

количествах в продуктах животного происхождения, в молочном жире около 1%, рыбьем жире до 10 %, в других животных жирах не более 0,5%. Суточная норма линолевой кислоты составляет около 4 г (и не более 10 г) [19].

Линолевая, линоленовая и арахидоновая кислоты не синтезируются в организме человека и должны поступать с пищей. В природе эти кислоты содержатся в основном в растительных маслах.

$\alpha$ -Линоленовая кислота входит в состав ТАГ масел многих растений: семян льна (до 66%), семян «чиа» (не менее 54%), горчичного масла (не менее 30%), соевого и рапсового масла (не более 10%) и т.д.

Главные источники линолевой кислоты: в масле сои на линолевую кислоту приходится 54%, в маслах подсолнечника и хлопка - до 78%, в маслах грецкого ореха, арахиса, в маслах косточек винограда - до 58%, в маслах семян сафлоры - до 70% [19].

$\gamma$ - линоленовая кислота впервые была обнаружена в энотере в 1919 г. [20]. Распространена она в маслах семян семейства бурачниковые, так в масле семян бурачника лекарственного на ее долю приходится 10-25%, в маслах семян растения синяк на ее долю приходится 6-12%, а в маслах семян незабудки 4-20%. В маслах семян растений семейства кипрейные (энотера двулетняя) содержание  $\gamma$ - линоленовой кислоты составляет 7-10%, в маслах семян семейства коноплевые (конопля посевная) 3-6%. В маслах семян семейства лоазовые ее содержание составляет 4-10%, а в масле семян семейства жимолостные 16%. В маслах семян растений семейства крыжовниковые содержание  $\gamma$ - линоленовой кислоты составляет: в семенах смородины черной 4-20%, а в семенах крыжовника буреинского - 12% [21 - 24].

Содержание линолевой кислоты в различных растениях может изменяться в следующих пределах (%): в кокосовом масле 1.5-2.6; в касторовом масле 2.0-3.0; в кориандровом масле 7.0-7.5; в горчичном масле 14.5-20.0; в льняном масле 5.0-30.0; в хлопковом масле 40.0-45.0; в

кукурузном масле 43.5-46.9; в подсолнечном масле 46.0-60.0; в соевом масле 52.0-65.0; в конопляном масле 56.0-65.0; в маковом масле 58.0-65.0. В натуральных маслах линолевая кислота находится в виде геометрического цис-изомера [3-16].

Стеарионовая кислота в небольших количествах содержится в масле семян черной смородины (2-4%), рыбьем жире, в растениях семейства лютиковые (2-8.5%), в масле семян крыжовника буреинского (0.9-4.4%), наибольшее содержание стеарионовой кислоты встречалось в листьях и семенах растений семейства бурачниковые (4-19%), [11 - 16].

Пальмитиновая кислота – одна из самых распространенных насыщенных жирных кислот. Ее содержание в пальмовом масле от 38 до 47% от общего содержания жирных кислот, а в некоторых фракционированных составах доходит до 80%. В масле семян арахиса, сои, кокосовых орехов и в жирах морских животных ее содержание достигает 10%, Пальмитиновая кислота содержится в масле какао, в свином сале и молочных жирах около 30%.

Стеариновая кислота содержится в жирах молока (5-15%), в сале (10%), в сливочном масле (15-30%), в маслах какао и ши (30-35%).

Эйкозановая кислота найдена в заметных количествах в арахисе, в семенах семейства сапидовые (до 20%). Она обнаружена и в масле семян моринги масличной.

Тетракозановая кислота присутствует в масле семян аденантера павлинья (до 25%), в большом количестве содержится в древесной смоле, особенно в смоле букового дерева, в масле арахиса ее содержание составляет 1.1—2.2 %.

Олеиновая кислота - одна из распространенных моноеновых жирных кислот, входящая в состав как растительных масел, так и животных жиров. В оливковом масле, по разным источникам, содержится до 60-80% этой кислоты. Главные источники олеиновой кислоты помимо оливкового масла: подсолнечное, особенно высокоолеиновое, пальмовое, рапсовое, соевое и

хлопковое масла. В арахисовом масле ее содержится до 66%, в подсолнечном - до 40%, в говяжьем жире 41 - 42%, в свином сале 37 - 44%, в тресковом жире - 30%.

*Цис-9*-гексадеценовая кислота содержится главным образом в жирах животных, рыбе и морских млекопитающих. Она найдена также в масле семян асклеписа сирийского до 10% [14], в масле орехов макадамии до 20%, в масле семян семейства протейные до 32 % [21], в масле семян облепихи крушиновидной ее содержание находится в интервале 16-22%. *Цис-9*-гексадеценовая кислота регулирует гомеостаз клеток и концентрацию инсулина [22, 23].

Петрозелиновая кислота присутствует в масле семян растений семейства зонтичные от 15 до 60%, в масле семян растений герань кроваво-красная до 48% [12]. В масле семян семейства зонтичные ее содержание достигает 82%. Семена растений рода тапсия также являются хорошим источником петрозелиновой кислоты. Эта кислота - важный компонент, использующийся в пищевой, фармацевтической, косметической и других отраслях промышленности [15].

Арахидоновая кислота является очень важной жирной кислотой – она главный компонент фосфолипидов мембран. «Более чем 80 стран мира признали арахидоновую кислоту в качестве биологически активной добавки. Помимо смесей для младенцев она используется в косметологии и биофармации [17]». Она редко встречается в растительных маслах, но содержится в некоторых мхах, от 20 до 40% [18], в грибах, папоротниках, в пресноводной зеленой микроводоросли ее содержание достигает 47% [24].

Каприловая кислота часто встречается в животных и растительных жирах, но редко ее содержание превышает 8 % от общего количества жирных кислот. Эта кислота найдена в масле семян куфий (около 70%) [29]. От 1 до 4% каприловой кислоты содержится в жирах молока, и 6-8% в кокосовом орехе и пальмовом масле [10].

Лауриновая кислота довольно часто встречается в составе ТАГ

различных масел, таких как масло семян лавра благородного, в коричном масле (80-90%), молочном жире (до 10%), в кокосовом масле (50.06 моль %)[20]. Используется в фармацевтической промышленности, так как обладает антибактериальными свойствами.

Миристиновая кислота содержится в семенах семейства мускатниковые (масло мускатного ореха содержит приблизительно 60-70% тримиристата), в кокосовых орехах содержится до 20% миристиновой кислоты [30], в ядрах пальмы и жирах молока - 8-12%. Избыток миристиновой кислоты в пище вызывает повышение холестерина в организме животных и человека [30 - 32].

Нонановая кислота - редкий пример жирной кислоты с нечетным числом атомов углерода в естественных продуктах. Она найдена в масле семян герани розовой. Нонановая кислота является первичным продуктом окисления олеиновой кислоты.

Каприновая (декановая) кислота содержится в масле семян вяза американского (более 60%), в масле семян дзелькве пильчатой (более 70%) [33], обнаружена она и в масле семян куфея (около 80%) [34].

### **1.1.3. Конъюгированные (сопряженные) жирные кислоты в составе липидов**

Относительно недавно обнаружили масла, в состав ТАГ которых входят полиненасыщенные жирные кислоты с сопряженной системой двойных связей. В настоящее время известно 16 природных сопряженных полиеновых жирных кислот, число выявленных природных источников кислот этого типа непрерывно расширяется [35]. «Среди растительных и животных масел, которые могут различаться степенью ненасыщенности триглицеридов или уровнем накопления сопутствующих минорных биологически активных веществ, особо выделяются масла, содержащие сопряженные (конъюгированные) двойные связи. Изначально интенсивные

исследования велись по изучению биологической активности конъюгированной линолевой кислоты (CLA), несколько геометрических изомеров которой обнаруживаются в мясной и молочной продукции. При этом в ряде исследований были обнаружены уникальные свойства этих соединений, включающие антиканцерогенный и атерогенный эффекты, усиление иммунной системы, антидиабетическое действие, способность существенно уменьшать ожирение человека при метаболическом синдроме и т.д. Потребление 1.8 г CLA в сутки в течение 12 недель приводит к снижению массы жира в организме здоровых людей (обычное потребление CLA не превышает 0.3 г в сутки)». По теме конъюгированных жирных кислот в соавторстве с коллегами была опубликована статья в 2010 году в журнале «Научные ведомости БелГУ С. Естественные науки.»

Конъюгированные жирные кислоты в зависимости от количества двойных связей делятся на диеновые, триеновые и тетраеновые кислоты. Основными представителями диеновых кислот являются стиллинговая, додекадиен-2,4-овая, *транс,транс-10,12*-октадекадиеновая и *транс,транс-9,11*-октадекадиеновая, диморфеколовая кислота и др.

Из диеновых C<sub>10</sub>-кислот в природе найдена лишь декадиен-2,4-овая (стиллинговая) кислота, которая была выделена из масла семян китайского «жирного» дерева и *Salix discolor*. Содержание стиллинговой кислоты в маслах этих семян не превышает 4-5%.

Додекадиен-2,4-овая кислота была обнаружена в масле семян молочай цветной, произрастающих в Сев. Америке.

Изомеры линолевой кислоты *транс,транс-10,12*-октадекадиеновая и *транс.транс-9,11*-октадекадиеновая кислоты с сопряженной системой двойных связей продуцируются анаэробными бактериями рубца крупного рогатого скота при биогидрогенизации.

Диморфеколовая кислота (9-гидрокси-10,12-октадекадиеновая) содержится в масле растения диморфотека, на ее долю приходится до 50% сопряженной диеновой кислоты.

Основными представителями триеновых кислот являются  $\alpha$ -элеостеариновая и  $\beta$ -элеостеариновая кислоты, пуниковая, катальповая, календовая, жакарандовая, камлоленовая, ликановая и др.

$\alpha$ -Элеостеариновая кислота является наиболее распространенной в природе, сопряженной триеновой кислотой. Наиболее известным источником  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты является тунговое масло, из которого она была выделена еще в 1875 г. В 1902 г. было установлено, что  $\alpha$ -элеостеариновой кислоте соответствует формула  $C_{18}H_{30}O_2$  и впервые был получен ее более высоко плавящийся изомер, названный  $\beta$ -формой. Выделенная из тунгового масла и очищенная низкотемпературной перекристаллизацией из спирта чистая  $\alpha$ -элеостеариновая кислота плавится при  $48^\circ\text{C}$ .

Пуниковая кислота была впервые выделена из масла семян граната, где ее количество составляет 72% от суммы жирных кислот. Она встречается также в растениях момордика, трихозант змеевидный (43%), бешеный огурец (семейство тыквенные) (22%).

Катальповая кислота была выделена из масла семян декоративного растения катальпа овальная, и ранее в масле семян различных видов катальпы была найдена  $\alpha$ -элеостеариновая кислота. Чистая катальповая кислота оказалась еще менее стабильной, чем пуниковая.

Календовая кислота выделена из масла семян календулы лекарственной. Ее изомер, имеющий *транс-транс-транс*-конфигурацию ( $\beta$ -календовая кислота), не содержится в этом масле, но получен из него в результате изомеризации календовой кислоты в процессе выделения.

Жакарандовая (джакарандовая) кислота является стереоизомером календовой кислоты, найдена в маслах семян жакаранда мимозолистная (до 6%).

Камлоленовая кислота является основной жирной кислотой масла плодов маллотус филиппинский, которое издавна применяли в народной медицине как слабительное средство. Подобно другим триеновым кислотам камлоленовая кислота известна в виде двух геометрических изомеров.

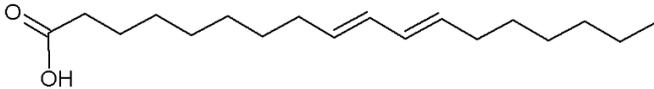
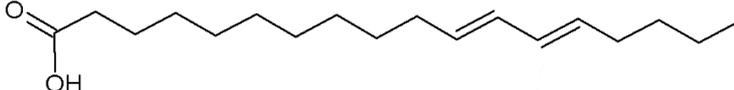
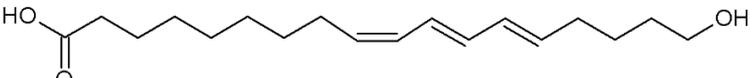
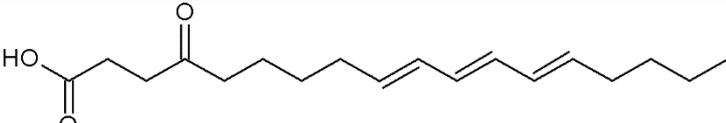
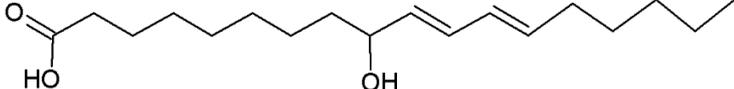
Ликановая кислота была впервые выделена в 1931 г. из масла семян тропического древесного растения ликания.

Тетраеновые (паринаровые) кислоты были выделены впервые из масла орехов паринарий лаурин и первоначально рассматривались как триеновые, изомерные элеостеариновой кислоте. Впоследствии каталитическим гидрированием и измерением йодного числа было установлено, что в молекуле паринаровой кислоты содержатся 4 этиленовые связи [36].

Кислоты с конъюгированными двойными обладают антиканцерогенным действием, а также регулируют обмен липидов в организме. Такие кислоты вызывают огромный научный интерес во всем мире. В некоторых странах выпускаются БАДы, в состав которых входят конъюгированными жирные кислоты. Существует несколько растений, в семенах которых накапливаются конъюгированные триеновые кислоты. Уникальное индийское растение момордика харантия, часто используемое в традиционной медицине на востоке, накапливает в семенах масло, очень богатое радикалами  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты. Сопряженная  $\alpha$ -элеостеариновая кислота оказывает положительное влияние на снижение жировой массы и сохранение мышечной массы [37]. В настоящее время человеческий организм получает намного меньше сопряжённых линолевых кислот, чем раньше: рацион питания сдвинулся в сторону низкожировой пищи, кроме того, снизилось содержание сопряжённых линолевых кислот в пищевых продуктах. Более подробная и полная информация о маслах, содержащих радикалы конъюгированных жирных кислот, опубликована в отчете «Получение функциональных масляных композиций на основе растительного сырья, содержащих масла с радикалами конъюгированных жирных кислот» ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, государственный контракт № НК-511П. Формулы основных природных конъюгированных кислот представлены в табл.1.1.

## Основные конъюгированные кислоты ТАГ масел семян

Название кислоты	Структура
Календовая 8t10t12c-18:3	
Катальповая 9t11t13c-18:3	
Жакарандовая 8c10t12c-18:3	
Пуниковая 9c11t13c-18:3	
Элеостеариновая 9c11t13t-18:3	
β-Элеостеариновая (9t11t13t)	
Паринаровая - 9c11t13t15c -18:4	
Паринаровая t11t13t15t-18:4	
Стиллинговая кислота (додекадиен-2,4-овая) 2t4t-10:2	

Продолжение таблицы 1.1.	
Название кислоты	Структура
<i>транс,транс</i> -10,12-октадекадиеновая t10t12t-18:2	
<i>транс,транс</i> -9,11-октадекадиеновая t9t11t-18:2	
Камлоленовая (9c,11t,13t)-18:3 гидросиоктадека-9,11,13-триеновая кислота	
4-оксо-9,11,13-октадекатриеновая кислота	
Диморфеколовая кислота 9-гидрокси-10,12-октадекадиеновая	

#### 1.1.4 Общая характеристика животных жиров

Жиры, получаемые из жировых тканей разных организмов, различаются по химическому составу триацилглицеринов. На степень такого различия оказывают влияние индивидуальные особенности жирового сырья, его происхождения и некоторые другие факторы [38-39].

Состав триацилглицеринов жиров, извлекаемых из жировых тканей домашних животных, может быть непостоянен даже качественно. Это в первую очередь зависит от метаболизма, сезона, а также кормовой базы. В жировых тканях животных может откладываться жир, входящий в состав

пищи. Химический состав этого жира может отличаться от состава жира, синтезируемого в теле животного. Таким образом, в жире животного появляются новые компоненты [30]. Пределы колебаний показателей состава и качества жира приводятся в соответствующих ГОСТах или технических условиях и справочниках [40].

Говяжий жир получают вытапливанием сала-сырца крупного рогатого скота. Кристаллизацией и прессованием его иногда делят на две фракции: жидкую — олеомаргарин и твердую — стеарин. В состав ТАГ говяжьего жира входят следующие кислоты (в %): олеиновая 43-44, линолевая 2-5, стеариновая 24-29, пальмитиновая 27-29, миристиновая 2-2.5. В составе олеиновых кислот содержится немного трансизомеров - вакценовая кислота (до 3-4%) [5-6].

Бараний жир получают из жировых тканей овец. В состав ТАГ жира входят (в %): олеиновых кислот 36-43, линолевой 3-4, стеариновой 25-31, пальмитиновой 25-27, миристиновой 2-4. В бараньем жире также содержится 3-4% вакценовой кислоты [10, 30].

Состав ТАГ свиного жира зависит от состава корма животных, обычно ТАГ содержат (в %): олеиновой кислоты 42-51%, пальмитиновой 25-30%, стеариновой 12-16%, линолевой 3-8%, миристиновой 2- 4, линоленовой с арахидоновой до 3% [28].

Костный жир получают вытапливанием или экстракцией из костей крупного и мелкого рогатого скота. Состав и свойства жира значительно зависят от типа и качества костей, а также от метода извлечения. В костном жире часто находят кальциевые мыла, а в жире низкого качества — значительное количество неомыляемых веществ. В составе ТАГ жира может быть 50-55 % олеиновой, 5-10 — линолевой, до 20 % стеариновой и столько же пальмитиновом кислот [30].

В состав ТАГ коровьего молока входит большое количество разных жирных кислот. Примерный состав их для образцов зимнего (З) и летнего (Л) масел, в процентах от массы всех кислот, приведен в табл.1.2.

## Содержание жирных кислот в коровьем жире [41]

Насыщенная жирная кислота	Содержание, % масс.		Ненасыщенная жирная кислота	Содержание, % масс.	
	<i>З</i>	<i>Л</i>		<i>З</i>	<i>Л</i>
Масляная (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> )	3.7	3.7	9-Деценная (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> )	0.2	0.1
Капроновая (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> )	1.0	1.7	9-Додеценная (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> )	-	0.2
Каприловая (C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> )	1.0	1.0	9-Тетрадеценная (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> )	1.2	1.6
Каприновая (C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> )	2.6	1.1	9-Гексадеценная (C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> )	5.0	3.4
Лауриновая (C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> )	1.7	2.8	Олеиновая (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	32.4	32.8
Миристиновая (C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> )	9.3	8.1	Линолевая (C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	4.0	3.7
Пальмитиновая (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	25.4	25.9	Арахидоновая (C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	0.4	1.2
Стеариновая (C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> )	10.7	11.2			

**1.2 Методы анализа масел****1.2.1 Определение показателей качества жиров и масел**

Основные показатели безопасности и качества животных жиров прописаны в [ГОСТ 25292-2017 Жиры животные топленые пищевые.

Технические условия]. Среди них важным показателем является органолептическая оценка, цветность, кислотное число, содержание антиокислителей и т.д. Далее приводятся некоторые нормативные документы, которые декларируют качество и безопасность растительных масел и жиров в РФ: [ГОСТ Р 51487-99 Масла растительные и жиры животные. Метод определения перекисного числа. ГОСТ 5478-90 Масла растительные и натуральные жирные кислоты. Метод определения числа омыления. ГОСТ ISO 10539-2015 Жиры и масла животные и растительные. Метод определения щелочности. ГОСТ ISO 935-2017 Масла и жиры животные и растительные. Определение титра. ГОСТ 26597-89 Подсолнечник. Метод определения кислотного числа масла с применением рН-метрии. ГОСТ 5475-69 Масла растительные. Методы определения йодного числа]. [ГОСТ ISO 6320-2012 Жиры и масла животные и растительные. Метод определения показателя преломления. ГОСТ 30418-96].

Более современные методы, а также широкое распространение масс-спектрометрических детекторов для ГЖХ и ВЭЖХ приборов позволяют значительно сократить время подготовки образца к анализу, способствует повышению контроля качества продуктов питания: [ГОСТ 33490-2015 Молоко и молочная продукция. Обнаружение растительных масел и жиров на растительной основе методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием Масла растительные. Метод определения жирнокислотного состава. ГОСТ 31663-2012 Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиленовых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме. ГОСТ 25292-2017 Жиры животные топленые и мука кормовая животного происхождения].

### **1.2.2 Газовая хроматография**

Первые попытки анализа ТАГ растительных и животных жиров с использованием метода ГЖХ были предприняты в 1952 г Джеймсом и

Мартинином [42]. В 1962 году была опубликована первая работа, в которой ТАГ, в том числе и молочного жира, были разделены на группы по углеродным числам с использованием стеклянных и металлических насадочных колонок [43].

Новым этапом в развитии анализа масел методом ГЖХ можно считать использование капиллярных колонок [54-91]. В работе Tvrzicka и Mares [44] был показан ряд преимуществ капиллярных колонок над насадочными: более высокие эффективность и воспроизводимость результатов, сокращение времени анализа, долговечность, стабильность. Для детектирования использовали пламенный ионизационный детектор (ПИД). Изменение полярности стационарных фаз позволило разделить ТАГ не только по числу атомов углерода, но и по степени ненасыщенности. Информация по результатам использования метода приведена в работах [45-93].

Метод определения ТАГ в молочном жире с использованием ГЖХ рекомендован Евросоюзом в качестве официального метода [47-52].

Высокоэффективное разделение индивидуальных ТАГ стало возможно за счет применения термостабильных стационарных фаз на основе полисилоксанов с метил-, фенил-, и цианнопропильными группами, химически привитыми к поверхности кварцевой капиллярной колонки. Химически-привитые кварцевые капиллярные колонки обладают более высокой термической устойчивостью, характеризуются небольшим дрейфом времён удерживания в сравнении с импрегнированными колонками [53]. Для анализа используют колонки с длиной от 3 до 30 метров, с толщиной привитого слоя порядка 0.1-0.2 мкм. [54]. Результаты использования такого метода приведены в работах [55,56]. Разделение ТАГ масла семян кофе описано в работе [57], где в качестве стационарной фазы использовали OV-101, при длине колонки 15 м удалось разделить ТАГ с CN = 54 на три фракции по числу ненасыщенных связей в молекулах ТАГ. Разделение ТАГ по числу двойных связей было достигнуто также с использованием стационарной фазы DB-5 [58]. Отметим, что на неполярных колонках

ненасыщенные ТАГ элюируются до насыщенных. Это объясняется разностью в давлении паров в насыщенных и ненасыщенных жирных кислотах, и их эфирах, поэтому возможно разделение по степени ненасыщенности:

$$t_R(U_3) < t_R(U_2S) < t_R(US_2) < t_R(S_3),$$

где U – радикал ненасыщенной кислоты,

S – радикал насыщенной кислоты с тем же числом атомов углерода.

Использование капиллярных колонок с химически привитым слоем полисилоксанов, содержащих 50-65% фенильных групп, позволило использовать более высокие температуры, что улучшило разделение ТАГ масел и жиров [59-69]. На колонках, покрытых более 50% фенил-метил-полисилоксановой плёнкой (RSL 300) удалось разделить ТАГ, ДАГ, МАГ и свободные жирные кислоты не только по CN, но и по числу двойных связей [70-73]. Более того, есть плёнки с содержанием 65% фенил, 35% метил полисилоксаном (CB-TAP), пример разделения на таких колонках показан на Рис.1.4 [63, 69].

Полярность и селективность таких колонок возрастает с ростом температуры, однако при 365-390<sup>0</sup>С кварцевые капиллярные колонки начинают разрушаться, возможно окисление продукта или неподвижной фазы под действием проникающего извне кислорода. Эта проблема решается при использовании алюминиевых капиллярных колонок, покрытых 75% фенил-, 25% метилполисилоксаном, более устойчивых к высоким температурам [72].

Капиллярные колонки, покрытые более полярной стационарной фазой типа цианопропил полисилоксан (OV-275, Silar 10C, CP Sil88, SP-2340, RTX-2330), непригодны при высокой температуре, необходимой для разделения ТАГ. Тем не менее, такие колонки (SP-2330, RTX-2330) были использованы для разделения смесей дериватизатов триметилсилильных эфирных производных ДАГ, МАГ и свободных жирных кислот [42].

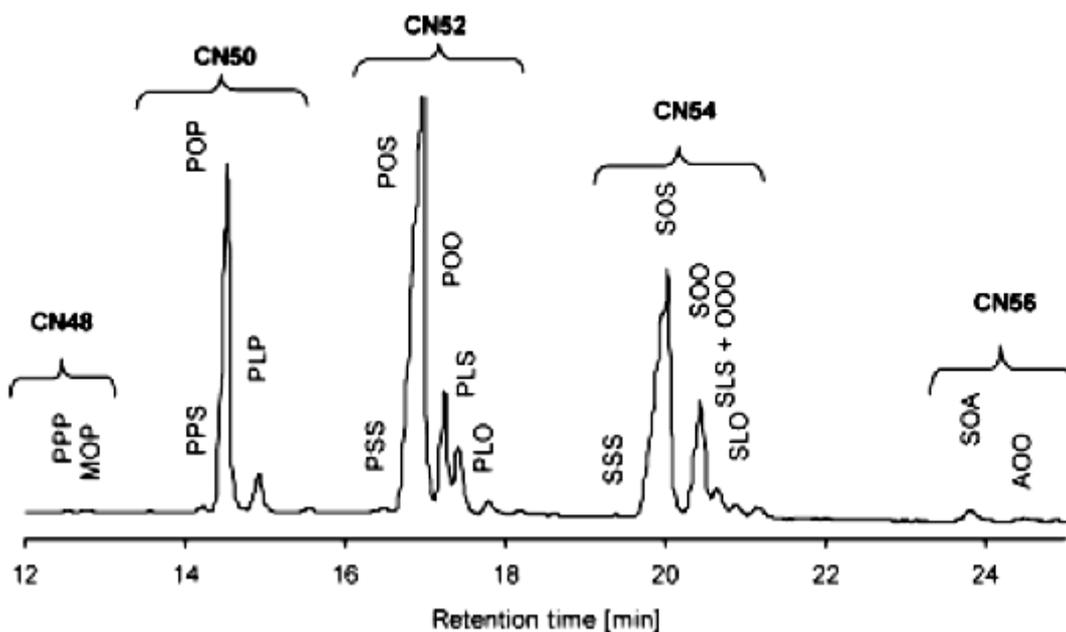


Рис. 1.4. Разделение ТАГ масла какао

Колонка: 25 м × 0.25мм СВ-ТАР, толщина привитого слоя 0.1 мм.

Как видно из хроматограммы на рис. 1.14, в ряду  $P_2C - P_2O - P_2L$  удерживание увеличивается. Тем не менее стереоизомеры (позиционные) остаются неподелёнными. При анализе соевого масла, более ненасыщенного, чем масло какао, удалось разделить ТАГ по углеродным числам (CN) на группы, причём в группах возрастает удерживание с увеличением полярности ТАГ. Полярность ТАГ возрастает с увеличением степени ненасыщенности в радикалах жирных кислот (Ln - L - O - C) и с ростом числа двойных связей в ТАГ (L<sub>3</sub>, OL<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>L, O<sub>3</sub>) [62, 63].

Однако количественный анализ ТАГ при помощи метода ГЖХ может давать недостоверные результаты особенно для ненасыщенных ТАГ [88, 89]. Ошибки в количественном анализе зависят от инъекции образца и потери на колонке [85, 86]. Авторами [84 - 88] опубликованы подробные исследования о влиянии техники инъекции насыщенных ТАГ. В принципе, в капиллярной ГЖХ методы инъекции могут быть разделены на 2 группы: испарение непосредственно на начальном участке колонки (I) и испарение во внешнем испарителе (II) до деления потока [89, 90]. Для варианта (II) потери ТАГ

составляют 14-20 % и 25-50% для варианта (I). Гроб [65] в своих трудах говорит, что метод (II) является более мягким по отношению к ненасыщенным ТАГ при высоких температурах.

В настоящее время существуют несколько способов получения производных для анализа при помощи ГЖХ:

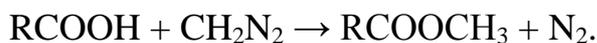
Основные способы получения производных липидов перечислены ниже:

1. Получение силильных производных.

2. Алкилирование

3. Получение сложных эфиров кислот:

а) диазометановый метод, где дериватизация проходит по уравнению



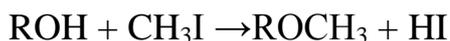
б) метанольный метод:



в) пиролитический метод:



4. Получение простых эфиров, дериватизация соединений проходит по уравнению:



5. Получение ацильных производных (наиболее распространенные ацилирующие реагенты — ангидриды соответствующих кислот).

6. Образование оксимов и гидразинов

7. Образование производных неорганических соединений (летучих хелатов металлов, алкилпроизводных ртути, гидридов, хлоридов). Некоторые примеры анализов методом ГЖХ приведены в Приложении 3.

Непосредственный анализ нативных ТАГ методом ГЖХ довольно длительный, занимает около часа. Для ускорения анализа в основном используются полученные производные ТАГ - метиловые эфиры. В любой стадии подготовки аналитов к анализу может возникать искажение информации о структуре аналитов. Неполный выход реакции

переэтерификации, изменение структуры жирных кислот и образование артефактов соединений, полимеризация, гелеобразование – все это влияет на полученные результаты анализа. Тем не менее, в современных методах ГЖХ-разделения стремятся к сочетанию высокой скорости и высокого разрешения. Например, можно отметить статью, в которой метиловые эфиры жирных кислот определяют в различных липидных матрицах с использованием быстрой ГЖХ в течение нескольких минут [91]. Bondia Pons с сотр. [92] применяли аналогичную стратегию для разделения 35 видов метиловые эфиры жирных кислот из человеческой плазмы в течение 32 мин. При анализе на неполярных капиллярных колонках время выхода аналита зависит от температуры кипения (в основном от длины цепи и количества двойных связей). При анализе на полярных колонках большое влияние имеет полярность вещества (увеличивается влияние двойных связей).

Кроме того, ГХ может сочетаться с Фурье-ИК-спектроскопией, например, для идентификации различных видов МЭЖК [93,94], хотя низкая чувствительность является основным недостатком данного метода. Примеры таких зависимостей можно наблюдать на хроматограммах в Приложении 4.

### **1.2.3 Тонкослойная хроматография**

При исследовании сложных природных смесей, называемых липидами и содержащих соединения с различными числом и видами полярных функциональных групп, прежде всего целесообразно разделить входящих в них компонентов на классы. Эту задачу удобно осуществлять с помощью нормально-фазовой ТСХ. Информация по использованию этого метода изложена в ряде научных статей и обзоров [95 -119].

Большинство работ по ТСХ липидов проводили на пластинах со слоями силикагеля. В качестве ПФ применяли неполярные растворители (петролейный эфир, гексан, метанол, бензол и тетрахлорид углерода), с

небольшими добавками более полярных растворителей, таких как диэтилового эфира, ацетона, уксусной кислоты и даже воды, табл.1.

Таблица 1.3.

Условия разделения липидов методом ТСХ

№	Объекты	Тип пластины	ПФ	Литературные источники
1	Липиды	силикагель	петролейный эфир (Т. кип. 60-70 °С) и диэтиловый эфир (92:8)	[95]
2	Полярные липиды	силикагель	смесь этилового эфира с метанолом (1:1)	[95]
3	Неполярные липиды	силикагель	гексан - диэтиловый эфир - уксусная кислота (70:30:1)	[95, 97]
4	Липиды сыворотки крови	силикагель	петролейный эфир (50-70°С), метилэтилкетон и уксусная кислота (95:4:1);	[95]
5	Липиды, растительного масла	силикагель	гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота; соотношение компонентов в смеси изменялось в пределах от 90:10:1 до 60:40:2	[95, 108, 110]
6	Липиды сыворотки крови	силикагель	хлороформ – метанол - уксусная кислота - вода (25:10:3:2)	[95]
7	Сыворотки крови нейтральных липидов	силикагель	смесь гексан - диэтиловый эфир - уксусная кислота (165:15:1)	[95]
8	Липиды, растительных и животных жиров	силикагель	петролейный эфир (60 - 70°С) - диэтиловый эфир - уксусная кислота (90:10:1)	[95]
9	Липиды	силикагель	метилацетат: изопропанол: хлороформ: метанол (0.25%) водный КСl (25:25:25:10:9, об. %) Изогексан:диэтиловый эфир: уксусная кислота (85:15:1, об.%)	[107]
10	ТАГ касторового и оливкового масла	силикагель	петролейный эфир (60 - 70°С) - диэтиловый эфир - уксусная кислота (70:30:2)	[95]
11	Животные липиды	силикагель	хлороформ – метанол – вода, 25:10:1	[96]
12	ТАГ	кизельгур, и сульфат кальция	Изопропанол - ацетонитрил, взятые в соотношении 3:2, насыщенная бромная вода	[95]
13	ТАГ	силикагель 60 G, Merck	1,0-2,5% (об / об) метанол в хлороформе,	[106]
14	МАГ и ДАГ	силикагель	н-гексан - диэтиловый эфир- уксусная кислота - метанол (90:20:2:3)	[95]

Выбор подвижной фазы зависит от свойств исследуемой смеси, подлежащей разделению. В таблице 1.3 приводятся несколько примеров составов ПФ, предназначенных для разделения нейтральных липидов.

Однако при использовании силикагеля не всегда удаётся добиться разделения веществ на классы. Адсорбенты для достижения желаемого разделения модифицируют путем пропитки другими веществами. Самым распространенным методом является обработка борной кислотой или нитратом серебра. Модификации с нитратом серебра используется для разделения ТАГ, ДАГ и МАГ по степени насыщенности [96].

Николова-Дамянова и сотр. установили, что ионы серебра образуют обратимые комплексы с  $\pi$ -электронами *цис*-изомеров прочнее, чем с  $\pi$ -электронами *транс*-изомеров, чем больше двойных связей в радикале, тем сильнее удерживание. Это даёт возможность разделять сложные эфиры в зависимости от положения, конформации и количества двойных связей [95, 96, 112, 113].

В работе [111] можно отметить, что обработка силикагеля 3-5 % раствором борной кислоты позволяет улучшить разделение МАГ, ДАГ и ТАГ.

Деструктивные методы детектирования соединений на пластинах включают распыление по пластине серной кислоты (50% об) и сушку при 180°C в течение 1 часа, липиды проявляются в виде чёрных пятен [98]. Некоторые реагенты, например,  $\text{FeCl}_3$ , селективны к определенным функциональным группам и могут быть использованы для обнаружения холестерина и эфиров холестерина, нингидрин может быть использован для обнаружения холин-содержащих фосфолипидов [95]. Некоторые липиды могут быть визуализированы непосредственно в УФ- или видимом свете.

Одномерное ТСХ разделение не всегда позволяет разделить и идентифицировать вещества, в этом случае можно воспользоваться двумерной ТСХ. Использование стандартов облегчает идентификацию неизвестных веществ.

## 1.2.4 Жидкостная хроматография

ВЭЖХ в последнее время играет исключительную роль в идентификации и разделении липидов. Возможность комбинировать различные методы детектирования с современными насосами высокого давления и новыми модифицированными сорбентами уменьшает время анализа, повышает чувствительность метода и увеличивает эффективность разделение аналитов. Жидкостную хроматографию в зависимости от вида обращенной фазы делят на: нормально-фазовую ВЭЖХ и обращенно-фазовую ВЭЖХ [120-132]. Для НФ характерно разделение по классам веществ, для ОФ характерно разделение классов веществ по аналитам.

Schaefer и сотр. [120] разработали для НФ ВЭЖХ липидов количественную методику определения и разделения по классам веществ, таким как: свободные жирные кислоты, моно- ди- и триациглицерины, сфинголипиды и фосфолипиды [121]. Существует довольно много методик разделения липидов для различных типов детекторов как на основе органических растворителей, так и на водно-дисперсных системах [122].

Ранее уже упоминалось влияние ионов серебра для ТСХ систем, по аналогии для ВЭЖХ систем используют сорбент, содержащий  $Ag^+$ . На порядок элюирования в этом случае больше влияет количество двойных связей в молекуле [123]. ВЭЖХ с добавками иона серебра хорошо показала себя при идентификации геометрических и позиционных изомеров ТАГ.

Основные типы современных детекторов, которые используют для определения липидов, представлены ниже [124]:

- 1) рефрактометрический [125],
- 2) УФ-детектор [126],
- 3) испарительного светорассеяния (ELSD) [127],
- 4) электрохимический [128],
- 5) кондуктометрический [129],
- 6) заряженного аэрозоля (CAD) [130].

Одним из оптимальных и универсальных детекторов можно назвать ELSD, он позволяет детектировать любые липидные классы соединений с хорошей стабильностью и эффективностью, совместим со многими органическими растворителями. В обзоре Mondello и сотр. [131] и Верри и сотр. [132] было рассмотрено применение различных видов многомерной хроматографии для липидного анализа для ГЖХ и ВЭЖХ систем.

### **1.2.5 Инфракрасная спектроскопия.**

Инфракрасная спектроскопия довольно широко распространена при проведении анализов жиров и масел. ИК- спектры масел дают существенную информацию о структуре и функциональных группах жиров и масел, а также о содержащихся в них примесях. Волновые числа характеристических полос, используемые в методе, представлены на рисунке 1.5, в высокочастотной области спектра ( $3700-3400\text{ см}^{-1}$ ) наблюдаются полосы валентных колебаний атомов водорода, связанные с атомом кислорода, в том числе воды (Н-ОН), гидроперекисей и продуктов их распада. В диапазоне с меньшими значениями волновых чисел ( $3025-2850\text{ см}^{-1}$ ) проявляются валентные колебания атомов водорода, связанные с атомами углерода в составе метильных, метиленовых, а также концевых метильных групп. На спектре для аналогичных связей также наблюдаются полосы, соответствующие валентным колебаниям атомов водорода с атомом углерода в *цис*-двойных связях и колебания атома водорода в альдегидной группе.

Ближе к центру спектра характерный пик поглощения наблюдается для группы  $\text{C} = \text{O}$  (сложноэфирной связи жирной кислоты с глицерином). Рядом с этим пиком находится сигнал, связанный с карбоксильной группой ( $\text{COOH}$ ) свободных жирных кислот. В той же области находятся полосы поглощения альдегидов ( $\text{R-CHO}$ ) и кетонов ( $\text{R-CO-R}$ ) – некоторых продуктов окисления масла. В области  $1500-900\text{ см}^{-1}$  можно обнаружить специфические полосы поглощения жиров и масел. [133, 134].

Родригес-Отеро и др. [135] использовали ИК-спектроскопию для определения жиров, белка и сухих веществ в сыре. Lee и др. [136] использовали поглощение в коротковолновой (700 нм - 1100 нм) ИК-области для оценки липидного состава мяса форели [137]. Использование ИК спектроскопии для определения содержания жиров и масел молока и молочной продукции описано Биггсом [138].

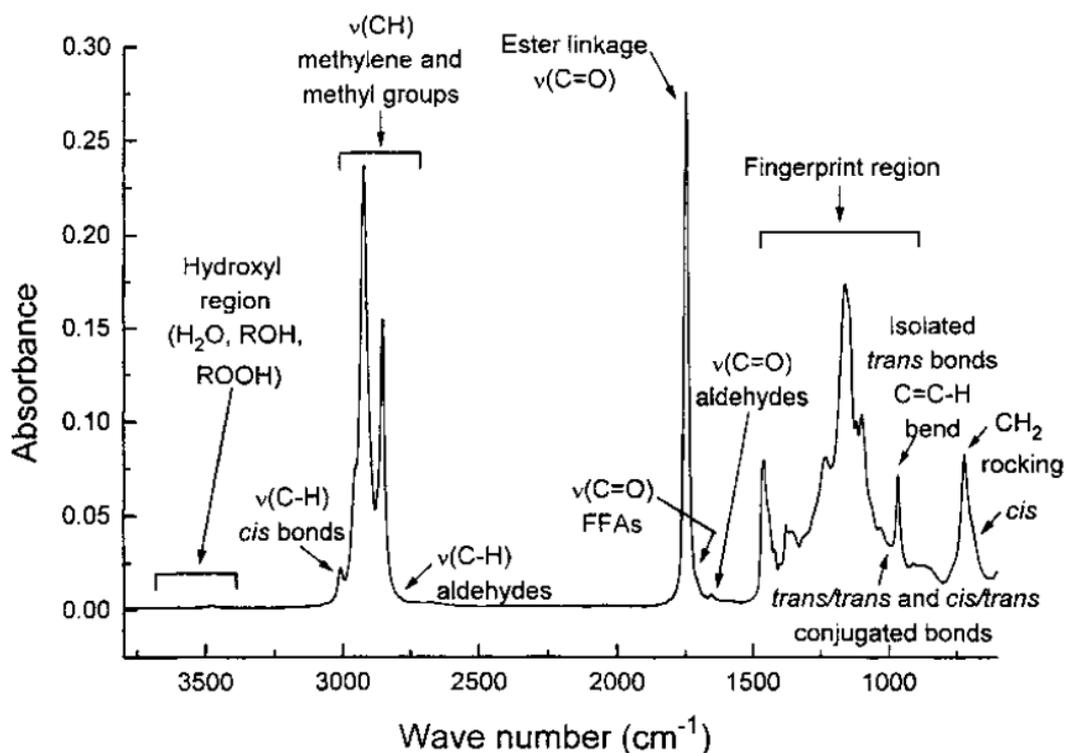


Рис. 1.5. Волновые числа, характеризующие функциональные группы ТАГ

Фурье ИК-спектроскопия находит свое применение при определении йодного числа, числа омыления и для определения наличия свободных жирных кислот [139,140], окислительной стабильности масел [141, 142]. ИК спектрометрия используется также для определения полимеризации масел при жарке [143,144].

В статье [145] авторы использовали метод ИК спектроскопии для подтверждения липидного состава *Mangifera indica* после предварительного разделения при помощи ТСХ. Метилловые эфиры жирных кислот определяли по полосам поглощения при  $1730\text{ см}^{-1}$ .

В работах [146 - 149] были разработаны и апробированы методы, применимые к пищевым продуктам и технологическим маслам. Попытка применения к биологическим матрицам с низким содержанием *транс* жира или низким общим содержанием жира не была удовлетворительна благодаря помехе ИК абсорбции других функциональных групп.

В работе [150] авторы сопоставляли 15 различных маргаринов при помощи ИК-спектроскопии и хемометрической модели. Анализ маргарина при помощи ИК спектров показал хорошие результаты при их идентификации.

В работе [151] авторы пришли к выводу о том, что метод ИК-спектроскопии может быть наиболее информативным при исследовании сложных смесей жиров и масел, включающих МАГ, ДАГ и ТАГ.

Че Манн и др. [152] разработали методику определения свободных жирных кислот в пальмовом масле при помощи ИК-спектрометрии. Калибровочная зависимость лежит в области поглощения  $1722-1690\text{ см}^{-1}$ , интенсивность полос поглощения сопоставлялась при  $1590\text{ см}^{-1}$ . Другая работа Манна посвящена методике определения ТАГ пальмового масла на основе смесей пальмитат-стеарат-олеат в разных соотношениях в течение 2 минут при помощи ИК- спектроскопии. Для градуировки использовали поглощение в широкой области от  $3050$  до  $2984\text{ см}^{-1}$ . В качестве базовой точки брали  $2984\text{ см}^{-1}$ . По интенсивности в этой точке можно найти количество двойных связей, а соответственно долю олеиновых кислот в ТАГ [153].

### **1.2.6 Масс-спектрометрия**

В зависимости от метода предварительной подготовки и разделения липидов масс-спектрометрическое детектирование можно классифицировать:

- а. прямой масс-спектрометрический анализ;
- б. ВЭЖХ-МС;

в. ГЖХ-МС.

г. капиллярный электрофорез с МС детектированием

В масс-спектрометрическом анализе ТАГ при сканировании положительно заряженных ионов в элюент добавляют формиат или ацетат аммония, муравьиную или уксусную кислоты, для образования аддуктов липидов с противоионами [132] или дополнительно используют пост-колоночное подщелачивание для стабильности или увеличения числа продуктов ионизации.

В работе [154] для идентификации ТАГ и ДАГ использовали ВЭЖХ с детектором ELSD и квадрупольный масс-спектрометр, в режиме химической ионизации при атмосферном давлении с использованием добавок ацетата аммония в подвижную фазу. Параметры ионизации (положительной) – напряжение 3000 В, сила тока (разряда) 5 мкА, температура ионизации 325°C, давление азота (газа распылителя) 60 атм., температура газа носителя и расход 350°C и 4 л/мин соответственно, диапазон записи масс-спектров 65-950 м/z.

Оптимальный потенциал образования молекулярных ионов триолеата с катионом аммония был определен в интервале 120-150 В, а трикаприлата - в интервале 60-90 В, таким образом, потенциал фрагментации должен быть уменьшен с уменьшением длины цепи в углеводородном радикале.

По данным некоторых авторов [155] с помощью масс-спектропии можно позиционно определить положение жирнокислотных остатков в глицерине. Отщепление жирных кислот в основном идёт по положению Sn-1,3, а по положению Sn-2 незначительно. Установлено для ненасыщенных жирных кислот, что чем ближе расположена двойная связь к сложноэфирной группе, тем легче образуются фрагменты при химической ионизации.

Анализ молочного жира при помощи НФ ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором позволил определить около 450 различных видов ТАГ.

Прямой масс-спектрометрический анализ подразумевает непосредственное внесение анализируемого материала в источник ионизации масс-спектрометра без предварительного разделения [156]. По существующим вариантам подачи образца можно разделить на подачу из микрошприца при помощи автоматической приставки, подачу твердого образца или специальной подложки, смоченной образцом при помощи специального шприца или непосредственный анализ летучих соединений из окружающей среды. Подавление ионизации, обусловленное различными факторами, является главным недостатком такого вида масс-детектирования. Кроме того, хорошее разделение аналитов приведет к улучшению пределов обнаружения и качества масс-спектрометрических данных в связи с уменьшением влияния матрицы.

### **1.2.7 Газовая хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией (ГХ/МС)**

Важными критериями при определении аналитов методом ГХ/МС или режиме МС/МС является летучесть и термическая стабильность анализируемых веществ. В некоторых случаях для улучшения стабильности и уменьшения или увеличения времени выхода аналитов некоторые функциональные группы могут быть дериватизированы алкилированием, силилированием. Первые достижения масс-спектрометрии в области химии липидов были получены с использованием электронной ионизации [157]. Подобно ГЖХ, в ГЖХ-МС липидные соединения можно анализировать как в нативном виде [158], так и в модифицированном [159].

Эффективность метода электронной ионизации была продемонстрирована при исследовании насыщенных или короткоцепочных ТАГ, ДАГ, МАГ, стеринов, гликолипидов, фосфолипидов. Внедрение методов мягкой ионизации для ГЖХ-МС позволило существенно расширить методики в анализе липидов при масс-спектрометрическом

детектировании. Наиболее распространенным газом-ионизатором является аммиак и хлор. Среди самых доступных и распространенных МС-детекторов в комбинации с ГЖХ используют квадрупольные [159] или времяпролетные масс-анализаторы [160]. Однако хочется отметить, что за последние 5 лет на рынок вышли МС детекторы с веретенообразной ионной ловушкой «Orbitrap» компании «Thermo Fisher Scientific», в свою очередь, это в скором времени скажется на появлении новых методов идентификации, в том числе и липидов.

### **1.2.8 Высокоэффективная жидкостная хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС)**

Использование жидкостной хроматографии существенно снижает подавление ионизации, устраняет фоновый шум, увеличивает динамический диапазон детектирования аналитов. Для разделения слабополярных аналитов, подобных ТАГ, используют ОФ ВЭЖХ с привитой неподвижной фазой, состоящей из 18 атомов углерода (C18) на сферические частицы диаметром до 5 мкм. Однако есть работы по разделению ТАГ на фазах C22, C30, с привитыми нитрильными, аминными, диольными функциональными группами. Отдельно можно упомянуть о современных монолитных колонках как о новом виде стационарной фазы, которые имеют большие возможности для дальнейшего улучшения. В аналитическом обзоре Яшин и сотр. упоминается еще несколько специфических стационарных фаз: «Кроме того, разработаны фенилгексильные, дифенильные, пентафторфенильные, активно исследуются сорбенты с полярными «вставками» в углеводородную цепь для работы при высоком содержании воды в элюенте, описаны сорбенты с привитыми ионными жидкостями (имидазол, 1-метилимидазол), фосфолипидами» [128]. Одна из тенденций в современном приборостроении - это снижение расхода органических растворителей и сокращение времени анализа путем уменьшения диаметра частиц стационарной фазы [132]. Что в

свою очередь приводит к увеличению давления для прохождения потока элюента через подобные колонки и появлению нового вида хроматографии УЛЬТРА-ВЭЖХ. Из текущих задач для Ультра-ВЭЖХ стоит в первую очередь увеличение селективности к выбранным анализам.

Основными методами ионизации веществ в системе ВЭЖХ-МС можно считать мягкие методы ионизации – «химическая ионизация при атмосферном давлении» (APCI) и «ионизация распылением в электрическом поле» (ESI) [161-162]. Эти методы ионизации зарекомендовали себя хорошо при определении: ТАГ, стерина, и сложных эфиров жирных кислот, фосфо- и гликолипидов) [163-167]. Другой метод, более современный, фотоионизация при атмосферном давлении (APPI), рекомендуется для определения слабополярных веществ типа ТАГ, стерина и т.п. Обладает более низкой ионизацией фона, в качестве реагентов для ионизации распространены добавки ацетона и толуола в ПФ.

### **1.2.9 Ядерный магнитный резонанс**

ЯМР низкого разрешения  $^1\text{H}$  (импульсная спектроскопия) и частотная область (frequency domain) может быть использована для определения жиров и масел в растительных и пищевых объектах [168-169]. В результате импульсной спектроскопии получают не обычный спектр с видимыми пиками резонанса, а изображение затухающих резонансных колебаний, в котором смешаны все сигналы от всех резонирующих ядер - так называемый «спад свободной индукции». Для преобразования данного спектра используют математические методы, так называемое Фурье- преобразование.

Этот метод может быть использован для определения содержания воды, масла, твердых жиров. Релаксационная область ЯМР была использована для анализа содержания жира в пищевых продуктах, в том числе сливочного масла, маргарина, шоколада, масличных культур, мяса, молока и сухого молока, и сыра [170-175].

Резонансный спектр масел отражает степень ненасыщенности и полиморфизм, содержание масла в воде [168, 173]. ЯМР  $^1\text{H}$  высокого разрешения даёт представление о структурном и количественном составе индивидуальных веществ в липидах. В случае ацилглицеринов в спектре обнаруживаются сигналы пяти атомов водорода в глицерине. Один сигнал в области 5.25 м.д. ( $\text{CHOCOR}$ ) попадает в область сигналов протонов олефиновой группы, а сигналы четырёх остальных протонов оказываются расположены между 4.12 и 4.28 м.д. ( $\text{CH}_2\text{OCOR}$ ) [173].

Этот метод также позволяет определять конформацию МАГ (положение жирнокислотного радикала в глицерине Sn1, Sn2 позиции) [176].

ЯМР  $^1\text{H}$  высокого разрешения хорошо показал себя при анализе динамики окисления масел [177]. ЯМР-спектры высокого разрешения  $^{13}\text{C}$  являются более сложными, чем  $^1\text{H}$  спектры, они обеспечивают качественную информацию о структуре вещества, а не количественные данные. Этот метод позволяет определять гидроксильные, эпоксидные, ацетиленовые функциональные группы и разветвления углеводородного скелета в молекулах. Применение ЯМР  $^{13}\text{C}$  для ТАГ позволяет определить позиционные изомеры радикалов жирных кислот в глицерине [175, 176].  $^{13}\text{C}$  резонанс карбонильной группы жирных кислот в Sn-1 и Sn-3 позиции хорошо различимы от Sn-2 положения. Большинство ненасыщенных жирных кислот в Sn-2 положении могут быть легко дифференцированы.  $^{13}\text{C}$  ЯМР был успешно применен для определения позиционного распределения ТАГ жирных кислот в растительных маслах [177-190] и в маслах морских животных и растений [185]. ЯМР-томографию [186] авторы применили для изучения кристаллизации жиров. Halloin и др. [190] описали две МРТ техники для изучения распределения липидов в эмбрионах пекана. Поврежденные эмбрионы дали изображение, которые были менее интенсивными, чем у нормальных эмбрионов, отражая снижение содержания масла. МРТ и ЯМР используются для определения содержания масла в смесях для заправки салатов, погрешность метода составила 2% [191].

Pilhofer (Пилхофер) и др. [192] изучили использование МРТ для исследования формирования и устойчивости эмульсий масла-в-воде с растительным маслом, молочным жиром и фракциями молочного жира.

ЯМР- $^{13}\text{C}$ -спектроскопия высокого разрешения является эффективным методом определения *цис*- и *транс*изомеров жирных кислот [193, 194].

ЯМР-спектроскопия  $^{13}\text{C}$  высокого разрешения была использована для определения *транс*- моно-, ди- и триеновых изомеров [195]. Этот метод также используется для подтверждения наличия специфических *транс*-диеновых изомеров в гидрогенизатах соевого масла [196,197]. Таблица химических сдвигов  $^1\text{H}$ -ЯМР высокого разрешения [174] представлена в Приложении №5.

### 1.2.10 УФ спектрофотометрия

Спектры органических соединений в УФ диапазоне электромагнитного спектра связаны с электронными переходами, При этом электронные переходы локализованы на определённых функциональных группах (хромофорах), чаще всего содержащих двойные, тройные или сопряжённые двойные связи, Каждая из таких групп имеет характеристические частоты поглощения ( $\lambda_{\text{max}}$ ) и характеризуется соответствующими коэффициентами молярного погашения ( $\epsilon_{\text{max}}$ ), таблица 1.4. Одинарные двойные связи имеют максимум в вакуумной УФ области, но принципиально возможно определение ненасыщенности масел по остаточному поглощению при 200 ÷ 210 нм [198].

Следует, впрочем, отметить, что  $\lambda_{\text{max}}$  для соединения может изменяться в зависимости от используемого растворителя [113, 199, 200]. Уф детектирование ТАГ как правило осуществляется при  $\lambda_{\text{max}} = 208 - 215$  нм на этой длине волны поглощение связано с карбоксильной группой, однако  $\lambda_{\text{max}}$  может меняться в зависимости от ПФ, ТАГ с сопряжёнными двойными связями в радикалах приводят к поглощению при более длинных волнах  $\lambda_{\text{max}}$

232 нм. Сопряжённые диеновые, триеновые (и более высокого порядка) ТАГ имеют характерный электронно-колебательный спектр с ярко выраженными тремя максимумами поглощения при 258, 268 и 278 нм (максимум при 268 нм) и сопряженных тетраеновые ТАГ имеют аналогичный триплет поглощения при 285, 300 и 315 нм (максимум при 300 нм) [201].

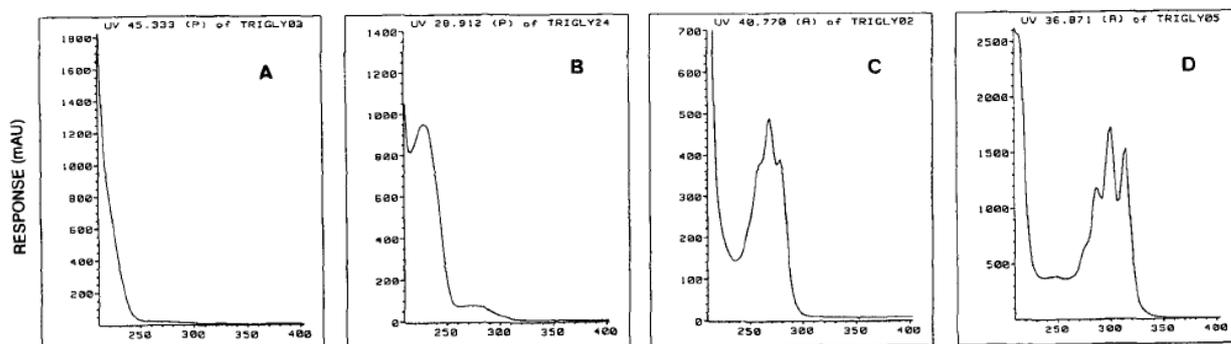
Таблица 1.4.

Некоторые диагностические полосы поглощения в УФ области, используемые при анализе липидов

Хромофоры	Пример	$\lambda_{\max}$ , нм	$\epsilon_{\max}$	ПФ
-C=C-	Октен	177	12600	Гептан
-C $\equiv$ C-	Октин	178	10000	Гептан
-C=C-C=C-	Бутадиен	217	20900	
-(C=C) <sub>n</sub> -	Конъюгированные полиены	217 +30 (n-2)	20000 – 100000	Гексан
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	Бензен	184	47000	Гексан
-(C=C-C=C) <sub>n</sub> -	$\beta$ -каротин	452	139000	Гексан
HC=O	Уксусный альдегид	290	17	Гексан
C=O	Ацетон	275	17	Этанол
-COOH	Этилпальмитат	208-210	32-50	Этанол

В качестве ПФ при УФ детектировании используют многокомпонентные смеси: метанол/изопропанол, метанол/ацетонитрил, изопропанол/ацетонитрил, хлористый метилен/ацетонитрил,

Авторы [202] использовали окисление масел для смещения  $\lambda_{\max}$  в длинноволновую область, они окисляли подсолнечное масло и сопоставляли



данные с исходным маслом, в результате окисления можно получить гидрокси- группы, эпокси- группы. Окисленные формы ТАГ в подсолнечном масле ( $L_3$ ,  $L_2O$ ,  $L_2P$ ,  $LO_2$ ) элюируются раньше не окисленных форм и меняют длины волн  $\lambda_{\max}$  в связи образования сопряженных диеновых связей, например окисленная форма  $L_3$  поглощает в области поглощения триеновых ТАГ, а  $L_{n3}$  поглощает в области тетраеновых ТАГ рис. 1.6.

Рис.1.6. УФ спектры ТАГ

A – триолеат ( $O_3$ ), B – тририцинат ( $R_3$ ), C – окисленная форма триолеата ( $L_3$ ), D – окисленная форма триолеата ( $L_{n3}$ )

Шустер [203] использовал УФ-спектроскопию для определения перекисных групп.

В качестве ПФ при ВЭЖХ детектировании масел и витамина E использовались ацетонитрил – метанол, с добавками изопропанола в градиентном режиме [199].

В работе [204] авторы предлагают метод УФ детектирование окисленных форм ТАГ в виде пероксидов жирных кислот, т. е. первичных продуктов окисления  $\lambda_{\max} = 246$  нм.

Альтернативное (косвенное) детектирование ТАГ в УФ спектроскопии подразумевает под собой модификацию исходного ТАГ (с навешиванием на него хромофора) ТАГ [205].

Другой распространённый метод в ВЭЖХ при УФ детектировании - дериватизация жирных кислот 4-бромфенацилбромидом ( $\lambda_{\max} = 258\text{nm}$ ) [113].

### 1.3 Индексация удерживания

В настоящее время используют большое число приемов идентификации аналитов, из которых наиболее часто применяемым и относительно доступным является способ идентификации с использованием образцов сравнения. Однако этот метод как в рутинном анализе, так и в групповой идентификации не всегда дает однозначные ответы и требует привлечения дополнительных аналитических параметров. Наиболее сложной и актуальной проблемой является идентификация при отсутствии образцов сравнения (стандартных образцов). Решение этой задачи представляется возможным с использованием хроматографических параметров удерживания, из которых наиболее применяемыми являются относительные времена (объемы) удерживания и индексы удерживания, в совокупности с другими критериями, характеризующими свойства определяемых соединений. Такой способ интерпретации данных включает в себя сравнение полученных параметров (в частности, индексов удерживания, как наиболее воспроизводимых параметров) с табличными данными (с базами данных). В качестве дополнительных критериев можно отметить УФ-спектры (существуют атласы УФ-спектров для большого числа органических соединений), относительные оптические плотности при фиксированных длинах волн, логарифмы коэффициентов гидрофобности ( $\log P$ ), коэффициенты распределения анализируемых соединений в гетерофазных системах и другие. В ряде случаев всех известных приемов бывает недостаточно для однозначной идентификации аналитов. Таким образом, существует необходимость поиска новых способов и критериев идентификации соединений различных классов в многокомпонентных смесях методом обращено-фазовой ВЭЖХ.

### 1.3.1 Индексация удерживания по Ковачу

Логарифмический индекс удерживания Ковача, предложенный в 1958 году, – это безразмерный параметр, характеризующий удерживание сорбата в условиях газовой хроматографии в масштабе шкалы удерживания  $n$ -алканов, хроматографируемых в идентичных условиях, где  $z$  и  $(z+1)$  – числа атомов углерода в молекулах  $n$ -алканов, элюирующихся до и после исследуемого вещества  $x$ , т.е.  $t'_{R(z+1)} > t'_{Rx} > t'_{Rz}$ . Следовательно, индекс удерживания  $I$  равен помноженному на сто числу атомов углерода в молекуле такого гипотетического  $n$ -алкана, который имел бы одинаковое с исследуемым веществом приведенное время удерживания [206]. Интерполяционные величины индексов удерживания  $I$  получают с использованием двух стандартных веществ сравнения.

$$I = 100 \left( \frac{\lg t'_{Rx} - \lg t'_{Rz}}{\lg t'_{R(z+1)} - \lg t'_{Rz}} + z \right) \quad (1.3.1)$$

Универсальный логарифмический индекс удерживания,  $J$ , предложен М.С. Вигдергаузом в 1986г [207].

$$J_x = \frac{t_{R(x)} - t_{R(n)}}{t_{R(n+1)} - t_{R(n)}} + n \quad (1.3.2)$$

В этом случае индекс удерживания метана равен 1, этана – 2, и т.д. «При расчете линейных индексов удерживания, как и при расчете логарифмических,  $n$ -алканы всегда подбирают так, чтобы пик проверяемого компонента на хроматограмме находился между пиками соседних алканов. Величина индекса удерживания данного вещества на определенной НЖФ при определенной температуре колонки практически не зависит от концентрации и хорошо воспроизводима. Табличные значения индексов для

многих органических веществ на различных НЖФ опубликованы в научно-технической литературе, включены в справочники и базы данных» [208].

Интересный обзор корреляционных уравнений и предсказания индексации удерживания для газовой хроматографии можно найти в статье Набивач и Дмитрияков опубликованный в журнале Успехи химии выпуск 62 [209] Автор приходит к мнению, что наиболее перспективные корреляционные уравнения должны учитывать отклонения от принципа аддитивности энергии межмолекулярного взаимодействия, уравнение 1.3.3, а также уравнения на основе структурных и топологических параметров соединений:

$$I = an + \frac{b(\ln n)}{n} + \frac{c}{((m-2)^2 + 0.1) + d} \quad (1.3.3)$$

### 1.3.2 Индексация удерживания в ОФ ВЭЖХ

В общем случае параметр удерживания вещества **R** в различных методах моделирования соотношений «удерживание – структура» или «удерживание – свойство» (в рамках метода QSRR – Quantitative Structure Retention Relationship: количественная взаимосвязь между структурой и удерживанием) предполагают находить в виде:

$$R = R_0 + a \cdot S(\Sigma), \quad (1.3.4)$$

где:

**R** и **R<sub>0</sub>** – параметр удерживания и постоянная составляющая параметра;

**S(Σ)** – параметр, описывающих существенные для хроматографирования свойства сорбата;

**a** – коэффициент.

В простых аддитивных моделях  $S$  - сумма инкрементов, отличающих строение некоторого сорбата от исходного (реперного) соединения:

$$S = \sum n_i s_i, \quad (1.3.5)$$

где:

$n_i$  – количество фрагментов, добавленных к структуре исходного сорбата;

$s_i$  – инкремент, приходящийся на каждый добавленный фрагмент.

В моделях «удерживание – свойство»  $S$  – некоторое свойство вещества (например, дипольный момент, мольный объем и т.д.). В моделях «удерживание – структура» возможно суммирование по всем добавленным функциональным группам.

По публикациям в хроматографических журналах за последние 15-25 лет можно утверждать, что QSRR (quantitative structure-retention relationship) является одним из наиболее часто используемых направлений исследований. Однако при этом используется следующая процедура: в некоторых хроматографических условиях (для конкретного состава подвижной фазы, для конкретной температуры и конкретной хроматографической колонки) исследуется удерживание определенного набора сорбатов по уравнению, введенному Abraham et al [210, 211]:

$$\log k = C_1 + rR_2 + s\pi_2^H + a\sum\alpha_2^H + b\sum\beta_2 + vW_x \quad (1.3.6)$$

где  $C_1$  – является не зависящей от сорбата константой, которая включает фазовое соотношение;  $a$  – сумма произведений различных величин, как предполагается, отражает набор возможных взаимодействий сорбата со стационарной фазой:  $r$  – избыточная молярная рефракция стационарной фазы,  $R_2$  – избыточная молярная рефракция сорбата,  $s$  – параметр дипольности/поляризуемости стационарной фазы,  $\pi_2^H$  – то же для сорбата;  $a$  – разность основности стационарной и подвижной фаз относительно образования водородной связи,  $\alpha_2^H$  – кислотность сорбата по соотношению к образованию водородных связей;  $b$  и  $\beta_2$  – аналогичные свойства (зеркальное

отражение),  $V$  - свободная энергия образования полости в стационарной фазе,  $V_x$  – молярный объем сорбата.

Известны некоторые модификации уравнения:

$$\log k = \log k_{ref} + \eta' H + \sigma' S + \beta' A + \alpha' B + \kappa' C \quad (1.3.7)$$

Даже не разбирая смысл, вкладываемый авторами в конкретные парциальные величины как для сорбата, так и для стационарной фазы, отметим, что их использование может представлять интерес, но отнесение таких исследований к QSRR не совсем понятно, поскольку константы для каждого конкретного вещества должны быть определены экспериментально. Поэтому задача предсказания удерживания по строению вещества напрямую не решается, при наличие двойной (тройной) связи добавляется 1.

В последнее время метод ВЭЖХ интенсивно используется для определения LogP сорбатов по соотношениям:

$$\lg k(i) = a + b \cdot \text{Log}P(i) \quad (1.3.8)$$

где:  $\lg k(i)$  – логарифм фактора удерживания вещества  $i$ ;

$\text{Log}P(i)$  – десятичный логарифм коэффициента распределения вещества в системе октанол-1 – вода;

$a$  и  $b$  – коэффициенты.

CLOGP может быть рассчитан по строению вещества в компьютерных программах более десятка различных фирм.

Прямое отношение к QSRR должны были иметь и инкременты (разности логарифмов факторов удерживания пар веществ при введении соответствующих функциональных групп). Разумеется, инкременты могут быть не совсем аддитивными, если возникают внутримолекулярные взаимодействия между имеющимися группами в молекуле или если все части молекулы неодинаково взаимодействуют со стационарной фазой. Но отказ от инкрементов в последние 20 лет связан с неудачами при попытке сопоставления инкрементов, поскольку отсутствовала обоснованная процедура их сопоставления. После разработки метода анализа

относительного удерживания [215 - 217] интерес к инкрементам может быть возрожден.

### 1.3.3 Индекс связуемости

К настоящему времени не выработано общепринятых количественных характеристик даже по простой аддитивной модели. Дело в том, что инкременты различаются как при переходе от одного состава подвижной фазы к другому, так и при смене стационарных обращенных фаз.

Чаще всего внимание обращают на изменение удерживания при последовательном добавлении метиленовых групп в структуру реперного соединения. Обычно отмечают, что зависимость логарифма фактора емкости от числа метиленовых групп имеет прямолинейный характер, рис.1.7.

Это позволяет рассчитывать состав радикалов, входящих в состав эфиров и диэфиров при известном удерживании двух диэфиров известного состава. Аддитивность лежит в основе методов определения состава ТАГ в различных вариантах эквивалентных углеродных чисел.

Шатц и др. [218] для описания зависимости удерживания от геометрического строения предложили использовать в качестве дескрипторов удерживания индексы связуемости,  $\chi$ :

$$\lg k = a + b \cdot \chi \quad (1.3.9)$$

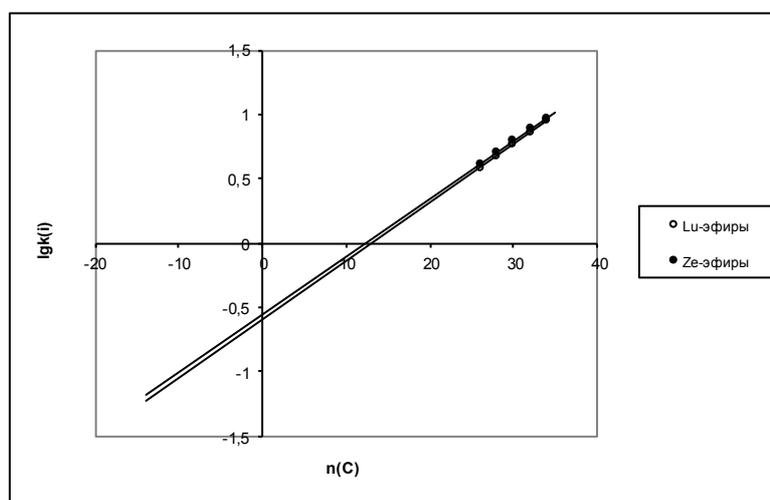


Рис.1.7. Зависимость удерживания диэфиров лютеина и зеаксантина от числа атомов углерода в жирнокислотных радикалах

Стационарная фаза: Кромасил С18; элюент СНЗСН – ацетон (17.5:82.5)

Индекс связуемости первого порядка (т.е. учитывающий связи только между соседними атомами) рассчитывается по правилам:

- учитываются все атомы скелета за исключением водорода;
- по каждой химической связи рассчитывают вклад в суммарный индекс связуемости: определяют число других атомов, связанных с рассматриваемым,  $\delta(i)$ ;
- по каждой из связей рассчитывают ее связуемость:

$$\chi_{ij} = \frac{1}{\sqrt{\delta(i) \cdot \delta(j)}} \quad (1.3.10)$$

- рассчитывают индекс связуемости как сумму по всем химическим связям:

$$\chi = \sum \chi_{ij} \quad (1.3.11)$$

Кроме того, на каждое замыкание цикла водится поправка – 0,5.

Довольно подробно рассмотрены топологические индексы и варианты расчета в аналитическом обзоре Курбатова и сотр. [219].

### 1.3.4 Особенности ВЭЖХ ТАГ растительных масел

Хроматографические методы (если не применяется масс-спектрометрическое детектирование) являются относительными методами, т.е. предполагающими использование определенных стандартных веществ. Вместо точного указания жирнокислотного состава ТАГ масел в мировой практике анализа масел используют различные варианты «эквивалентных углеродных чисел» (ЭУЧ), CN (carbon numbers) или ECN (equivalent carbon numbers) [220]. Суммарное число атомов углерода (n) в радикалах ТАГ

соответствует значению  $\lg k(n)$ , между логарифмами фактора удерживания и  $\Sigma(CN)$  существует прямолинейная зависимость рис. 1.8:

$$CN(n) = \frac{\lg k(n) - a}{b} \quad 1.3.12$$

При сопоставлении стандартной смеси насыщенных ТАГ с логарифмом фактора удерживания, анализируемых ТАГ в одних и тех же условиях, можно рассчитать значение  $CN(n)$  для конкретного вещества (1.3.12). Наличие двойных связей в радикалах ТАГ приводит к необходимости введения поправки для значения  $CN(n)$ , по примерной оценке, одна двойная связь сопоставима с уменьшением значения  $CN(n)$  на 2 единицы в этом случае  $CN(n)$  переименовывается в  $ECN(n)$  (ЭУЧ). ЭУЧ не учитывают положение и изомеризацию двойной связи, сопряженность связей при наличии, механизмы удерживания и т.д. Подробнее о значениях и факторах, влияющих на ЭУЧ, описано в Главе 3. Повсеместное введение масс-спектрометрических детекторов позволяет даже без стандартных смесей, насыщенных ТАГ посчитать число атомов углерода в определенном ТАГ по масс-спектрам [221, 222].

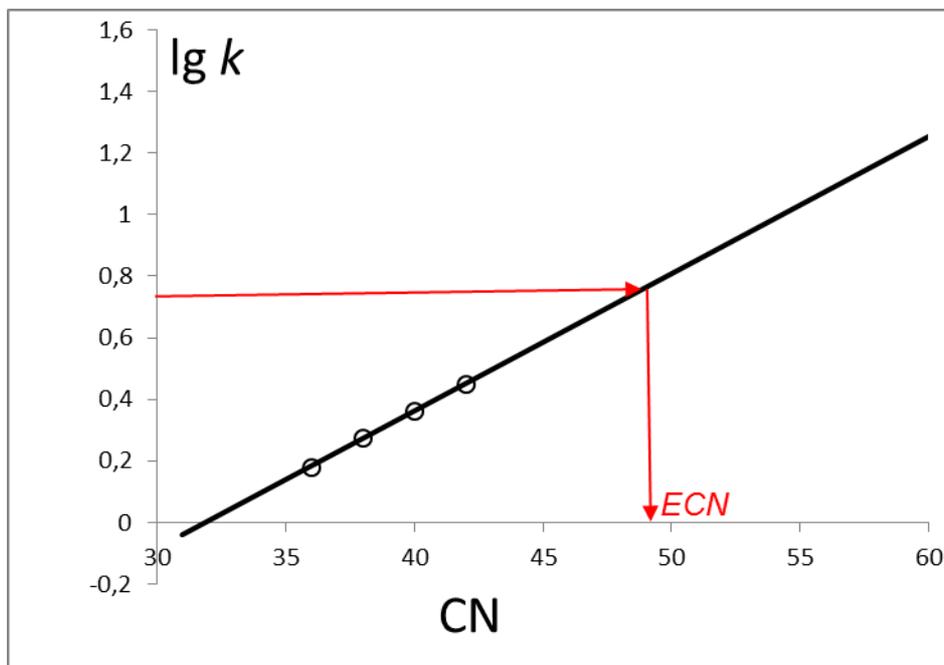


Рис. 1.8. Система эквивалентных углеродных чисел

### 1.3.5 Особенности индексации ТАГ методом МОАУ

Для удерживания ТАГ, образованных насыщенными жирными кислотами (от трикапроноата до трипальмитата в виде трех четырехкомпонентных смесей – капроноат-лауратов, лаурат-миристатов и миристат-пальмитатов), в настоящей работе была получена линейная зависимость по уравнению (1.3.18) при трех различных составах подвижных фаз, рис. 1.9. При этом прямые линии пересекаются в одной точке с ординатой, близкой к трем ( $y_0 = 3.4$ ). Это не удивительно, поскольку в молекуле триглицерида имеются три (карбоксильных) атома углерода трех жирнокислотных радикалов, которые не вносят вклад в гидрофобное удерживание ТАГ.

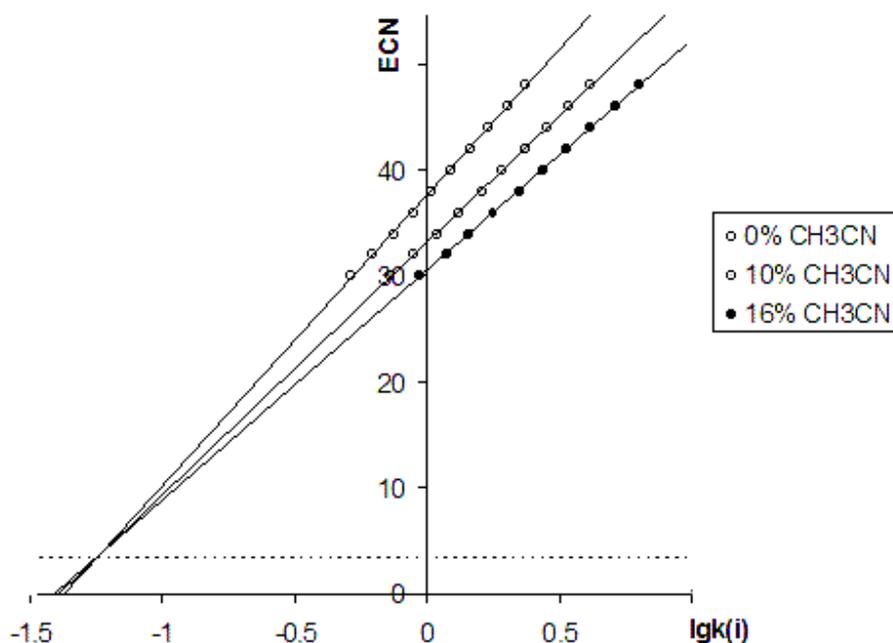


Рис.1.9. Зависимость удерживания триглицеридов, образованных насыщенными жирными кислотами от подвижной фазы.

Впрочем, это непостоянство значений  $ECN(i)$  не слишком велико и эквивалентные углеродные числа ТАГ могут учитываться при анализе

составов и распознавании масел. При этом есть необходимость использования смесей стандартных ТАГ. Но, как показал наш многолетний опыт исследования масел методом обращено-фазовой ВЭЖХ, в качестве стандартных можно использовать и легко и повсеместно доступные масла. Например, подсолнечное масло из розничной сети вне зависимости от производителя (внутри России или включая даже масло из Аргентины) имеет довольно однородный состав. Его основные компоненты – трилинолеат ( $L_3$ ), дилинолеат-олеат ( $L_2O$ ) и дилинолеат-пальмитат ( $L_2П$ ). При этом вместо *ECN* лучше воспользоваться инкрементным подходом, предложенным ранее [213, 214], который предназначен для прямого расчета компонентного состава ТАГ.

При знакомстве с любой публикацией, посвященной хроматографическим методам анализа, возникает вопрос – насколько общими являются получаемые закономерности. Это важно по крайней мере для работ, при выполнении которых были использованы сложные технологии с большими временными затратами и с использованием труднодоступного оборудования. Разработкой и апробацией занимался д.х.н., профессор Дейнека В.И. До разработки метода относительного анализа удерживания (МОАУ), по сути дела, не существовало обоснованного способа сопоставления параметров удерживания веществ, полученных в различных хроматографических системах. Главная причина этих различий – неэквивалентность свойств стационарных фаз не только различных производителей, но и фаз одной торговой марки различных партий.

Применение аналитического подхода МОАУ позволяет в ряде случаев проводить прямое сопоставление экспериментальных данных. Кроме стандартной для МОАУ линейности подтверждается еще одна закономерность: для относительно малополярных веществ - функциональная зависимость относительного удерживания мало изменяется при смене стационарных фаз [213-217, 223-228].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Глава 2. Объекты исследования и методики эксперимента

В качестве объектов исследования в работе использовались: семена растений ООО «Группа компаний «Гавриш» аквилегия, клецелины, лаватеры, моркови, бораго, энотера, ООО «Семена НК» -ипомея, салат айсберг, ЗАО ССПП «Сортсемовощ» - нигелла, настурция везувий, Компания «СеДеК» аквилегия, ООО «Плазмас» - аквилегия;

Орехи грецкие, миндаль, кешью, кедровые, фундук, пекан; растительные масла: подсолнечные масла: «Урожай солнца» изг. ООО "Маслокомбинат "Нижегородский", «Олейна», «Олейна+» изг. ООО "БУНГЕ СНГ", «Милора» изг. ОАО "ВКРМ", масло подсолнечное нерафинированное ООО "Риф" масло подсолнечное «Альтеро» изг. ОАО «ЭФКО», масло подсолнечное «Слобода» изг. ОАО «ЭФКО», масло подсолнечное «Идеал» изг. ООО "БУНГЕ СНГ"

Масло Злато подсолнечно –оливковое изг. ООО «МЭЗ Юг Руси», подсолнечное с добавлением оливкового «Слобода» изг. ОАО «ЭФКО», масло подсолнечное-оливковое «Аведовъ» изг. ОАО «МЖК «Краснодарский», масло подсолнечное-оливковое «Альтеро» ОАО «ЭФКО».

Масло Ши, Аргану, изг. ТМ «Ароматика», масло облепихи изг. «Маслянный король», примула вечерняя изг. «Фарм-косметика», масло эхиум, пенник луговой, чаульмугра изг. ООО «Терра Ароматика», масло облепихи, манкетти, граната изг. ООО «Аромарти», масло авакадо, сезамовое изг. ООО «НПФ «Царство ароматов», кокосовое масло интернет магазина «Икаров», масло железного дерева, хлопковое, календулы, косточек персика изг. ООО «Ботаника», масло макадами изг. ООО «натуральная косметика», масло абрикосовое изг. «Галено-фарм», масло авакадо изг. ООО «ТГК Ароматы жизни» Масло кедровое «Сибирское» изг. ЗАО «Эвалар». Пальмоядровое изг. ООО «ТГК Ароматы жизни»,

льняное масло изг. ООО "Лён", Масло льняное Вологодское изг. ООО «Завод растительных масел Вологодское» Масло соевое, рапсовое - изготовитель SARL HBS (Франция), кукурузное масло «Злато» изг. ООО «МЭЗ Юг Руси», кукурузное масло изг. ООО «ПК «Вкусы здоровья», «Облепиховое масло из плодов и листьев», «Облепиховое масло» «Катунь Олеум», РФ; «Облепиховое масло» ЗАО «Алтайвитамины», ООО НПФ «Алтайский букет»; «Масло какао» Theobroma cacao ООО «Натуральная косметика» (Аромашка).

Плоды и семена растений, предоставленные Ботаническим садом НИУ «БелГУ», Московским Ботаническим садом плоды древогубца, бересклета, вишни, черешни, яблок, облепихи.

Плоды облепихи сортов «Перчик», «Масличная», «Юбилейная», «Бочонок», «Любительская» и «Брат красного» были собраны в конце августа 2006 г в ботаническом саду БелГУ. Образцы «Облепиховых масел» были приобретены в аптеках г. Белгорода.

Маргарин универсальный «Чудесница» изг. «Солнечные продукты», спред растительно-жировой «Крестьянский» изг. «Нижегородский масложировой комбинат», спред растительно-жировой изг. ТМ «Кремлёвский», маргарин «Пышка» изг. ООО «Юнилевер Русь», маргарин «Пышный рецепт» изг. ОА «Нижегородский масло-жировой комбинат», маргарин «Сливочный Нижегородский» Хозяюшка изг. ОА «Нижегородский масложировой комбинат». Молоко козье ООО «Виринея», домашнее Белгородская обл.

Масла сливочные: «Вологодское» изг. ОАО «Учебно-опытный молочный завод» ВГМХА им. Верещагина», Масло сладко-сливочное Традиционное изг. «Братья Чебурашкины», Сливочное масло Фонтерра Лимитед «Anchor», Масло сливочное Тысяча озер «Свежесть раннего утра», масло сливочное Алексеевское традиционное, масло сливочное Брест-Литовск, масло сливочное 82.5% Дмитрогорский молочный завод, масло сливочное «Домик в деревне», масло сливочное Курский молочный

завод «Ностальгия», масло растительно-сливочное «Курскмаслопродукт» «Классическое», масло сливочное крестьянское «Валуйские просторы», Масло сладко-сливочное под торговой маркой Viola изготовлено ООО «Кохмайстер РУС», Сливочное масло «Крестьянское» изг. ЗАО «Томмолоко», масло сладкосливочное «Крестьянское» несоленое изг. ЗАО «Озерецкий молочный комбинат», масло сливочное «Крестьянское» сладкосливочное несоленое изг. ООО «Лав продукт», Масло сливочное «Крестьянское» изг. АО «Тульский молочный комбинат», масло сладкосливочное «Крестьянское» изг. ЗАО «Озерецкий молочный комбинат», масло сливочное изг. АО «ХК «Ополье», масло сливочное изг. ООО «Курское молоко», масло сливочное крестьянское «Курское поле» изг. ООО «Молоко», масло крестьянское сладко-сливочное несоленое «Золотой Эталон», изг. ООО «Молочный дом», масло сливочное крестьянское «Бабушкино золото» изг. ООО «Курскмаслопром-1», масло сливочное крестьянское «Белая слобода», изг. ООО «Курское молоко», масло сливочное крестьянское «Буренушка», изг. ООО «Курская молочная компания», масло сливочное крестьянское «Слобода» изг. ООО «Содружество», Масло сливочное крестьянское изг. ЗАО «Молочный комбинат «Авида», масло сладко-сливочное крестьянское несоленое «Белый город» ООО «Белгородский молочный комбинат», масла сладко-сливочного несоленого изг. ООО «Молоко плюс», масло сливочное крестьянское ТМ «Ровеньки» изг. ООО «Ровеньки-маслосырзавод», масло сливочное крестьянское изг. ОАО «Молоко» Воронежская обл., масло сливочное крестьянское «Каждый день» изг. ООО «Белый медведь», сладко-сливочное масло «Lurpack» изг. Дания.

Образцы шоколада и шоколадных конфет: Edel herbe Sahne. Bellarom Lindl Stiftung & Co. KG Российский, Темный шоколад с миндалем ОАО «Кондитерское объединение «РОССИИ», Горький шоколад «Amour» 72% АТ ВО «КОНТИ», Черный «Дольчи» шоколад АТ «Во «КОНТИ», Бабаевский горький шоколад с фундуком, ОАО Кондитерский концерн

Бабаевский, Бабаевский горький с целым миндалем ОАО Кондитерский концерн Бабаевский, "Банкет" шоколад горький 72% ЗАО «Кондитерская фабрика «Славянка», «Осенний вальс» ОАО «РОТ ФРОНТ», Шоколад пористый "Спартак" СП ОАО «Спартак», Шоколад десертный с лесным орехом и изюмом ООО Кондитерская фабрика «Победа», Roshen Elegance с миндалем Киевская кондитерская фабрика ROSHEN, Украина, г. Киев, Темный шоколад Alpen Gold ООО «Крафт Фудс Рус», Горький шоколад 80% какао ОАО «Красный Октябрь», Шоколад «Амур» черный с цельным фундуком, ЗАТ Виробниче об'єднання «КОНТИ», Zart herb. Chocour. WIHA GMBH, Ореховый ОАО Кондитерский концерн Бабаевский, Молочный шоколад Nestle ОАО «Кондитерское объединение «Россия», «Для Вас» Шоколад ОАО «Красный Октябрь», Воздушный шоколад темный пористый ООО «Крафт Фудс Рус», «Экстра темный шоколад» ЗАО «Кондитерская фабрика «Славянка», Настоящий шоколад ЗАО «Кондитерская фабрика «Славянка», Cadbury Whole Nut ООО «ДиролКэдбери», Шоколад с кусочками какао ЗАО «Кондитерская фабрика «Славянка», "Кремлевские забавы" Царь-колокол 1735 ООО Кондитерская фабрика «Победа»

## **2.1 Методики извлечения ТАГ из объектов исследования**

### **2.1.1 Подготовка образцов ТАГ, извлекаемых из семян растений**

Экстракцию масел из семян растений осуществляли *n*-гексаном при растирании семян с кварцевым песком под слоем экстрагента в фарфоровой ступке. Проводили исчерпывающую экстракцию, последовательно добавляя порции *n*-гексана при комнатной температуре. Контроль полноты экстракции осуществляли методом ТСХ или спектрофотометрическим методом при 280 нм в случае ТАГ, образованных сопряженными триеновыми кислотами, или при 210 нм для несопряженных кислот относительно *n*-гексана. Порции

экстракта объединяли и растворитель удаляли на вакуумном ротационном испарителе.

### **2.1.2 Подготовка образцов ТАГ, извлекаемых из плодов растений**

Для экстракции масла из свежих плодов навеску массой 5 - 10 г разминали в колбе стеклянной палочкой; заливали последовательно порциями ацетона по 5 - 10 мл; плоды дополнительно разминали под растворителем стеклянной палочкой; далее на 5 минут ставили на вибростряхиватель; каждую порцию экстракта отделяли от остатка фильтрованием. Процесс повторяли до обесцвечивания твердого остатка. Все порции фильтрата объединяли, добавляли *n*-гексан и 10%-ный раствор хлорида натрия в воде. Гексановый слой дополнительно промывали тремя порциями 5-ти кратного объема 10%-ного раствора хлорида натрия. Влагу из экстракта удаляли выдерживанием над прокаленным сульфатом натрия. Масло мякоти плодов облепихи получали отгонкой *n*-гексана из очищенного экстракта под вакуумом.

### **2.1.3 Пробоподготовка масел в составе шоколада**

ТАГ из шоколада экстрагировали ацетоном при растирании образцов в фарфоровой ступке. Экстракт отделяли от исходного материала центрифугированием или фильтрованием. Расчет массы навески велся в зависимости от содержания масла в образце так, чтобы суммарная концентрация масла в экстракте составляла не более 10 мг/мл.

### **2.1.4 Подготовка образцов ТАГ животных жиров**

Экстракцию и определение ТАГ осуществляли следующим методом: к навеске растительного жира ( $m = 100$  мг) добавляли порцию ацетона в

объеме равном 5 мл. ТАГ извлекали из внутреннего жира животного, путем перетапливания под воздействием высоких температур. После отстаивания смесь фильтровали.

## **2.2 Методика омыления ТАГ растительных масел**

Для проведения гидролиза ТАГ к четырем пробам масла, массой 150 мг, приливали по 5 г 5%-ного спиртового раствора щелочи и смесь выдерживали в течение 30 мин. К омыленному раствору добавляли 5 мл *n*-гексана, к смеси добавляли 5%-ный водный раствор серной кислоты до слабокислой реакции (рН – около 3). К смеси добавляли насыщенный водный раствор хлорида натрия и органический слой отделяли в делительной воронке. Гексановый слой высушивали добавлением прокаленного сульфата натрия. Из полученного экстракта *n*-гексан удаляли выпариванием на вакуумном ротационном испарителе; остаток растворяли в 2 мл ацетона для хроматографирования после фильтрования через насадочный фильтр с порами 0.45 мкм.

## **2.3 Методика определение ТАГ методом ОФ ВЭЖХ**

Состав ТАГ в приготовленных образцах определяли методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии:

- 1) с рефрактометрическим детектированием в системе, составленной из насоса высокого давления Beckman 110В, крана дозатора Rheodyne 7125 с петлей объемом 20 мкл и рефрактометрического (R-401, Waters) детектора. Для регистрации и обработки хроматограмм использовали ПП Мультихром 1.5 (Ampersand Ltd. 2005).
- 2) со спектрофотометрическим детектированием в системе, составленной из насоса высокого давления Beckman 110В, крана дозатора Rheodyne 7125 с петлей объемом 20 мкл и спектрофотометрического (LC/9563 Nicolet)

детектора. Для регистрации и обработки хроматограмм использовали ПП Мультихром 1.5 (Ampersand Ltd. 2005).

Все исследования в условиях 1 и 2 проводили при комнатной температуре.

Кроме того, в работе был использован хроматограф Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным детектором или с рефрактометрическим детектором R-401. В данном случае была возможность работать в условиях термостатирования хроматографической колонки (30°C).

В работе использовали хроматографические колонки:

250×4.6 мм Kromasil 100-5C18, защищенная предколонкой 10×4.6 мм, Кромасил-100 5C18 (2 штуки)

250×4.6 мм Reprosil-Pur C18-AQ, 5 мкм,

250×4.6 мм Lichrosphere 100RP-18, 5 мкм,

250×4.6 мм Nucleosil 100 C18, 5 мкм,

250×4.6 мм Equisil ODS C18, 5 мкм.

Для приготовления подвижных фаз использовали ацетон (х.ч. ч.д.а Лаверна), ацетонитрил (ч.д.а. и для град. ВЭЖХ Merck), метиленхлорид (ос.ч.), пропанол-2 (для град. ВЭЖХ Merck), *n*-гексан (ос.ч.-1 сорт Кривохром, Лаверна).

## **2.4 Спектрофотометрические исследования**

Спектрофотометрические исследования выполняли в кварцевых кюветах на приборе СФ-56.

## **2.5 Методика определение метиловых эфиров жирных кислот методом ГЖХ**

Метиловые эфиры получали по ГОСТ 31665-2012 «Масла растительные и жиры животные. Получение метиловых эфиров жирных кислот»

«Для определения эфиров методом ГЖХ использовали газовый хроматограф TRACE 1310 (Thermo Scientific) с масс-селективным детектором TSQ 8000. В работе использовали капиллярную колонку 30MX0.25MMID SOLGEL-WAX 0.25UM (длина колонки 30 м, внутренний диаметр 0.25 мм, толщина слоя жидкой фазы 0.25 мкм). Температурный режим: 1) изотермический - 40°C (выдержка 2 мин); 2) градиентный - нагрев 15°C/мин до 210°C; 3) изотермический - 210°C (выдержка 3 мин); 4) градиентный - нагрев 5°C /мин до 240°C; 5) изотермический - 240 °C (выдержка 5 мин). Газ-носитель азот (N<sub>2</sub>), объемная скорость 1 мл/мин, деление потока 10:1 (в некоторых случаях 20:1). Температура испарителя 240°C, объем вводимой пробы 1 мкл. Ионизация электронным ударом, при напряжении 70 эВ температура источника электронов (катода) 200-220°C, температура лайнера 240°C. Сканирование масс-спектров от m/z 40 до 450 за 0,5 секунды. Хроматограммы регистрировали, хранили и обрабатывали, используя ПО Xcalibr и NIST MS search 2.2»

## 2.6 Расчет мертвого времени для ТАГ в ОФ ВЭЖХ

Для расчета мертвого времени ( $t_0$ ) использовали современный подход, основанный на рекуррентных соотношениях [222-228], которые в нашем случае могут быть обоснованы следующим образом: пусть изменение логарифма фактора удерживания одинаково для любых пар соседних веществ ( $i$ ) и ( $i+1$ ) некоторого ряда гомологов при данных хроматографических условиях:

$$\lg k(i+1) - \lg k(i) = \Delta. \quad (2.1)$$

После простых преобразований, можно получить рекуррентное соотношение между временами удерживания последовательных гомологов, функциональная зависимость между которыми позволяет рассчитывать требуемое значение  $t_0$ :

$$t_R(i+1) = 10^\Delta \cdot t_R(i) - (10^\Delta - 1) \cdot t_0. \quad (2.2)$$

## 2.7 Определение времени удерживания ТАГ

Время удерживания,  $t_r$  - время, за которое компонент проходит всю систему от инжектора (момент ввода пробы принимается за  $t = 0$ ) до детектора. Такое прохождение называется элюированием. Чаще всего определяется путём опускания перпендикуляра из вершины пика на нулевую линию. В идеале элюируемое анализируемое вещество даёт совершенно симметричный пик. На деле же пик чаще получается асимметричным, большая его часть находится после максимума или до максимума. Время удерживания ТАГ определяли по ширине пика на нулевой линии в ручном режиме, в программе обработки хроматограмм МультиХром 1.5. Погрешность при таком определении не более 0,002 логарифмических единиц.

## 2.8 Количественный анализ при рефрактометрическом детектировании

Для определения количественного состава ТАГ и жирных кислот в исследуемом образце при рефрактометрическом детектировании в системе ацетонитрил-ацетон составили программу в таблицах Excel, в которой вводим данные состава подвижной фазы (объемы ацетонитрила и ацетона), на основании расчета мольных долей высчитывается относительный показатель преломления для ПФ. В компьютерной программе на основании компьютерного моделирования были построены ТАГ и получены их относительные показатели преломления теоретические (столбик В). В следующем столбце (С) мы рассчитываем разницу относительного показателя преломления между ПФ и каждым ТАГ, далее в столбце D мы провели нормализацию показателей преломления всех ТАГ относительно  $L_3$ . Далее вводим экспериментальные данные по площадям анализируемых веществ, рассчитываем с помощью нормализованных коэффициентов теоретические

площади пиков, далее следует расчет по процентному содержанию каждого ТАГ. Отдельной таблицей выводится содержание жирных кислот в масле исходя из мольной доли ТАГ, для этого мольные доли ТАГ, содержащие определенную кислоту, суммируются с учетом количества кислотных остатков в ТАГ и высчитывается процентное содержание от суммы мольных долей кислотных остатков.

## 2.9 Алгоритм компьютерного моделирования хроматограммы

Алгоритм компьютерного моделирования был реализован в программе Excel. По данным удерживания ТАГ, полученных для колонки Kromasil 100-5C18 в системе подвижной фазы ацетонитрил-ацетон, строились прямые удерживания с коэффициентами,  $a$  и  $b$ . В ручном режиме в определенные поля в таблице Excel вносится мертвое время ( $t_0$ ), логарифм фактора удерживания для  $L_3$  ( $\text{Log } k_{L_3}$ ) автоматически происходит расчет удерживание для 35 ТАГ

После идентификации неизвестных анализов в соответствующую графу можно внести площадь пика для расчета содержания жирных кислот в образце с учетом поправок.

Для построения формы пика использовали уширение, рассчитанное по формуле, которое зависит от логарифма фактора удерживания для каждого компонента.

$$Y(x) = 1/(\sigma\sqrt{2\pi})e^{-\left[\frac{(t_R-x)}{\sigma}\right]^2/2} \quad 2.3$$

$$2\sigma^2 = a + b \cdot k(k+1) \quad 2.4$$

## 2.10 Статистическая обработка результатов

Расчет показателей регрессии выполняли по компьютерной программе Excel. В таблицах данных Excel выполняли следующие команды: – в главном меню выберем пункты **Сервис/Анализ данных/Регрессия**, после чего

щелкнем по кнопке **OK**; – заполним диалоговое окно ввода данных для параметра  $y$  и  $x$ ; для этого в каждое окно (Интервал  $Y$  и Интервал  $X$ ) поместим наши данные, выделив их предварительно в соответствующих столбцах, выделим в текстовом поле **Выходной интервал** новая страница, от которой будет формироваться весь блок получаемых статистических показателей; при этом укажем другой лист – **Лист 2**; вводим уровень вероятности, в нашем случае  $P=0,95$  при  $n=5$ , после чего нажимаем кнопку **OK**.

В итоге мы получаем набор разнообразных статистических данных и выбираем результаты которые нам требуются.

### 3 Результаты и их обсуждение

#### 3.1 Исследование масел с использованием инкрементного подхода

##### 3.1.1 Масло семян подсолнечника

Проведенный нами ГЖХ анализ метиловых эфиров жирных кислот нескольких образцов подсолнечного масла показал, что основной жирнокислотный компонент масла – линолевая или (9Z,12Z)-октадекадиеновая кислота (Л, C18:2<sup>9Z12Z</sup>); по нашим данным ее содержание находится в пределах от 63 – 65 %. Второй по значимости компонент – олеиновая, или (9Z)-октадеценовая кислота (О, C18:1<sup>9Z</sup>) кислота с содержанием от 22 до 25 %, далее следуют пальмитиновая (П, C16:0) кислота с содержанием 7-9 % и стеариновая (С, C18:0) кислота с содержанием около 3-5%, рис.3.1. Полученные результаты совпадают с литературными данными [10-13,32-34,77], хотя к настоящему времени выведены сорта подсолнечника с принципиально иным жирнокислотным составом.

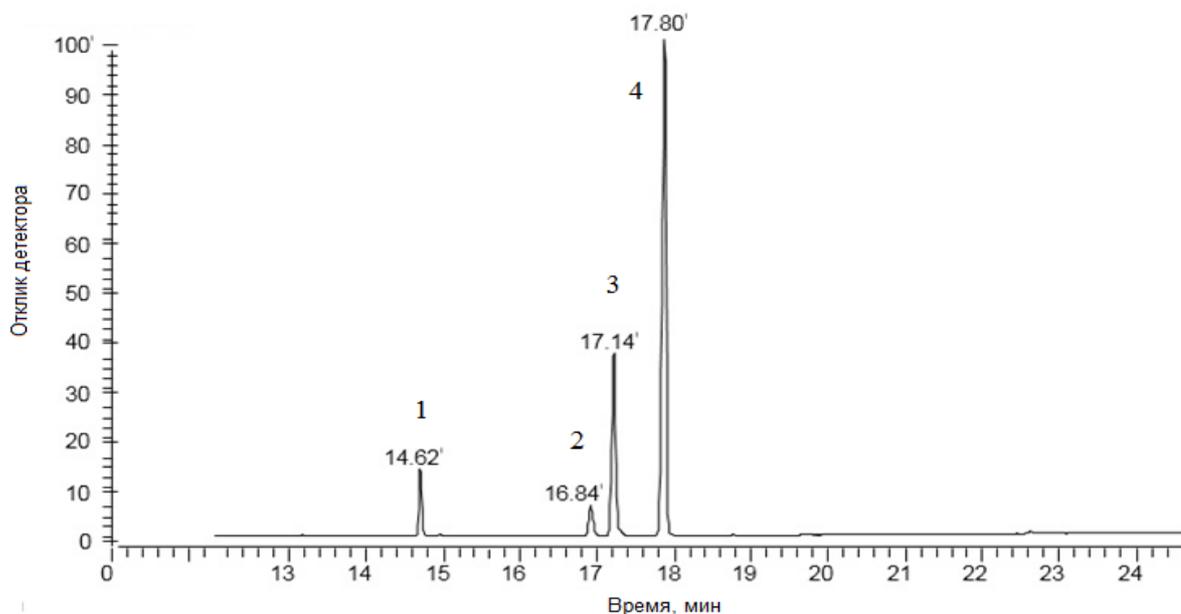


Рис.3.1. Хроматограмма метиловых эфиров подсолнечного масла.

Вещества – метиловые эфиры кислот: 1 - пальмитиновой, 2- стеариновой, 3 - олеиновой и 4 - линолевой кислот.

Условия хроматографирования представлены в главе 2.1

При статистическом (т.е. равновероятностном) распределении всех радикалов по различным видам ТАГ и различным позициям в нем можно получить 20 видов ТАГ без учета положений радикалов в молекуле, табл.3.1.

Таблица 3.1.

ТАГ подсолнечного масла

№	Вид ТАГ	Теоретическая доля, $\alpha_{\text{теор.}}$ ТАГ, %		LogP	$t_R$ , мин	$\alpha_{\text{эксп.}}$	log k	Инкременты		
		Формула	$\alpha_{\text{теор.}}$					Л→О	О→П	П→С
1	Л <sub>3</sub>	p(L) <sup>3</sup>	26.21	22.16	7.53	33.3	0.322	0.114	0.034	0.100
2	Л <sub>2</sub> О	3p(L) <sup>2</sup> p(O)	28.26	22.68	9.08	26.3	0.4372	0.115		
3	Л <sub>2</sub> П	3p(L) <sup>2</sup> p(P)	9.83	22.13	9.61	11.3	0.4705		0.033	
4	Л <sub>2</sub> С	3p(L) <sup>2</sup> p(C)	6.14	23.19	11.47	6.7	0.5706			0.100
5	ЛО <sub>2</sub>	3p(L)p(O) <sup>2</sup>	10.16	23.19	11.09	6.5	0.5519	0.115		
6	ЛОП	6p(L)p(O)p(P)	7.07	22.65	11.79	4.5	0.5857	0.115	0.034	
7	ЛОС	6p(L)p(O)p(C)	4.42	23.71	14.21	1.84	0.6855			0.100
8	ЛП <sub>2</sub>	3p(L)p(P) <sup>2</sup>	1.23	22.11	12.55	1.06	0.6196		0.034	
9	ЛПС	6p(L)p(P)p(C)	1.54	23.17	15.15	0.98	0.7189		0.033	
10	ЛС <sub>2</sub>	3p(L)p(C) <sup>2</sup>	0.48	24.23	18.44	0.01	0.8188			0.100
11	О <sub>3</sub>	p(O) <sup>3</sup>	1.22	23.71	13.68	4.75	0.6655	0.114		
12	О <sub>2</sub> П	3p(O) <sup>2</sup> p(P)	1.27	23.17	14.56	1.47	0.6983	0.113	0.033	
13	О <sub>2</sub> С	3p(O) <sup>2</sup> p(C)	0.79	24.23	17.7	0.29	0.7982	0.113		0.100
14	ОП <sub>2</sub>	3p(O)p(P) <sup>2</sup>	0.44	22.63	15.53	0.41	0.7317			
15	ОПС	6p(O)p(P)p(C)	0.55	23.69	18.91	0.46	0.8314			
16	ОС <sub>2</sub>	3p(O)p(C) <sup>2</sup>	0.17	24.75	23.17	0.01	0.9312	0.112		0.100
17	П <sub>3</sub>	p(P) <sup>3</sup>	0.05	22.09	16.55	0.01	0.7642		0.033	
18	П <sub>2</sub> С	3p(P) <sup>2</sup> p(C)	0.10	23.15	20.2	0.01	0.8641		0.033	0.101
19	ПС <sub>2</sub>	3p(P)p(C) <sup>2</sup>	0.06	24.21	24.8	0.01	0.9641			0.101
20	С <sub>3</sub>	p(C) <sup>3</sup>	0.01	25.27	30.6	0.01	1.0642			0.101

Относительная доля ТАГ ( $\alpha$ ) может быть рассчитана по простой комбинаторной модели с вероятностью присутствия  $i$ -той кислоты, равной  $p(i)$  (содержание кислоты в долях от единицы, столбец 3 в табл.3.1), экспериментальное значение  $\alpha$  приведено в седьмом столбце.

В обращенно-фазовой ВЭЖХ удерживание анализов увеличивается при росте их липофильности. В соответствии с оценкой липофильности по расчётному значению коэффициента распределения вещества в системе «октанол-1 – вода» (столбец 5 в табл.3.1) наименьшее удерживание среди всех анализов должен иметь ТАГ состава Л<sub>3</sub>. Это подтверждается экспериментальными данными, представленными на рис.3.2.

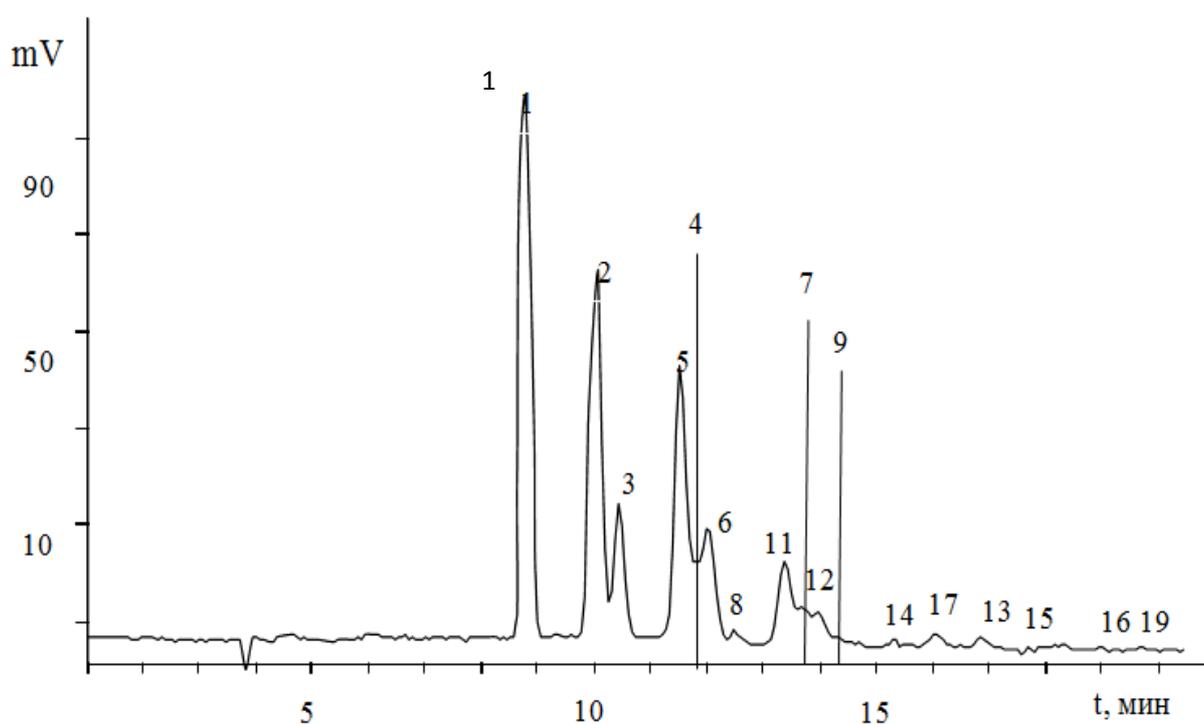


Рис.3.2. Хроматограмма ТАГ подсолнечного масла

Колонка Kromasil 100-5C18, ПФ 10 об. % ацетонитрила в ацетоне, 1 мл/мин, температура 25°C. Рефрактометрическое детектирование. Вертикальные линии указывают на положение пиков, не отделенных от соседних

Но далее следует ТАГ с одним из наиболее вероятных составов - Л<sub>2</sub>О, а не ТАГ с меньшей площадью – Л<sub>2</sub>П. Следовательно, в модели, применяемой в ChemSketch, либо занижен вклад в липофильность, приходящийся на

радикалы пальмитиновой кислоты, либо завышен парциальный вклад радикалов линолевой кислоты.

Состав ТАГ легко рассчитывается по инкрементному подходу [223]; он представлен в таблице 3.1. Рассчитанный состав полностью соответствует составу, при определении которого использовали масс-спектрометрическое детектирование [173]. Таким образом, это позволяет использовать подсолнечное масло в качестве дешевой смеси стандартных соединений для расчета базовых зависимостей (инкрементов) замены Л на О, О на П и П на С подробнее скрининг исследования подсолнечных масел описано в главе.3.3.1.

### **3.1.2 Масло семян льна**

На Руси семена льна и льняное масло были одним из важнейших продуктов питания – масло употребляли с овощами в пост, на основе его готовили праздничные блюда, семена льна добавляли в сдобную выпечку для аромата. Льняное масло используется в промышленности для получения быстросохнущих олиф, красок, применяется в производстве линолеума и художественных масляных красок. В фармацевтической промышленности выпускает несколько видов БАДов льняного масла для приема внутрь и для наружного применения. Полезные свойства льняного масла обусловлены содержанием незаменимых полиненасыщенных жирных кислот омега - 3 и омега - 6 [18-20].

При проведении анализа метиловых эфиров жирных кислот льняного масла методом ГЖХ были полученные следующие данные: основной компонент по предположению  $\alpha$ -линоленовая кислота, или 9Z,12Z,15Z-октадекатриеновая кислота (Лн, C18:3<sup>9Z12Z15Z</sup>) содержание варьируется от 46 - 66%.  $\alpha$ -Линоленовая кислота была определена масс-спектрометрическим методом по сравнению с библиотеками баз данных (рисунок в Приложение 3). Далее следуют линолевая кислота 14 - 16 % и олеиновая кислота от 12 до 25%, и в меньших количествах присутствуют эфиры предельных кислот:

пальмитиновая кислота содержится в количестве 4-7% и стеариновая кислота содержится в количестве 2-5%, рис. 3.3.

Инкременты, рассчитанные по удерживанию ТАГ на хроматограммах льняного и подсолнечного масла, довольно близки, таблица 3.2, но не идентичны. Причины и влияние различных факторов на инкременты будут рассматриваться далее.

Несмотря на сложный состав масла семян льна и наличие проблемных (трудноразделимых) ТАГ неплохие результаты получаются и при распознавании состава ТАГ при включении радикалов  $\alpha$ -линоленовой кислоты. рис.3.4. Сложность расшифровки пиков осложняются близкими значениями инкрементов замены линоленовой кислоты на линолевую кислоту ( $\Delta(Ln \rightarrow L) = 0.107$ ) и пальмитиновой кислоты на стеариновую кислоту ( $\Delta(P \rightarrow C) = 0.101$ ). В таком случае лучше изменить условия хроматографирования для большей достоверности результатов таблица 3.2.

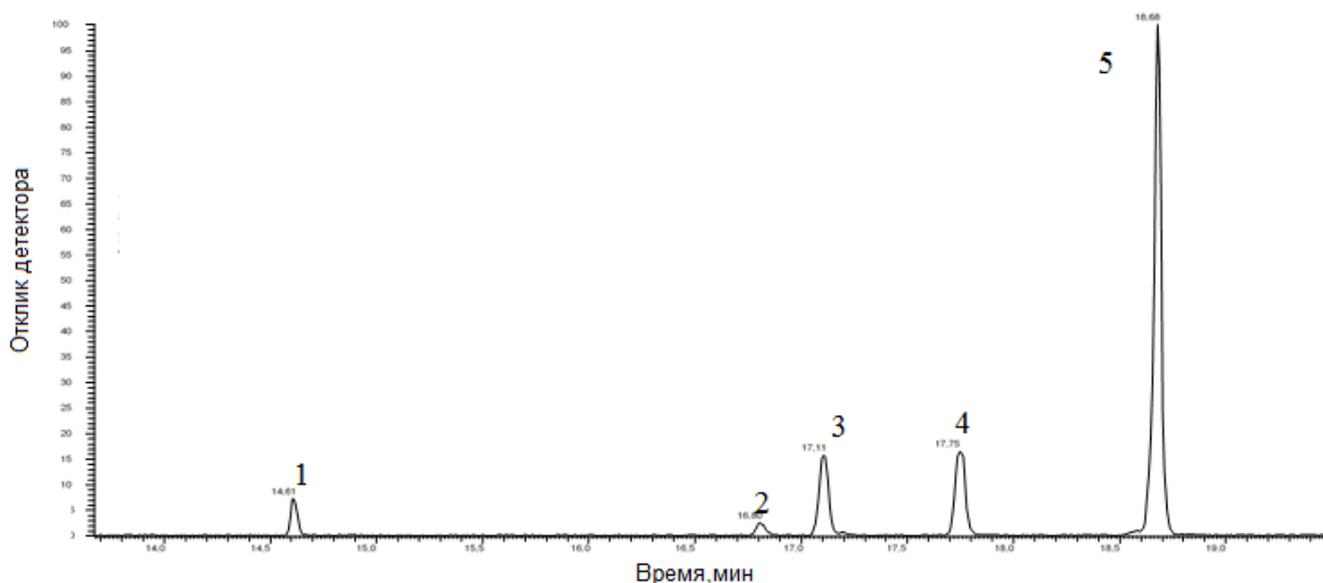


Рис.3.3. Хроматограмма метиловых эфиров льняного масла методом ГЖХ. Вещества – метиловые эфиры кислот: 1- пальмитиновой, 2- стеариновой, 3 олеиновой, 4 – линолевой, 5 –  $\alpha$ -линоленовой. В Приложение 4 рис. 1 приводится масс-спектр линоленовой кислоты

Инкременты, найденные в подсолнечном масле, при неизменных ПФ, стационарной фазы и температуры колонки, сохраняются с погрешностью, соответствующей погрешности метода определения  $\lg k$  (0.002). Инкременты замены линолевой кислоты на олеиновую кислоту в масле подсолнечном и льняном равны 0,114 и 0,115 ( $\Delta(L \rightarrow O)$ ), соответственно, инкременты замены пальмитиновой кислоты на стеариновую равны 0,100 и 0,101 ( $\Delta(P \rightarrow C)$ ) соответственно.

Остановимся подробнее на применении инкрементного подхода:

Инкремент замены  $\alpha$ -линоленовой кислоты линолевой может быть рассчитан по формуле 1:

$$\Delta(L_n \rightarrow L) = \lg k(L_n L_2 L) - \lg k(L_n L_3); \quad (3.1)$$

Аналогичные инкременты можно найти при идентичной замене радикала  $\alpha$ -линоленовой кислоты на линолевою в следующих ТАГ:  $\lg k(L_n L_2)$  -  $\lg k(L_n L_3)$ ;  $\lg k(L_3)$  -  $\lg k(L_n L_2)$ ;  $\lg k(L_n L_1 O)$  -  $\lg k(L_n L_2 O)$ ;  $\lg k(L_n L_1 P)$  -  $\lg k(L_n L_2 P)$ ;  $\lg k(L_n L_1 O)$  -  $\lg k(L_2 O)$ ;  $\lg k(L_1 O_2)$  -  $\lg k(L_n O_2)$ .

Инкремент замены линолевой кислоты на олеиновую можно рассчитать по формуле 2:

$$\Delta(L \rightarrow O) = \lg k(L_2 O) - \lg k(L_3); \quad (3.2)$$

Аналогичные инкременты можно найти при идентичной замене радикала линолевой кислоты на олеиновую в следующих ТАГ:  $\lg k(L_2 O)$  -  $\lg k(L_3)$ ;  $\lg k(L_n O_2)$  -  $\lg k(L_n L_1 O)$ ;  $\lg k(L_1 O_2)$  -  $\lg k(L_2 O)$ ;  $\lg k(L_1 O P)$  -  $\lg k(L_2 P)$ ;  $\lg k(O_3)$  -  $\lg k(L_1 O_2)$ ;  $\lg k(L_1 O C)$  -  $\lg k(L_2 C)$ ;  $\lg k(O_2 P)$  -  $\lg k(L_1 O P)$ ;

Инкремент замены олеиновой кислоты на пальмитиновую может быть рассчитан по формуле 3:

$$\Delta(O \rightarrow P) = \lg k(L_2 P) - \lg k(L_2 O); \quad (3.3)$$

По аналогии составляем пары ТАГ для инкремента замены олеиновой кислоты на пальмитиновую:  $\lg k(L_n L_2 P)$  -  $\lg k(L_n L_2 O)$ ;  $\lg k(L_n L_1 P)$  -  $\lg k(L_n L_1 O)$ ;  $\lg k(L_2 P)$  -  $\lg k(L_2 O)$ ;  $\lg k(L_1 O P)$  -  $\lg k(L_1 O_2)$ ;  $\lg k(O_2 P)$  -  $\lg k(O_3)$ ;

Инкремент замены пальмитиновой кислоты на стеариновую может быть рассчитан по формуле 4 или 5:

$$\Delta(\Pi \rightarrow C) = \lg k(L_2C) - \lg k(L_2\Pi); \quad (3.4)$$

$$\Delta(\Pi \rightarrow C) = \lg k(\text{ЛОС}) - \lg k(\text{ЛОП}). \quad (3.5)$$

Для инкрементных зависимостей выполняются и другие математические действия, например, сложение:

$$\Delta(L \rightarrow \Pi) = \Delta(L \rightarrow O) + \Delta(O \rightarrow \Pi); \quad (3.6)$$

Для примера можно рассчитать логарифм фактора удерживания для  $L_{H_2\Pi}$ :

$$\lg k(L_{H_2\Pi}) = \lg k(L_{H_2O}) + \Delta(O \rightarrow \Pi) \quad (3.7)$$

$0.197 + 0.034 = 0.231$ , в таблице 3.2 он равен 0.232, что соответствует погрешности метода. Расчет логарифма фактора удерживания для этого ТАГ может быть выполнен и из других исходных данных, например:

$$\lg k(L_{H_2\Pi}) = \lg k(L_{H_2\Pi}) - \Delta(L \rightarrow O) \quad (3.8)$$

Для инкрементов справедливо умножение и деление, пример 9:

$$\Delta(L \rightarrow O) = (\lg k(O_3) - \lg k(L_3))/3 \quad (3.9)$$

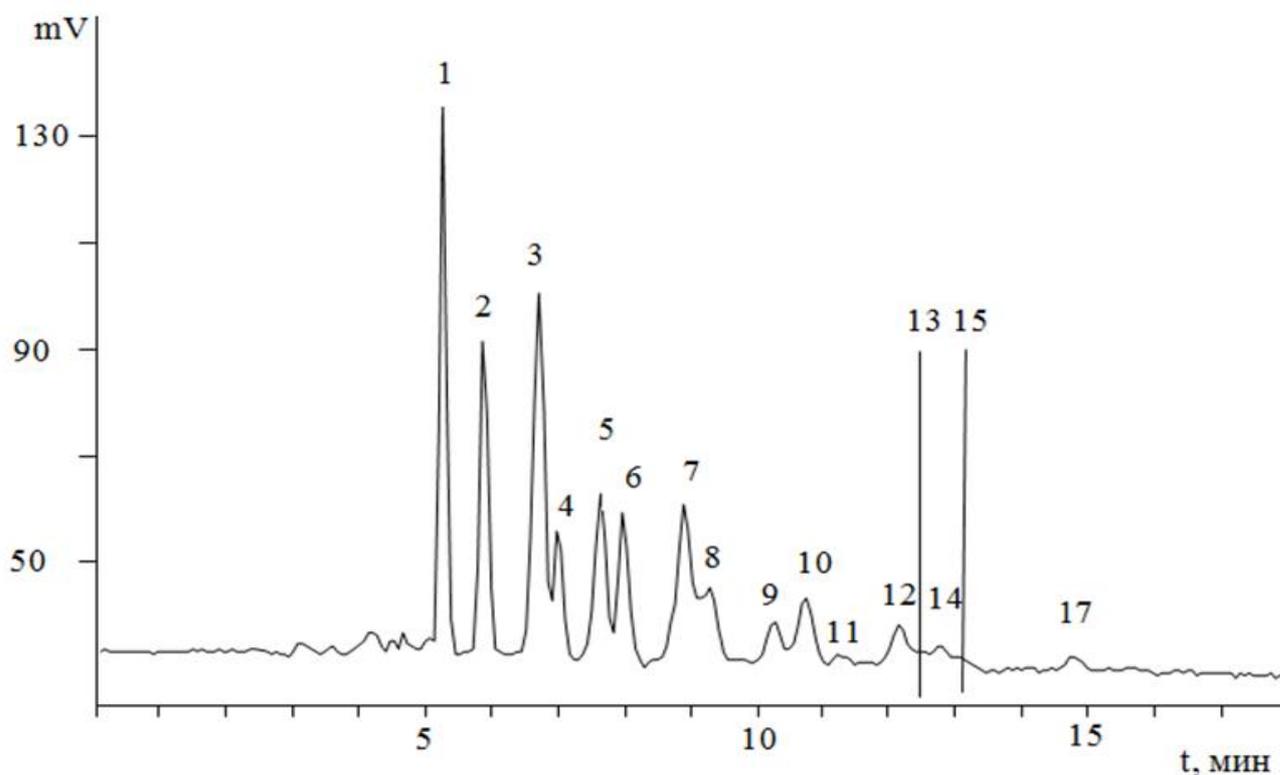


Рис.3.4. Хроматограмма ТАГ масла семян льна

Колонка Kromasil 100-5C18, ПФ 10 об. % ацетонитрила в ацетоне. Номера веществ см. в табл.3.2

Таблица 3.2.

## ТАГ масла семян льна

№	ТАГ	Удерживание		Инкременты			
		t <sub>R</sub> , мин	Lgk	ЛН→Л	Л→О	О→П	П→С
1	ЛН <sub>3</sub>	4.92	-0.032				
2	ЛН <sub>2</sub> Л	5.59	0.076	0.108			
3	ЛНЛ <sub>2</sub>	6.43	0.182	0.106			
4	ЛН <sub>2</sub> О	6.56	0.197				
5	ЛН <sub>2</sub> П	6.88	0.230			0.033	
6	Л <sub>3</sub>	<b>7.54</b>	<b>0.292</b>	0.109			
7	ЛНЛО	7.68	0.304	0.107			
8	ЛНЛП	8.12	0.339	0.107		0.036	
9	Л <sub>2</sub> О	9.08	0.408	0.105	0.117		
10	ЛНО <sub>2</sub>	9.26	0.420		0.117		
11	Л <sub>2</sub> П	9.65	0.445			0.036	
12	ЛО <sub>2</sub>	11.09	0.525	0.105	0.117		
13	Л <sub>2</sub> С	11.52	0.546				0.102
14	ЛОП	11.79	0.559		0.114	0.034	
15	О <sub>3</sub>	13.68	0.640		0.115		
16	ЛОС	14.21	0.660		0.114		0.101
17	О <sub>2</sub> П	14.56	0.673		0.114	0.033	
Среднее значение				0.107	0.115	0.034	0.101

**3.1.3 Масла семян некоторых других культур**

Жирнокислотный состав масла семян рапса, исследованный методом ГЖХ, показал, что основной компонент масла олеиновая кислота 60-62%, содержание линолевой кислоты составляет 25-27%, линоленовой кислоты - 6-

7%, пальмитиновой кислоты - 5-6%, стеариновой кислоты - 2% и миристиновой кислоты – 0.5%, рис. 3.5

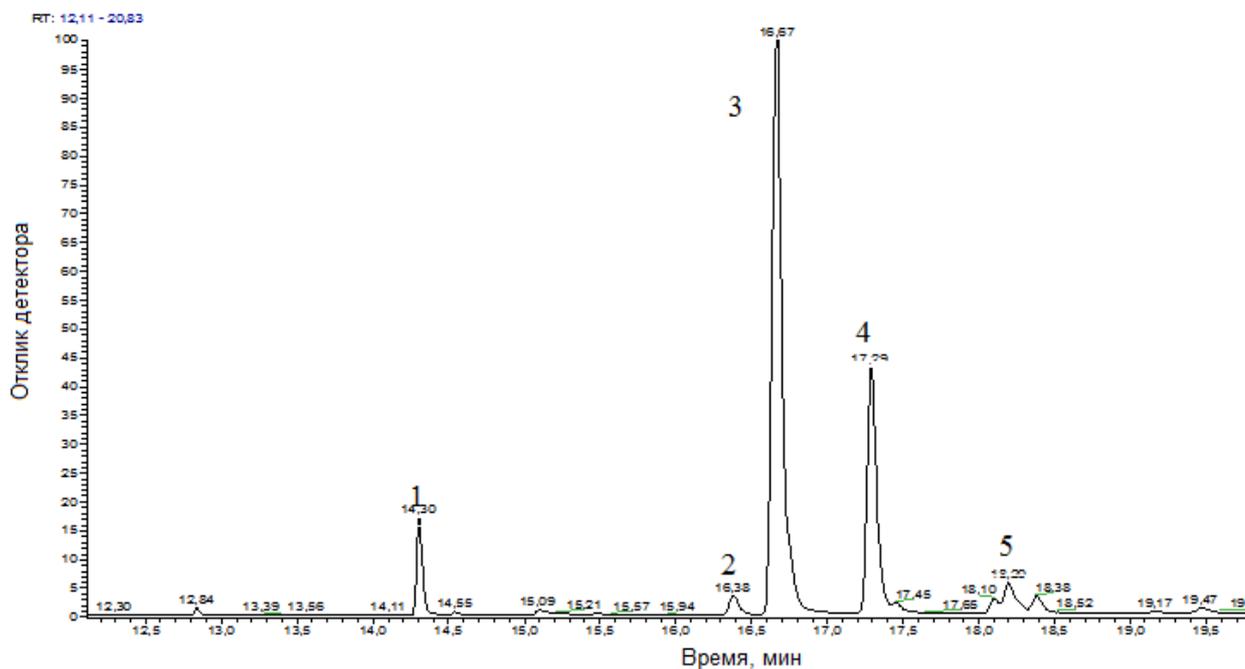


Рис.3.5. Хроматограмма метиловых эфиров масла рапса:

Вещества – метиловые эфиры кислот: 1- пальмитиновой, 2- стеариновой, 3 - олеиновой, 4 – линолевой, 5 – линоленовой.

Хроматограмма исходного рапсового масла представлена на рис. 3.6. Она заметно отличается от хроматограмм многих масел. Причина тому – не только присутствие в больших количествах ТАГ с радикалами олеиновой кислоты, что характерно для многих масел, но и заметное содержание радикалов  $\alpha$ -линоленовой кислоты, присутствие которой вместе с линолевой приводит к появлению большого числа ТАГ с близкими временами удерживания. Анализ в таком случае следует выполнять в элюентах с меньшей элюирующей силой, т.е. с большим содержанием ацетонитрила, рис.3.6.

По указанной причине инкременты отличаются от инкрементов, приведенных ранее для подсолнечного и льняного масел. Несмотря на изменённые условия инкрементные зависимости в масле сохраняются с соответствующей погрешностью, табл.3.3

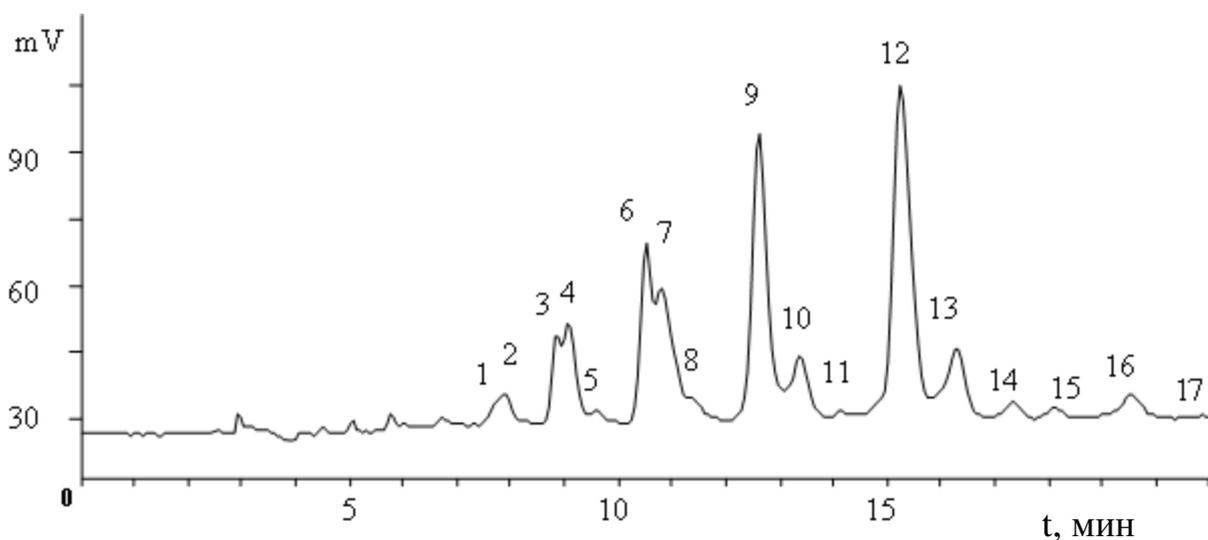


Рис.3.6. Хроматограмма ТАГ масла рапса

Колонка Kromasil 100-5C18, ПФ 15 об% ацетонитрила в ацетоне. Номера пиков см. табл.3.3.

Таблица 3.3.

ТАГ масла рапса

№	ТАГ	Удерживание		Инкременты			
		t <sub>R</sub> , мин	L <sub>gk</sub>	Л→О	О→П	Лн→Л	П→С
1	2	3	4	5	6	7	8
1	ЛнЛ <sub>2</sub>	7.69	0.343				
2	Лн <sub>2</sub> О	7.91	0.361				
3	Л <sub>3</sub>	8.84	0.429			0.085	
4	ЛнЛО	9.08	0.445			0.084	
5	ЛнЛП	9.54	0.473		0.029		
6	Л <sub>2</sub> О	10.54	0.530	0.102		0.086	
7	ЛнО <sub>2</sub>	10.83	0.546	0.101			
8	ЛнОП	11.39	0.574	0.100	0.028		
9	ЛО <sub>2</sub>	12.63	0.630	0.099		0.084	
10	ЛОП	13.35	0.659		0.029	0.086	
11	ЛП <sub>2</sub>	14.10	0.688		0.029		
12	О <sub>3</sub>	15.31	0.731	0.101			

Продолжение табл.3.3							
1	2	3	4	5	6	7	8
13	O <sub>2</sub> П	16.27	0.762	0.103	0.031		
14	ОП <sub>2</sub>	17.29	0.793	0.105	0.031		
15	П <sub>3</sub>	18.31	0.816		0.029		
16	O <sub>2</sub> C	19.50	0.853				0.091
17	ОПС	20.79	0.884		0.032		0.092
Среднее значение				0.102	0.030	0.085	0.091

Другой важнейшей экспортной культурой среди масличных является соя. Жирнокислотный состав масла показал, что основной компонент – линолевая кислота 55-57%, остальные кислоты содержались соответственно в меньшем количестве: олеиновая 20-22%, линоленовая 7-8%, пальмитиновая 10-11% и стеариновая 4-5%, рис.3.7.

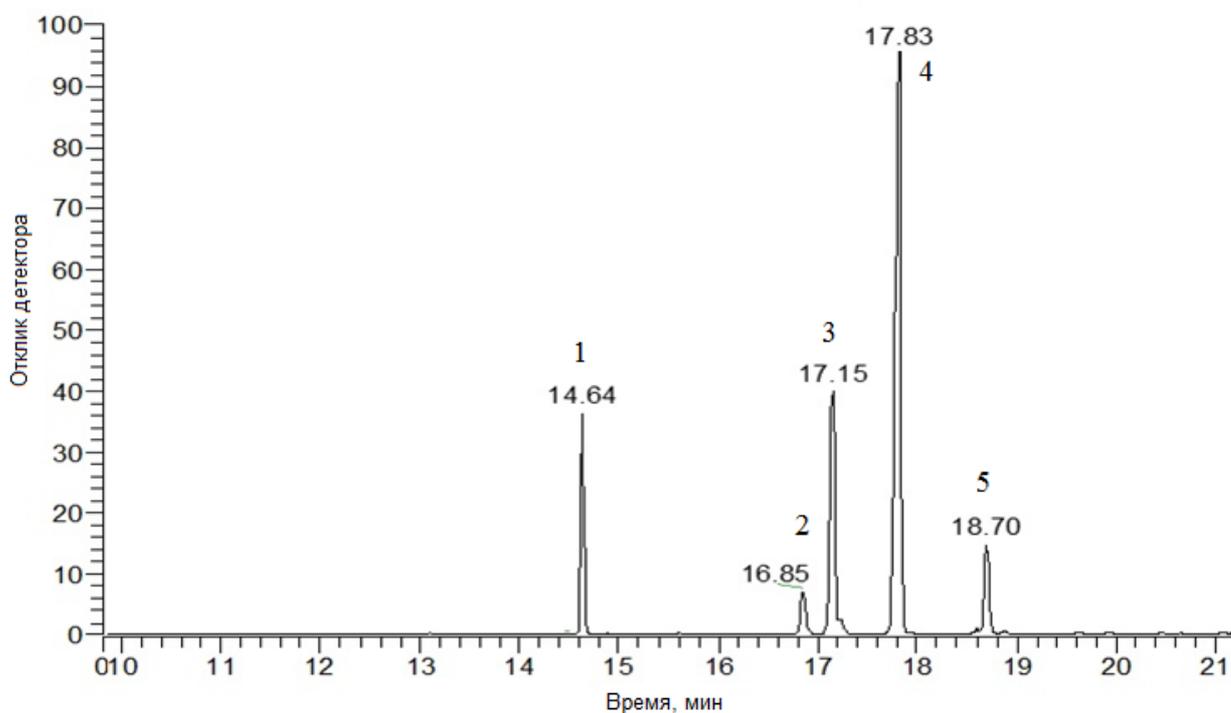


Рис.3.7. Хроматограмма метиловых эфиров масла сои.

Вещества – метиловые эфиры кислот: 1- пальмитиновой, 2- стеариновой, 3 - олеиновой, 4 – линолевой, 5 – линоленовой.

Хроматографический профиль масла сои исходных ТАГ осложняется многочисленными пиками сравнительно небольшой площади и до конца не разделенных ТАГ, рис. 3.8.

Однако инкременты довольно неплохо коррелируют с маслом рапса, условия хроматографирования у них одинаковые и инкременты сохраняются, таблица 3.4.

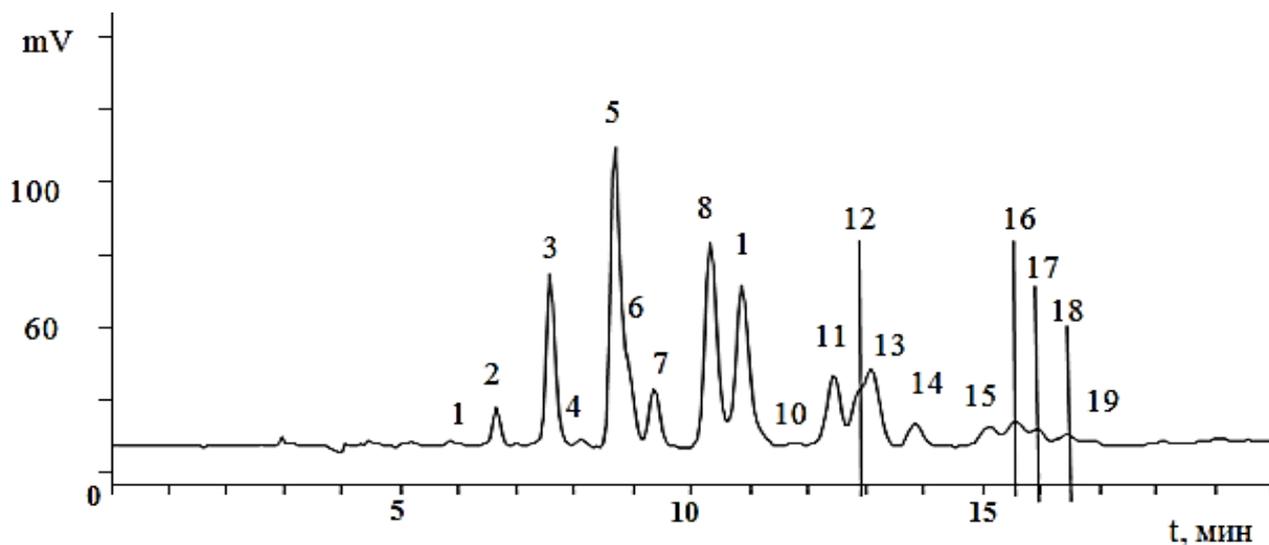


Рис.3.8. Хроматограмма ТАГ масла сои

Колонка: Kromasil 100-5C18, ПФ 15 об% ацетонитрила в ацетоне.

Таблица 3.4.

ТАГ соевого масла

№	ТАГ	Удерживание		Инкременты				
		t <sub>R</sub> , min	Lgk	Л→О	О→П	Лн→Л	Л→П	О→С
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	ЛН <sub>3</sub>	5.84	0.156					
2	ЛН <sub>2</sub> Л	6.60	0.243			0.087		
3	ЛНЛ <sub>2</sub>	7.52	0.329			0.086		
4	ЛН <sub>2</sub> П	8.07	0.373				0.130	
5	Л <sub>3</sub>	8.65	0.416			0.087		
6	ЛНЛО	8.90	0.433	0.103				

Продолжение табл.3.4

1	2	3	4	5	6	7	8	9
7	ЛнЛП	9.31	0.459			0.086		
9	Л <sub>2</sub> П	10.86	0.547		0.029	0.088		
10	ЛнП <sub>2</sub>	11.70	0.588				0.129	
11	ЛО <sub>2</sub>	12.38	0.619	0.101	0.031			
12	Л <sub>2</sub> С	12.82	0.638					0.120
13	ЛОП	13.05	0.647	0.100			0.129	
14	ЛП <sub>2</sub>	13.80	0.677		0.030	0.088	0.129	
15	О <sub>3</sub>	15.08	0.723	0.104		0.085		
16	ЛОС	15.52	0.738	0.100				0.119
17	О <sub>2</sub> П	15.88	0.749	0.102			0.130	
18	ЛПС	16.43	0.767		0.029		0.129	0.120
19	ОП <sub>2</sub>	16.83	0.779		0.030		0.130	
20	П <sub>3</sub>	18.00	0.813				0.136	
21	П <sub>2</sub> С	19.10	0.843		0.030			0.120
22	ЛС <sub>2</sub>	19.62	0.856					0.118
23	ПС <sub>2</sub>	20.16	0.869		0.030			0.120
Среднее значение:				0.102	0.029	0.087	0.130	0.119

### 3.1.4 Масло грецкого ореха.

Одним из самых ценных и полезных продуктов в рационе человека являются орехи. Жирнокислотный состав масла грецкого ореха, исследованный методом ГЖХ, показал, что основной компонент масла линолевая кислота, ее содержание составляет 43-48%, содержание олеиновой кислоты составляет 21-25%, содержание  $\alpha$ -линоленовой кислоты - 16-19%, пальмитиновой кислоты - 6-8%, стеариновой кислоты - 3-5% и не более 0,5% приходится на сумму других кислот, рис. 3.9.

В данном случае особенно острой является проблема разделения пиков с близкой липофильностью. Для ее решения был применен прием разделения на двух последовательно соединенных колонках, рис.3.10.

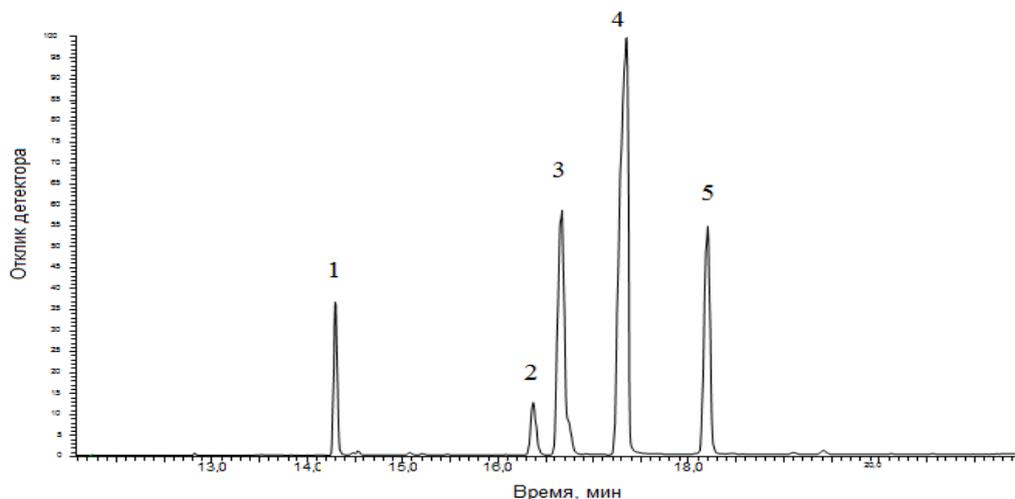


Рис.3.9. Хроматограмма метиловых эфиров масла грецкого ореха. Вещества – метиловые эфиры кислот: 1 - пальмитиновой, 2- стеариновой, 3 - олеиновой, 4 - линолевой, 5 – линоленовой.

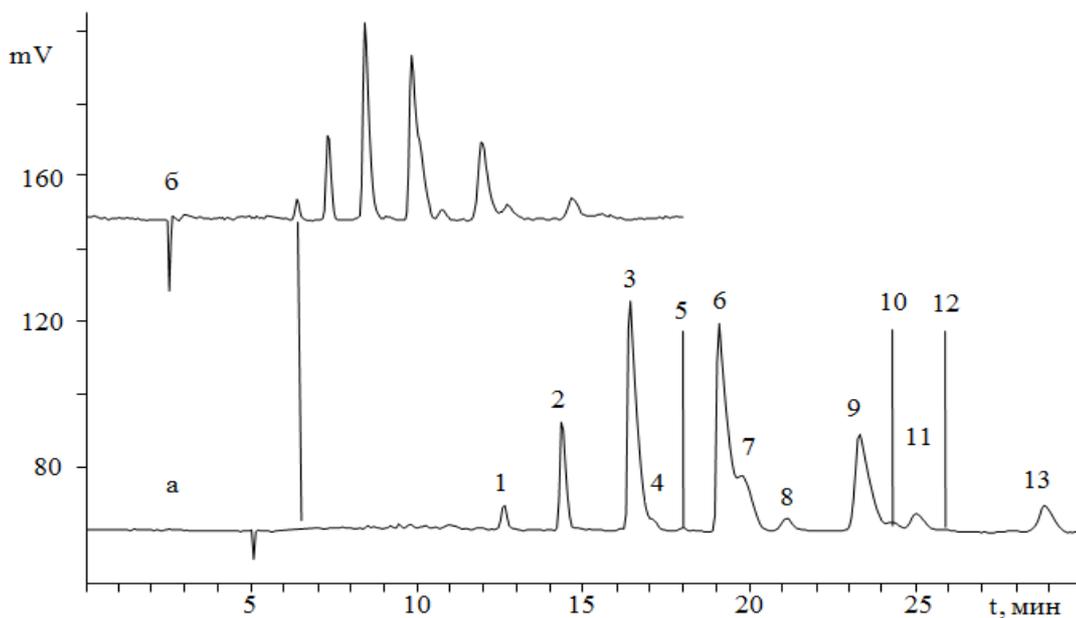


Рис.3.10. Разделение ТАГ масел семян грецкого ореха.

а – две последовательно соединенные колонки 4.6×250 мм Колонки Kromasil 100-5C18; б – одна колонка Kromasil 100-5C18; подвижная фаза 20 об% ацетонитрила в ацетоне

В использованном варианте хроматографирования удалось добиться лучшего разделения ТАГ. При этом мертвое время ( $t_0$ ) увеличилось с 2,55 мин до 5,2. Несмотря на такие изменения в условиях хроматографирования, инкрементные зависимости сохраняются для всех ТАГ, таблица 3.5.

Таблица 3.5.

ТАГ масла грецкого ореха

№	ТАГ	Удерживание		Инкременты		
		$t_R$ , мин	lgk	ЛН→Л	Л→О	О→П
1	ЛН <sub>3</sub>	12.58	0.152			
2	ЛН <sub>2</sub> Л	14.39	0.247	0.095		
3	ЛНЛ <sub>2</sub>	16.58	0.34	0.093		
4	ЛН <sub>2</sub> О	17.12	0.36		0.113	
5	ЛН <sub>2</sub> П	18.03	0.392			0.032
6	Л <sub>3</sub>	19.26	0.432	0.092		
7	ЛНЛО	19.95	0.453	0.093	0.113	
8	ЛНЛП	21.12	0.486	0.094		0.033
9	Л <sub>2</sub> О	23.49	0.546	0.093	0.114	
10	ЛНО <sub>2</sub>	24.32	0.565		0.113	
11	Л <sub>2</sub> П	25.03	0.581	0.095		0.035
12	ЛНОП	25.86	0.599		0.113	0.034
13	ЛО <sub>2</sub>	28.93	0.659		0.113	
Среднее значение:				0.094	0.113	0.033

### 3.1.5 Триацилглицерины с конъюгированными диеновыми двойными связями

О нахождении и применении ТАГ содержащие радикалы высших жирных кислот с конъюгированными диеновыми двойными связями мы подробно останавливались в Главе 1. В данном параграфе подробно

остановимся на недооцененных источниках  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты (октадекатриеновая кислота). Она накапливается в масле семян валерианы лекарственной (около 50% от кислот), косточках вишни, черешни и черемухи. Абсолютное содержание  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты не превышает 20 % для масла косточек. Другой важный фактор анализа ТАГ, содержащие данную кислоту в своем составе, - это возможность сопоставить два типа детекторов при идентификации – рефрактометрический и УФ-детектор.

Для нахождения «базовых инкрементов» в качестве стандартной смеси ТАГ использовали масло косточек яблони (у растений трибы яблоневые подсемейства сливовые ЖКС схож) Хроматограммы масла линолево-олеинового типа и косточек вишни для двух методов детектирования при одном составе ПФ представлены на рис.3.11.

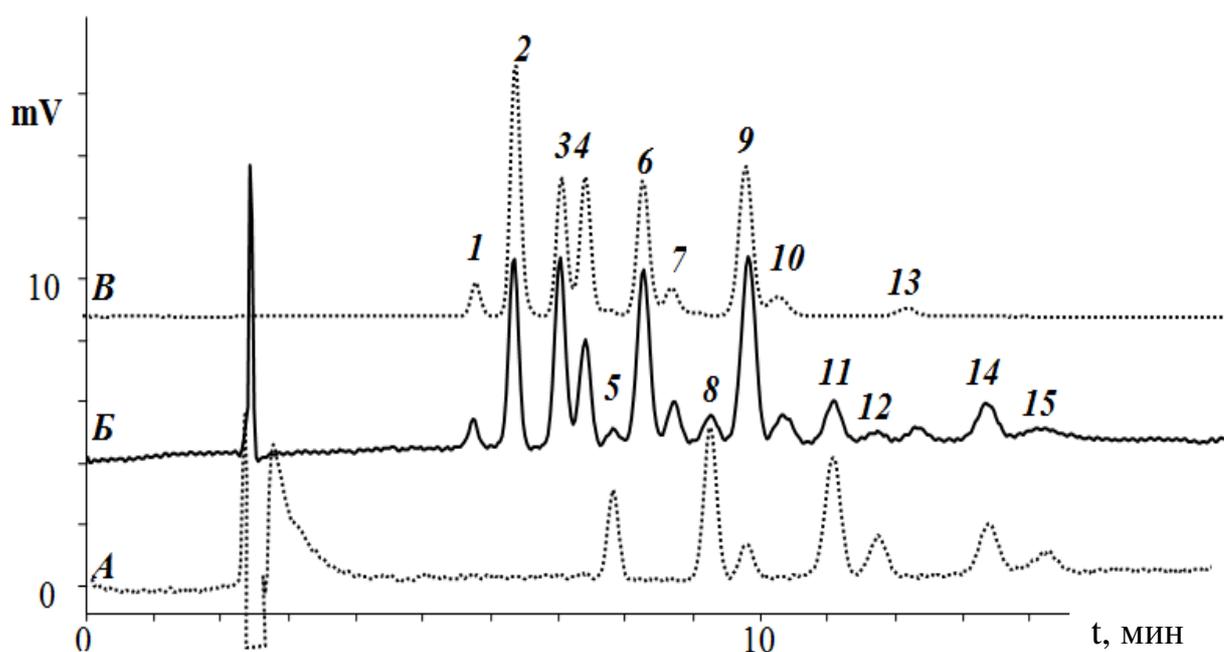


Рис.3.11. Хроматограммы масла семян вишни «антипки» и яблока

А - масло семян яблок; Б - масла вишни сорта «антипка» - рефрактометрическое детектирование, В - масла вишни сорта «антипка» - спектрофотометрический детектор. Колонка Kromasil 100-5C18; подвижная фаза 30 об % пропанол-2 в ацетонитриле, скорость подачи элюента 1 мл/мин

Основные составляющие ТАГ состоят из комбинаций линолевой, олеиновой кислот и, согласно литературным данным,  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты. В минорных ТАГ следует замена одной из основных кислот на пальмитиновую или стеариновую кислоты. Действительно, время  $L_3$  существенно больше, чем для первых 4 пиков на хроматограмме рис.3.11, это говорит о том, что ТАГ содержат менее липофильные кислоты в своем составе. При сопоставлении хроматограм двух видов детектирования видно, что некоторые пики, которые наблюдались при рефрактометрическом детектировании, исчезли при исследовании на УФ-детекторе, т. о. они не содержали в своем составе ВЖК с хромофорными группами (при  $\lambda = 280$  нм), расшифровка состава ТАГ намного облегчается. Как видно на хроматограммах изменилось соотношение высот пиков, причем строго в соответствии с предположенным числом радикалов  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты в одной молекуле ТАГ. Таким образом, идентификация ТАГ, представленная в табл.3.6, может считать неоспоримой.

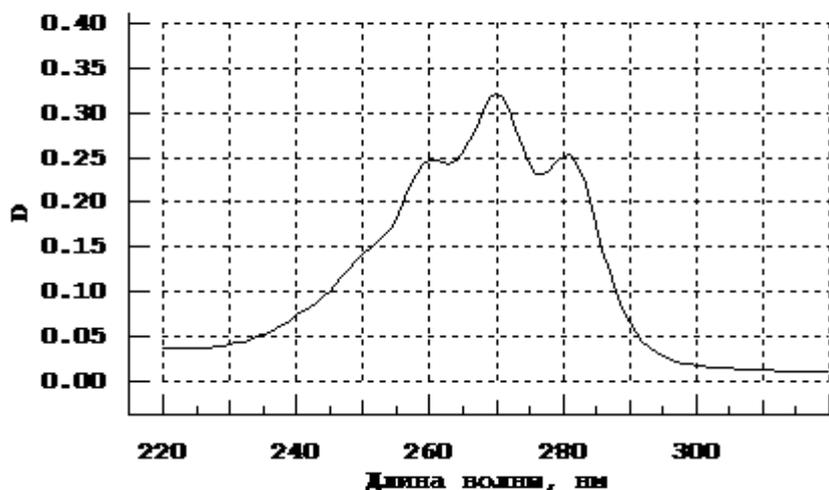


Рис.3.12. Электронный спектр поглощения раствора масла семян косточек вишни сорта «антипка»

Для исследуемых в работе масел такое предположение может быть легко проверено, поскольку спектр раствора исследуемого масла характерен именно для радикалов  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты (рис.3.12, [222]).

Таблица 3.6.

Параметры удерживания триглицеридов масла семян косточек вишни сорта «антипка».

№*	ТАГ	t <sub>R</sub> , мин	Инкременты				
			lgk	Δ(X→Л)	Δ(X→Л)	Δ(X→Л)	Δ(П→С)
1	X <sub>3</sub>	5.73	0.136				
2	X <sub>2</sub> Л	6.32	0.207	0.071			
3	ХЛ <sub>2</sub>	7.01	0.278	0.071			
4	X <sub>2</sub> O	7.39	0.313		0.105		
5	X <sub>2</sub> П+Л <sub>3</sub>	7.80	0.347	0.069		0.034	
6	ХЛО	8.24	0.381	0.069			
7	ХЛП	8.70	0.414			0.033	
8	Л <sub>2</sub> O	9.24	0.450		0.103		
9	ХО <sub>2</sub> +Л <sub>2</sub> П	9.80	0.484		0.103	0.034	
10	ХОП	10.4	0.515			0.031	
11	ЛО <sub>2</sub>	11.1	0.553		0.103		
12	ЛОП	11.7	0.584			0.031	
13	ХОС+ЛП <sub>2</sub>	12.3	0.611				0.095
14	O <sub>3</sub>	13.4	0.655		0.102		
15	O <sub>2</sub> П	14.1	0.684			0.029	

\* - нумерация пиков по хроматограмме на рис.3.11.

Отдельно можно отметить, что инкрементные соотношения сохраняются для одного и того же состава ПФ даже для другого вида ПФ, однако в связи с небольшим изменением механизма удерживания точки конвергенции на карте разделения изменяют ординату (происходит сдвиг по оси Y).

Хроматограммы некоторых исследуемых сортов масла косточек вишни представлены на рис.3.13, для хроматографической системы с рефрактометрическим детектором.

В масле косточек вишни «бессея» содержание кислоты минимальное, из всех исследуемых сортов, это видно по хроматограммам по практически полному отсутствию ТАГ с номером 1-6 (табл. 3.7). Наибольшая доля  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты приходится на ТАГ масла косточек вишни сорта «антипки» табл. 3.7.

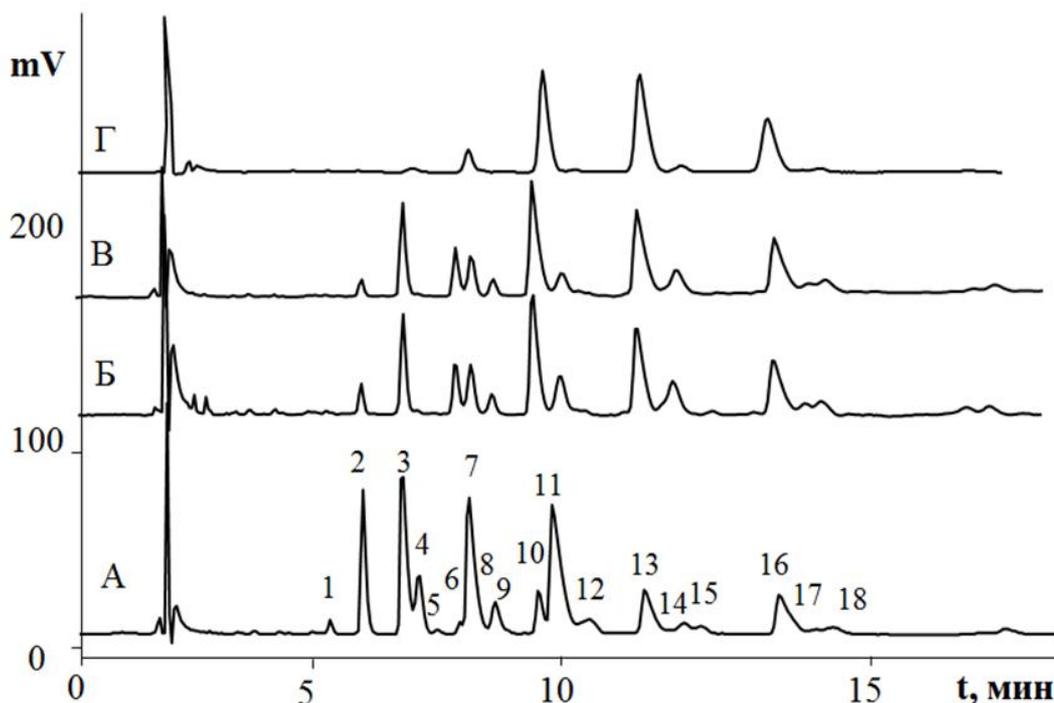


Рис.3.13. Удерживание ТАГ масел из косточек вишни различных сортов масел: А - вишня «антипка»; Б – вишня обыкновенная; В - вишня «степная»; Г – вишня «бессея». В условиях обращено-фазовой ВЭЖХ. Колонка Kromasil 100-5C18, подвижная фаза: 25 об% ацетонитрила в ацетоне.

Хроматографический профиль масел косточек черешни схож с маслом косточек вишен, рис.3.14. Принципиальных различий в количественное соотношение ТАГ не обнаружено. Для количественного анализа состава ТАГ был использован метод поправок на площади пиков с учетом чувствительности детектора к жирнокислотному составу индивидуальных ТАГ [198], для этого рассчитывали коэффициенты преломления в программе «ACD/ChemSketch 12.0».

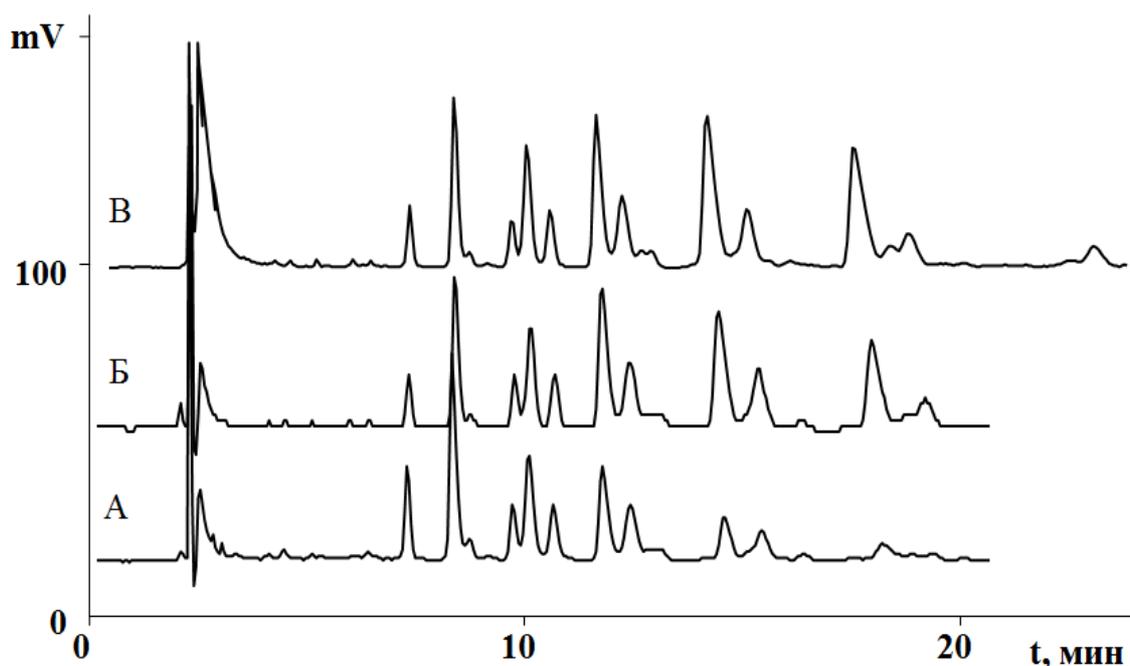


Рис. 3.14. Удерживание триглицеридов масел из косточек трех (А, Б и В) сортов черешни Колонка Kromasil 100-5C18, подвижная фаза: 25 об% ацетонитрила в ацетоне.

В таблице 3.7 полужирными начертаниями выделены по три ТАГ, с относительно большими долями в рассматриваемых маслах. Тогда становится очевидным, что исследованные масла являются линолево-олеиновыми, как и масла семян многих других растений семейства «розоцветные» [222], с отличительной для исследованных растений особенностью – присутствием  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты. Помимо вишни сорта «бессея» присутствие  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты минимально и в сорте вишни «войлочная», по жирнокислотному составу эти сорта ближе к остальным растениям подсемейства сливовые. Максимальное содержание  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты в составе ТАГ содержит сорт вишни «антипка» около 30% среди всех исследуемых сортов вишни, черешни семян черемухи двух сортов.

Мольное содержание ТАГ рассчитывали с учетом коэффициента чувствительности рефрактометрического детектора, для каждого компонента, приняв за 1 коэффициент чувствительности по ЛЗ.

Коэффициент чувствительности рассчитывали с учетом поправки расчетных значений коэффициентов преломления ТАГ и экспериментальных значений коэффициента преломления подвижной фазы, приложение 5.

Таблица 3.7.

Видовой состав триглицеридов масла косточек вишен и родственных растений

№	ТАГ	Триглицеридный состав, мол.%								
		Черешня			Вишня				Черемуха	
		1	2	3	А*	1	2	Ст**	1	2
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Э <sub>3</sub>	<0.2	0.3	0.2	1.0	0.4	<0.2	0.2	<0.2	0.6
2	Э <sub>2</sub> Л	2.8	7.7	2.6	8.9	4.0	2.5	1.6	0.9	5.4
3	Э <sub>2</sub> О	0.8	2.1	0.8	6.1	0.8	0.5	0.3	<0.2	0.9
4	Э <sub>2</sub> П	<0.2	0.3	0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	0.4
5	ЭЛ <sub>2</sub>	10.5	<b>22.3</b>	9.5	<b>14.3</b>	<b>13.6</b>	8.3	10.2	7.2	<b>25.1</b>
6	ЭЛО	9.3	<b>14.2</b>	9.0	<b>16.0</b>	8.1	6.1	5.8	10.0	<b>19.4</b>
7	ЭЛП	4.7	6.3	4.0	4.1	3.4	2.2	2.2	1.0	1.2
8	ЭО <sub>2</sub>	<0.2	<0.2	3.6	<b>19.3</b>	5.3	4.5	4.8	2.1	0.9
9	ЭОП	<0.2	<0.2	1.4	4.2	0.3	0.2	1.5	0.9	0.9
10	Л <sub>3</sub>	3.4	5.6	2.8	0.8	6.7	5.4	5.4	5.8	7.8
11	Л <sub>2</sub> О	<b>14.2</b>	<b>13.3</b>	<b>12.2</b>	4.8	<b>19.7</b>	<b>16.6</b>	<b>19.2</b>	<b>23.5</b>	<b>15.8</b>
12	Л <sub>2</sub> П	8.8	8.6	3.8	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	2.1	4.1
13	ЛО <sub>2</sub>	<b>15.1</b>	7.0	<b>17.2</b>	7.5	<b>17.8</b>	<b>20.2</b>	<b>19.7</b>	<b>29.5</b>	12.3
14	ЛОП	7.9	6.0	5.4	1.5	6.8	6.8	7.8	1.1	2.1
15	ЛОС	2.1	2.3	2.4	0.5	0.3	2.4	4.0	<0.2	0.6
16	О <sub>3</sub>	<b>13.3</b>	3.1	<b>16.9</b>	9.8	11.0	<b>19.4</b>	<b>15.0</b>	<b>14.0</b>	0.2
17	О <sub>2</sub> П	4.7	1.0	4.6	1.3	1.9	4.8	2.4	1.8	<0.2
18	О <sub>2</sub> С	1.5	<0.2	2.3	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2

А\* - «антипка»; Ст\*\* - степная

По количественному составу ТАГ масел можно посчитать количество жирных кислот в маслах табл.3.8.

## Жирнокислотный состав ТАГ масла косточек вишен и родственных растений

№	Кислоты	Жирнокислотный состав триглицеридов, мол.%								
		Черешня			Вишня			Черемуха		
		1	2	3	А*	1	2	Ст**	1	1
1	$\alpha$ -Элеостеариновая	10.8	21.8	16.0	30.7	14.0	9.3	9.7	12.2	21.1
2	Линолевая	40.6	50.5	33.7	26.7	42.7	35.6	38.9	46.2	53.1
3	Олеиновая	39.6	21.1	44.8	40.1	40.2	50.3	46.1	40.0	22.4
4	Пальмитиновая	7.8	5.8	4.3	2.1	2.7	4.0	4.0	1.2	2.5
5	Стеариновая	1.2	0.8	1.8	0.4	0.4	0.8	1.3	0.4	0.9

А\* - антипка; Ст\*\* - степная.

Помимо анализа ТАГ провели анализ гидролизатов масел, содержащих  $\alpha$ -линоленовой и  $\gamma$ -линоленовой для сравнения (мягкий гидролиз 10%-ный спиртовой раствор NaOH при комнатной температуре, в течении 6 ч). В гидролизате масле черешни обнаруживается кислота, по характеристическому УФ-спектру соответствующая  $\alpha$ -элеостеариновой. Ее удерживание отлично от удерживания кислот, полученных гидролизом масла семян черной смородины и кедрового масла, рис.3.15.

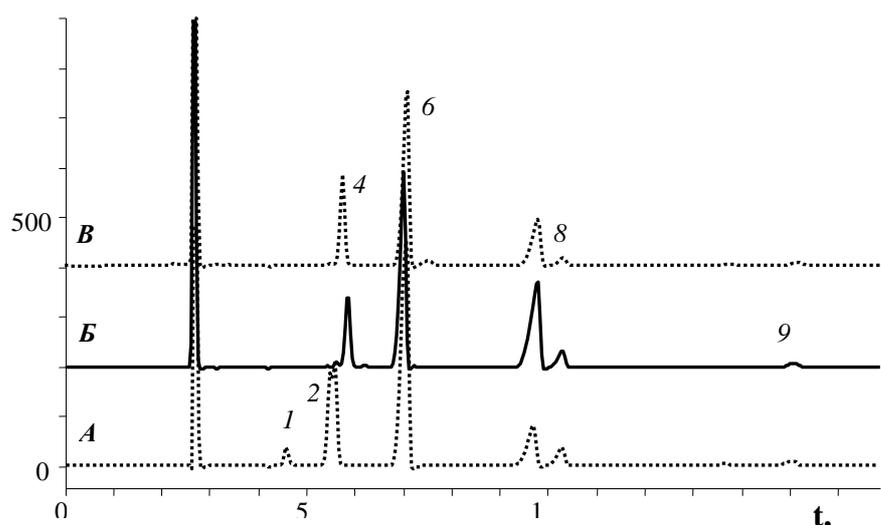


Рис.3.15. Разделение жирных кислот гидролизатов масел

Подвижная фаза: 10% ацетона и 1 % уксусной кислоты в ацетонитриле, 1 мл/мин. Гидролизаты: А – льняного масла, Б - масла черешни, В – кедрового

масла. Кислоты: 1 –стеарионовая (C14:0), 2 –  $\alpha$ -линоленовая, 3 –  $\gamma$ -линоленовая, 4 – линолеиновая, 5 –  $\alpha$ -элеостеариновая; 6 – линолевая, 7 – олеиновая, 8 – пальмитиновая, 9 – стеариновая.

При этом и соотношение площадей пиков индивидуальных кислот в гидролизате масла черешни согласуется с приведенными в табл.3.8 результатами. По теме ТАГ с конъюгированными жирными кислотами опубликовано несколько научных статей автора в соавторстве с коллегами в периодических изданиях рекомендуемые ВАК [222] и [247], выполнен Гос. контракт № НК -511П в рамках ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009-2013 годы на тему: «Получение функциональных масляных композиций на основе растительного сырья, содержащих масла с радикалами конъюгированных жирных кислот» Принято участие в «Нано - и супрамолекулярная химия в сорбционных и ионообменных процессах. Всерос. конф. с элементами научной школы для молодежи» по теме «Каталитическое превращение триглицеридов масла *tomordica Charantia* в сорбционно-десорбционных процессах на природных глинах» Белгород 2010г.

### **3.1.6 Прогностическая функция в инкрементном подходе**

В ОФ хроматографии для конкретных составов ПФ может быть использован инкрементный подход с расширенной функциональностью, позволяющей прогнозировать изменение удерживания при заданном изменении строения ТАГ.

Рассмотрим возможность применения такого подхода на нескольких примерах.

Рассмотрим смесь масел семян дельфиниума и лимнантеса. Проведем анализ получаемых по удерживанию ТАГ инкрементов. Такую смесь удобно сравнивать, поскольку удерживание всех компонентов первого масла и

второго масла различаются настолько, что отсутствует перекрывание пиков: в начальной части элюируются все ТАГ масла дельфиниума, и только затем – ТАГ масла лимнантеса, рис.3.16.

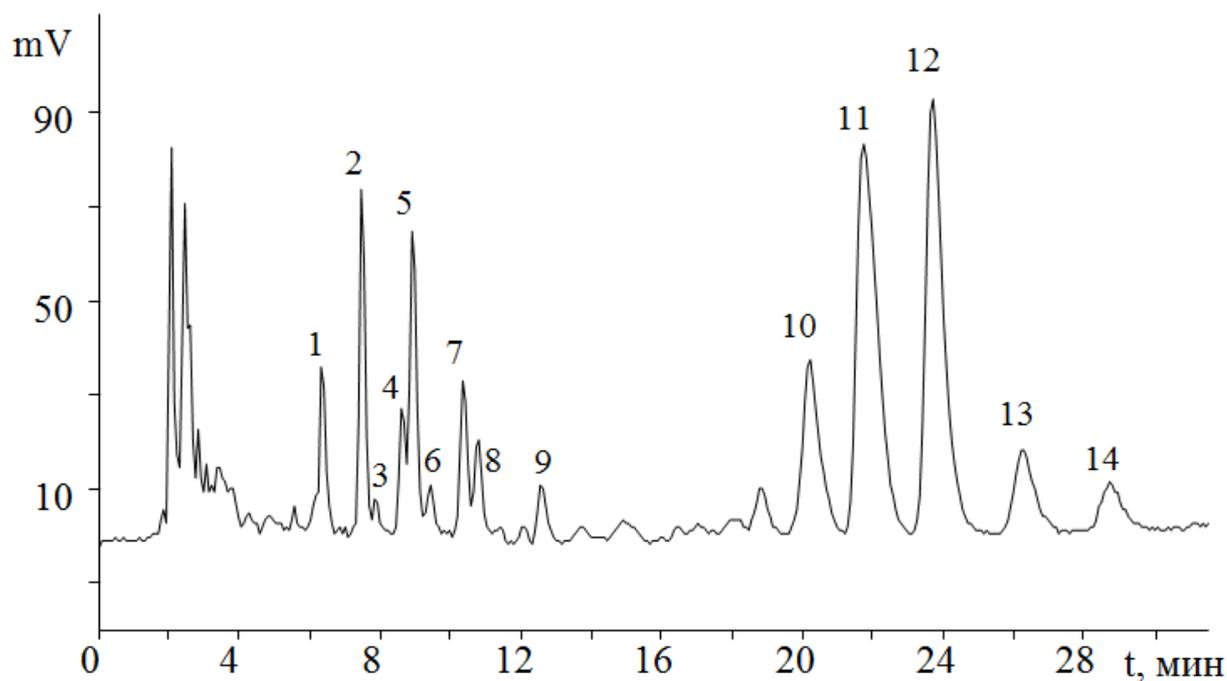


Рис.3.16. Разделение ТАГ масел семян дельфиниума и лимнантеса. Колонка Kromasil 100-5C18, ПФ 15 об% ацетонитрила в ацетоне.

Сопоставляя ТАГ смеси с таковыми для подсолнечного масла и настурции [224], легко удастся идентифицировать все основные компоненты, табл.3.9.

В этом случае возникают несколько новых инкрементов. Во-первых, в масле семян дельфиниума – кислота А (эйкозеновая кислота): C20:1<sup>11</sup>, по ней определяется новый инкремент:

$$\Delta(O \rightarrow A) = 0.081 \quad (3.10)$$

По удерживанию триэруката (последний пик в масле лимнантеса), рассчитывается инкремент замены олеиновой на эруковую кислоту (C22:1<sup>13</sup>):

$$\Delta(O \rightarrow \text{Э}) = 0.161 \quad (3.11)$$

Таблица 3.9.

## ТАГ масел семян дельфиниума и лимнантеса

№	ТАГ	Удерживание		Инкременты:					
		t <sub>R</sub> , мин	lgk	O→A	L→O	O→Π	O→E	Z→Y	Y→E
	Триглицерид			0.081	0.102	0.030	0.161	0.036	0.042
	Масло семян дельфиниума								
1	L <sub>3</sub>	6.33	0.351						
2	L <sub>2</sub> O	7.47	0.452		0.100				
3	L <sub>2</sub> Π	7.84	0.48			0.028			
4	L <sub>2</sub> A	8.61	0.533	0.082					
5	ЛО <sub>2</sub>	8.91	0.553		0.101				
6	L <sub>2</sub> Π	9.39	0.582						
7	ЛОA	10.34	0.634	0.081					
8	O <sub>3</sub>	10.75	0.654		0.102				
9	O <sub>2</sub> A	12.55	0.735	0.081					
	Масло семян лимнантеса								
10	ZY <sub>2</sub>	20.18	0.971						
11	Y <sub>3</sub>	21.97	1.011					0.040	
12	EY <sub>2</sub>	23.97	1.053						0.042
13	E <sub>2</sub> Y	26.25	1.096						0.043
14	E <sub>3</sub> (C22:1 <sup>13</sup> )	28.7	1.137				0.166		0.041
				0.081	0.102	0.030	0.161	0.036	0.042

Следует обратить внимание на то, что в ряду O – A – Э происходит одинаковое последовательное изменение структуры (добавление двух метиленовых групп в цепь между карбоксильной группой и двойной связью), причем каждому такому изменению тогда соответствуют практически равные значения инкрементов – по 0.081. Эта величина заметно меньше по сравнению с инкрементом:

$$\Delta(P \rightarrow C) = 0.092 \quad (3.12)$$

Разность инкрементов составляет  $0.092 - 0.081 = 0.011$ , что может быть интерпретировано как инкремент на перемещение двух метиленовых групп из внутренней части молекулы во внешнюю.

Петрозелиновая кислота (C18:1<sup>6</sup>) может быть получена из олеиновой (C18:1<sup>9</sup>) перемещением трех метиленовых групп из внутренней во внешнюю часть, т.е., в соответствие с выше изложенным, может быть рассчитан соответствующий инкремент:

$$\Delta(O \rightarrow Pe) = \frac{3}{2} \cdot 0.011 = 0.0165 \quad (3.13)$$

С другой стороны, этот инкремент легко определяется экспериментально по удерживанию ТАГ масла семян любого растения семейства Umbelliferae – в нашем случае – моркови, в которое для наглядности добавлено масло семян фундука, - первые пики в каждой из групп на рис.3.17.

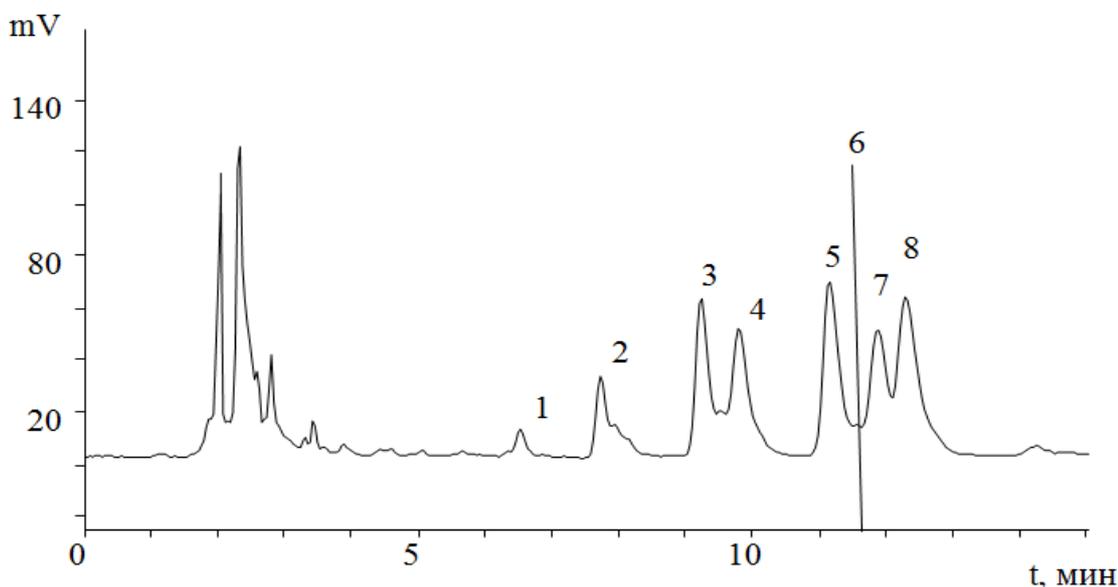


Рис.3.17. Разделение ТАГ масел семян моркови и фундука  
Колонка Kromasil 100-5C18, ПФ 15 об% ацетонитрила в ацетоне.

Расшифровка состава ТАГ и определение инкрементов в этом случае выполнить точно труднее из-за относительно небольших различий в

удерживании между олеиновыми и петрозелиновыми компонентами, но среднее экспериментальное значение 0.017 превосходно согласуется с предсказанным ранее, таблица 3.10.

Таблица 3.10.

ТАГ масел семян моркови и фундука

№	ТАГ	Удерживание		Инкременты	
		t <sub>R</sub> , мин	Igk	Л→О	О→Пе
1	Л <sub>3</sub>	6.5	0.368		
2	Л <sub>2</sub> О	7.7	0.470	0.102	
3	ЛО <sub>2</sub>	9.2	0.570	0.101	
4	ЛПе <sub>2</sub>	9.77	0.603		0.016
5	О <sub>3</sub>	11.12	0.672	0.102	
6	О <sub>2</sub> Пе	11.52	0.691		0.019
7	ОПе <sub>2</sub>	11.84	0.705		0.014
8	Пе <sub>3</sub>	12.26	0.723		0.018
Среднее значение:				0.102	0.017

Возвращаясь к маслу семян лимнантеса, отметим, что самой липофильной кислотой (по литературным данным [34]) является эруковая кислота, поэтому последний пик на хроматограмме эвляется триэрукатом. Пик перед ним должен содержать вторую по липлофильности кислоту масла семян лимнантеса, которой является Y = 20:1<sup>5Z</sup> (цис-5-эйкозеновая кислота). Нетрудно рассчитать по данным в таблице 3.5 инкремент:

$$\Delta(O \rightarrow Y) = \Delta(O \rightarrow \mathcal{E}) - \Delta(Y \rightarrow \mathcal{E}) = 0.161 - 0.041 = 0.120 \quad (3.14)$$

Сопоставляя строение кислот Y (C<sub>20</sub>:1<sup>5Z</sup>) и A (C<sub>20</sub>:1<sup>11Z</sup>), находим, что структуры могут быть преобразованы перемещением шести метиленовых групп, т.е. инкремент для их замены должен составить 0.011\*3 = 0.033, в то время как экспериментальная величина составляет:

$$\Delta(A \rightarrow Y) = \Delta(O \rightarrow Y) - \Delta(O \rightarrow A) = 0.119 - 0.081 = 0.038 \quad (3.15)$$

что лишь на 0.005 единиц больше предсказанного. Это очень немного, если учесть, что, во-первых, погрешность определения инкрементов обычно порядка 0.002 единиц, а, во-вторых, пики ТАГ семян лимнантеса на хроматограмме в избранных условиях весьма широки и ассиметричны, вследствие, по-видимому, не индивидуальности: инкременты, близкие к 0,040, следует предполагать и для других замен среди радикалов образующих масло кислот [224].

Таким образом,

- 1) замена одготипных радикалов приводит к одинаковому изменению удерживания ТАГ вне зависимости от строения остальных радикалов, т.е. инкрементный подход может быть использован для расчета состава растительных масел с любой степенью ненасыщенности;
- 2) между инкрементами существует структурно определенная взаимосвязь, объясняющая предсказательную функцию метода;
- 3) при этом как удерживание ТАГ, так и соответствующие инкременты зависят от удерживания ТАГ, т.е. от состава подвижной фазы и от температуры.

### **3.2 Индексация удерживания ТАГ по методу относительного анализа удерживания**

Зависимость удерживания ТАГ и инкрементов от состава подвижной фазы можно отнести к неблагоприятным факторам, препятствующим широкому использованию такой системы индексации удерживания. Однако оказывается, что между параметрами удерживания ТАГ при различных составах подвижных фаз существует прямолинейная зависимость. Это является одним из важнейших вариантов применения метода относительного анализа удерживания [224] для контроля удерживания ТАГ, разработанного для обращенно-фазовой хроматографии.

Так, например, для ТАГ, типичных для линолево-олеиновых масел, к которым можно отнести подсолнечное, кукурузное и ряд других масел для

трех (а, следовательно, и для любых остальных) составов подвижных фаз для одной и той же стационарной фазы (Kromasil 100-5C18) получены результаты, представленные в табл.3.11.

Таблица 3.11.

Логарифмы фактора удерживания для некоторых ТАГ в разных составах ПФ с указанной объемной долей ( $\omega_{\text{CH}_3\text{CN}}$ , %) ацетонитрила в ацетоне

№	ТАГ	lgk ТАГ для подвижной фазы с $\omega_{\text{CH}_3\text{CN}}$ , %		
		20	15	10
1	ЛН <sub>3</sub>	0.257	0.125	-0.032
2	ЛН <sub>2</sub> Л	0.348	0.223	0.076
3	ЛНЛ <sub>2</sub>	0.438	0.319	0.182
4	ЛН <sub>2</sub> П	0.484	0.363	0.23
5	Л <sub>3</sub>	0.521	0.426	0.292
6	ЛНЛО	0.542	0.433	0.304
7	ЛНЛП	0.574	0.462	0.339
8	Л <sub>2</sub> О	0.632	0.528	0.408
9	Л <sub>2</sub> П	0.665	0.557	0.445

Если среди полученных результатов выбрать удерживание триинолеата (Л<sub>3</sub>) в качестве реперного соединения, то можно рассмотреть зависимость удерживания всех остальных ТАГ относительно удерживания этого компонента по уравнению:

$$\lg k(i) = a + b \cdot \lg k(\text{Л}_3) \quad (3.16)$$

Выбор именно триинолеата в качестве реперного соединения не случаен, поскольку этот ТАГ присутствует в большом количестве природных растительных масел и не требует введения с маслом дополнительного стандартного вещества. Впрочем, при необходимости в качестве реперного соединения может быть выбран любой удобный ТАГ.

Как следует из графического представления данных табл.3.11, рис.3.18, экспериментальные данные укладываются на прямые линии относительного удерживания.

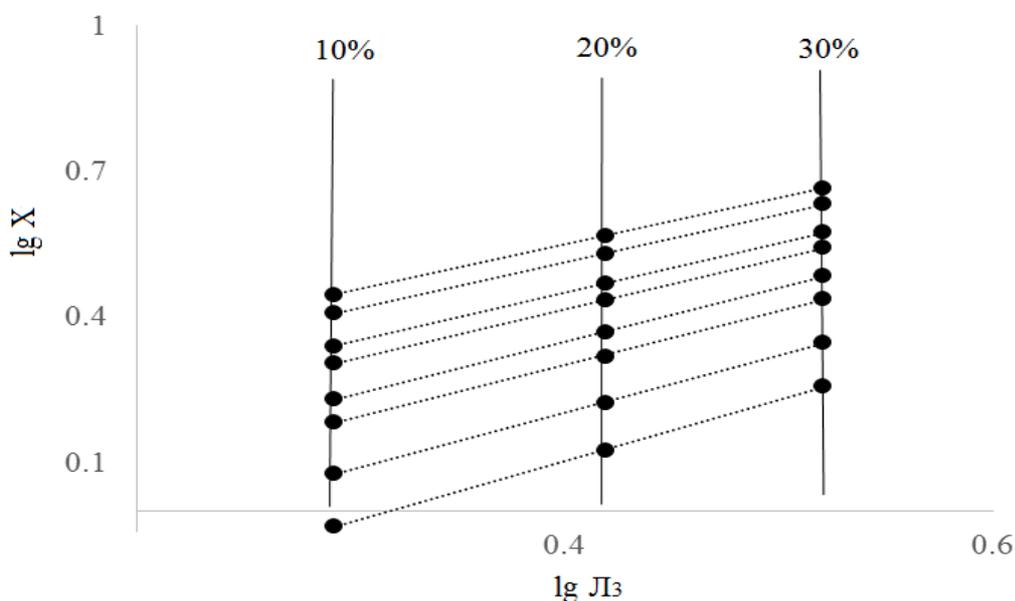


Рис.3.18. Удерживание логарифма фактора удерживания TAG относительно реперного логарифма фактора удерживания TAG Л<sub>3</sub>

### 3.2.1 Карты хроматографического удерживания TAG

Известная в мировой литературе система ECN удобна в силу линейности, аддитивности и вытекающей отсюда простоты, но величины ECN для одних и тех же TAG зависят от состава подвижной фазы. Она построена по тому же принципу, что и индексы Ковача – между «логарифмами факторов удерживания синтетических TAG, построенных на насыщенных высших жирных кислотах, и числом атомов углерода в этих радикалах наблюдается линейность, которая позволяет TAG с заданным экспериментальным удерживанием приписать ECN. Однако, величина ECN (как и величины инкрементов) имеют существенные ограничения:

- 1) ECN являются функцией состава ПФ (табл.3.12);
- 2) изменение температуры при заданном составе ПФ приводит к изменению ECN (табл.3.12);

3) изменяются при смене не только марки октадецилсилановой стационарной фазы, но и партии сорбента одной и той же марки.

Например, для трииноленоата ECN изменение превышает 1 при изменении доли ацетонитрила от 10 до 30 об% (от 32.9 до 34.2), табл.3.12.

Таблица 3.12.

Влияние ПФ на ECN

Вид ТАГ	Объемное % содержание ацетонитрила в ацетоне, 30°C					ECN <sub>min</sub>	ECN <sub>max</sub>	σ
	10	15	20	25	30			
	ECN ±0,05							
ЛН <sub>3</sub>	32.87	33.20	33.56	33.81	34.15	32.87	34.15	0.503
ЛН <sub>2</sub> Л	34.86	35.20	35.52	35.75	36.03	34.86	36.03	0.457
ЛН <sub>2</sub> О	37.11	37.41	37.70	37.92	38.17	37.11	38.17	0.419
ЛН <sub>2</sub> П	37.90	38.15	38.37	38.54	38.76	37.90	38.76	0.335
ЛН <sub>2</sub> С	39.89	40.16	40.38	40.53	40.76	39.89	40.76	0.334
ЛНЛ <sub>2</sub>	36.85	37.20	37.47	37.68	37.91	36.85	37.91	0.411
ЛНЛО	39.10	39.41	39.66	39.85	40.05	39.10	40.05	0.373
ЛНЛП	39.90	40.15	40.33	40.47	40.64	39.90	40.64	0.289
ЛНЛС	41.89	42.16	42.33	42.46	42.64	41.89	42.64	0.289
ЛНО <sub>2</sub>	41.35	41.62	41.84	42.03	42.20	41.35	42.20	0.336
ЛНОП	42.14	42.36	42.51	42.64	42.79	42.14	42.79	0.251
ЛНОС	44.13	44.37	44.51	44.64	44.79	44.13	44.79	0.251
ЛНП <sub>2</sub>	42.94	43.09	43.19	43.26	43.38	42.94	43.38	0.167
ЛНПС	44.93	45.11	45.19	45.25	45.37	44.93	45.37	0.168
ЛНС <sub>2</sub>	46.92	47.12	47.19	47.25	47.37	46.92	47.37	0.169
Л <sub>3</sub>	38.85	39.20	39.43	39.61	39.79	38.85	39.79	0.366
Л <sub>2</sub> О	41.09	41.41	41.61	41.79	41.93	41.09	41.93	0.329
Л <sub>2</sub> П	41.89	42.15	42.28	42.40	42.52	41.89	42.52	0.245
Л <sub>2</sub> С	43.88	44.16	44.29	44.40	44.52	43.88	44.52	0.245
ЛО <sub>2</sub>	43.34	43.62	43.79	43.96	44.08	43.34	44.08	0.291
ЛОП	44.14	44.36	44.47	44.58	44.67	44.14	44.67	0.207
ЛОС	46.12	46.37	46.47	46.57	46.67	46.12	46.67	0.208
ЛП <sub>2</sub>	44.93	45.09	45.14	45.19	45.26	44.93	45.26	0.124
ЛПС	46.92	47.11	47.14	47.19	47.25	46.92	47.25	0.126
ЛС <sub>2</sub>	48.91	49.12	49.14	49.18	49.25	48.91	49.25	0.128
О <sub>3</sub>	45.59	45.83	45.98	46.13	46.23	45.59	46.23	0.254

Условия: колонка 4.6×250 мм Кромасил-100 5С18; подвижная фаза – от 10% до 30 об.-% ацетонитрила в ацетоне, 1 мл/мин.

В тоже время все хроматографические колонки различаются по удерживанию аналитов для одного и того же состава подвижной фазы не только для различных марок стационарной фазы, но и для различных партий одной и той же стационарной фазы, поэтому значимость такой индексации серьезно ограничивается. Более того изменение температуры при заданном составе ПФ также приводит к изменению ECN - не столь значительно для ТАГ с меньшим содержанием двойных связей, по сравнению с триеновыми, но также вносит свой вклад, таблица 3.13.

Таблица 3.13.

Влияние температуры хроматографирования ECN в одном диапазоне ПФ  
(10% СН<sub>3</sub>CN в ПФ)

°С	20	30	40	20	30	40	20	30	40	Коэффициенты уравнения прямой	
Вид ТАГ	t, мин			lgk			ECN ± 0,05			a	b
Лн <sub>3</sub>	5.46	4.6	4	0.07	-0.1	-0.21	33.5	32.8	32.2	1.098	-0.134
Л <sub>3</sub>	7.96	6.2	5.2	0.33	0.2	0.03	39.3	38.9	38.7	1.209	0.112
О <sub>3</sub>	13.2	9.5	7.3	0.63	0.4	0.29	45.5	45.6	45.6	1.353	0.379
М <sub>3</sub>	6.35	5.3	4.6	0.18	0.1	-0.07	36	36	36	1.000	0.000
М <sub>2</sub> Ла	7.26	5.9	5	0.28	0.1	0.01	38	38	38	1.070	0.080
МЛа <sub>2</sub>	8.35	6.6	5.5	0.37	0.2	0.08	40	40	40	1.133	0.158
Ла <sub>3</sub>	9.62	7.5	6	0.46	0.3	0.15	42	42	42	1.182	0.236

В то же время температура не влияет на параметры удерживания по методу относительного анализа удерживания, рис. 3.19.

Цифрами 1, 2, 3 обозначено удерживание соответствующих ТАГ (Лн<sub>3</sub>, Л<sub>3</sub>, О<sub>3</sub>) относительно М<sub>3</sub> в четырёх составах ПФ от 10 об% до 30 об% ацетонитрила в ацетоне. Красные точки на этих прямых удерживания Лн<sub>3</sub>, Л<sub>3</sub>, О<sub>3</sub> относительно М<sub>3</sub> в составе ПФ - 10% ацетонитрила в ацетоне при температурах 20°С, 30°С, 40°С соответственно. (чем больше температура элюирования, тем меньше удерживание на колонке). Такое изменение условий сопровождается такими сильными изменениями в удерживании, что

хроматограммы невозможно сопоставлять напрямую, рис. 3.20, хотя при анализе удерживания по МОАУ различия практически не заметны.

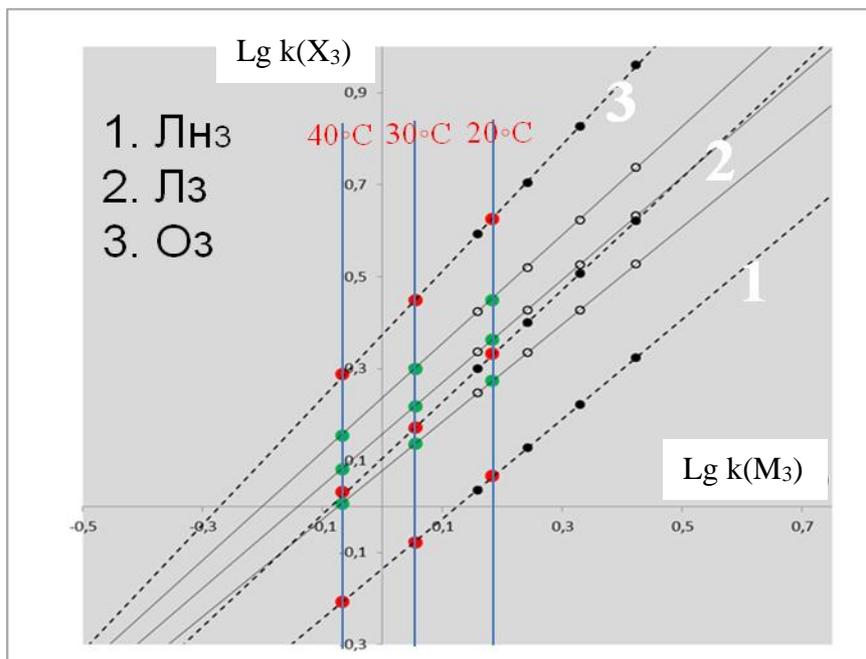


Рис.3.19. Относительное удерживание ТАГ в зависимости от температуры  
Условия измерений: колонка – 4.6×250 мм Кромасил-100 5С18; подвижная фаза – от 10 об % до 30 об % ацетонитрила в ацетоне, 1 мл/мин;

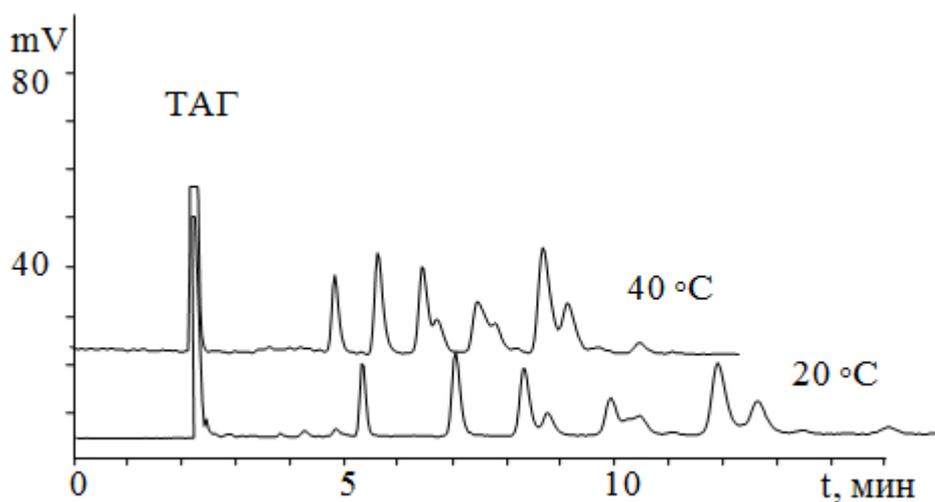


Рис.3.20. Хроматограмма ТАГ смеси льняного и оливкового масла.  
Изменение температуры в диапазоне от 20°C до 40°C. Kromasil 100-5С18, ПФ 10 об% ацетонитрила в ацетоне.

Применение подхода МОАУ, при соблюдении условий метода, позволяет проводить непосредственное сопоставление экспериментальных данных. Так, на рис.3.21 показано удерживание логарифма фактора удерживания  $ЛО_2$ ,  $О_3$  относительно логарифма фактора удерживания трилинолеата ( $Л_3$ ). Кроме стандартной для МОАУ линейности подтверждается еще одна закономерность: для относительно малополярных веществ функциональная зависимость относительного удерживания мало изменяется при смене марки стационарной фазы.

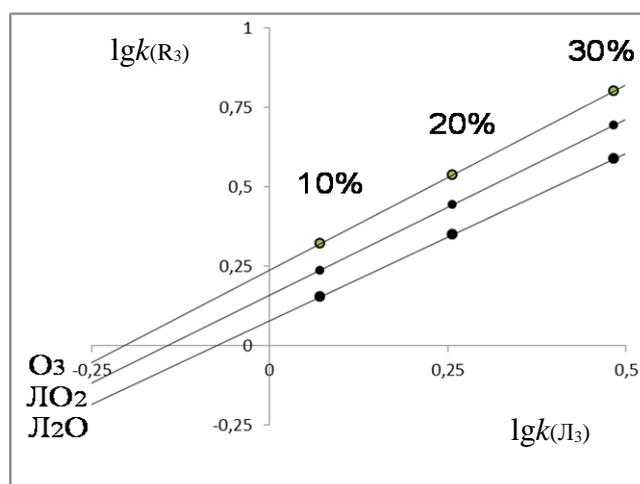


Рис.3.21. Удерживание соответствующих ТАГ относительно  $Л_3$ . Колонка марки Kromasil 100-5C18 ПФ от 10 до 30 об% ацетонитрила в ацетоне.

Поскольку для стационарных фаз различных партий одного и того же производителя различие в абсолютных величинах удерживания сорбатов не больше найденного для двух сопоставляемых в данной работе стационарных фаз, то найденная функциональная зависимость сохранится для используемой колонки в течение длительного времени (до потери эффективности колонки).

«По физическому смыслу метод анализа относительного удерживания веществ соответствует отказу от исследования закономерностей изменения удерживания в нелинейных координатах “удерживание – состав подвижной

фазы». В предлагаемом пространстве графика  $\lg k(R_3)$  как функции  $\lg k(L_3)$  каждая точка соответствует конкретной сумме энергий всех видов взаимодействий, характеризующих всю хроматографическую систему. При изменении состава подвижной фазы точка для выбранной пары веществ перемещается в данном пространстве. Причем положение точки и характер ее перемещения должны зависеть от типа модификатора подвижной фазы, если изменение типа модификатора приводит к изменению вклада различных видов взаимодействий (дисперсионных, ориентационных, индукционных, образования водородных связей и т.д.) в суммарный энергетический эффект» [225]. Таким образом, оценка удерживания вещества может быть сопоставлена для различных марок и серий стационарных фаз в рамках одной и той же системы ПФ, например, «изопропанол-ацетонитрил». Результаты, полученные для других систем, например, «ацетонитрил-ацетон», должны рассматриваться отдельно вследствие неэквивалентности вкладов различных видов взаимодействий в подвижной фазе.

Помимо разности в механизме удерживания существенный вклад в суммарное удерживание может вносить способность сорбатов образовывать водородные связи с остаточными силанольными группами, но если в качестве вещества сравнения используется тот же тип соединения, что и в исследуемой группе сорбатов, то такое влияние может быть нивелировано [225].

Наши исследования показали, что при переходе от колонок Кромасил к колонкам фирмы ReproSil-Pur C18-AQ; Lichrosphere 100RP-C18; Nucleosil100 C18; Equisil ODS C18, Диасфер C18 прямолинейные зависимости, полученные для колонок Кромасил, сохраняются. При этом удерживание в одном составе ПФ на разных колонках заметно различается, рис.3.22.

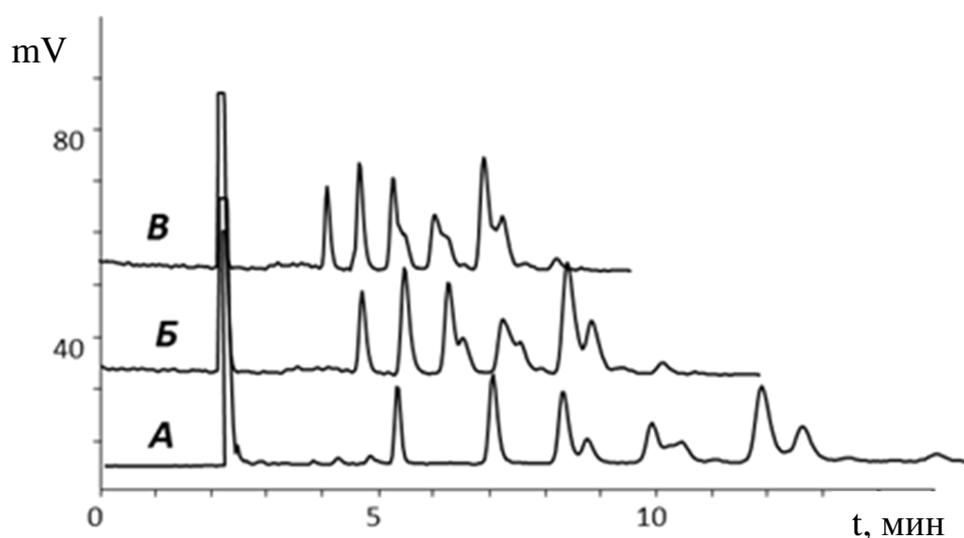


Рис.3.22. Хроматограммы смеси льняного и оливкового масла на колонках: (А- Kromasil 100-5C18; Б- ReproSil-Pur C18-AQ; В-Lichrosphere 100RP-C18; ПФ 10 об% ацетонитрила в ацетоне

Таблица 3.14.

Коэффициенты уравнения удерживания ТАГ на различных колонках

Колонка \ ТАГ	Л <sub>2</sub> О		ЛО <sub>2</sub>		О <sub>3</sub>	
	а	В	а	В	а	В
Kromasil-100 5C18	1.052	0.080	1.110	0.160	1.169	0.240
Reprosil-Pur C18-AQ	1.055	0.079	1.100	0.164	1.1443	0.248
Lichrosphere 100RP-18	1.050	0.084	1.098	0.169	1.145	0.255
Nucleosil 100 C18	1.058	0.079	1.114	0.160	1.172	0.239
Equisil ODS C18	1.048	0.081	1.096	0.163	1.188	0.231
Общее	1.056	0.079	1.110	0.160	1.165	0.241

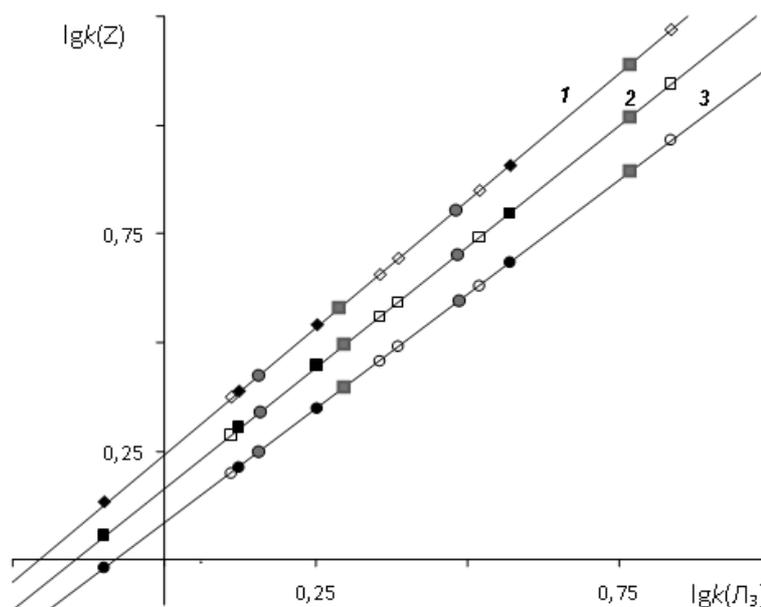


Рис.3.23. Удерживание ТАГ относительно удерживания триинолеата ( $L_3$ ): триолеат (1), линолеат-диолеат (2); дилинолеат-олеат (3).

Из приведенных экспериментальных данных можно сделать вывод: для неполярных соединений карта разделения оказывается одной и той же, как и для стационарных фаз ряда различных марок, рис.3.23, даже существенно отличающихся по сорбционной способности. Так, в настоящей работе было показано, что при переходе от сорбента марки Kromasil 100-5C18 к сорбентам других марок: Reprosil-Pur C18-AQ; Lichrosphere 100RP-C18; Nucleosil100 C18; Equisil ODS C18, Диасфер C18 - эти зависимости остаются не только линейными, но имеют практически те же коэффициенты для уравнения прямой, хотя фазы характеризуются существенно различающимися сорбционными свойствами при одинаковом составе ПФ, данные представлены в таблице 3.14.

Об удерживании на разных стационарных фазах можно судить по различию логарифма фактора удерживания между теоретическими и практическими полученными данными для различных марок стационарных фаз C18, которые представлены в таблице 3.15. Абсолютное отклонение метода незначительно, 0.004, не превышает погрешность «Метода относительного анализа удерживания».

Таблица 3.15.

Значение расчетных логарифмических факторов удерживания и отклонения  
от практических значений

№ п/п	Вид ТАГ	lgk(эксп.) при объемной доле CH <sub>3</sub> CN, %			lgk (расч.) при объемной доле CH <sub>3</sub> CN, %			lgk (расч.) - lgk(эксп.) при объемной доле CH <sub>3</sub> CN, %		
		10	15	25	10	15	25	10	15	25
Reposil-Pur C18-AQ, 5 мкм										
1	Л <sub>3</sub>	0.070	0.256	0.560						
2	Л <sub>2</sub> О	0.154	0.351	0.670	0.154	0.350	0.670	0.000	0.000	0.000
3	ЛО <sub>2</sub>	0.238	0.445	0.781	0.238	0.444	0.780	0.001	-0.001	-0.002
4	О <sub>3</sub>	0.322	0.540	0.894	0.323	0.538	0.890	0.001	-0.001	-0.004
доля CH <sub>3</sub> CN, % объёмных		20	25	30	20	25	30	20	25	30
Lichrosphere 100 RP-18, 5 мкм										
5	Л <sub>3</sub>	0.474	0.534	0.601						
6	Л <sub>2</sub> О	0.581	0.644	0.715	0.579	0.643	0.713	-0.002	-0.001	-0.002
7	ЛО <sub>2</sub>	0.689	0.755	0.828	0.684	0.752	0.825	-0.004	-0.003	-0.003
8	О <sub>3</sub>	0.794	0.863	0.940	0.790	0.860	0.937	-0.004	-0.003	-0.003
Nucleosil 100 C18, 5 мкм										
9	Л <sub>3</sub>	0.323	0.443	0.546						
10	Л <sub>2</sub> О	0.421	0.549	0.657	0.420	0.546	0.655	-0.001	-0.002	-0.002
11	ЛО <sub>2</sub>	0.519	0.654	0.768	0.518	0.650	0.765	-0.001	-0.004	-0.003
12	О <sub>3</sub>	0.617	0.758	0.877	0.615	0.754	0.874	-0.002	-0.004	-0.003
Equisil ODS C18, 5 мкм										
13	Л <sub>3</sub>	0.258	0.354	0.472						
14	Л <sub>2</sub> О	0.351	0.453	0.575	0.352	0.453	0.577	0.001	0.000	0.002
15	ЛО <sub>2</sub>	0.445	0.552	0.679	0.446	0.553	0.683	0.002	0.001	0.004
16	О <sub>3</sub>	0.539	0.651	0.792	0.540	0.652	0.788	0.002	0.001	-0.004

На основании полученных данных была создана собственная универсальная система индексации удерживания ТАГ в случае ОФ ВЭЖХ.

Индексация выполняется при помощи линейной зависимости удерживания всех ТАГ относительно реперного соединения трилинолеата. Коэффициенты уравнения представлены в таблице 3.16.

Таблица 3.16.

Значение логарифмических факторов удерживания и уравнения для колонки Kromasil 100-5C18

Тип ТАГ	Объемная доля ацетонитрила в системе ацетонитрил-ацетон, %					Параметры уравнения (3.16)				
	10	15	20	25	30	<i>a</i>	$\Delta a$	<i>b</i>	$\Delta b$	R <sup>2</sup>
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ЛН <sub>3</sub>	-0.046	0.045	0.134	0.224	0.312	0.8741	0.0073	-0.2214	0.0031	0.99992
ЛН <sub>2</sub> Л	0.036	0.133	0.225	0.318	0.412	0.9161	0.0048	-0.1476	0.0021	1
ЛН <sub>2</sub> О	0.127	0.230	0.326	0.425	0.525	0.9684	0.0067	-0.0669	0.0029	0.99994
ЛН <sub>2</sub> П	0.159	0.262	0.357	0.455	0.556	0.9671	0.0074	-0.0352	0.0032	0.99993
ЛН <sub>2</sub> С	0.238	0.351	0.450	0.553	0.662	1.027	0.0098	0.0334	0.0042	0.99989
ЛНЛ <sub>2</sub>	0.118	0.220	0.315	0.413	0.511	0.958	0.0024	-0.0738	0.0010	0.99999
ЛНЛО	0.209	0.318	0.416	0.520	0.625	1.0104	0.0051	0.0069	0.0022	0.99997
ЛНЛП	0.240	0.350	0.447	0.550	0.656	1.0091	0.0065	0.0386	0.0028	0.99995
ЛНЛС	0.320	0.438	0.540	0.648	0.762	1.0689	0.0095	0.1072	0.0041	0.99991
ЛНО <sub>2</sub>	0.300	0.415	0.517	0.626	0.738	1.0627	0.0091	0.0876	0.0039	0.99991
ЛНОП	0.332	0.447	0.549	0.657	0.769	1.0614	0.0107	0.1193	0.0046	0.99988
ЛНОС	0.412	0.535	0.641	0.754	0.875	1.1213	0.0136	0.1879	0.0059	0.99982
ЛНП <sub>2</sub>	0.363	0.479	0.580	0.687	0.801	1.0601	0.0126	0.151	0.0054	0.99983
ЛНПС	0.443	0.568	0.672	0.785	0.907	1.12	0.0159	0.2196	0.0068	0.9998
ЛНС <sub>2</sub>	0.523	0.656	0.765	0.883	1.013	1.1799	0.0193	0.2882	0.0083	0.9997
Л <sub>3</sub>	0.200	0.308	0.406	0.508	0.611	1		0		
Л <sub>2</sub> О	0.291	0.405	0.507	0.615	0.724	1.0523	0.0044	0.0807	0.0019	0.99998
Л <sub>2</sub> П	0.322	0.437	0.538	0.645	0.756	1.0511	0.0064	0.1124	0.0027	0.99996
Л <sub>2</sub> С	0.402	0.526	0.630	0.743	0.862	1.1109	0.0099	0.1810	0.0042	0.99991
ЛО <sub>2</sub>	0.382	0.503	0.608	0.721	0.838	1.1047	0.0087	0.1614	0.0037	0.99992
ЛОП	0.413	0.535	0.639	0.751	0.869	1.1034	0.0106	0.1931	0.0045	0.99988
ЛОС	0.493	0.623	0.731	0.849	0.975	1.1633	0.0139	0.2617	0.0060	0.99982
ЛП <sub>2</sub>	0.445	0.567	0.670	0.782	0.901	1.1021	0.0128	0.2248	0.0055	0.99983
ЛПС	0.525	0.655	0.763	0.879	1.006	1.162	0.0162	0.2934	0.0070	0.99975
ЛС <sub>2</sub>	0.604	0.744	0.855	0.977	1.112	1.2218	0.0198	0.3620	0.0085	0.99966
О <sub>3</sub>	0.473	0.600	0.709	0.828	0.951	1.157	0.0131	0.2420	0.0056	0.99984
О <sub>2</sub> Р	0.483	0.626	0.736	0.857	0.992	1.1557	0.0112	0.2738	0.0061	0.99983
О <sub>2</sub> С	0.565	0.715	0.829	0.955	1.097	1.2156	0.0126	0.3424	0.0068	0.99975
ОР <sub>2</sub>	0.516	0.658	0.767	0.887	1.023	1.1544	0.0135	0.3055	0.0042	0.99972
ОРС	0.598	0.748	0.860	0.985	1.128	1.2143	0.0164	0.3741	0.0071	0.99964
ОС <sub>2</sub>	0.681	0.837	0.953	1.083	1.233	1.2742	0.0172	0.4427	0.0076	0.99963

Продолжение табл. 3.16										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
P <sub>3</sub>	0.549	0.691	0.799	0.918	1.053	1.1532	0.0181	0.3373	0.0063	0.99954
P <sub>2</sub> S	0.631	0.780	0.892	1.016	1.159	1.213	0.0183	0.4058	0.0076	0.99953
PS <sub>2</sub>	0.714	0.869	0.985	1.114	1.264	1.2729	0.0189	0.4744	0.0083	0.99938
S <sub>3</sub>	0.796	0.958	1.078	1.211	1.369	1.3328	0.0192	0.543	0.0091	0.99934

Отметим, что изменение параметров  $a$  и  $b$  одинаковое при одинаковом изменении структуры ТАГ, это доказывает, что инкрементные зависимости сохраняются при любом диапазоне подвижных и стационарных фаз.

Такая схема позволяет легко моделировать удерживание любых масел в простой математической модели. Она была реализована в программе, в которую заносится удерживание  $L_3$  и мертвое время - автоматически происходит расчёт всех других логарифмов фактора удерживания и времени для ТАГ. При введении площадей пиков в таблицу данных выдается расчет по содержанию жирных кислот в образце, рис. 3.24.

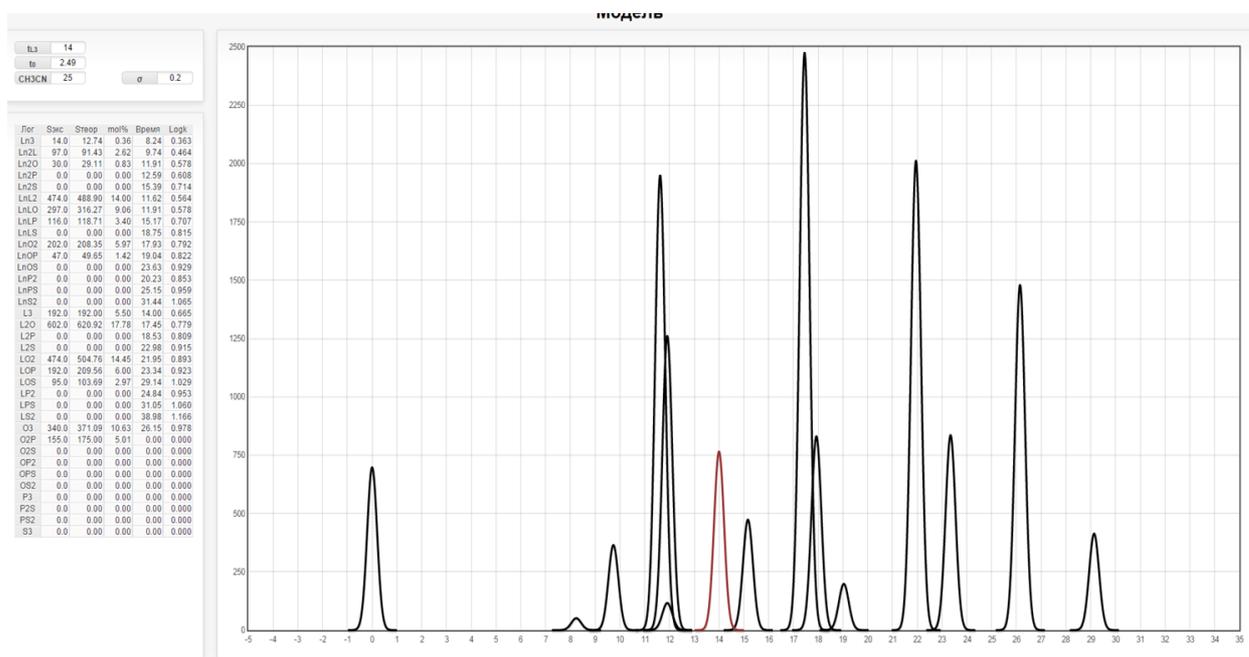


Рис.3.24. Расчетная программа для нахождения времени удерживание ТАГ в состав которых входят радикалы Ln, L, O, P, S жирных кислот, относительно удерживания трилинолеата (L<sub>3</sub>) для колонок C18 в системе ПФ ацетон-ацетонитрил.

Полученное максимальное отклонение 0.004 не превышает погрешность метода относительного анализа удерживания, на это может повлиять наличие сторонних пиков и мертвое время.

### **3.2.2 Анализ животных жиров**

Анализ удерживания для разных групп гомологов в координатах относительного удерживания по отношению к логарифму фактора удерживания  $L_3$  показал, что для основных гомологических рядов с различным набором функциональных групп координаты точек конвергенции отличны друг от друга. Аппроксимация прямолинейных зависимостей на предельно сильные элюенты (в нижнюю левую координатную четверть) обнаруживает существование точек конвергенции – точек, или гипотетических составов ПФ, в которых времена удерживания всех членов одного гомологического ряда оказывается одинаковым. Можно предположить, что в этих условиях свойства стационарных и подвижных фаз оказываются эквивалентными, вследствие чего логарифм фактора удерживания равен логарифму фазового соотношения. Это объясняет постоянство ординат точек, но остаточные гидрофильные свойства стационарной фазы дифференцируют абсциссы точек по гидрофильности заместителей основы гомологов: точка конвергенции для ТАГ смещается вправо при добавлении каждой двойной связи. Именно различие координат точек конвергенции для различных гомологических рядов и является причиной неэффективности любых точечных систем индексации.

По карте разделения с учетом координаты точки конвергенции для синтетических ТАГ (или любого другого ТАГ с точно известным числом двойных связей) можно подсчитать число двойных связей в ТАГ по удалению точки конвергенции от указанной точки для ТАГ с радикалами высших насыщенных жирных кислот. Справедливость такого подхода была

подтверждена исследованиями с использованием масс-спектрометрического детектирования.

Такая схема может быть признана экспертной системой, поскольку она позволяет определить число двойных связей в молекуле ТАГ – контролем координат точки конвергенции - абсциссы точки пересечения, соответствующей линии тренда с горизонталью, соответствующей ординате точек конвергенции. Точки конвергенции являются экстраполяционными. Примеры будут приведены далее по ходу работы.

### 3.2.2.1 Определение ТАГ состава гусиного жира

Простого сопоставления времен удерживания компонентов гусиного жира и масла «железного дерева» (или подсолнечного), рис.3.25, оказывается достаточно для идентификации основных ТАГ. В масле очевидно преобладание олеиновой и пальмитиновой кислот, в меньшем количестве содержатся стеариновая и линолевая, но имеются и весьма специфические ТАГ.

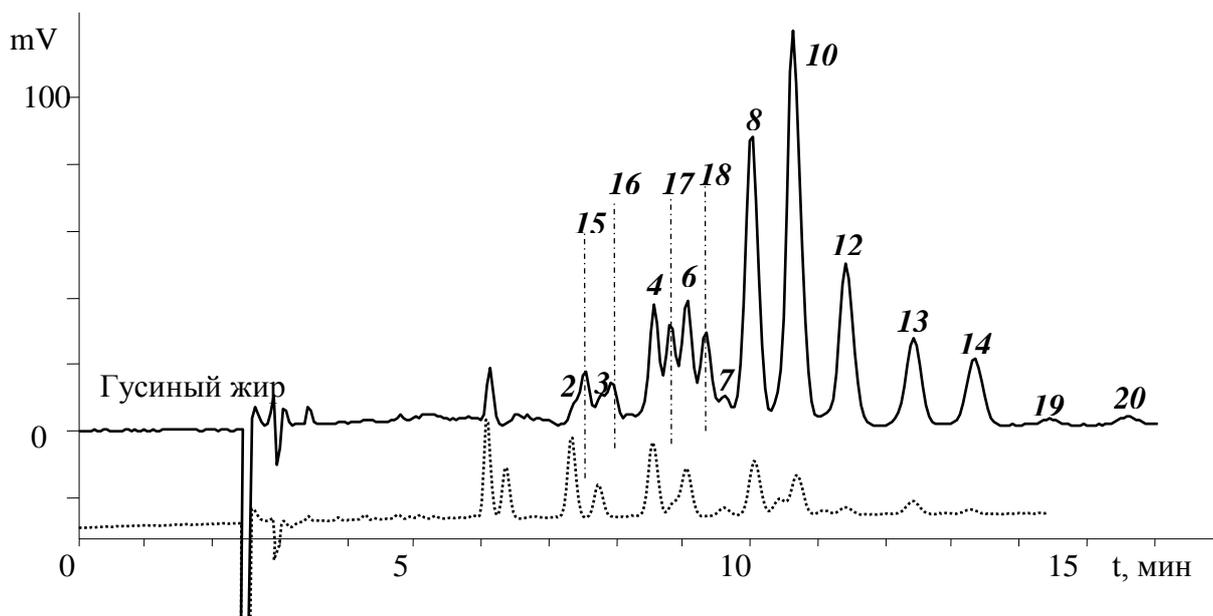


Рис.3.25 Хроматограмма гусиного жира, подвижная фаза 5% ацетонитрила в ацетоне

Специфические пики (две пары с номерами 15 и 16, 17 и 18) появляются в группах проблемных пиков при ТАГ  $L_2O$  и  $LO_2$  и имеется плохо разделенная группа пиков в диапазоне удерживания  $L_3$ . Отсутствие новых пиков в диапазоне  $O_3$  свидетельствует о том, что в указанных группах происходит замена радикала линолевой кислоты на некоторую не столь традиционную кислоту:  $L \rightarrow X$ . Такой кислотой  $X$  может быть пальмитолеиновая [30-31].

Смысл и значение экспертной системы состоит в следующем: вследствие дрейфа удерживания для нового образца возможно некоторое изменение времен удерживания. В таком случае на карту разделения наносится точка для выбранного пика  $i$  с координатами, определяемыми по рассматриваемой хроматограмме:  $x = \lg k(L_3)$  и  $y = \lg k(i)$ . При этом пика  $L_3$  может и не быть на хроматограмме – его координаты предварительно подбираются по координатам известного ТАГ и последовательно проверяется совпадение точки с соответствующими линиями трендов. Кроме того, линия тренда для пика 17 проходит через точку конвергенции, соответствующую ТАГ с тремя двойными связями, рис.3.26.

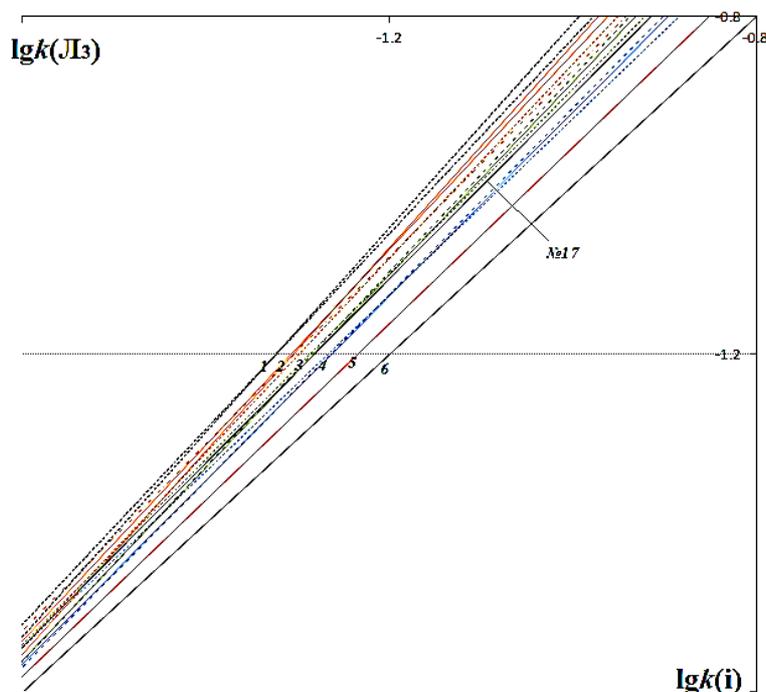


Рис.3.26 Линия тренда для пика №17 на карте разделения

По совокупности данных [5,6,9-13] представлен состав гусиного жира, который образован кислотами, составляющими в сумме 93.9 %: олеиновой - 53.5 %; пальмитиновой - 20.7 %; линолевой 9.8 %; стеариновой - 6.1 %; пальмитолеиновой - 2.8 %; линоленовой - 0.5%; миристиновой - 0.5 %.

Это позволило провести отнесение пиков на рис.3.26, см. таблица 3.17. В набор обычных ТАГ введены в первой частично разделенной группе – L<sub>2</sub>O как плечо на пике ЛПоО (По – радикал пальмитолеиновой кислоты), а во второй группе отчетливо разделились ЛО<sub>2</sub>, ЛПоО, ЛОП и ЛПоП с хорошим соблюдением инкрементной разности. Для пиков ТАГ состава О<sub>2</sub>С, ОПС, ОС<sub>2</sub> и ОПС некоторый рост инкрементов не случаен, так как они относятся к различным группам гомологов [224-227].

Таблица 3.17

ТАГ гусиного жира

№*	Состав ТАГ	Удерживание ТАГ		Инкремент	
		t <sub>R</sub> , мин	lgk(i)	Л→По	О→П
2	L <sub>2</sub> O	пл.			
15	ЛПоО	7.52	0.308		
3	L <sub>2</sub> П	пл.			
16	ЛПоП	7.92	0.341		0.033
4	ЛО <sub>2</sub>	8.55	0.389		
17	ПоО <sub>2</sub>	8.79	0.406	0.017	
5	ЛОП	9.04	0.422		0.033
18	ПоОП	9.31	0.440	0.018	0.034
8	O <sub>3</sub>	9.99	0.481		
10	O <sub>2</sub> П	10.61	0.516		0.035
12	ОП <sub>2</sub>	11.39	0.555		0.039
13	O <sub>2</sub> С	12.40	0.602		
14	ОПС	13.31	0.640		0.038
19	ОС <sub>2</sub>	14.41	0.682		
20	ОСП	15.56	0.722		0.040

Таким образом, основная особенность гусиного жира – присутствие радикалов пальмитолеиновой (*цис*-9-гексадеценовой, C<sub>15</sub>H<sub>29</sub>COOH) кислоты,

в ощутимых количествах содержащейся только в таких маслах, как облепиховое, масло мякоти плода авокадо и масло макадамии [228].

### 3.2.2.2 Свиной и говяжий жиры

Определение ТАГ при анализе свиного и говяжьего жиров практически не представляет сложности после сопоставления пиков ТАГ гусиного жира.

Очевидно, что в случае свиного жира основные компоненты - пальмитиновая, олеиновая, стеариновая и линолевая кислоты в составе ТАГ, заметно также и небольшое количество пальмитолеиновой кислоты. Хроматограмма свиного жира представлена на рис.3.27.

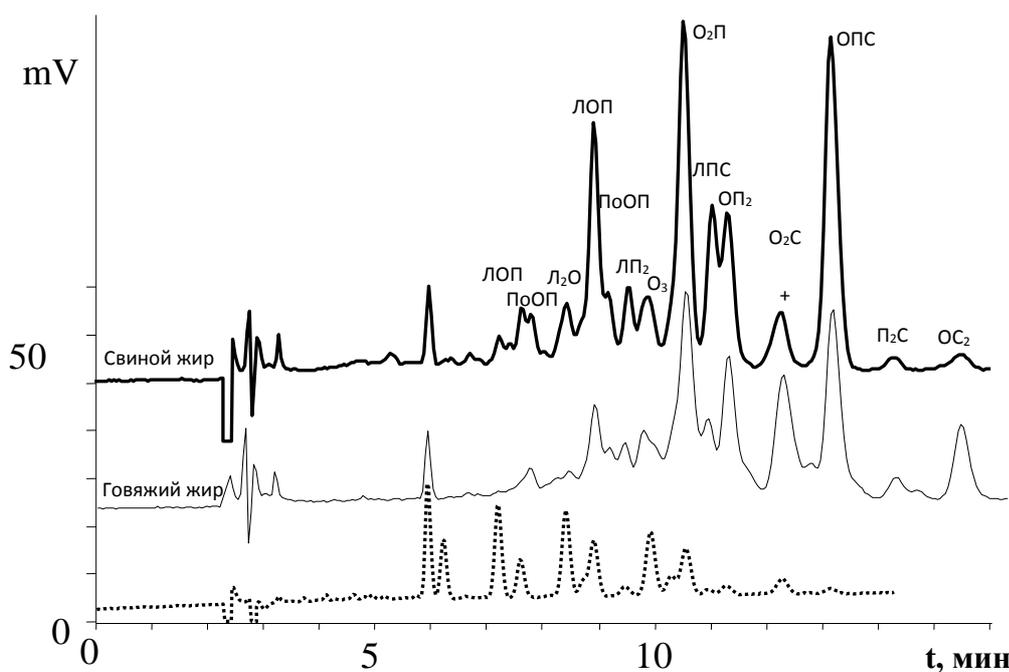


Рис.3.27 Хроматограмма свиного жира

Подвижная фаза 5% ацетонитрила в ацетоне; Колонка 250×4.6 мм Kromasil 100-5C18, подвижная фаза ацетон, 1 мл/мин, рефрактометрический детектор.

В говяжьем жире видны те же основные пики, но меньше вклад линолевой кислоты и больше – стеариновой. Впрочем, обнаруживается

большое количество иных пиков, часто плохо разделенных друг от друга, рис.3.28.

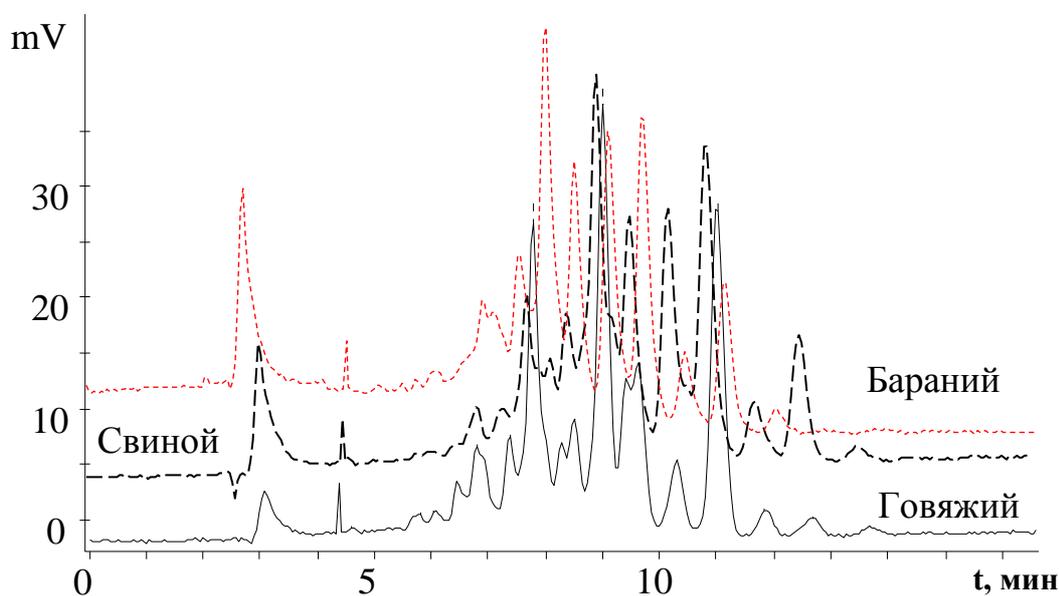


Рис.3.28 Хроматограмма животных жиров.

Колонка 250×4.6 мм Kromasil 100-5C18, подвижная фаза ацетон, 1 мл/мин, рефрактометрический детектор.

Таким образом, межинкрементные зависимости могут использоваться для расчета всех ТАГ животных жиров по аналогии с растительными маслами. Карта разделения для ТАГ показала свою эффективность при идентификации неизвестных компонентов даже без наличия стандартных веществ. Коэффициенты удерживания относительно насыщенных ТАГ или  $L_3$  легко можно пересчитать на любой другой ТАГ, т. о. метод оказывается достаточно гибким, так как он мало чувствителен к дрейфу удерживания анализов, к температуре и т.д.

### 3.2.3 Масла с радикалами уксусной кислоты

Одно из направлений современной науки - это возможность получить возобновляемые источники энергетических ресурсов, в частности, разработка топлива типа «биодизель» - на основе природных растительных масел [229]. Классическая подготовка такого вида топлива основана на технологии переэтирификации, это позволяет снижать вязкость горючего до пригодных к эксплуатации значений, хотя цена продукта заметно возрастает. Температура плавления и вязкость масел существенно уменьшается, если в составе их ТАГ находится хотя бы один короткоцепочечный радикал, например, уксусной или муравьиной кислот [230] Такой подход позволяет использовать подобные масла в качестве дизельного топлива без дополнительной пробоподготовки.

В природе обнаружены растительные объекты, синтезирующие масла с ТАГ, содержащие радикалы уксусной кислоты [230 - 232]; среди них - растения из семейства бересклетов и древогубцев [233]. Первые публикации по исследованию необычного масла семян бересклета датируется первой половиной XX века. По нашим данным, в состав ТАГ бересклетов и древогубцев входит не больше одного радикала уксусной кислоты [224]. Помимо необычных физико-химических свойств масла, плоды, семена и масла этих растений используют в лечебных целях в аюрведической медицине. Исследований по видовому составу ТАГ масел семян методом ВЭЖХ нами в литературе не обнаружено. Выделение и создание биореакторов с ферментом, отвечающим за синтез подобных масел в инкубаторе, например, бактериями, в будущем очень перспективно. Возможное получение трансгенных растений введением гена позволит напрямую получать низкокалорийные масла, коммерчески доступные под названием SALATRIM (short and long acyltriglyceride molecule) [235]).

ТАГ масел семян древогубцев и бересклетов по удерживанию заметно отличаются от ТАГ линолево - олеиновых масел, по удерживанию ближе к

льняному маслу, рис.3.29. Качественный состав ТАГ этих масел одинаковый (пики №1 - №10, рис.3.29), однако в составе ТАГ семян древогубцев содержание уксусной кислоты в радикалах ТАГ значительно выше, рис.3.29.Б:

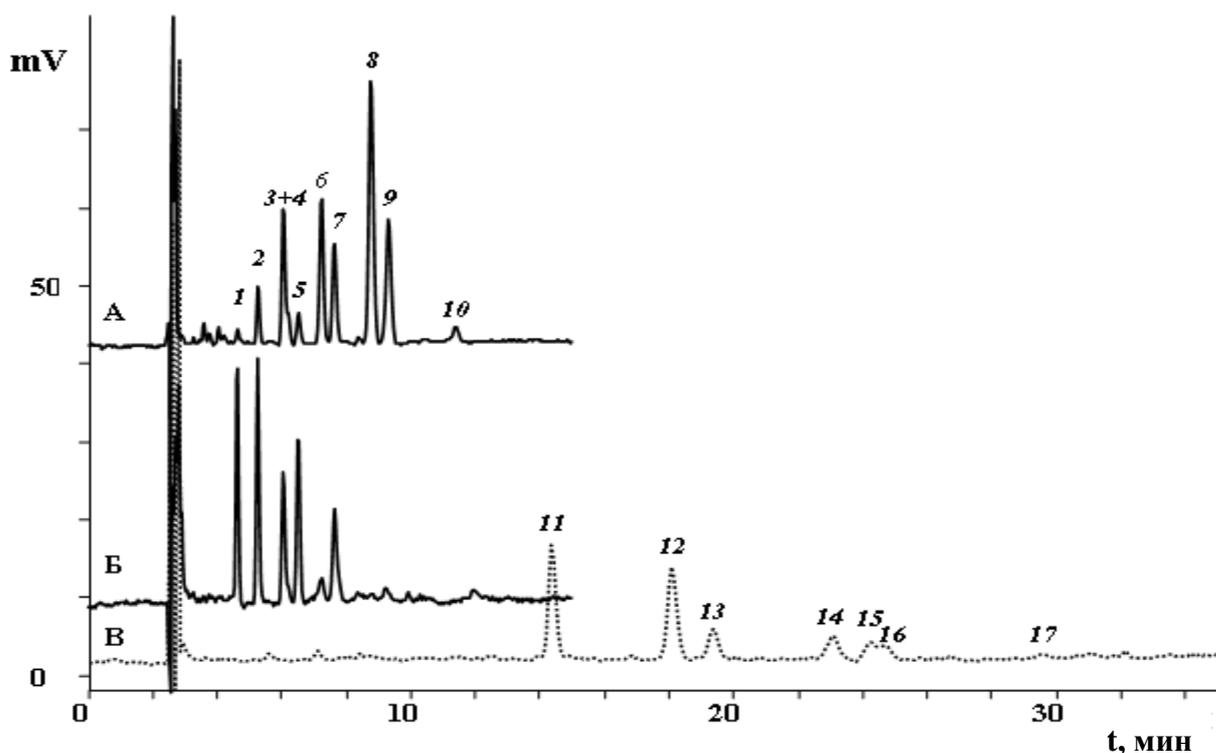


Рис.3.29. Хроматограмма ТАГ масел семян: А - бересклета (*Euonymus japonicus*), Б - древогубца (*Celastrus rugosus*), В – масло линолево-олеинового типа. Колонка: 4.6×250 мм Кромасил-100 5С18. ПФ: содержание ацетонитрила в ацетоне 25 об%.

Для приблизительной оценки состава ТАГ можно попробовать использовать ЭУЧ [224]. Однако найденные эквивалентные углеродные числа для каждого из компонентов смеси не прояснили ситуацию. Так, для пика №1 ЭУЧ равно примерно 25-26, что соответствует ТАГ, содержащему два остатка каприловой кислоты (С8) и один каприновой кислоты (С10). Помимо предложенного примера существует еще десятка два варианта ТАГ с соответствующим ЭУЧ. Таким образом, уже на начальном этапе без знания достоверной информации об анализе можно выбрать неправильное направление в исследовании, табл. 3.18.

Таблица 3.18

## ТАГ состав масел семян древогубцев и бересклетов

	ТАГ	Параметры			Параметры удерживания						Инкременты (25% CH <sub>3</sub> CN)			Массы	
		1*	2*	3*	ЭУЧ по уравнению			t <sub>R</sub> , мин.	lgk(i)	Л <sub>Н</sub> _Л	Л_О	О_П	ТАГ	иона	
					20%	25%	30%								
1	АЛН <sub>2</sub>	38	6	26	25.4	25.8	26.1	4.52	-0.132				654.97	655.5	
2	АЛНЛ	38	5	28	27.6	27.9	28.2	5.14	-0.010	0.122			656.99	657.5	
3	АЛ <sub>2</sub> +														
	АЛНО	38	4	30	29.7	30.0	30.2	5.92	0.106	0.116			659.00	659.5	
4	АЛНО	38	4	30	30.1	30.3	30.5	6.09	0.128		0.138		659.00	659.5	
5	АЛНП	36	3	30	30.8	31.0	31.1	6.39	0.164			0.036	632.97	633.5	
6	АЛО	38	3	32	32.0	32.3	32.4	7.09	0.237	0.109	0.131		661.02	661.5	
7	АЛП	36	2	32	32.8	32.9	33.0	7.50	0.275	0.112		0.038	634.98	635.5	
8	АО <sub>2</sub>	38	2	34	34.3	34.5	34.5	8.61	0.364		0.127		663.03	663.5	
9	АОП	36	1	34	35.1	35.1	35.2	9.14	0.401			0.037	637.00	637.5	

1\* - углеродное число (УЧ без поправок на двойные связи)

2\*- количество двойных связей

3\* ЭУЧ (с поправками на наличие двойных связей)

Возвращаясь к идентификации ТАГ, воспользуемся инкрементным подходом и рассчитаем зависимости инкрементов для масла стандарта линолево-олеинового вида и используем их для дальнейшей расшифровки неизвестных компонентов масел. Из 10 пиков на хроматограмме, используя «базовые инкременты», рассчитываем инкременты по разности логарифмов фактора удерживания для ТАГ, формулы 3.17 и 3.18, для 4х пиков найдено значение одного радикала, пик под номером 1 остался полностью под

вопросом, а для 5 пиков удалось найти значение по двум радикалам жирных кислот:

а) линолевой кислоты на олеиновую:

$$\Delta(\text{Л} \rightarrow \text{О}) = \lg k(\text{Л}_2\text{О}) - \lg k(\text{Л}_3). \quad (3.17)$$

б) олеиновой кислоты на пальмитиновую:

$$\Delta(\text{О} \rightarrow \text{П}) = \lg k(\text{Л}_2\text{П}) - \lg k(\text{Л}_2\text{О}). \quad (3.18)$$

По инкрементной разности удалось понять, что одним из радикалов в неизвестных компонентах ТАГ может быть радикал с тремя двойными связями в составе ТАГ. Используя льняное масло в качестве дополнительно стандарта, рассчитываем инкремент по разности логарифмов фактора удерживания аналитов [226] для замены по формуле 3.19:

в)  $\alpha$ -линоленовой кислоты на линолевую:

$$\Delta(\text{Л}_n \rightarrow \text{Л}) = \lg k(\text{Л}_{n+2}\text{Л}) - \lg k(\text{Л}_{n+3}); \quad (3.19)$$

Используя новый инкремент логарифма фактора удерживания замены линоленовой кислоты на линолевую удалось достоверно установить по два жирнокислотных радикала в составе ТАГ на хроматограмме.

«Однако точного соответствия инкрементов, найденных по удерживанию ТАГ подсолнечного и льняного масел с одной стороны и исследуемых масел семян древогубца и бересклета с другой стороны в настоящей работе не получено. Это связано с особенностями хроматографического поведения рядов гомологов, для которых наблюдается изменение инкремента, приходящегося на одну  $\text{CH}_2$ -группу при увеличении числа метиленовых групп в диапазоне 8 – 10» [234].

Используя данные логарифмов фактора удерживания, полученные для трех составов ПФ (20, 25, 30 об. % содержания ацетонитрила в ацетоне), строим карту относительного удерживания ТАГ. Аппроксимация линий

трендов на предельно сильные элюенты исследуемых ТАГ пересекают прямую параллельную оси Y с некоторым интервалом рис.3.30.

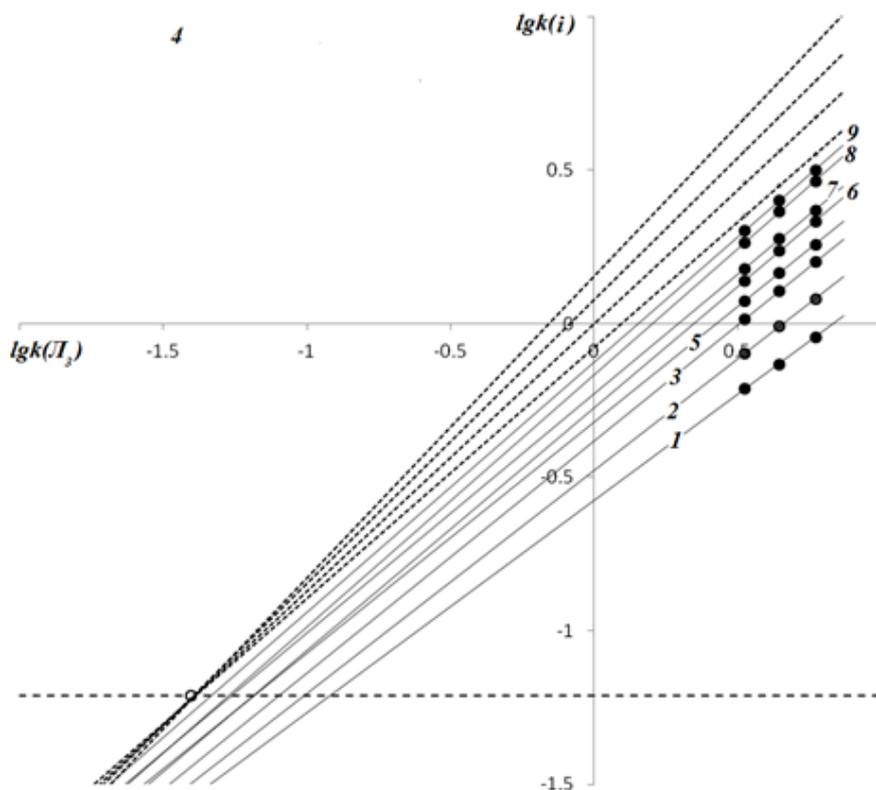


Рис.3.30. Карта разделения ТАГ масел семян древогубцев и бересклетов. Номера на линиях трендов – номера пиков соответствуют номерам в табл. 3.18;

Как ранее упоминалось, отсчет числа двойных связей можно начинать от любого достоверно известного компонента, но в данном случае у нас в наличие есть логарифмы фактора удерживания для насыщенных ТАГ, по которым мы находили ЭУЧ (прямые обозначены пунктирной линией на рисунке 3.30). Теперь зная точку конвергенции для насыщенных ТАГ на гипотетической прямой, можно посчитать число двойных связей по удалению от этой точки. ТАГ, которому соответствует пик №1, имеется шесть двойных связей, у пика №2 – пять, ТАГ (№5 и №6) и (№7 и №8), число двойных связей имеют соответственно по 3 и по 2. Это полностью соответствует предложенному отнесению в табл.3.18, из этого следует, что

неизвестный радикал не содержит С=С-связей и не противоречат литературным данным.

Эффективность использованных в работе вышеизложенных хроматографических приемов была подтверждена альтернативным методом ВЭЖХ-МС в режиме химической ионизации при атмосферном давлении (APCI), рис.3.31. Отметим, что такой способ детектирования оказался эффективным при использовании микроколонки (2.1×150 мм, SB-C18, 1.8 мкм, Agilent) с расходом подвижной фазы 0.1 мл/мин.

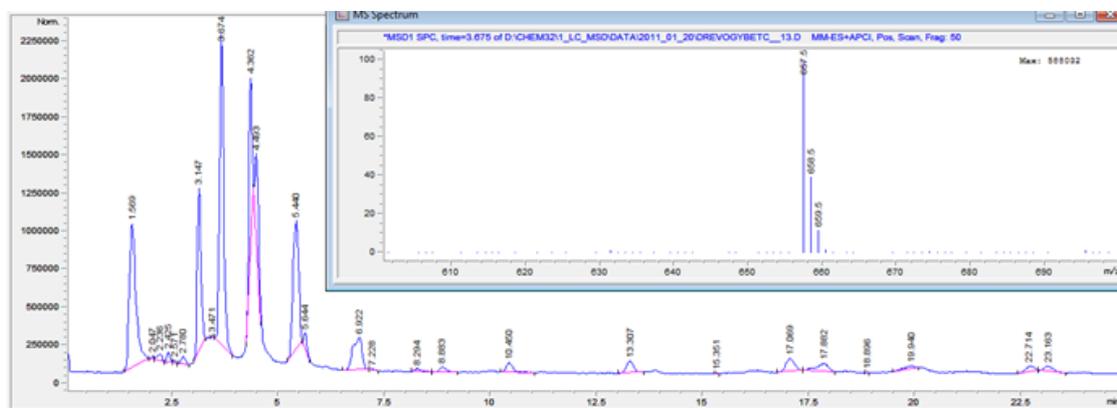


Рис.3.31. Хроматограмма триацилглицеринов масла семян древогубца и масс-спектр пика состава АЛНЛ (№ 2 в табл. 3.18)

Колонка: 2.1×150 мм, SB-C18, 1.8 мкм.

Найденное отнесение пиков было использовано для определения жирнокислотного состава масел семян десяти видов бересклета и трех видов древогубца, таблица 3.19. Полученные данные показывают, что масла семян указанных растений образованы в основном (более чем на 90%) ТАГ, в состав которых всходит один радикал уксусной кислоты, кроме бересклета *Euonymus maackii*. Можно отметить, что биосинтез ТАГ масел семян древогубцев преимущественно идет на синтез Лн, Л и А (уксусной) кислот, а бересклетов на синтез Л, О, А кислот.

Таблица 3.19.

## ТАГ состав семейства CELASTRACEAE

ТАГ/ Вид	Бересклеты (содержание %)										Древогубцы (содержание %)		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
АЛН <sub>2</sub>	1	1.9	0.9	1.3	2.3	1.3	0.4	2.3	1.9	3.6	19.4	8.0	9.2
АЛНЛ	4.6	6.3	4.2	3.3	6.3	3.6	3.7	7.1	4.4	8.7	22.6	21.3	22.8
АЛ <sub>2</sub> +АЛНО	14	15.5	12.4	9.1	15.1	10.7	30.0	18.6	13.1	17.9	14.4	24.7	25.2
АЛНП	2	3.1	3.0	2.5	3.0	1.9	1.8	3.1	2.7	5.5	18.6	10.6	11.9
АЛО	16.1	14.2	13.9	14.7	17.0	16.6	14.2	16.9	15.5	19.4	3.2	8.6	9.1
АЛП	7.8	11.0	10.6	6.6	8.0	6.1	21.5	11.9	6.8	12.3	13.6	13.0	12.5
АО <sub>2</sub>	18.6	30.7	31.9	36.3	31.0	40.1	12.6	21.6	33.2	28.2	1.1	2.8	2.8
АЛС+АОП	10.2	14.3	15.9	17.4	13.2	14.6	11.5	13.5	13.8	0.2	3.7	4.9	3.0
остаток др ТАГ	25.7	3.0	7.1	9.0	4.1	5.1	4.5	5.0	8.6	4.4	3.4	6.2	3.6

Виды *Euonymus*: 1 - *maackii*, 2 – *macropterus*, 3 – *japonicus*, 4 – *hamiltonianus*, 5 – , 6 – *sieboldianus*, 7 – *sacrosanctus*, 8 – *maximowiczianus*, 9 – *bungeanus*, 10 – *europaeus*; *Celastrus*: 11 – *orbiculatus*, 12 – *scandens*, 13 – *rugosus*.

Таким образом, инкрементные зависимости сохраняются даже для короткоцепочечных радикалов в составе ТАГ, точки конвергенции для ТАГ, содержащих уксусный радикал, сдвигаются по тому же принципу, что и для обычных линолево-олеиновых ТАГ.

### 3.2.4 Масла с триеновыми двойными связями, сопоставление методов анализа ГЖХ-МС и ВЭЖХ

Одной из сложнейших задач даже по меркам современного оборудования можно считать селективное разделение изомеров, с этой задачей однозначно не всегда может справиться даже ЯМР-спектроскопия. В качестве объекта исследования выбрали изомеры октадекатриеновых кислот с различной биологической активностью:

1.  $\alpha$ -линоленовая (C18<sup>9Z,12Z,15Z</sup>) [235];
2.  $\gamma$ -линоленовая (C18<sup>6Z,9Z,12Z</sup>) [236];
3. пиноленовая (C18<sup>5Z,9Z,12Z</sup>) [237];
4. колумбиновая (C18<sup>5E,9Z,12Z</sup>) [238].

Согласно литературным данным и ранним нашим исследованиям, эти кислоты содержатся в маслах семян льна, огуречной травы, кедрового ореха, водосбора.

В ряде работ при анализе метиловых эфиров жирных кислот масла кедровых орехов методом ГЖХ не делаются однозначные выводы о строении найденной октадекатриеновой кислоты [239], либо ошибочно приписывается ей иное строение [240], в некоторых случаях даже гибридные методы анализа не дают достоверный результат [241] (ГЖХ метода определения метиловых эфиров и ЯМР-спектрометрии исходного масла был сделан вывод о присутствии C18<sup>6Z,9Z,12Z</sup> кислоты с небольшими добавками и C18<sup>5Z,9Z,12Z</sup> и C18<sup>9Z,12Z,15Z</sup> кислот). Ранее д. х. н. Дейнекой В.И. был проведен скрининг ТАГ состава масел большого числа видов хвойных растений [242] методом ОФ ВЭЖХ, который показал присутствие в маслах именно (C18<sup>5Z,9Z,12Z</sup>) кислоты.

Исходя из противоречивых литературных данных по содержанию пинолеиновой кислоты или возможное появление новых гибридных сортов кедровых орехов, решили сопоставить данные по двум хроматографическим методам: ГЖХ-МС определение метиловых эфиров ТАГ масел и ОФ ВЭЖХ исходных ТАГ.

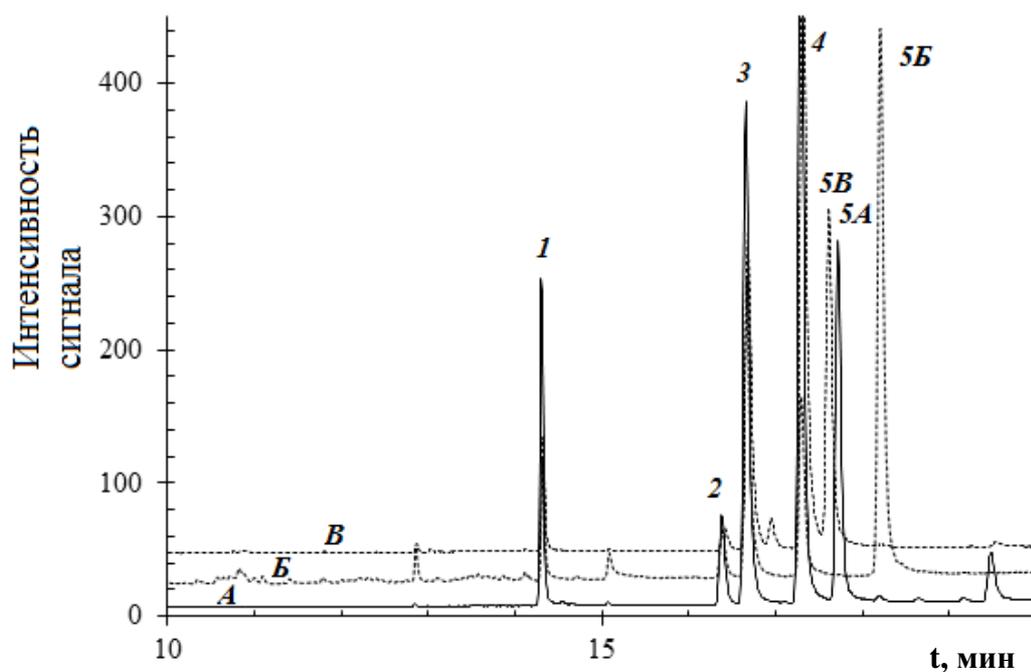


Рис.3.32. Хроматограмма метиловых эфиров в гексане приготовленных по ГОСТ 31665-2012; Состав масел: А – семян бораго, Б – семян льна, В - кедрового ореха. Параметры хроматографирования указаны в Главе 2.

Из полученных данных видно, что метиловый эфир  $\alpha$ -линоленовой кислоты имеет максимальное удерживание среди четырех октадекатриеновых кислот. Время удерживания достоверно отличается от времени удерживания метиловых эфиров других изомеров, рис. 3.32 (пик 5 Б). Время выхода трех других октадекатриеновых кислот довольно близко и при довольно высоких концентрациях аналитов в смеси практически неразделимо табл.3.20. Однако в разбавленных растворах удается разделить метиловые эфиры  $\gamma$ -линоленовой и смеси линоленовой колумбиновой кислот, при данных хроматографических условиях (рис. 3.32, 5В, 5А). Незначительное различие в параметрах удерживание *цис*-, *транс*-изомеров, в положение 5, не позволяет их поделить на данной капиллярной колонке, возможно, это осуществимо на колонках длиной от 60 м.

Таблица 3.20

Времена удерживания метиловых эфиров высших жирных кислот четырех масел

	Название кислоты	Структура	ЭУЧ*	Времена удерживания метиловых эфиров жирных кислот, $t_R$ , ( $\pm 0.02$ мин) для масел:			
				Семян льна	Семян бораго	Кедрового ореха	Семян аквилегии
1	Пальмитиновая	C16:0	16	14.32	14.30	14.33	14.32
2	Стеариновая	C18:0	18	16.39	16.38	16.41	16.40
3	Олеиновая	C18:1 <sup>9Z</sup>	18.16	16.66	16.66	16.68	16.68
4	Линолевая	C18:2 <sup>9Z12Z</sup>	18.68	17.29	17.29	17.32	17.31
5	$\alpha$ -Линоленовая	C18:3 <sup>9Z12Z15Z</sup>	19.37	18.21			
6	$\gamma$ -Линоленовая	C18:3 <sup>6Z9Z12Z</sup>	19.01		17.22		
7	Пиноленовая	C18:3 <sup>5Z9Z12Z</sup>	18.91			17.61	
8	Колумбиновая	C18:3 <sup>5E9Z12Z</sup>	18.96				17.64

При анализе ТАГ методом ОФ ВЭЖХ, по сравнению с определением метиловых эфиров методом ГЖХ, возрастает число возможных комбинаций для ТАГ, например, при наличии четырех радикалов жирных кислот в составе ТАГ возможные варианты их комбинации, без учета стехиометрического расположения, комбинация равна 20, наличие 5 радикалов дает уже 35 комбинаций ТАГ, рис.3.33.

Наиболее простой хроматографический профиль можно получить для масла семян аквилегии, табл. 3.21, состав ТАГ которого легко расшифровывается использованием инкрементного подхода [243], по которому выполняется простое уравнение:

$$\lg k(ABY) - \lg k(ABX) = \Delta(X \rightarrow Y), \quad (3.20)$$

«где АВУ и АВХ – ТАГ, содержащие радикалы двух попарно одинаковых кислот, и происходит замена радикалов третьей кислоты (Х на У). При этом инкремент  $\Delta(X \rightarrow Y)$  в первом приближении не зависит от типа остальных радикалов.

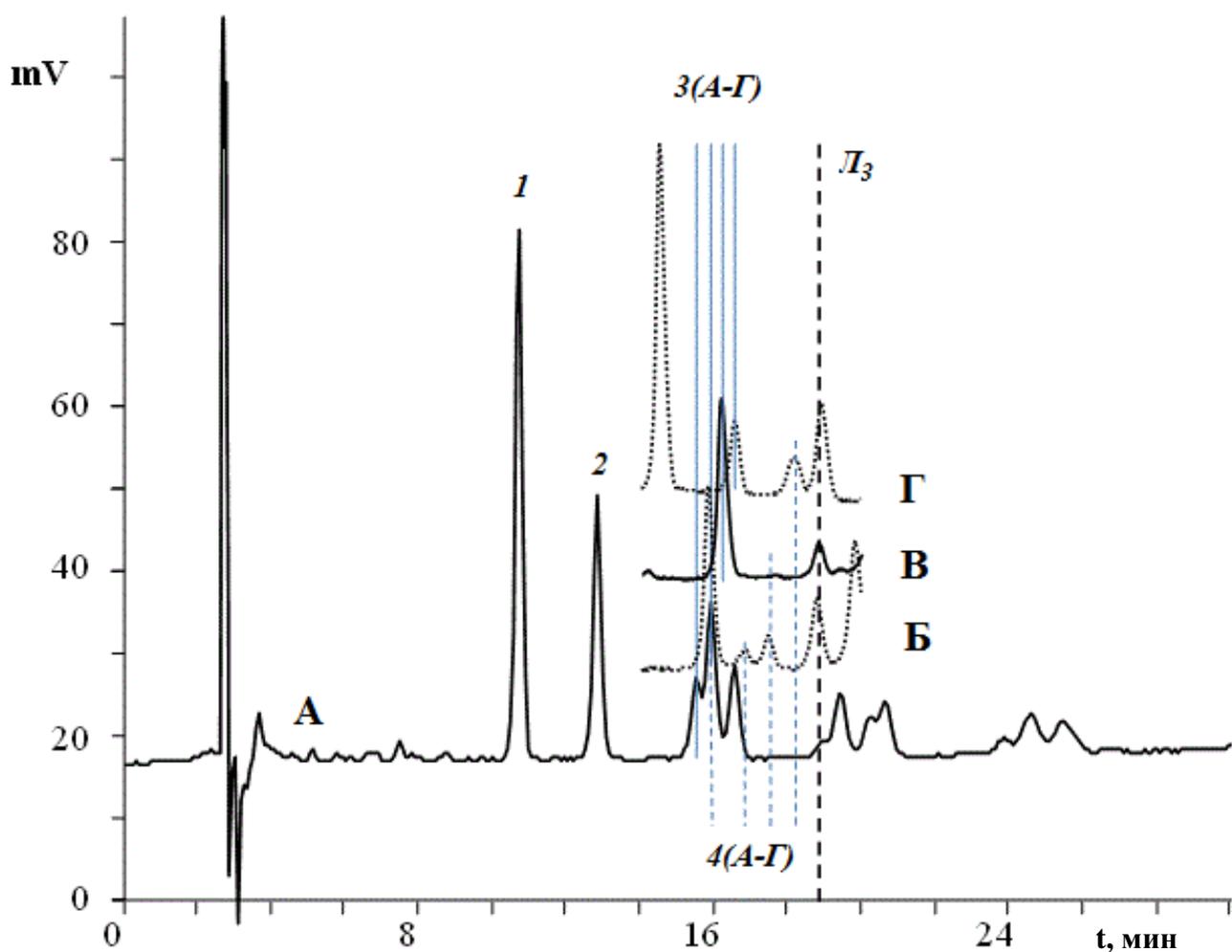


Рис. 3.33. Сопоставление удерживания ТАГ  $LnLn_2$  (3) и  $Ln_2O$  (4) в четырех маслах: А – льняное, Б – семян бораго, В – кедровых орехов, Г – семян аквилегии Колонка: 250×4 мм Диасфер 110-С18, 5 мкм, температура 30 °С, подвижная фаза 40 об. % ацетонитрила, 60 об. % ацетона, 1 мл/мин. Отнесение пиков – в табл.3.20.

Для остальных трех масел получены несколько более сложные хроматограммы, содержащие большее количество ТАГ с большим удерживанием, кроме того, далеко не во всех из них обнаруживаются те же типы ТАГ, что и в масле аквилегии. Так, на хроматограмме масла семян бораго компонент  $Ln_3$  среди минорных пиков может быть найден скорее по инкрементному подходу, чем напрямую» [244], рис.3.34.

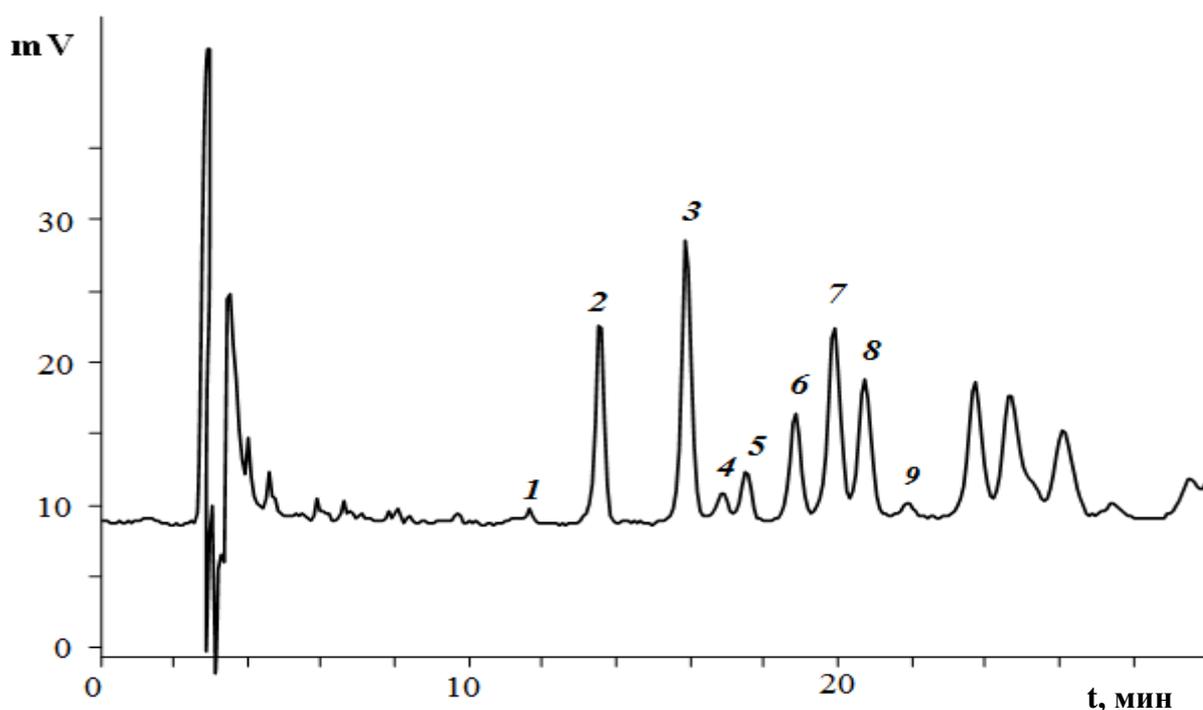


Рис.3.34 Хроматограмма триацилглицеринов масла семян бораго

Колонка: 250×4 мм Диасфер 110-С18, 5 мкм, температура 30°C, подвижная фаза 40 об. % ацетонитрила, 60 об. % ацетона, 1 мл/мин. Отнесение пиков – в табл.3.20

В масле кедрового ореха можно отметить полное отсутствие триленолената, даже ТАГ состава диленоленат-линолеат не превышает значение в 1%. При этом удерживание всех ТАГ, содержащих  $\gamma$ -линоленовую кислоту, существенно меньше, чем удерживание аналогичных ТАГ с колумбиновой кислотой, но чуть больше, чем ТАГ с  $\alpha$ -линолевой кислотой. Время удерживания однотипных ТАГ с пиноленовой кислотой меньше, чем с колумбиновой, и различие в их удерживании является наименьшим, но достаточным для их дифференциации, табл.3.20.

На основании полученных результатов можно сделать выводы о том, что разделение смеси трех изомеров С18:3 кислот методом ГЖХ возможно при тщательном контроле времен удерживания метиловых эфиров жирных октадекатриеновых кислот, даже при совместном присутствии, а разделение

смеси эфиров пиноленовой и колумбиновой кислот, при данных хроматографических условиях, не представляется возможным.

Таблица 3.21.

Параметры удерживания ТАГ масла семян аквилегии в подвижной фазе 40 об. % ацетонитрила и 60 об. % ацетона

	Вид ТАГ	t <sub>R</sub> , мин	lgk(i)	Инкременты для замен радикалов:			
				Δ(Л <sub>Н</sub> →Л)	Δ(Л→О)	Δ(О→П)	Δ(П→С)
1	Л <sub>Н3</sub> *	12.95	0.524				
2	Л <sub>Н2Л</sub>	14.60	0.591	0.067			
3	Л <sub>НЛ2</sub>	16.56	0.659	0.068			
4	Л <sub>Н2О</sub>	18.20	0.708		0.117		
5	Л <sub>Н2П</sub>	18.93	0.729			0.020	
6	Л <sub>3</sub> **	18.81	0.725	0.067			
7	Л <sub>НЛО</sub>	20.82	0.777	0.069	0.118		
8	Л <sub>НЛП</sub>	21.71	0.798			0.021	
9	Л <sub>Н2С</sub>	23.76	0.843				0.115
10	Л <sub>НО2</sub>	26.43	0.896		0.119		
11	Л <sub>НОП</sub>	27.46	0.915			0.019	
Среднее значение:				0.068±0.001	0.118±0.001	0.020±0.001	

\* Л<sub>Н</sub> - 5E,9Z,12Z-октадекатриеновая (колумбиновая) кислота, \*\* - расчетное значение

В случае ОФ ВЭЖХ «селективность разделения ТАГ, содержащих радикалы четырех изомерных октадекатриеновых кислот, достаточна для их дифференциации. При этом, разумеется, с ростом числа радикалов таких кислот в ТАГ различие в удерживании однотипных ТАГ увеличивается, рис.3.33. При использовании данного метода и *цис-транс*-изомеризация (на примере перехода от пиноленовой к колумбиновой кислотам) более заметно сказывается на удерживании соединений по сравнению с определением метиловых эфиров жирных кислот методом ГЖХ» [244].

Сопоставление удерживания ТАГ четырех изомерных октадекатриеновых  
кислот

№		t <sub>R</sub> , мин ТАГ с изомерными кислотами:			
		α-линоленовой	γ-линоленовой	пиноленовой	колумбиновой
1	ЛН <sub>3</sub>	10.67	11.60	12.36	12.95
2	ЛН <sub>2</sub> Л	12.80	13.51	14.15	14.60
3	ЛНЛ <sub>2</sub>	15.50	15.87	16.28	16.56
	Δ(ЛН→Л)*	0.105	0.088	0.076	0.068

### 3.2.5 Масла с радикалами эпокси- и гидрокси- группами в ТАГ

При исследовании масел, содержащих эпокси- и гидрокси- группы в составе радикалов ТАГ, мы остановились на двух маслах: касторовом и на масле, выделенном из семян диморфотеки.

#### 3.2.5.1 Касторовое масло

При исследовании касторового масла при помощи ВЭЖХ была получена следующая хроматограмма, рис. 3.35. При помощи инкрементного подхода и метода относительного анализа удерживания были расшифрованы основные пики, содержащиеся в касторовом масле. Если наименьшее время удерживания (2.87 мин) отнести к тририциноату (1), то пики основных примесей должны соответствовать,

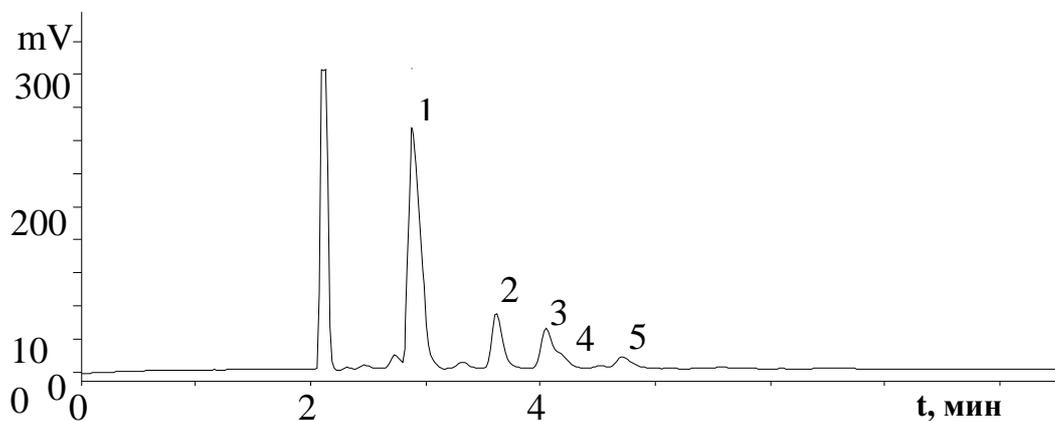


Рис.3.35 Разделение триглицеридов касторового масла,  
Состав подвижной фазы 40 об. % ацетонитрила и 60 об. % ацетона.

дирициноат-линолеату (2) (3.61 мин) и дирициноат-олеату (3) (4.04 мин), что подтверждается наличием обязательного пальмитинового аналога, проявляющегося только в этом случае характерным «плечом» дирицинат-пальмитат (4), и, наконец, со временем 4.71 мин должен элюироваться дирициноат-стеарат (5). Для подтверждения полученного вывода было исследовано удерживание ТАГ смеси касторового и подсолнечного масел и выполнен расчет по исправленному удерживанию пиков (коррекция по срединам пиков), рис. 3.36.

Замена в рассматриваемых образцах рицинолевой кислоты на линолевую, олеиновую, пальмитиновую и стеариновую подтверждается равенством соответствующих инкрементов для сопоставляемых масел – касторового и подсолнечного, для которого идентификация ТАГ многократно подтверждена различными методами, таблица 3.23.

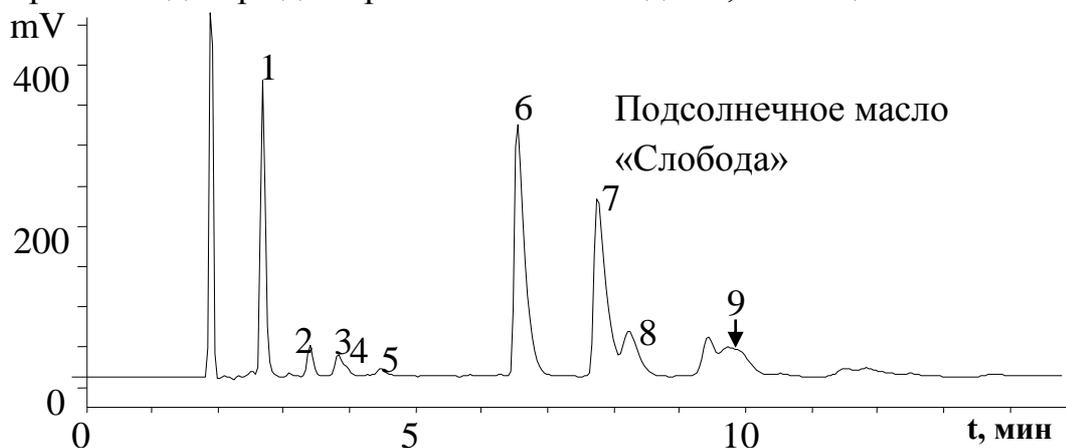


Рис.3.36 Хроматограмма смеси касторового и подсолнечного масел

## Инкрементные соотношения для касторового и подсолнечного масел

№	Состав	$t_R$ , мин	$lgk$	$\Delta(X \rightarrow L)$	$\Delta(L \rightarrow O)$	$\Delta(O \rightarrow П)$	$\Delta(П \rightarrow C)$
Масло касторовое							
1	$X_3$	2.91	-0.342	0.242			
2	$X_2L$	3.62	-0.092	0.250			
3	$X_2O$	4.04	0.009		0.100		
4	$X_2П$	4.18	0.037			0.029	
5	$X_2C$	4.67	0.125				0.088
Масло подсолнечное							
6	$L_3$	6.85	0.385				
7	$L_2O$	8.07	0.482		0.097		
8	$L_2П$	8.47	0.510			0.028	
9	$L_2C$	9.95	0.599				0.089

В подтверждение предложенного отнесения отметим, что инкремент, соответствующий замене радикала рицинолевой кислоты на радикал линолевой кислоты,  $\Delta(X \rightarrow L) = 0.250$ , близок к трети «расстояния» между первым пиком и пиком трилинолеата (0.242). Это соответствует сохранению инкрементной разности для случая появления гидроксильных групп в составе радикалов жирной кислоты. Последнее очевидно, например, потому, что при наличии таких радикалов возможно образование внутримолекулярных водородных связей (при наличии более двух радикалов с гидроксигруппами).

### 3.2.5.2 Масло семян диморфотеки

Кроме касторового масла хорошим источником масла с радикалами, содержащими гидроксильные группы, является масло семян диморфотеки. Строение радикалов этих *гидрокси*-кислот заметно различаются, рис.3.37:

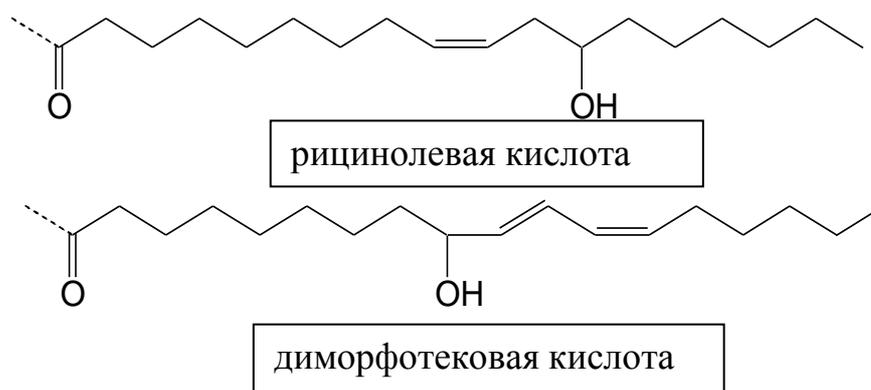


Рис.3.37 Структура радикалов *гидрокси-кислот*

Диморфотековая кислота более ненасыщенная по сравнению с рицинолевой и гидроксильная группа, ближе расположена к гидрофильному концу радикала. Поскольку в обращено-фазовой ВЭЖХ положение ОН-группы не очень существенно, то следует ожидать увеличения инкремента  $\Delta(X \rightarrow Л)$  вследствие добавления ненасыщенной связи.

Действительно, основной пик масла имел время удерживания меньше, чем в случае касторового масла (2.65 мин). При этом появляются продукты замены одного радикала X на линолевую, олеиновую (+пальмитиновую – что видно по уширению пика) и стеариновую. Заметны также и другие минорные компоненты масла, рис.3.38. Для хроматограммы смеси двух масел – диморфотекового и подсолнечного - расчетные параметры удерживания однозначно свидетельствуют в пользу предложенного отнесения пиков.

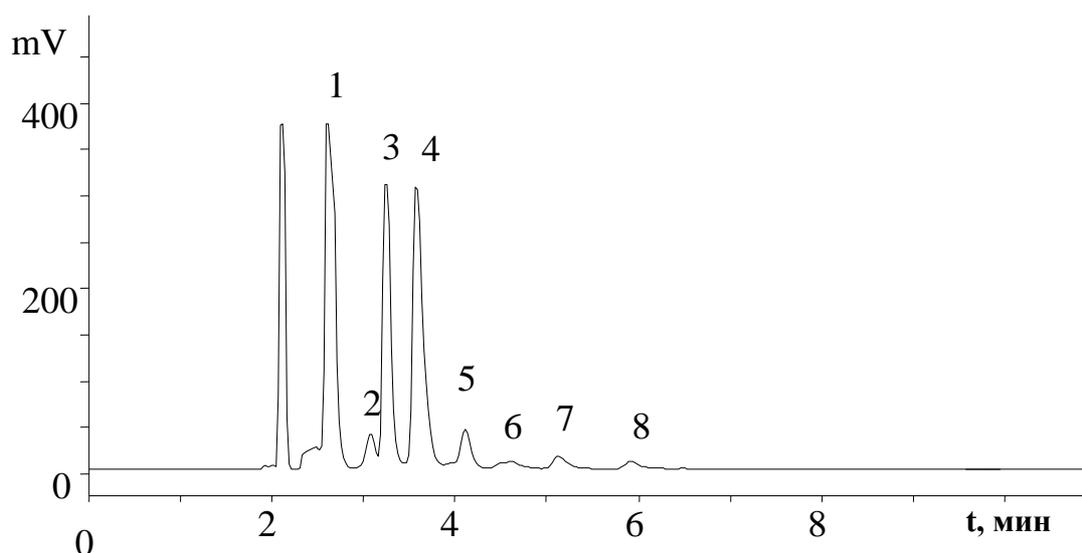


Рис.3.38 Разделение ТАГ масла семян диморфотеки

При анализе ТАГ масла диморфотеки доля гидрокси- кислоты заметно меньше, чем в случае касторового масла, поэтому на хроматограмме детектируются и другие комбинации ТАГ, содержащие радикалы диморфотековой кислоты, таблица 3.24.

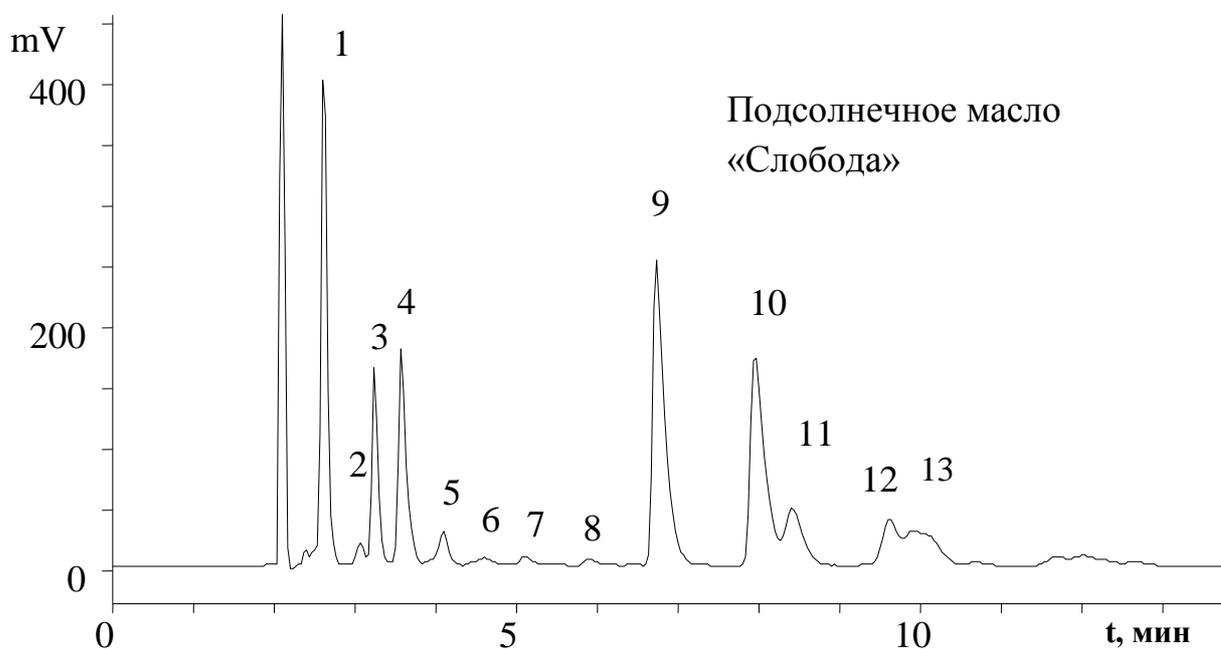


Рис.3.39 Хроматограмма смеси диморфотекового и подсолнечного масел  
Колонка: 250×4 мм, Диасфер-110-С18, 5 мкм: подвижная фаза 20 об % ацетонитрила в ацетоне, 1 мл/мин. Детектор – рефрактометрический.

Инкремент  $\Delta(X \rightarrow Л)$  в случае диморфотековой кислоты, рис.3.39, 0.294 существенно больше, чем для рицинолевой (0.242), что примерно вдвое меньше инкремента, соответствующего добавлению неопределенной связи (для переходов  $C \rightarrow O$  или  $O \rightarrow Л$ ), что, возможно, связано с изменением положения гидроксильной группы.

Таблица 3.24

Инкременты ТАГ диморфотекового и подсолнечного масел

№	Состав ТАГ	$t_R$ , мин	$lgk$	$\Delta(X \rightarrow Л)$	$\Delta(Л \rightarrow O)$	$\Delta(O \rightarrow C)$
Масло семян диморфотеки						
1	2	3	4	5	6	7
1	X <sub>3</sub>	2.63	-0.502	0.294		
2	RX	3.07	-0.272			
3	X <sub>2</sub> Л	3.24	-0.208	0.294		
4	X <sub>2</sub> O	3.57	-0.105		0.102	
5	X <sub>2</sub> C	4.09	0.0191			0.124
6	XЛ <sub>2</sub>	4.45	0.088	0.296		
7	XОЛ	5.1	0.190		0.102	
8	XO <sub>2</sub>	5.9	0.290		0.100	
Масло подсолнечное						
1	2	3	4	5	6	7
9	Л <sub>3</sub>	6.81	0.381			
10	Л <sub>2</sub> O	8.04	0.480		0.099	
11	Л <sub>2</sub> П	8.43	0.507			
12	ЛО <sub>2</sub>	9.61	0.580		0.100	
13	Л <sub>2</sub> C	9.97	0.600			0.120

Для построения карты разделения ТАГ по группам неопределенности в радикалах использовали литературные данные и некоторые наши более

ранние исследования. В качестве объектов исследования отобрали масло (или семена растений, содержащих масло): семена дельфиниума, настурции, нигеллы, льняное масло, семена лаватеры [231], семена энотеры двухлетней [232] и осота полевого [34], рис.3,40.

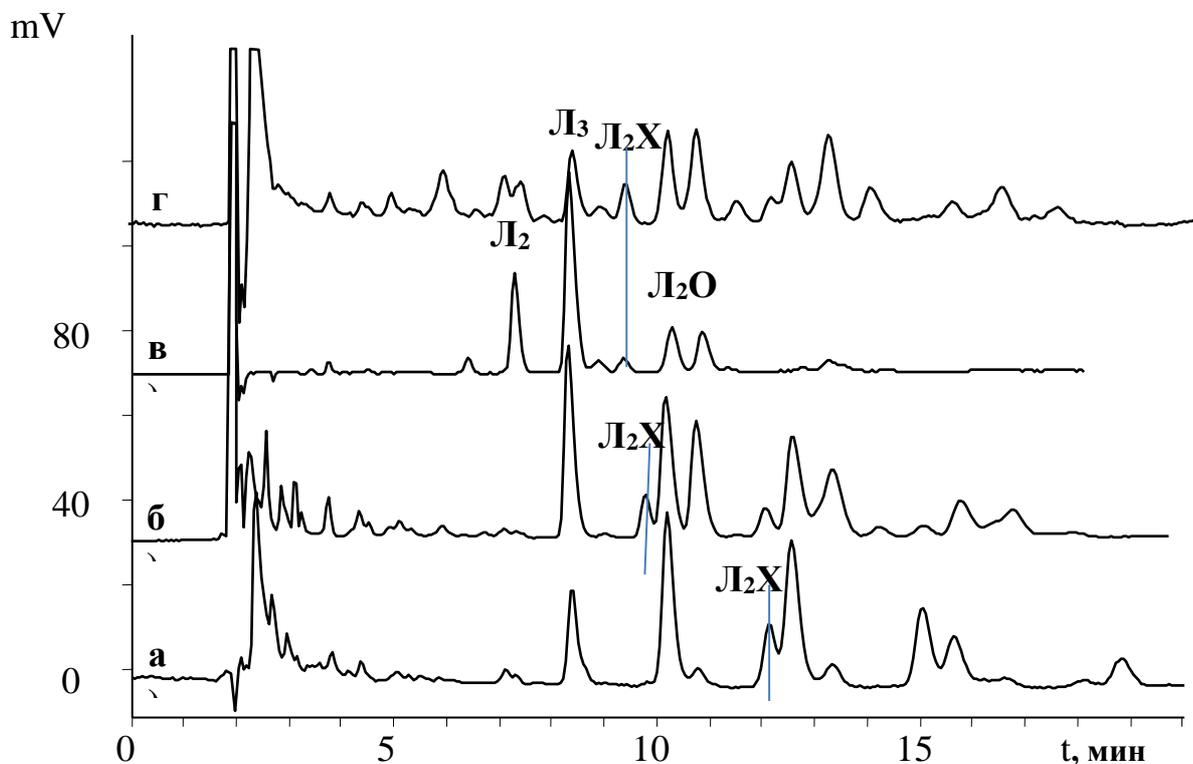


Рис.3.40. Разделение ТАГ масел семян дельфиниума (а), нигеллы (б), энотеры двухлетней (в), лаватеры (г).

Колонка: 250×4 мм, Диасфер-110-С18, 5 мкм: подвижная фаза 20 об % ацетонитрила в ацетоне, 1 мл/мин. Детектор – рефрактометрический.

При построении прямых по МОАУ в качестве реперного вещества использовали логарифм фактора удерживания трилинолеата. Все масла были проанализированы в трех составах ПФ – 5, 10 до 20 об. % ацетонитрила в ацетоне. Для упрощения рисунка и наглядности использовали данные логарифма фактора удерживания для ТАГ состава  $L_2X$ , где X переменный радикал жирной кислоты с разным числом двойных связей или функциональных групп.

После аппроксимаций линий тренда на гипотетически предельно сильные элюенты отмечаем области, где на гипотетической прямой,

параллельной оси Y, образуются области, в которых сходятся линии трендов для гомологов по числу двойных связей в ТАГ, рис. 3.41.

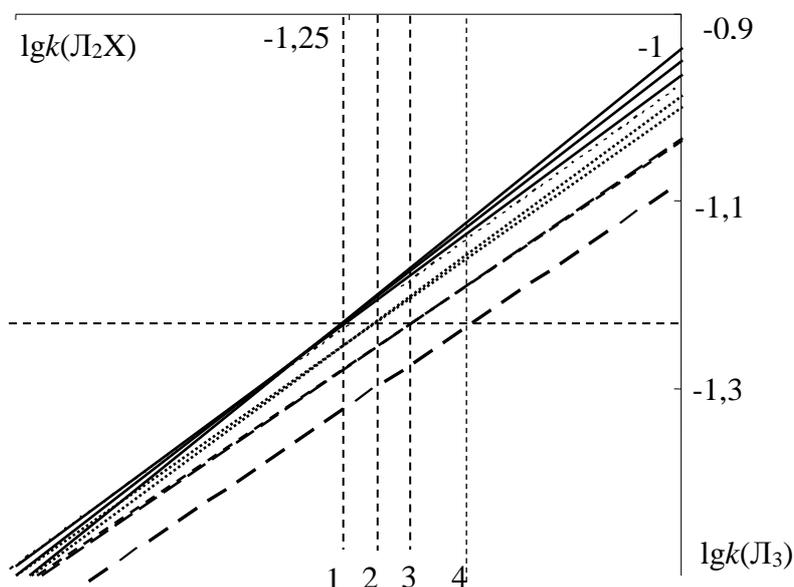


Рис.3.41. Удерживание ТАГ  $L_2X$  относительно  $L_3$

Радикалы X: 1-моноеновых кислот (в том числе и мальвовой); 2- диеновых; 3- триеновых кислот; 4 – эпокси- кислоты.

Тенденция изменения абсциссы точки конвергенции пропорциональна числу двойных связей в радикале, что позволяет предложить очевидный хроматографический метод установления числа двойных связей в радикалах жирный кислот – по смещению слева направо (моноеновые, диеновые, триеновые). Отметим, что для циклопропеновой кислоты (*мальвовой* - октадека-8,9-метилен-8-еновой) линия тренда, соответствующего триацилглицерина также проходит через точку конвергенции для моноеновых радикалов X. Если посмотреть на точку конвергенции для эпокси-кислоты, то она не пересекает ни одну из областей (интенсивная пунктирная линия на рис.3,41 №4).

### 3.3. Определение фальсификатов масел

#### 3.3.1. Исследование подсолнечного масла с добавками оливкового

После многолетних фронтальных исследований подсолнечных масел различных производителей (включая масло из Аргентины), были получены результаты, свидетельствующие об их очень близком жирно-кислотном составе. В свою очередь, оливковое масло также имеет постоянный состав, в котором основные компоненты  $O_3$ ,  $O_2П$ ,  $ЛО_2$ ,  $ЛОП$  и  $O_2С$ , есть еще небольшая доля ТАГ  $Л_2О$  и  $Л_2П$ . Таким образом, при добавлении оливкового масла в подсолнечное в первую очередь должно возрасть содержание следующих ТАГ:  $O_3$ ,  $O_2П$ ,  $ЛО_2$ ,  $ЛОП$  рис.3.42. Это легко рассчитать по площадям основных компонентов или их соотношению, что невозможно при определении метиловых эфиров состава масла методом ГЖХ.

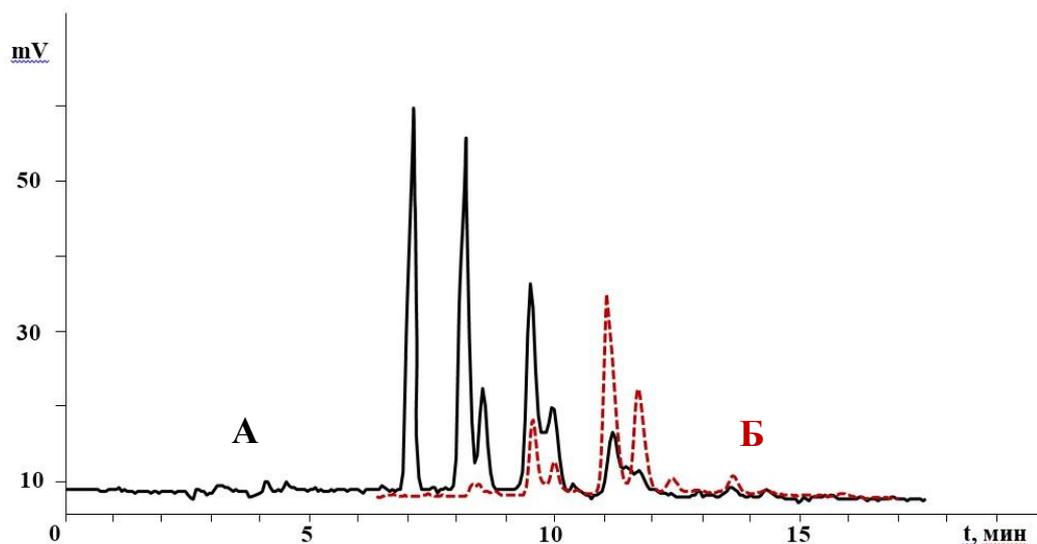


Рис.3.42. Хроматограммы подсолнечного масла (А) и оливкового (Б) масла

К настоящему времени ситуация несколько изменилась. На рис. 3.43, приведены хроматограммы «продажного» подсолнечного масла с добавками оливкового (1) и масла высокоолеиновых семян подсолнечника (2). Таким образом, выведены даже такие сорта подсолнечника, в котором биосинтез олеиновой кислоты сопоставим с оливковым маслом.

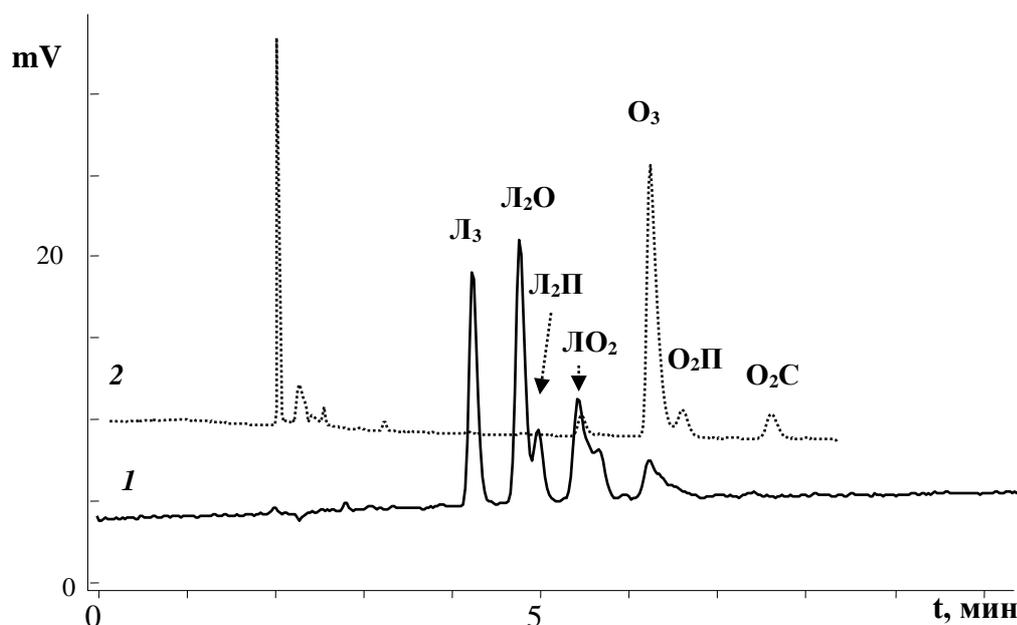


Рис.3.43. Хроматограммы «продажного» подсолнечного масла с добавками оливкового (1) и масло высокоолеиновых семян подсолнечника (2)

На представленных на рис.3.44 хроматограммах представлены хроматографические профили некоторых торговых марок подсолнечного масла. Во всех случаях основной триглицерин образован радикалами линолевой кислоты ( $L_3$ ). Следом за ним идет второй основной пик триглицерида, образованного двумя радикалами линолевой и одним - олеиновой кислот,  $L_2O$ . Отметим, что относительная площадь этого пика должна втрое превышать долю олеиновой кислоты в масле при статистическом распределении радикалов по видам триглицеринов. Наконец третий пик относится к триглицериду, в котором место радикала олеиновой кислоты занял радикал пальмитиновой кислоты,  $L_2П$ .

Если в растении возрастает интенсивность биосинтеза олеиновой кислоты, то при статистическом распределении радикалов возрастет в первую очередь относительная площадь именно триглицерида  $L_2O$ , в то время как при добавлении оливкового масла соотношение площадей пиков  $L_3$  и  $L_2O$  не должно измениться, поскольку компонента  $L_2O$  в оливковом масле практически нет. С другой стороны, увеличение доли олеиновой,

пальмитиновой кислоты в традиционном подсолнечном масле можно добиться вымораживанием масла, причем некоторые производители указывают на этикетке, что масло подвергалось вымораживанию.

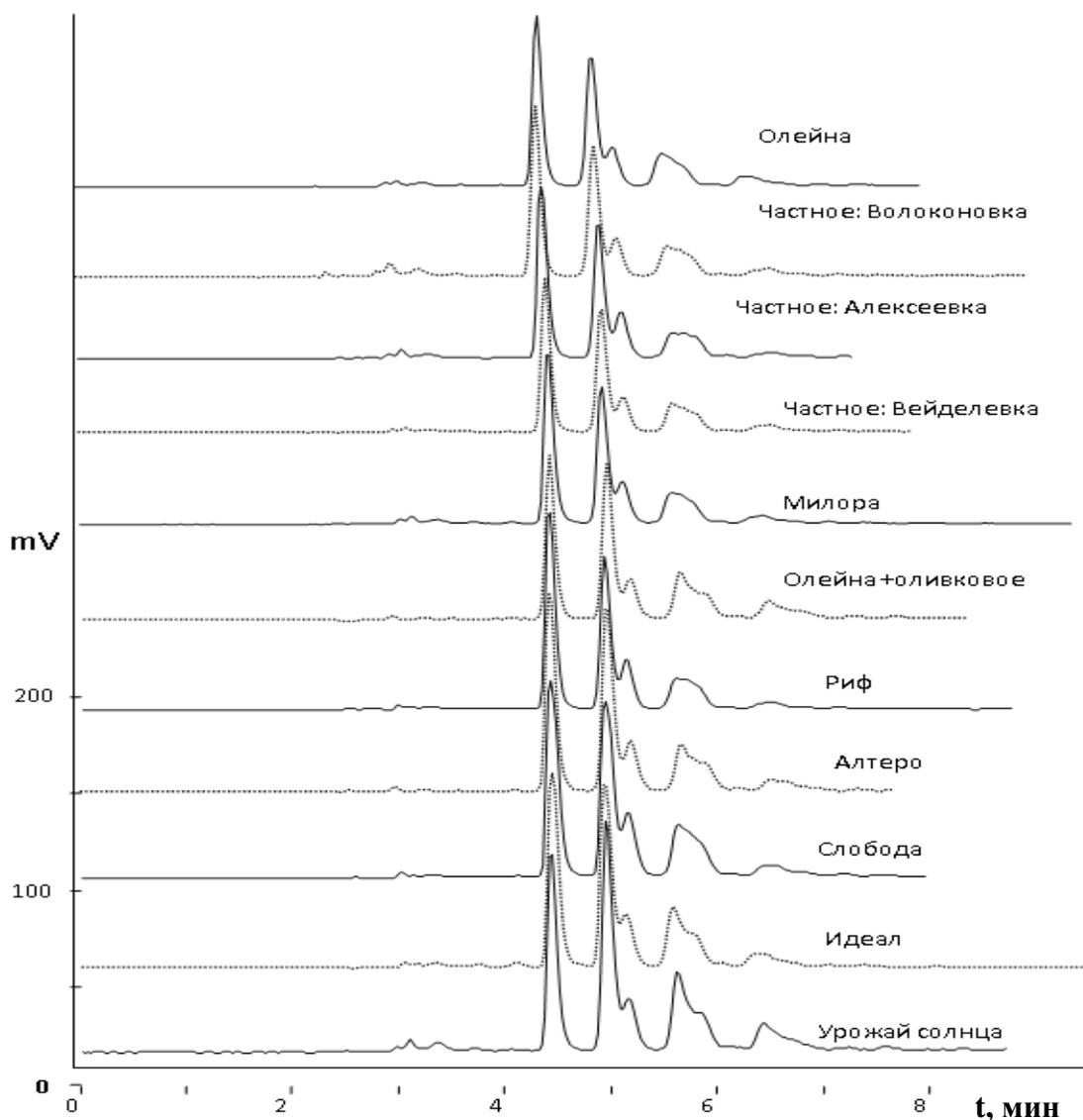


Рис.3.44. Хроматограммы подсолнечных масел некоторых торговых марок.

Поэтому можно твердо утверждать, что добавки оливкового масла в подсолнечные масла «Урожай солнца» и «Олейна» если и имеют место, то только в количестве, не превышающей ошибку определения триглицеридов - 2-4 %, рис.3.44.

Тем не менее, подсолнечное масло остается самым распространённым растительным маслом в Европе, с довольно постоянным составом и

невысокой ценой. Таким образом, это позволяет использовать подсолнечное масло в качестве дешевой смеси стандартных соединений для расчета базовых зависимостей (инкрементов) замены Л на О, О на П и П на С.

### 3.3.2 Масло мякоти облепихи

Облепиховое масло является одним из дорогих и ценных масел. Основная масса масла накапливается в мякоти плодов - до 80 %. [229]; в мякоти также накапливается большое количество каротиноидов и витаминов [228, 233]. В качестве альтернативы облепиховому маслу во времена его острого дефицита разработали препарата АЕКОЛ [247]. В настоящее время на прилавках многих аптек можно обнаружить сразу десяток марок «Облепихового масла» различных производителей. Соответственно, проблема стандартизации продукции и обнаружения фальсификации становится достаточно актуальной [245].

Плоды облепихи шести сортов были собраны в конце августа 2006 г в Ботаническом саду БелГУ. Коммерческие образцы облепиховых масел были приобретены в аптеках города Белгорода и Москвы.

Термином «инкремент» называется разность логарифмов факторов удерживания двух ТАГ, состав которых различается только одним радикалом кислоты, уравнение 3.21:

$$\Delta(L \rightarrow O) = \lg k(L_2O) - \lg k(L_3) = \lg k(ЛОП) - \lg k(L_2П). \dots\dots\dots(3.21)$$

Одной из характеристик масел, подлежащих контролю в настоящее время, является их жирнокислотный состав [247]. При переходе от анализа ЖКС методом ГЖХ метиловых эфиров к контролю ТАГ масел методом обращено-фазовой ВЭЖХ необходимо сопоставить ТАГ хроматографический профиль масел, которыми могут быть использованы для мацерации масла облепихи.

Одна из характерных черт масла мякоти плодов облепихи – присутствие в ТАГ радикалов пальмитолеиновой (9-*цис*-гексадеценовой, C16:1<sup>Δ9</sup>, *По*) и вакценовой (11-*цис*-октадекаеновой, C18:1<sup>Δ11</sup>) кислот. На долю пальмитолеиновой кислоты в масле мякоти приходится по разным источникам от 13 до 51% от суммы кислот [10-13, 32-34] с наиболее вероятным содержанием - в диапазоне 25 ÷ 30 %. В этом плане особо актуален метод анализа масел с использованием ЯМР [248], в котором не подразумеваются промежуточные стадии, в которых может искажаться достоверная информация о ТАГ. В качестве сравнения для идентификации пальмитолеиновой кислоты можно использовать масло авокадо или макадамии [232,233]. Используя ранее предложенную инкрементную модель, можно предложить формулу для нахождения инкремента 3.22:

$$\Delta(L \rightarrow По) = \Delta(O - L) - \Delta(C - П) = 0.101 - 0,092 = 0.009 \quad (3.22)$$

Таким образом, ТАГ, содержащие линолевую кислоту вместо пальмитолеиновой, будут элюироваться чуть раньше. Ввиду небольшой разности инкрементов можно наблюдать неполное разделение таких пиков, тогда эквивалентные ТАГ, в которых один радикал линолевой кислоты заменен на пальмитолеиновую, будут элюироваться в виде плеча, причем оно будет ближе, чем эквивалентное плечо замены олеиновой кислоты на пальмитиновую. На хроматограммах масел это предположение полностью подтверждается рис.3.45.

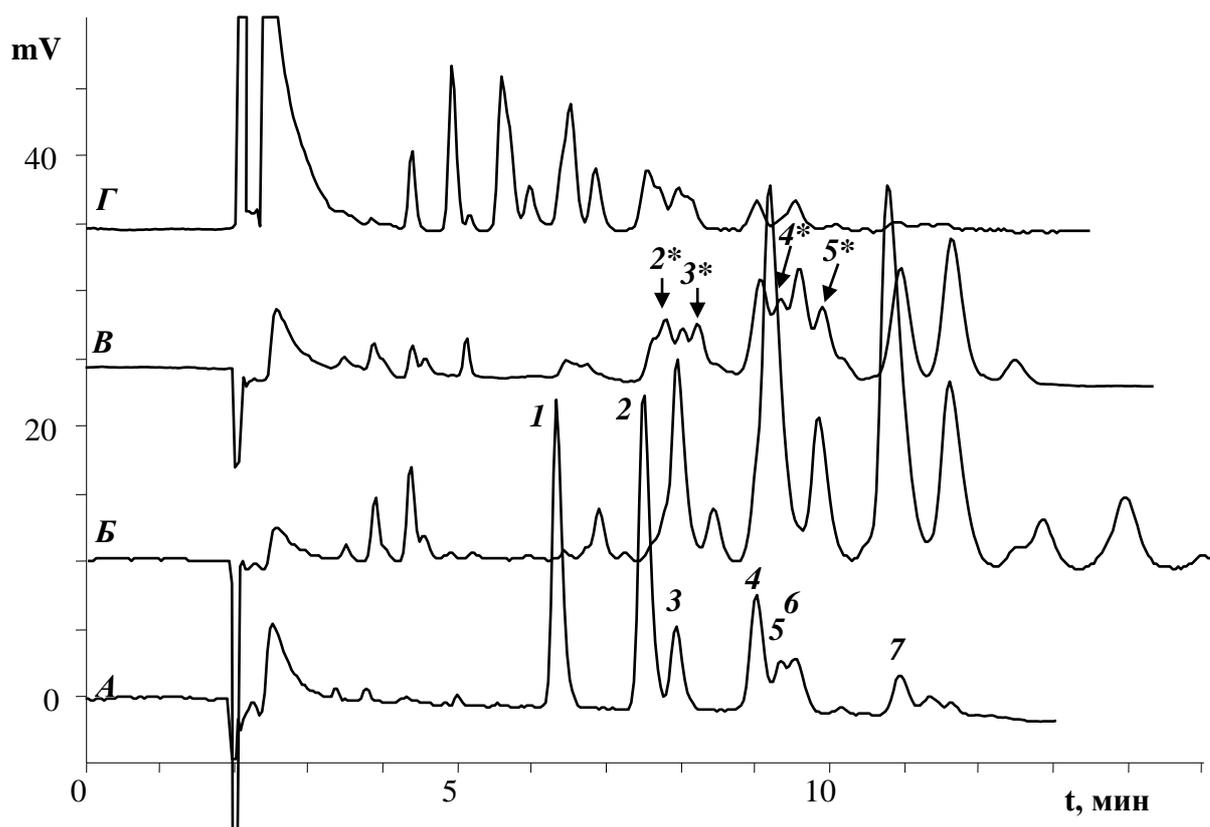


Рис.3.45. Хроматограммы растительных масел, использованных в качестве масел сравнения

*A* – подсолнечное масло, *Б* – масло макадамии; *В* – масло авокадо; *Г* – масло семян облепихи. Триглицериды: *1* – Л<sub>3</sub>, *2* – Л<sub>2</sub>О, *3* – Л<sub>2</sub>П, *4* – ЛО<sub>2</sub>, *5* – Л<sub>2</sub>С, *6* – ЛОП, *7* – О<sub>3</sub>, *2\** – ЛПоО, *3\** – ЛПоП, *4\** – ПоО<sub>2</sub>, *5\** – ПоОП. Подвижная фаза ацетонитрил – ацетон (10:90 об.), 1 мл/мин.

При наличии масла облепихи в экстракте появляется пара специфических пиков после триглицерина состава Л<sub>2</sub>П и группа пиков в диапазоне от ЛОП до О<sub>3</sub>. В фальсифицированных образцах этих пиков нет, рис.3.46.

В Приложении 4, рис. 2-6, приводятся хроматограммы метиловых эфиров масла фальсификата облепихи, натурального облепихового масла, масла авокадо и некоторые масс-спектры методом ГЖХ.

Для быстрого выполнения контроля облепихового масла используются условия, при которых не происходит полного разделения пиков ТАГ. При

желании степень разделения может быть увеличена использованием элюентов с большей объемной долей ацетонитрила (более 25 об. %) или тандема из двух колонок, подсоединенных последовательно; однако при этом теряется экспрессивность метода.

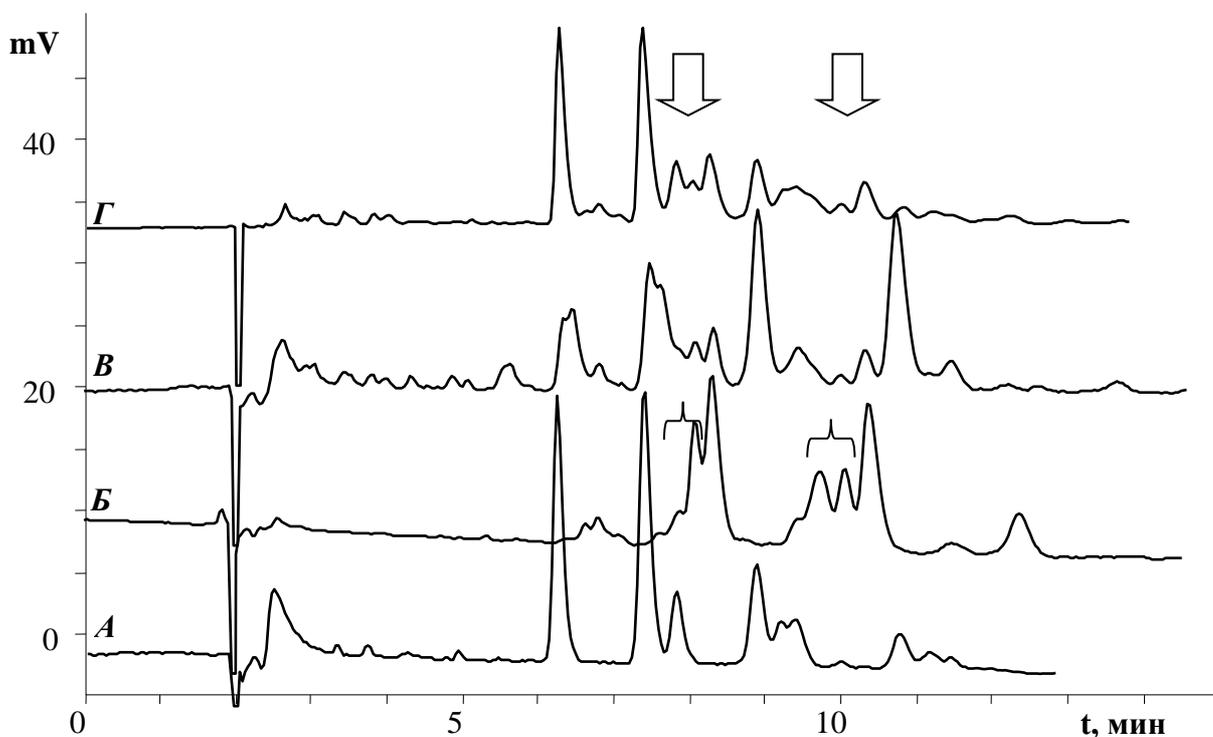


Рис.3.46. Хроматограммы облепиховых масел

*A* – подсолнечное масло, *B* – масло мякоти плодов облепихи сорта «Масличная»; *B* – “Облепиховое масло из плодов и листьев”, Катунь Олеум, РФ; *Г* – “Облепиховое масло”, ЗАО «Алтайвитамины», РФ. Подвижная фаза ацетонитрил – ацетон (10:90 об.), 1 мл/мин. Стрелкой и скобкой отмечены диагностические пики на хроматограмме смеси облепихового масла с маслом-экстрагентом.

Предложенный метод был применен к анализу покупных облепиховых масел. Хроматограммы масел мякоти плодов облепихи исследованных сортов практически не различались между собой, в то время как окраска плодов изменялась от желтой до оранжево-красной. Различие в хроматограммах покупных облепиховых масел существенно. В образцах

продукции ЗАО «Алтайвитамины» (на фоне масла линолево-олеинового типа) и «Катунь Олеум») на долю масла мякоти плодов облепихи приходилось 30-50 %; около 20 % - в продукции (ООО НПФ «Алтайский букет»), а в четырех образцах «Облепиховых масел» найдено лишь хорошего качества масло типа подсолнечного.

Таким образом, метод обращено-фазовой ВЭЖХ может быть использован для быстрого установления подлинности (или обнаружения фальсификации) облепиховых масел по триглицеридному составу с рефрактометрическим детектированием. Данный подход использовали при определении подлинности таких экзотических масел, как Ши и Таману. Наличие специфических кислот и нестатистическое распределение радикалов по ТАГ в маслах делает метод ОФ ВЭЖХ универсальным и референтным. Более подробно о анализе масла Таману и Ши сказано в статье «Обращенно-фазовая ВЭЖХ триацилглицеролов масел таману и ши» в журнале Масложировая промышленность, 2008. №1. С. 17-19.

### **3.3.3 Сливочное масло**

Во всем мире ускоренными темпами развиваются технологии создания новых масложировых смесей - заменителей молочного жира путем рафинации, фракционирования, каталитической переэтерификации, гидрогенизации, ферментативного катализа. Поэтому производство пищевых продуктов с использованием в рецептуре тропических жиров является актуальным направлением в некоторых отраслях пищевой промышленности [249]. Соблазн фальсификации сливочного масла этими жирами достаточно велик в связи с существенной разностью себестоимости продуктов. А также в связи с несовершенством методов контроля качества выпускаемой продукции со стороны потребителя.

Основная проблема установления фальсификации масел связана со сложностью и изменчивостью их составов. Газохроматографическое

определение жирнокислотного состава для установления фальсификации масла является официальным методом в России (ГОСТ 32261-2013), использование метода по умолчанию считается надежным и достоверным методом [250]. Однако, несмотря на то что в ряде случаев метод ГЖХ действительно незаменим, его достоверность и надежность в ряде случаев весьма проблематична. Другим методом определения фальсификации молока и молочных продуктов является ГОСТ 31979-2012 «Молоко и молочные продукты. Метод обнаружения растительных жиров в жировой фазе газожидкостной хроматографией стериннов» [251]. Однако этот метод эффективен только при фальсификации растительными маслами, а в случае с животными жирами и синтетическими смесями он неэффективен, к тому же метод довольно трудоемкий и продолжительный, около 3-6 часов занимает пробоподготовка и анализ.

Исследованные в данной работе масла были приобретены в магазинах городов Белгорода и Москвы. Для исследования образец массой  $200 \pm 25$  мг растворяли в 10 мл ацетона, перед вводом в хроматограф смесь отделяли от взвешенных нерастворимых веществ фильтрованием через мембранный фильтр, 0,45 мкм. ТАГ, содержащие радикалы только насыщенных жирных кислот, синтезировали из глицерина и трех бинарных смесей: каприновой (C10:0) и лауриновой (C12:0); лауриновой и миристиновой (C14:0); миристиновой и пальмитиновой (C16:0) кислот.

При исследовании было получено три принципиально различных типа хроматограмм, рис.3.47. Хроматограмма масла, содержащего заведомо молочные жиры (в этом случае исследовали масло приготовления из натурального коровьего молока кустарным способом) заметно отличалась от хроматограмм, типичных для ряда исследованных образцов торговых марок масел и маргарина.

Множество пиков на хроматограмме (подвижная фаза – чистый ацетон) коровьего масла (в данном случае под названием «коровье масло» подразумевается масло, полученное из коровьего молока, а не тип масла по

существующим стандартам) соответствует его сложному жирнокислотному и, следовательно, триглицеридному (более 47 пиков на хроматограмме) составу. На хроматограмме (Г, рис.3.47) нет полного разделения пиков, но это почти недостижимо даже для существенно более слабых элюентов (например, 30 % ацетонитрила в ацетоне, [249]), требующих в 5 - 10 раз больше времени на полную запись хроматограммы. Отметим, что в настоящее время в научной литературе все чаще используется метод «отпечатков пальцев», в котором нет необходимости использования большого числа стандартных веществ. Тогда необязательно и полное разделение пиков на хроматограммах – метод основан на прямом сравнении ТАГ профиля достоверных образцов с анализируемыми объектами.

Второй тип хроматограмм (В, рис.3.47) оказался принципиально одинаковым для некоторых продуктов, включая фальсификаты сливочного масла (на этикетке было указано соответствие продуктов требованиям ГОСТ 37-91), дешевого масла (под названием «масла к чаю») и даже для одного из исследованных маргаринов. Эти хроматограммы значительно проще хроматограмм коровьего масла и по типу напоминают хроматограмму пальмового масла с какими-то добавками.

Третий тип хроматограмм (Б, рис.3.47) принадлежал типичным маргаринам. На хроматограмме отчетливо виден пик трилинолеата (время удерживания около 4.5 мин) и пары «дилинолеат-олеат + дилинолеат-пальмитат» (время удерживания 4.9 – 5.2 мин) – основных компонентов ТАГ подсолнечного масла. За ними следуют уширенные пики, которые соответствуют насыщению от 1 до 4 двойных связей в молекулах, указанных ТАГ.

Поскольку, при гидрировании подсолнечного масла возможно насыщение двойных связей в различных положениях радикала линолевой (9-*цис*,12-*цис*-октадекадиеновой), а также изомеризация, то образуется целая

группа ТАГ с близкой хроматографической подвижностью, и как следствие – образование уширенных пиков суммы ТАГ.

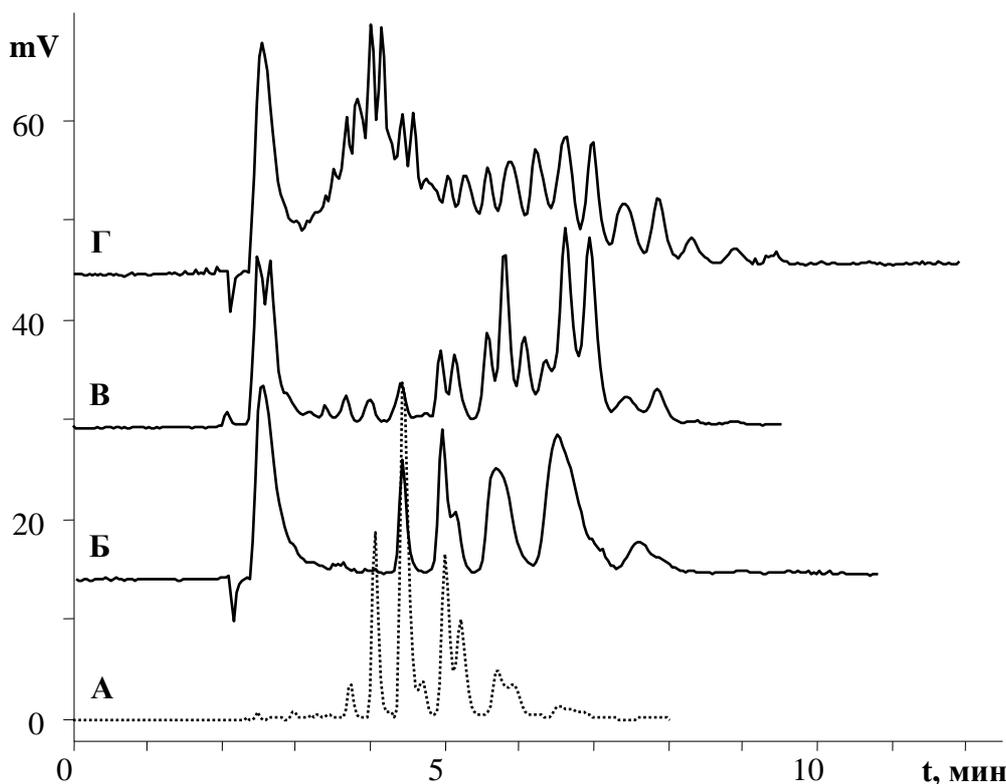


Рис.3.47. Типы хроматограмм некоторых масел и маргарина

Подвижная фаза: 100 % ацетон, 1 мл/мин. А - соевое масло; Б – маргарин; В – фальсификат коровьего масла; Г - масло коровье домашнего приготовления

Отметим, что ни в одном из исследованных в данной работе масел не была обнаружена фальсификация молочных жиров гидрированным подсолнечным маслом. На рис.3.47-А приведена (для сравнения) хроматограмма соевого масла.

В настоящей работе нами были исследованы масла производства областей: Белгородской, Курской, Воронежской, Вологодской и Московской, а также продукция, на этикетках которой в качестве производителя указывались фирмы Финляндии и Дании, рис.3.48.

Для использования метода «отпечатки пальцев» требуется знать естественно допустимые вариации составов масел и вида хроматограмм. Строго говоря, такая работа может быть выполнена при длительном эксперименте при наличии возможности исследования заведомо не

фальсифицированных масел на основе коровьего молока различных сезонов и (государств) производителей.

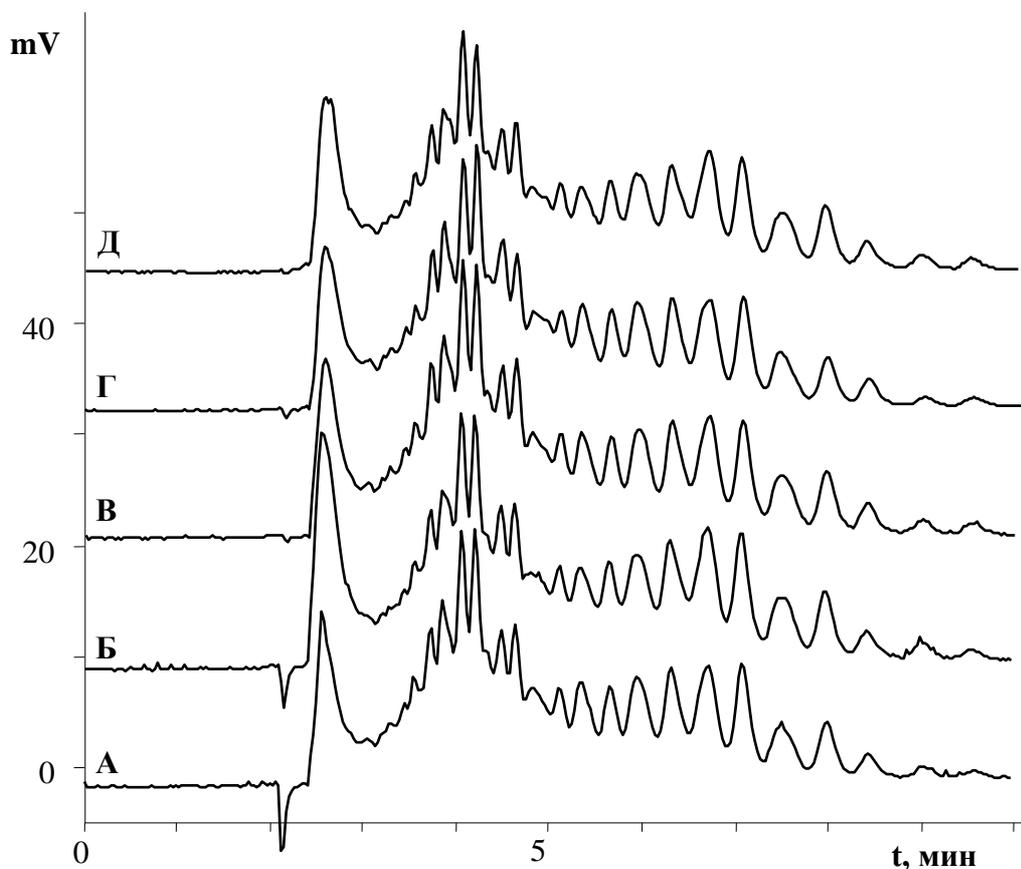


Рис.3.48. Хроматограммы нефальсифицированных масел на основе молочного жира

Подвижная фаза: 100 % ацетон, 1 мл/мин. Масла производства регионов: А и Б – Белгородского, В – Финляндии; Г – Московского, Д – домашнего изготовления.

В работе анализировались в основном относительно дорогостоящие масла (не менее 100-120 рублей за 250 г). При этом ни в одном из случаев (кроме случаев с грубой фальсификацией) не было обнаружено серьезных различий между ними и маслом домашнего приготовления. Хроматограммы некоторых масел с откровенной фальсификацией (хроматограммы типа В рис. 3.47) представлены на рис.3.49; подобный вид имела также хроматограмма одного из продукта под названием «маргарин» [234].

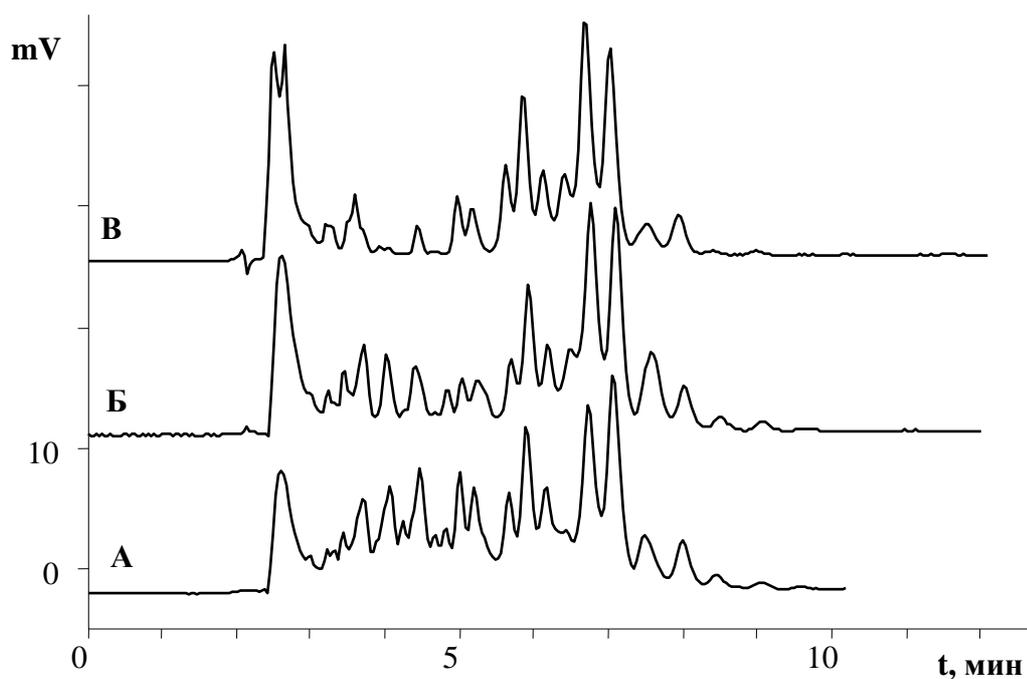


Рис.3.49. Хроматограммы фальсифицированных масел

Подвижная фаза: 100 % ацетон, 1 мл/мин. А – «Вологодское масло»; Б – «Коровье масло»; В – «К чаю».

Таким образом, простого отнесения хроматограммы к одному из трех типов, представленных на рис.3.47, достаточно для обнаружения подмены молочного жира растительным маслом. Однако следует подчеркнуть, что замена маргарина пищевым пальмовым маслом является современной мировой тенденцией, направленной на уменьшение содержания *транс*-кислот в продуктах питания.

В Приложении 4, рис. 9 приводятся хроматограмма метиловых эфиров молочного жира методом ГЖХ-МС.

### 3.3.4 Исследование шоколада и шоколадной продукции

«Шоколад – изделие, приготовленное из шоколадной массы с начинкой или без нее. Основное сырье для производств шоколада – тертое какао,

какао-масло и сахар. В качестве дополнительного сырья используют орехи, кофе, сухое молоко и др., позволяющие рационально использовать какао-бобы.

Какао-продукты получают из какао-бобов – семян дерева какао, произрастающего в странах с теплым и влажным климатом. Многочисленные виды дерева какао делятся на две основные группы: криолло (благородные, сортовые) - культура, дающая небольшой урожай плодов с самыми лучшими по качеству бобами (Ява, Цейлон, Тринидад, Арроба и др.) и форастеро (потребительские, ординарные) – культура более урожайная, но дающая бобы среднего качества (Гана, Томе, Аккра, Байя и др.). По происхождению какао-бобы подразделяются на группы: американские, африканские и азиатские. Наименование товарных сортов какао-бобов соответствует названию района их производства, страны или порта вывоза (Гана, Нигерия и т.д.)» [252].

Ядра какао-бобов содержат не менее 50% какао-масла. Какао-масло обладает рядом важнейших свойств. Особенность масла какао – это высокое содержание насыщенных жирных кислот в составе ТАГ. По количественному соотношению содержит: пальмитиновую (до 25%), стеариновую (до 34%), олеиновую (до 43%) и линолевую (до 2%) кислоты, а также следы арахидиновой кислоты, такой ЖКС состав обеспечивает твердую структуру какао-масла при комнатной температуре, большое количество естественных антиоксидантов обеспечивает длительный срок хранения шоколада [252].

Масла какао относятся к дорогим маслам, зачастую в качестве его замены, например, в кондитерском производстве пользуются эквивалентами масла какао (ЭМК). Для оценки количественного содержания масла какао в связи с его довольно простым составом можно использовать соотношения основных ТАГ по отношению друг к другу. Впрочем, единого метода определения фальсификации масла какао нет, заменители масла могут иметь

не только разнообразный жирнокислотный состав, но различные концентрации остальных липофильных соединений [252].

В качестве образца сравнения использовали «Масло какао» производителя ООО «Натуральная косметика». Для анализа ТАГ экстракцию из навесок шоколада проводили ацетоном, далее проводилось фильтрование и введение пробы в хроматограф. Пробоподготовка занимает около 5 мин, а сам анализ около 17 мин. В процессе пробоподготовки не проводилось никаких промежуточных химических преобразований с какао-маслом. Официально используемый метод, пожалуй, единственный метод, где исследуется ТАГ состав масел методом ГЖХ [ГОСТ Р ИСО 23275-2-2013 Жиры и масла животные и растительные. Эквиваленты масла какао в масле какао и шоколаде. Часть 2. Определение количества эквивалентов масла какао.] Время анализа одного образца около 50 минут, к нему плюсуется время для анализа стандартной смеси ТАГ для расчета концентраций.

Типичная хроматограмма масла какао представлена на рис.3.50, один из трех основных ТАГ (олеат-дипальмитат, ОП<sub>2</sub>) плохо отделен от пары других ТАГ с близкими временами удерживания (с диолеат-пальмитатом, О<sub>2</sub>П и с линолеат-пальмитат-стеаратом, ЛПС). Однако разделение проблемных пиков лишь незначительно улучшается при использовании существенно более медленных элюентов (требующих на порядок большее время на единичное хроматографирование [252]), поэтому предложенные в работе хроматографические условия можно считать оптимальными.

Выполненный в работе анализ большого числа шоколадов различных марок и внешней заливки некоторых шоколадных конфет показал, что в ряде случаев для оценки происхождения использованного для их изготовления масла достаточно качественного анализа хроматограмм.

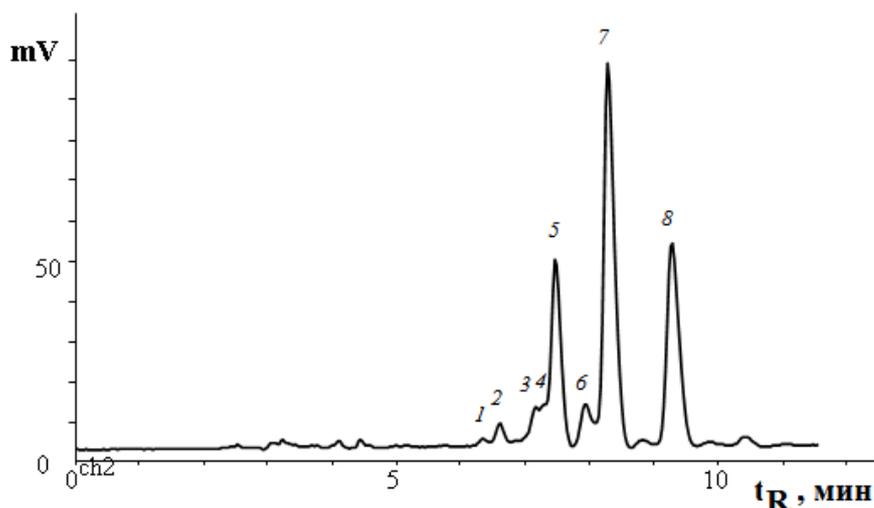


Рис.3.50. Хроматограмма ТАГ масла какао

ТАГ: 1 - ЛОП; 2 - ЛП<sub>2</sub>; 3 - ООП; 4 - ЛПС; 5 - ОП<sub>2</sub>; 6 - О<sub>2</sub>С; 7 - ОПС; 8 - ОС<sub>2</sub>.  
 Колонка 250×4.6 Kromasil 100-5С18; подвижная фаза – ацетон (1 мл/мин);  
 термостат колонок 30°С; детектор рефрактометрический

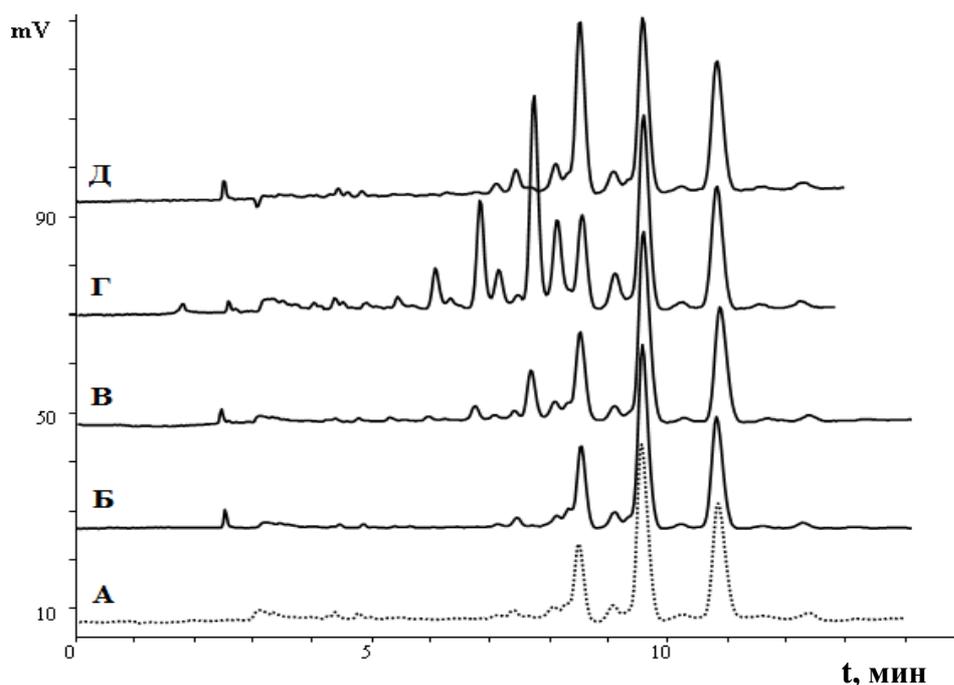


Рис.3.51. Хроматограммы ацетоновых экстрактов некоторых шоколадов: А -  
 масло какао; шоколады: Б - «Экстра»; В - «Amour» (с фундуком); Г -  
 «Ореховый»; Д - «Кремлевские забавы»

Например, шоколад «Экстра», как и многие другие, содержит масло, не  
 отличимое от масла какао (рис.3.51, Б). Масла шоколадов марок «Amour» (с

фундуком) и «Ореховый» осложнены появлением дополнительных пиков, но их хроматографический профиль соответствует маслам орехов, использование которых декларировано на упаковке (рис.3.51, В и Г). В подлинности масла какао, экстрагированного из шоколада марки «Кремлевские заботы», можно усомниться - относительная доля ТАГ ОП<sub>2</sub> заметно больше, чем в остальных образцах, что очевидно и без количественных расчетов (рис.3.51, Д).

Масла, отчетливо различающиеся по хроматографическому профилю от масла какао обнаружены во внешней заливке многих глазурей исследованных в настоящей работе «шоколадных» конфет:

- по иному соотношению площадей характерных и для масла какао основных пиков, что указывает на использование (добавки) искусственно приготовленных смесей (рис.3.52, А и Б);
- по характерным для продуктов гидрирования (традиционных маргаринов [252]) широким неразделенным группам пиков суммы изомерных ТАГ с одинаковыми эквивалентными углеродными числами [224] (рис.3.52, Г).

Наконец, в некоторых шоколадах была обнаружена замена масла какао на иное масло – кокосовое (или на продукт, приготовленный на его основе) а также фракции пальмового масла. Впрочем, во всех таких случаях речь не может идти о фальсификации, поскольку производители декларировали произведенную замену.

Данный метод предполагает построение схемы, в которой в трехмерном пространстве базисные векторы соответствуют долям трех основных ТАГ масла какао:  $0x$  – ОП<sub>2</sub>,  $0y$  – ОПС и  $0z$  – ОС<sub>2</sub>, строится реперный вектор, по заведомо достоверному образцу, затем строится другой вектор - с координатами, соответствующими доле площадей этих пиков в исследуемом образце масла, рис.3.53. Степень несовпадения двух векторов

может быть оценена по углу между ними, определяемому по формуле уравнение 3.23:

$$\phi = \arccos \frac{x_i x_0 + y_i y_0 + z_i z_0}{\sqrt{(x_i^2 + y_i^2 + z_i^2)^{0.5} \cdot (x_0^2 + y_0^2 + z_0^2)^{0.5}}}. \quad (3.23)$$

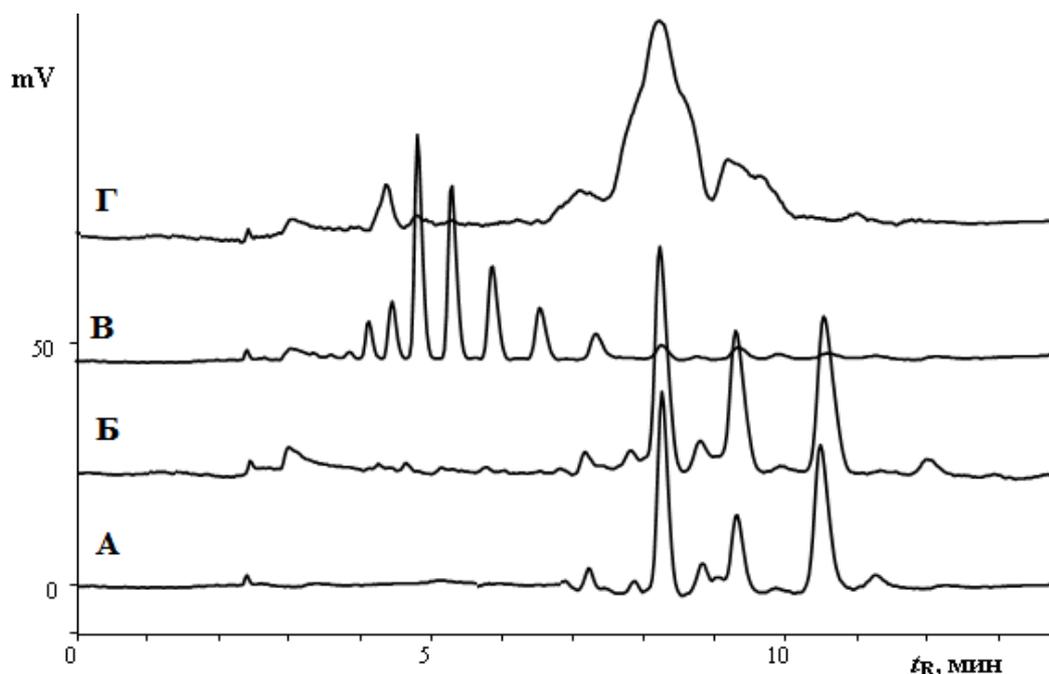


Рис.3.52. Хроматограммы ацетоновых экстрактов шоколадов

Экстракты глазури конфет: А - «Миндаль»; Б - «Ассорти»; Г - «Княжеские»; В - шоколадная плитка

Однако, как следует из литературных данных, некоторые различия в составе масла какао могут быть связанными с местом его производства (произрастания).

«Если из представленных в табл.3.25 данных в качестве реперного образца взять масло какао из плодов растения, выращенного в Кот-д’Ивуаре, то по предложенному выше уравнению можно рассчитать диапазон углов в векторной модели, соответствующих различиям в составе натуральных масел какао. При среднем отклонении векторов от реперного вектора на уровне 3 градуса максимальный угол оказался даже больше 5 градусов для заведомо

достоверных растительных масел» [252]. В Приложении 4, рис. 10-14, приводятся несколько хроматограмм метиловых эфиров масла какао и схожих с ним заменителей какао масла и масс-спектры методом ГЖХ-МС.

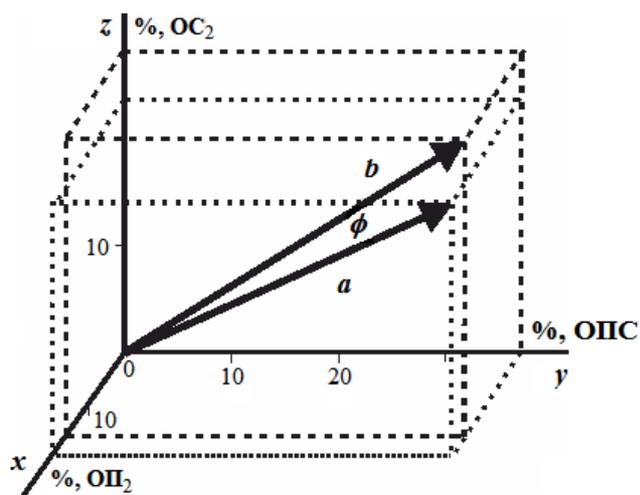


Рис.3.53. Векторная модель для оценки достоверности использования масла какао

Следовательно, в качестве ориентировочного критерия достоверности масла какао в шоколаде можно использовать непревышение угла между векторами в 6 градусов. Превышение угла в 6 градусов, по - видимому, следует воспринимать как подозрение на добавление к маслу какао сторонних масел.

Результаты исследования масел в составе различных марок шоколадов и глазури некоторых марок конфет приведены в табл.3.26. Примерно для 15 образцов шоколада нет оснований считать, что масло какао было заменено или в него было введено стороннее масло, в других образцах были небольшие отклонения. Три оказались фальсификатами, так как имели хроматографический профиль, отличный от профиля чистого какао-масла.

Это шоколад «Кремлевские забавы», «Настоящий шоколад», «Шоколад с кусочками какао».

Таблица 3.25

Характеристики масла какао из плодов растений различных мест произрастания

Производители:	Самоа	Кот-д'Ивуар	Эквадор	Малайзия	Гана	Нигерия	Байя (Бразилия)
Вид ТАГ	Доля по площадям пиков						
ОП <sub>2</sub>	16.4	15.9	15.3	13.8	15.2	14.8	14.0
ОПС	38.3	36.6	36.3	36.6	37.3	37.4	34.6
ОС <sub>2</sub>	26.8	23.8	26.9	28.4	26.8	26.4	23.7
Характеристические углы по отношению к вектору масла какао производства Кот-д'Ивуар							
$\phi$ , град	1.96	0	3.56	5.68	3.04	2.94	2.02

Исследование 12 видов шоколадных конфет показало, что практически все образцы не содержали натуральное масло какао, но только на упаковке шоколадных конфет «Вдохновение» производитель привел информацию о том, что в их состав входит заменитель масла какао.

В результате выполненных исследований было установлено, что масляные компоненты всех исследованных образцов шоколада содержали именно масло какао (если на этикетке не было указано другое масло). Иная ситуация наблюдается при анализе масла какао в шоколадных конфетах. В конфетах масла отчетливо различаются по хроматографическому профилю от масла какао:

1. по иному соотношению площадей основных пиков характерных для масла какао, что указывает на использование (или добавки) искусственно

приготовленных заменителей масла какао;

2. по принципиально иному хроматографическому профилю (в некоторых образцах была обнаружена замена масла какао на масло типа кокосового;

3. по характерным для продуктов гидрирования традиционных маргаринов с широкими, вследствие соэлюирования индивидуальных компонентов группами пиков ТАГ с близкими эквивалентными углеродными числами.

Таблица 3.26.

Результаты исследования масел некоторых марок шоколада и глазури  
некоторых марок конфет

№	Название образца				α, град.
		OP2	OPS	OS2	
1	2	3	4	5	6
	Масло какао	21.4	43.3	25.6	0
Шоколад					
1	Edel herbe Sahne. Bellarom Lindl Stiftung &Co. KG	19.7	43.7	26.6	2.12
2	Российский. Темный шоколад с миндалем ОАО «Кондитерское объединение «РОССИИ»	22.2	43.3	28.7	2.72
3	Горький шоколад "Amour" 72% АТ ВО «КОНТИ»	22.4	46.8	30.8	2.85
4	Черный «Дольчи» шоколад ЗАТ Виробниче об'єднання «КОНТИ»	20.8	44.9	29.5	3.04
5	Бабаевский горький шоколад с фундуком ОАО Кондитерский концерн Бабаевский	21.7	43.6	29.6	3.33
6	Бабаевский горький с целым миндалем ОАО Кондитерский концерн Бабаевский	20.1	44.8	29.5	3.54
7	"Банкет" шоколад горький, 72% ЗАО «Кондитерская фабрика «Славянка»	21.1	42.1	29.3	3.96
8	«Осенний вальс» ОАО «РОТ ФРОНТ»	21.2	46.6	32.2	4.46

Продолжение таблицы 3.26					
1	2	3	4	5	6
9	Шоколад пористый "Спартак" ОАО «Спартак»	19.0	43.8	29.7	4.59
10	Шоколад десертный с лесным орехом и изюмом ООО Кондитерская фабрика «Победа»	26.6	44.0	29.4	4.62
11	Roshen Elegance с миндалем, Киевская кондитерская фабрика ROSHEN, Украина, г. Киев	17.4	41.3	27.9	4.92
12	Темный шоколад Alpen Gold ООО «Крафт Фудс Рус»	21.2	43.3	31.4	5.12
13	Горький шоколад 80% какао ОАО «Красный Октябрь»	20.4	43.5	31.4	5.29
14	Шоколад «Амур» черный с цельным фундуком ЗАТ Виробниче об'єднання «КОНТИ»	17.5	44.8	29.4	5.48
15	Zart herb. Choceur. WIHA GMBH	17.4	46.1	30.1	5.95
16	Ореховый (ОАО Кондитерский концерн Бабаевский)	21.1	45.2	33.7	6.17
17	Молочный шоколад Nestle ОАО «Кондитерское объединение «Россия»	18.3	42.3	30.7	6.24
18	"Для Вас" Шоколад ОАО «Красный Октябрь»	17.5	41.5	30.0	6.38
19	Воздушный шоколад темный пористый ООО «Крафт Фудс Рус»	16.9	44.1	30.0	6.39
20	Экстра. Темный шоколад. ЗАО «Кондитерская фабрика «Славянка»	24.1	38.1	29.5	7.38
21	Настоящий шоколад ЗАО «Кондитерская фабрика «Славянка»	21.2	39.3	32.0	7.94
22	Cadbury Whole Nut (ООО «ДиролКэдбери»)	15.9	46.2	32.1	8.26
23	Шоколад с кусочками какао ЗАО «Кондитерская фабрика «Славянка»	29.2	35.0	29.8	12.8
24	"Кремлевские забавы" Царь-колокол 1735 ООО Кондитерская фабрика «Победа»	29.7	33.2	26.2	13.8

Продолжение таблицы 3.26					
1	2	3	4	5	6
№	Название образца «Шоколадные конфеты»:	Шоколадные конфеты			α, град.
		OP2	OPS	OS2	
25	"Ассорти"	21.6	41.0	28.4	3.76
26	"French Kiss"	19.4	44.5	30.0	3.76
27	"Ассорти" (темный слой)	20.5	42.7	28.9	3.76
28	"Коркунов" (молочный с лесным орехом)	21.9	45.3	32.8	5.19
29	"Alpen Gold Composition"	31.8	41.2	27.0	10.1
30	"Княжеские"	12.4	67.3	20.3	18.6
31	"Золотая лилия"	7.5	70.6	21.9	21.5
32	"Ассорти" (молочн.слой)	33.7	25.1	28.2	23.8
33	"Миндаль"	36.1	16.8	36.0	34.4

Разработанный нами метод с использованием векторной модели определения качества масла в исследуемом продукте предназначен для решения спорных вопросов, в которых метод «отпечатков пальцев» не может быть использован для однозначного решения.

### **3.4 Использование компьютерной обработки хроматограмм для определения удерживания неразделенных аналитов.**

Во всех широко используемых в мировой хроматографической практике программных продуктах, (Xcalibur™, ChemStation 32 Agilent, LC и Мульти-хром 1.5), нет возможности автоматического разделения пиков моделированными гауссианами. Однако для компьютерной обработки не полностью разделенных при ВЭЖХ пиков (далее - «критическими парами» [253]) можно воспользоваться программой Magic Plot, или бесплатной не полнофункциональной Student-версией программы [254]. Разделение таких пиков моделированными гауссианами позволит определить основные

параметры пиков: время удерживания, число теоретических тарелок, рассчитать разрешение пиков (степень разделения),  $R_s$ .

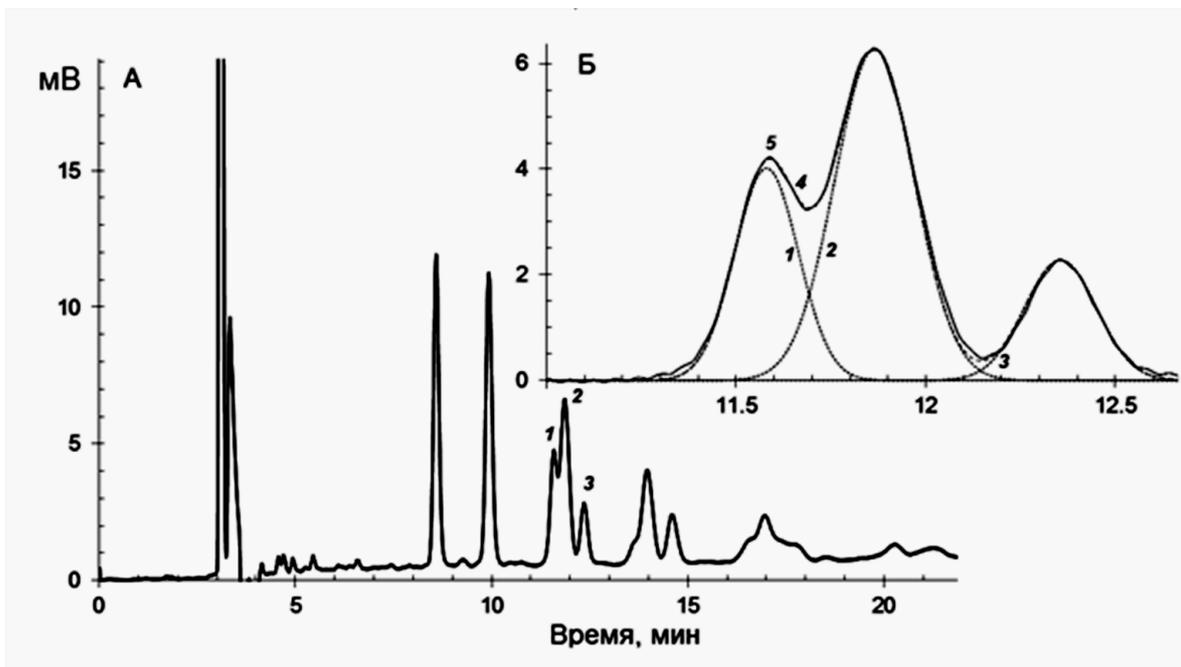


Рис. 3.54. Разделение триацилглицеринов льняного масла (А) и компьютерное разделение трех компонентов гауссовыми кривыми (Б)

Условия: колонка 250×4.6 мм, Kromasil 100-5C18, подвижная фаза, 20 об. % ацетонитрила в ацетоне, 0.8 см<sup>3</sup>/мин.

Для компьютерного разделения пиков с  $R_s$  менее 1 необходимо, прежде всего, задать форму пика в таблице Excel. Гауссова функция (ГФ), представляющая форму идеального хроматографического пика в соответствии с методом теоретических тарелок [255, 256] имеет вид:

$$y(t) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(t_R-t)^2}{2\sigma^2}}, \quad (3.24)$$

где  $t$  – время с начала записи хроматограммы,  $t_R$  – время удерживания вещества,  $\sigma$  – среднеквадратическое отклонение.

Затем подбираем параметры функции Гаусса так, чтобы они вписывались в критические пары искомым пиков и делаем поправку площадей пика при

расчете конечного содержания каждого компонента. Однако полученные результаты не существенно отличаются от ручной разметки при расчете площадей пиков в программах обработки хроматограмм (различия не более 2%). Преимущество данного метода в том, что он позволяет рассчитать число теоретических тарелок (формула 3.25) для каждого пика и их разрешение ( $R_s$ ):

$$N = 5.54 \cdot \left(\frac{t_R}{\omega}\right)^2 = 8 \cdot \ln 2 \cdot \frac{t_R^2}{8 \cdot \ln 2 \cdot \sigma^2} = \frac{t_R^2}{\sigma^2}, \quad (3.25)$$

Из полученных данных видно, что критические пары имеют разную полуширину, это может быть объяснено существованием двух позиционных изомеров типа ААБ и АБА. Тип ААБ может состоять из двух практически неразделимых изомеров (в данных условиях элюирования), при этом вероятность биосинтеза каждого изомера может отличаться и суммарный гауссиан может иметь ассиметричную форму.

Существенные различия появляются при расчете критических пар пиков с различной степенью уширения соседних пиков, изменения площади таких пиков при ручной разметке в программе обработке и при построении гауссиан могут доходить до 10% от исходного значения. Более подробный способ расчёт формы гауссиан отражен в статье «Использование MS Excel для обработки неразделенных пиков на хроматограммах» в соавторстве с коллегами [257].

## ВЫВОДЫ:

1. В работе показаны преимущества двухпараметрического способа индексации удерживания ТАГ, основанного на использовании метода относительного анализа удерживания и инкрементного подхода. Экспериментально определены параметры относительного удерживания ТАГ, необходимые для расчета удерживания компонентов многих растительных масел. Найденные параметры применимы в широких диапазонах составов подвижных фаз системы «ацетон-ацетонитрил», не зависят от температуры и могут быть перенесены на стационарные C18 фазы различных производителей.

2. Компьютерный способ расчета времен удерживания ТАГ (в программе MSExcel) позволяет рассчитывать времена удерживания ТАГ с заданным жирнокислотным составом, с отклонением от экспериментальных данным не более 0.004 логарифмических единиц. При этом результаты компьютерного расчета жирнокислотного состава масел совпадают с результатами определения жирнокислотного состава методом ГЖХ метиловых эфиров.

3. Впервые определен ТАГ состав ряда растительных масел и животных жиров (результаты включены в базу данных SOFA (Германия)). Показано, что обычное подсолнечное масло, благодаря постоянству качественного состава, является доступным образцом для использования в качестве стандартной смеси для расчета базовых инкрементов для разработанной системы индексации.

4. Эффективность подхода при переносе инкрементных соотношений с «тренировочного ряда» на другие соединения с аналогичным изменением структуры показана на примере расчета параметров удерживания ТАГ, содержащих петрозелиновую и пальмитолеиновую ВЖК. Смещение точек конвергенции вправо по оси абсцисс при увеличении степени ненасыщенности ТАГ позволяет выполнять неразрушающий хроматографический подсчет числа двойных связей в ТАГ и для ВЖК.

5. Показана эффективность предложенной векторной модели, построенной по площадям характеристических пиков масла какао, при определении качества шоколада и шоколадных конфет.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kalo P. Determination of Triacylglycerols in Butterfat by Normal-Phase HPLC and Electrospray–Tandem Mass Spectrometry / P. Kalo, A. Kemppinen, V. Ollilainen // *Lipids*. - 2009. - V.44. - P.169 - 195.
2. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). The nomenclature of lipids. // *Eur. J. Biochem.* 1967 Sep; 2 (2): 127 - 31.
3. Тюкавкина Н. А. Биоорганическая химия. / Н. А. Тюкавкина, Ю. И. Бауков, С. Э. Зурабян, - М.: ГЭОТАР - Медиа. - 2010. - С. 416.
4. Березов Т.Т./ Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин, Биологическая химия: Учебник. - М.: Медицина, 1998. – С. 188.
5. Тютюнников Б.Н. / Б.Н. Тютюнников, Химия жиров М.: изд. «Пищевая промышленность», 1966. - С.415-419.
6. Пилипенко Т.В. / Т.В. Пилипенко, Товароведение и экспертиза пищевых жиров. - СПб. - изд. ГИОРД. - 2006. - С. 384.
7. Christie W.W. Lipid Analysis. Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids. / W.W. Christie // The Oily Press. – 2003. – P. 446.
8. Fahy E. A Comprehensive classification system for lipids / E Fahy, S. Subramaniam, H.A. Brown. // *J. Lipid Res.* – 2005. – V. 46. – P. 839–861.
9. Рудаков О.Б. Жиры. Химический состав и экспертиза качества. / О.Б. Рудаков и сотр. // М.: ДеЛи принт. - 2005. - С. 312.
10. О Брайен Р. Жиры и масла. Производство, состав и свойства, применение. // Р. О Брайен; пер. с англ. В.Д Широкова, Д.А. Бабейкиной, Н.С. Селивановой, Н.В. Магды. СПб.: Профессия. - 2007.- С. 752.
11. Степанов А.Е. Физиологически активные липиды. / А.Е.Степанов, Ю.М. Краснопольский, В.Н. Швец. // М.: изд. Наука. - 1991. – С. 136.
12. Ушакова В.Н., Стабильность липидов пищевых продуктов/ В.Н.Ушакова // М.: Агропромиздат. -1988. – С. 152.

13. Биохимия липидов и их роль в обмене веществ (сборник статей), М.: Наука. - 1984. – С. 168.
14. Клиническая биохимия (учебное пособие для студентов мед. ВУЗов), под ред. Ткачука В.А. М. - ГЭОТАР-МЕД. - 2002 - 358с
15. Биохимия: Учебник / Под ред. Е. С. Северина. - 2 изд., испр. - М: ГЭОТАР-МЕД. - 2004. – С. 784.
16. Kromann, N. Epidemiological Studies in the Upernavik District / N. Kromann, A. Green // Acta Med. Scand. - 1980. - P. 208, 401-406.
17. Yam D. Diet and disease - the Israeli paradox: possible dangers of a high omega-6 polyunsaturated fatty acid diet. / D.Yam, A. Eliraz, E.M. Berry // Israeli J. Med. Sci. - 32. - P. 1134 - 1143.
18. Simopoulos P. The Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods / P. Simopoulos, R. R. Kifer and R.E. Martin // Academic Press, Inc. - 1986.
19. Abbey M. Effect of fish oil on lipoproteins, lecithin: cholesterol acyltransferase, and lipid transfer protein activity in humans/ M .Abbey and [et al.] // Arteriosclerosis. - 1990. - Jan-Feb. - P. 85-94.
20. Joyce A. Nettleton Omega-3 Fatty Acids and Health / A. Joyce // Springer US. - 2012. - P. 359.
21. Дейнека В.И. Эссенциальные жирные кислоты растений Белгородской флоры / В.И. Дейнека и сотр. // Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармакология. - 2005. - №1(21), вып.4. - С. 27-37.
22. Freese R. a-linolenic acid and marine long chain n-3 fatty acids differ only slightly in their effects on hemostatic factors in healthy subjects. / R. Freese, Mutanen M. // Am. J. Clin. Nutr. №.6. - 1997. - P. 591 - 598.
23. Turek J.J. Dietary polyunsaturated fatty acids effects on immune cells of the porcine lung / J.J. Turek and [et al.] // J. Leuk. Biol. - №.56. - 1994. - P. 599 - 604.
24. Williams C. Improving the Fat Content of Foods Technology and Nutrition / C. Williams, J. Buttriss // Woodhead Publishing. - 2006. - P. 560.

25. Packer L. Neuroprotection by the metabolic antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid. Free Radic. / L. Packer, H. J. Tritschler, K. Wessel // Biol. Med. - №22. - 1997. - P. 359 - 378.
26. 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. - Volume 16, Issue 7. - P. 546 - 551
27. Tsuyoshi T. Conjugated Eicosapentaenoic Acid (EPA) Inhibits Transplanted Tumor Growth via Membrane Lipid Peroxidation in Nude Mice. / T. Tsuzuki, M. Igarashi, T. Miyazawa // J. Nutr. - № 134. – 2004. - P. 1853 - 1856.
28. Беззубов Л.П. / Л.П. Беззубов Химия жиров. М. - Пищевая промышленность. - 1975. - С. 65-79.
29. Титов В. Н. Жирные кислоты. Физическая химия, биология и медицина. / В. Н.Титов, Д. М. Лисицын// М. - Триада. – 2006. – С. 672.
30. Равич Б. Г. / Б. Г. Равич Химия жиров и контроль производства. М.: Пищепромиздат. - 1939. – С. 236.
31. Либерман, С. Г. / С. Г. Либерман, В. П. Петровский. Справочник по производству животных жиров – 3-е. изд. М.: Пищевая промышленность. - 1972. – С. 488.
32. Голдовский А. М. / А.М. Голдовский. Теоретические основы производства растительных масел. - М. - 1958. - С. 45 - 67.
33. Леонтьев В. Н. Идентификация масел растительного происхождения при анализе их жирнокислотного состава. Материалы II Республиканской науч. - практ. Конф. / В. Н. Леонтьев // Белорус. Гос. ун-т. – Минск. - 2004. – С. 67 - 70.
34. Горяев М. И. Справочник по газожидкостной хроматографии органических кислот / М. И. Горяев, Н. А. Евдакова // Изд. «НАУКА» Казахской ССР. – 1977. – С. 562.

35. Jain V.P. Pilot-Scale Production of Conjugated Linoleic Acid-Rich Soy by Photoirradiation / V.P. Jain, A. Proctor, R. Lall // J. Food Sci. - 2008. - Vol. 73. - P. E183 - E192.1.
36. Солодовник В.Д. Химия природных жирных кислот с сопряженной системой двойных связей. / Солодовник В.Д. // Успехи химии. - Т. XXXVI. - 1967.
37. Явич П.А. К вопросу использования отдельных химических компонентов в косметических кремах/ П.А. Явич и сотр. // ISSN 2223 - 4888. - 2015. - №.7. Ч. 5.
38. Нагорнов С. А. / С. А. Нагорнов, Д. С. Дворецкий и др. Техника и технологии производства и переработки растительных масел: учебное пособие //Изд. ГОУ ВПО ТГТУ. - 2010. - С. 96.
39. Титов В. Н. / В. Н. Титов, Д. М. Лисицын. Жирные кислоты. Физическая химия, биология и медицина. - М.: Триада. - 2006. - С. 672.
40. ГОСТ 25292-2017 Жиры животные топленые пищевые. Технические условия.
41. ГОСТ 32261 - 2013 Масло сливочное. Технические условия.
42. James A. T. Gas-liquid partition chromatography: the separation and microestimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. / A. T. James, A. J. Martin // Biochem. J. 50. - 1952. - P. 679 - 690.
43. Kuksis A. Gas-liquid chromatographic fractionation of natural triglyceride mixtures by carbon number. / A. Kuksis, M. J. McCarthy. // Can. J. Med. Sci. 40 - 1962.-P.679 - 686.
44. Tvrzicka E. Gas-liquid chromatography of neutral lipids. In: Lipid Chromatographic Analysis. / E. Tvrzicka, P. Mares, T. Shibamoto. // New York (USA). - 1994. - P. 103 - 176.
45. Aneja R. Evaluation of selected stationary phases suitable for the gas-liquid chromatographic analysis of triglycerides. / R. Aneja and [et al.] // J. Chromatogr. A. 173. - 1979. - P.392 - 397.

46. Precht D. Gas chromatography of triacylglycerols and other lipids on packed columns, in Handbook of Chromatography: Analysis of Lipids. / D. Precht, K. D. Mukherjee, N. Weber // CRC Press, Boca Raton. - FL (USA). - 1993. - P. 123 - 138.
47. Precht D. Control of milk fat purity by gas chromatographic triglyceride analysis. / D. Precht // Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber. - 1991. - P. 219 - 242.
48. Collomb M. Adulteration des produits laitiers. Revue des criteres analytiques de detection de graisses vegetales et animales dans la graisse de beurre. / M. Collomb, M. Spahni // Trav. chim. Aliment. Hyg. 82. - 1991. - P. 615 - 662.
49. ISO/DIS 17678:2017. Milk and milk products - Determination of milk fat purity by gas chromatographic analysis of triglycerides.
50. Fontecha J. Triglyceride analysis by gas chromatography in assessment of authenticity of goat milk fat / J. Fontecha, V. Díaz [et al.] // J. Am. Oil Chem. Soc. 1998. - Volume 75, Number 12. – P. 1893.
51. Commission of the European Communities: Consideration of results submitted from the first to sixth EEC collaborative trial: Determination of triglycerides in milk fat. Doc. VI / 4604 /93.
52. Lipp M. Determination of the adulteration of butter fat by its triglyceride composition obtained by GC. A comparison of the suitability of PLS and neural networks. / M. Lipp // Food Chemistry 55 (4). – 1996 - P. 389 - 395.
53. Van Renterghem R. The triglyceride composition of belgian butter in view of EU controls on milk fat purity. / R. Van Renterghem. // Milchwissenschaft 52 (2). - 1997. - P. 79 - 82.
54. Novotny M. Capillary column chromatography of steroids: Evaluation of stationary phases. / M. Novotny, A. Zlatkis // J. Chromatogr. A 56. - 1971. - P. 353 - 356.

55. Rodríguez-Estrada M.T. Applications on Thermostable Polar Capillary GC Columns/ M.T. Rodríguez-Estrada, N. Frega, G. Lercke // *Grasas y Aceites* Vol. 53. Fasc. 1. - 2002. - P. 76 - 83.
56. Grob K. Jr. Evaluation of injection techniques for triglycerides in CGC. / K. Jr. Grob // *J. Chromatogr.* - 178. - 1979. - P. 387 - 392.
57. Grob K. Jr. Triglyceride analysis with glass capillary gas chromatography/ K. Jr. Grob, H. P. Neukom, R. Battaglia // *J. Am. Oil Chem. Soc.* - № 57. - 1980. - P. 282 - 286.
58. Geeraert E. On-column injection in the capillary gas chromatographic analysis of fats and oils. / E. Geeraert, P. Sandra, D. de Schepper // *J. Chromatogr.* - № 279. - 1983. - P. 287 - 295.
59. Collomb M. Analysis of triglycerides. I. Optimization and validation of a rapid GC method and application to different vegetable and animal fats. *Trav.* / M. Collomb, Spahni, M. S. T. Buehler // *Chim. Aliment. Hyg.* 89. - 1998. - P. 59 - 74.
60. Frega N. The HRGC determination of triglycerides. / N. Frega, F. Bocci, E. Lercker // *Ital. J. Food Sci.* - № 4. - 1990. - P. 257 - 264.
61. Antoniosi Filho N. R. Fast quantitative analysis of soybean oil in olive oil by high temperature - capillary gas chromatography (HT-CGC). / N. R. Antoniosi Filho, E. Carrilho, F. M. Lanc // *J. Am. Oil Chem. Soc.* № 70. - 1993. P. 1051 - 1053.
62. Sassano G. J. Gas chromatography of triacylglycerols in palm oil fractions with medium-polarity wide-bore columns. / G. J. Sassano, B. S. J. Jeffrey // *J. Am. Oil Chem. Soc.* - № 70. - 1993. - P. 1111 - 1114.
63. Rezanka T. Determination of plant triacylglycerols using capillary gas chromatography, high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. / T. Rezanka, P. Mares // *J. Chromatogr.* - № 542. - 1991. - P. 145 - 159.

64. Hinshaw J. Analysis of triglycerides by capillary gas chromatography with programmed-temperature injection. *J. High Resol. / J. Hinshaw, W. Seferovic // Chromatogr. - № 9. - 1986. - P. 731 - 736.*
65. Alonso L. Capillary gas chromatography of some triglycerides in cheese using programmed-temperature injection. / L. Alonso // *Chromatographia* 35. - 1993. - P. 649 - 652.
66. Termonia M. High oven temperature - cold on-column injection for the automated CGC analysis of high molecular weight compounds such as TGs./ M. Termonia, F. Munari, P. Sandra // *J. High Resol. Chromatogr.* 10. -1987. - P. 263 - 268.
67. Simoneau C. Detection and quantification of cocoa butter equivalents in chocolate model systems. Analysis of triglyceride profiles by High Resolution GC. / C. Simoneau, P. Hannaert, E. Anklam // *Food Chem.* 65. - 1999. - P. 111 - 116.
68. E. Geeraert. On the potential of CGC in triglyceride analysis. Short Communications. / E. Geeraert, P. Sandra // *J. High Resol. Chromatogr. - № 7. -1984. - P. 431 - 432.*
69. Geeraert E. Capillary GC of triglycerides in fats and oils using a high temperature phenylmethylsilicone stationary phase. Part II. The analysis of chocolate fats. / E. Geeraert, P. Sandra // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64. - 1987. P. 100 - 105.
70. Bocci F. Analysis of the volatile fraction from sunflower oil extracted under pressure/ F. Bocci, N. Frega // *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73(6). - P. 713 - 716.
71. Buchgraber M. Capillary GLC a robust method to characterise the triglyceride profile of cocoa butter - Results of an intercomparison study. *Eur. / M. Buchgraber, F. Ulberth, E. Anklam // J. Lipid Sci. Tech.* 105. - 2003. - P. 754 - 760.

72. Von Schaller H. Anwendung von Hochtemperaturphasen für die Triglyceridanalytik mittels Kapillar-GC. / H. Von Schaller // *Fat Sci. Technol.* 93. - 1991. - P. 510 - 515.
73. Mayer B. X. A new 75% diphenyl, 25% dimethyl-polysiloxane coated on fused silica capillary columns for high temperature gas chromatography. / B. X. Mayer // *J. Sep. Sci.* 25. - 2002. - P. 60 - 66.
74. Aichholz R. Analysis of cyanolipids and triacylglycerols from sapindaceae seed oils with high temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. / R. Aichholz, V. Spitzer, E. Lorbeer // *J. Chromatogr. A* 787. - 1997. - P. 181 - 194.
75. Buchgraber M. Comparison of HPLC and GLC techniques for the determination of the triglyceride profile of cocoa butter. // *J. Agric. Food Chem.* 48. - 2000. - P. 3359 - 3363.
76. An Li. Detection of Hydrocarbons in Irradiated Chilled Beef by HS-SPME-GC - MS and Optimization of the Method // *J. Am. Oil Chem. Soc.* - 2010. - P. 731 - 736.
77. Tasan M. Trans FA in Sunflower Oil at Different Steps of Refining/ M. Tasan and M. Demirci // *JAOCS.* - Vol. 80, no. 8. - 2003.
78. Chun-Di Hu. Determination of Essential Oil Composition from Osmanthus fragrans Tea by GC-MS Combined with a Chemometric Resolution Method / Hu. Chun-Di // *Molecules.* - 2010. - P. 3683 - 3693.
79. Molquentin J. Equivalence of Packed and Capillary GC Columns for Detection of Foreign Fat in Butter by Use of the Triglyceride Formula Method/ J. Molquentin, D. Precht // *Chromatographia.* - Vol. 52, No. 11 - 12. - 2000. - P. 791 - 797.
80. Molquentin J. Precision of Milk Fat Quantitation in Mixed Fats by Analysis of Butyric Acid/ J. Molquentin, D. Precht // *Chromatographia.* - Vol. 48, No. 11 - 12. - 1998. P. 758 - 762

81. Yılmaz M. T. Thermal analysis of lipids isolated from various tissues of sheep fats/ M. T. Yılmaz, M. Karakaya // *J. Therm. Anal. Calorim.* - 2010. - P. 403 - 409/
82. Duvekot C. Determination of Free and Total Glycerine and mono-, di-, triglyceride content in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography/ C. Duvekot // *Application Note SI-0421/B/03.08.*
83. Le Néchet. Lipid composition of the liver oil of the ray, *Himantura bleekeri*. / Le Nechet [et al.] / *Food Chemistry.* - Volume 104, Issue 2. - 2007. - P. 559 - 564.
84. Mares P. Quantitative capillary gas-liquid chromatography of triglycerides on a fused-silica column with a chemically bonded stationary phase. / P. Mares, P. Husek // *J. Chromatogr.* №. 350. - 1985. - P. 87 - 103.
85. Mayer B. X. Fused silica capillary column coated with a medium polar stationary phase for HRGC. / B. X. Mayer, E. A Lorbeer // *J. Chromatogr. A* 758. - 1997. - P. 235 - 242.
86. Grob Jr. K. Factors affecting the accuracy and precision of cold on-column injections in capillary gas chromatography./ Jr. K. Grob, H. P. Neukom // *J. Chromatogr. A* 189. -1980. - P. 109 - 117.
87. Galli M. Benefits of a special cooling system to improve precision and accuracy in non-vaporizing on-column injection procedures. / M. Galli // *J. Chromatogr.* - 203. - 1981. - P. 193 - 205.
88. Gilkinson I. S. Trennung und Bestimmung von Triglyceriden mit der Kapillar-GC. / I. S. Gilkinson, O. Heisz // *Chromatographia. Laborpraxis* 15. - 1991. - P. 503 - 508.
89. Poy F. Automatic injection in high-resolution gas chromatography: A programmed temperature vaporizer as a general purpose injection system. / F. Poy, S., Visani, F. Terrosi // *J. Chromatogr.* 217. - 1981. - P. 81 - 90.
90. Woodford F. P. Gas liquid chromatography of fatty acid methyl esters: The carbon number as a parameter for comparison of columns. / F. P. Woodford, C. M. Van Gent // *J. Lipid Res.* - № 1. - 1960. - P. 188 - 190.

91. Schomburg G. Gas chromatographic analysis with glass capillary columns. / G. Schomburg [et al.] // J. Chromatogr. - № 122. - 1976. - P. 55 - 72.
92. Mondello L. Evaluation of fast gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry in the analysis of lipids. / L. Mondello // J. Chromatogr. A. – 2004. – V. 1035. – P. 237 - 247.
93. Bondia-Pons I. Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination / I. Bondia-Pons, A.I. Castellote, M.C. Lopez-Sabater // J. Chromatogr. B. – 2004. – V. 809. – P. 339 - 344.
94. Mossoba M.M. Application of on-line capillary GC-FTIR spectroscopy to lipid analysis / M.M. Mossoba, R. E. McDonald, M.P. Yurawecz // Eur. J. Lipid Sci. Technol. – 2001. – V. 103. – P. 826 - 830.
95. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография / Ю. Кирхнер. Под ред. В. Г. Березкина. М.: Мир. - 1981.
96. Adlof R.O. Advances in Lipid Methodology / R.O. Adlof // Elsevier. - 2003. - P. 104 -123.
97. Evan D. A Study of Phospholipids and Galactolipids in Pollen of Two Lines of Brassica napus L. (Rapeseed) with Different Ratios of Linoleic to Linolenic Acid. / D. Evan // Plant Physiol. - 1990. - P. 418 - 424.
98. Christie W. W. Lipid Analysis -4th Edition. / W. W. Christie, X. Han // Oily Press. - 2010. – P. 448.
99. Skipski V. P. Separation of acidic phospholipids by one dimensional thin-layer chromatography. / V. P. Skipski // Biochem. Biophys. Acta 137. - 1967. - P. 80 - 89.
100. Gardner H. W. Preparative isolation of monogalactosyl and digalactosyl diglycerides by thin layer chromatography. / H. W. Gardner // J. Lipid Res. – 1968. – V. 9. – P. 139 – 141.
101. Storry J. E. Thin layer chromatography of plasma lipids by single development / J. E. Storry, B. Tuckley // Lipids. – 1967. – V.2. – P. 501 – 502.

102. Martin J.C. Essential fatty acid composition of human colostrum triglycerides: its relationship with adipose tissue composition/ J.C. Martin // *Am J Clin Nutr.* -1991. - P. 829 - 835.
103. Radwan S. S. Arachidonic Acid from Fungi Utilizing Fatty Acids with Shorter Chains as Sole Sources of Carbon and Energy. / S. S. Radwan, A. H. Soliman // *Journal of General Microbiology.* - 1988. - P. 387 – 393.
104. Du M. Effects of Dietary Conjugated Linoleic Acid and Linoleic: Linolenic Acid Ratio on Polyunsaturated Fatty Acid Status in Laying Hens / M. Du, D. U. Ahn // *J. METABOLISM AND NUTRITION Poultry Science.* - №. 79. - P. 1749 – 1756.
105. Bilyk A. Separation of cholesterol, and fatty acylglycerols, acids and amides by thinlayer chromatography / A. Bilyk // *Lipids.* – 1991. – V. 26. – P. 405 – 406.
106. Hiromi Yoshida Ж. Lipid Classes, Fatty Acid Distributions and Triacylglycerol Molecular Species of Broad Beans (*Vicia faba*) // *J Am Oil Chem Soc.* - 2008. - P. 535 – 541.
107. Leaver M. J. Effect of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on lipid composition, metabolism and gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*) tissues. / M. J. Leaver // *PubMed.* - № 145. - P. 258 - 267.
108. Shahnaz H. Lipid Studies of cuminum cyminum fixed oil / H. Shahnaz [et al.] // *Pak. J. Bot.* - P. 395 - 401.
109. Borch-Jensen C. Analysis of Shark Liver Oil by Thin-Layer and Supercritical Fluid Chromatography / C. Borch-Jensen, M. Magnussen, J. Mollerup // *J. Chromatogr. B.* – 2008. – V. 609. – P. 339 – 344.
110. Alam M. Shahina determination of c9,t11-CLA in Major Human Plasma Lipid Classes Using a Combination of methylating methodologies / M. Alam // *Lipids.* - 2003. - P. 793 – 800.
111. Akoh C. Food Lipids: Chemistry, Nutrition, Biotechnology / C. Akoh B. Min // *Researchgate DOI: 10.1201/9780203908815.* 2002

112. Nikolova-Damyanova B. Mechanistic Aspects of Fatty Acid Retention in Silver Ion Chromatography / B. Nikolova-Damyanova, W. W Christie, B Herslof // *J. Chromatogr. A.* - 1996. - P. 47 - 54.
113. Isaac G. Development of Enhanced Analytical Methodology for Lipid Analysis from Sampling to Detection / G. Isaac // UPPSALA. – 2005.
114. Roche I. A. The selective utilization of diglyceride species into maize triglycerides. / I. A. Roche, E.J. Weber, D. E. Alexander // *Lipids* 1971. - P. 537 - 540.
115. Blank M.L. Determination of triglyceride structure via silver nitrate-TLC. / M.L. Blank, B. Verdino, O.S. Privett // *J. Am. Oil Chem. Soc.* - 1965. - № 42. - P. 87 - 90.
116. Yoshida H. Changes in the structure of soybean triacylglycerols due to heat. / H. Yoshida, J. C. Alexander // *Lipids*. 1984 Aug;19(8):589. doi: 10.1007/BF02534716.
117. Schwab U. Fatty Acid Composition in Diet-Induced Weight Loss in Subjects with Abnormal Glucose Metabolism – the GENOBIN Study / U. Schwab, T. Seppänen-Laakso // *PLoS ONE* July. - 2008. - P. 2630.
118. Hiromi Yoshida. Lipid classes, fatty acid composition and triacylglycerol molecular species of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) // *European Journal of Lipid Science and Technology.* - V. 107, Issue 5, No. 5 - 2005. - P. 307 – 315. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200401078>.
119. Hiromi Yoshida Ж. Characteristic profiles of lipid classes, fatty acids and triacylglycerol molecular species of peas (*Pisum sativum* L.) // *Euro Fed Lipide.* - V. 109, Issue 6, No. 6. -2007. - P. 600 – 607.
120. Schaefer A. Migration of lubricants from food packagings. Screening for lipid classes and quantitative estimation using normal-phase liquid chromatographic separation with evaporative light scattering detection / A. Schaefer, T. Kuchler, T.J. Simat // *J. Chromatogr. A.* – 2003. – V. 1017. – P. 107 – 116.

121. Lin J.T. HPLC Separation of Acyl Lipid Classes / J.T. Lin // Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. - Volume 30. - 2007.
122. McIntyre D.J. The Analysis of Triglycerides in Edible Oils by APCI LC/MS / D.J. McIntyre // Agilent Technologies. - Inc. - 2008.
123. Nikolova-Damyanova B. Silver ion HPLC for the analysis of positionally isomeric fatty acids / B. Nikolova-Damyanova, S. Momchilova // J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. – 2002. – V. 25. – P. 1947 – 1965.
124. Rainville P.D. Novel application of reversed-phase UPLC-TOF-MS for lipid analysis in complex biological mixtures: A new tool for lipidomics // Proteome Res. – 2007. – V. 4. – P. 552 – 558.
125. Дейнека В.И. Обращенно-фазовая ВЭЖХ в анализе растительных масел. Метод контроля подлинности и установление фальсификации облепихового масла / В.И. Дейнека и др. // РНАС. - Т43, №1. - 2009.
126. Ван А. Н. Определение триацилглицеринов масла семян валерианы лекарственной с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХс двумя способами детектирования. / А. Н. Ван и др. // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2017. - Т. 17. № 4.
127. Cunha S. Discrimination of vegetable oils by triacylglycerols evaluation of profile using HPLC/ELSD / S.Cunha, M. Oliveira // Food Chemistry. - 2006. - Т. 95, № 3.- P. 518-524.
128. Яшин Я. ВЭЖХ и ультра-ВЭЖХ: Состояние и перспективы / Я. Яшин и др. // Аналитика. - 2015.
129. Шаповалова Е.Н. / Е.Н. Шаповалова, А.В. Пирогов Хроматографические методы анализа Методическое пособие для специального курса. М. - 2007.
130. Olsson P. Separation of lipid classes by HPLC on a cyanopropyl column / P Olsson, J J Holmbäck, B. Herslöf // Lipids. - 2012. - P. 93 - 99.
131. Mondello L. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: A review / L. Mondello, P. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo // Mass Spectrom Rev. – 2008. – V. 27. – P. 101 - 124.

132. Beppu F. Quantification of triacylglycerol molecular species in cocoa butter using HPLC equipped with nano quantity analyte detector / F. Beppu, T. Nagai et al. // *J/ Oleo Sci.* - V.62, №10. - 2013. - P. 789 - 794.
133. Грибов Л.А. Введение в молекулярную спектроскопию. / Л.А. Грибов // М. - 1976.
134. Кросс А. Введение в практическую инфракрасную спектроскопию, пер. с англ. / А. Кросс // М. – 1961.
135. Rodrigueuz-Otero J. L. Determination of fat protein and total solids in cheese by near IR reflectance spectroscopy. // *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* №78 – 1995 - P. 802 – 807.
136. Lee M. H. Noninvasive short wave-length near IR spectroscopic method to exhibit the crude lipid content in the muscle of intact rainbow trout. // *J. Agric. Food Chem.* №40. - 1992. - P. 2176 – 2179.
137. Wold J. P. Atlantic salmon average fat content estimated by near IR transmittance spectroscopy. / J. P. Wold, T. Jøkebsen, and L. Krane // *J. Food Sci.* № 6. - 1996. -P. 74 - 78.
138. Biggs D. A. Milk analysis with the infrared milk analyzer. / D. A. Biggs // *J. Dairy Sci.* - №50. – 1967. -P. 799 - 803.
139. Voort F. R. Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. / F. R. Voort // *Food Res. Int.* №25.-1992.-P.397–403.
140. Gunstone F. D. Fatty Acid and Lipid Chemistry. / F. D. Gunstone // Blackie, London, UK, 1996.
141. Voort F. R. FTIR spectroscopy: The next generation of oil analysis methodologies / F. R. Voort, J. Sedman // *Inform.* - №11. - 2000. - P. 614 – 620.
142. Sedman J. Application of FTIR/ATR differential spectroscopy for monitoring oil oxidation and antioxidant efficiency. In: *Natural Antioxidants: Chemistry, Health, and Applications* (F. Shahidi, ed.). AOCS. - Press, Champaign, IL. – 1996. - P. 358 – 378.

143. Kates M. *Techniques of Lipidology*, 2nd ed. / M. Kates // Elsevier. - New York. - 1986.
144. David B. *Min Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* Second Edition, Revised and Expanded edited by Casimir C. Akoh The Univeristy of Georgia Athens, Georgia The Ohio State University Columbus, Ohio Copyright by Marcel Dekker, Inc. / B. David // All Rights Reserved. - 2002.
145. Zeeshan A. *Lipids Classification of Mangifera indica Kernel Fat*. A. Zeeshan, L. Hamid, M. Shahid, H. Shahnaz // *J. Chem. Soc. Pak.* - Vol. 31, №1. - 2009.
146. Sheri L. *Analysis of Triglycerides via LC and FTIR Using the LC-Transform Interface AN-19*/ L. S. Jordan, L. T. Taylor // Institute and State Department of Chemistry, Virginia Polytechnic.
147. Julia Kuligowski. *Direct determination of polymerized triglycerides in deep-frying olive oil by attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy using partial least squares regression*/ J. Kuligowski, G. Quintás, S. Garrigues, M. de la Guardia // Published online. Springer-Verlag. - 2010.
148. Siatis N.G. *Improvement of Biodiesel Production Based on the Application of Ultrasound: Monitoring of the Procedure by FTIR Spectroscopy* / N.G. Siatis, A.C. Kimbaris, // *Journal of the American Oil Chemists' Society.* - 2006. - Volume 83. – P. 53 - 57.
149. Alfred A. *Thermally Induced Isomerization of Trilinolein and Trilinoelaidin at 250 °C: Analysis of Products by Gas Chromatography and Infrared Spectroscopy*/ A. Alfred // *Lipids.* - №44. - 2009. - P. 1105 - 1112.
150. Hernandez-Martinez M. *Rapid characterization and identification of fatty acids in margarines using horizontal attenuate total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (HATR-FTIR)*/ M. Hernandez-Martinez [et al.] // *Eur. Food Res. Technol.* - 2010. - P. 321 - 329.

151. O'Connor R. T. The Infrared Spectra of Mono-, Di-, and Triglycerides/ R. T. O'Connor, E. F. Dupre, and R. O. Feuge. // J. Am Oil Chem. Soc. June 18 - 1954. - P. 88 – 93.
152. Che Man Y.B. Determination of Free Fatty Acids in Crude Palm Oil and Refined-Bleached-Deodorized Palm Olein Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy/ Y.B. Che Man, M.H. Moh // JAOCS. - № 76. - 1999. - P. 485 – 490.
153. Che Man Y.B. Determination of Iodine Value of Palm Oil by Fourier Transform Infrared Spectroscopy/ Y.B. Che Man, G. Setiowaty // JAOCS. - № 76. - 1999. - P. 693 – 699.
154. Gao F. Separation of phospholipids by capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet detection/ F. Gao, J. Dong, W. Li // J. Chromatogr. A. – 2006. – V. 1130. – P. 259 – 264.
155. Chen Y.L. Determination of lysophosphatidic acids by capillary electrophoresis with indirect ultraviolet detection / Y.L. Chen, Y. Xu // J. Chromatogr. B. – 2001. – V. 753. – P. 355 – 363.
156. Kalo P. Determination of Triacylglycerols in Butterfat by Normal-Phase HPLC and Electrospray–Tandem Mass Spectrometry/ P. Kalo, A. Kemppinen, V. Ollilainen. // Lipids. – 2009. -№ 44. - P. 169 – 195.
157. Акмурзина В.А. От анализа липидов к липидомике / В.А. Акмурзина, А.А. Селищева, В.И. Швец // Вестник МИТХТ. - 2012. - Т. 7, № 6.
158. Byrdwell W. C. The Bottom-Up Solution to the Triacylglycerol Lipidome Using Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry / W. C. Byrdwell // Lipids. - № 40. - 2005. - P. 383 – 417.
159. Matyash V. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics / V. Matyash, G. Liebisch, T.V. Kurzchalia // J. Lipid Res. – 2008. – V. 49. – P. 1137 - 1146.
160. Liebisch G. Glycerophospholipid identification and quantitation by electrospray ionization mass spectrometry // Methods in Enzymol. – 2007. – V. 432. – P. 21 – 57.

161. Biedermann W. Structural characterization of some fatty acids from the brain as biomarkers of BSE risk material / W. Biedermann, E. Luercker, J. Poerschmann // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2004. – V. 379. – P. 1031 – 1038.
162. Keller S. Determination of underivatized sterols and bile acid trimethyl silyl ether methyl esters by gas chromatography-mass spectrometry-single ion monitoring in feces / S. Keller, G. Jahreis // *J. Chromatogr. B.* – 2004. – V. 813. – P. 199 – 207.
163. Roessner U. High-resolution metabolic phenotyping of genetically and environmentally diverse potato tuber systems. Identification of phenocopies/ U. Roessner, L. Willmitzer, A.R. Fernie // *Plant Physiol.* – 2001. – V. 127. – P. 749 – 764.
164. Winder C.L. Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures: An evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites // *Anal. Chem.* – 2008. – V. 80. – P. 2939 – 2948.
165. Milne S. Lipidomics: An analysis of cellular lipids by ESI-MS / S. Milne, P. Ivanova, J. Forrester // *Methods.* – 2006. – V. 39. – P. 92 – 103.
166. Byrdwell W.C. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids / W.C. Byrdwell // *Lipids.* – 2001. – V. 36. – P. 327 – 346.
167. Rezanka T. Structural analysis of a polysaccharide from *Chlorella kessleri* by means of gas chromatography-mass spectrometry of its saccharide alditols/ T. Rezanka, K. Sigler // *Curr. Anal. Chem.* – 2007. – V. 52. – P. 246 – 252.
168. Eads T. M. NMR application to fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* - №65. - 1988. - P. 78 – 83.
169. Cornway T. F. Nuclear magnetic resonance for determining oil content of seeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* - №40. - 1963. - P. 265 – 268.

170. Alexander D. E. Analysis of oil content of maize by wide-line NMR. / D. E. Alexander, L. Silvela, I. Collins and R. C. Rodgers // J. Am. Oil Chem. Soc. - № 44. - 1967. - P. 555 – 558.
171. Collins I. Analysis of oil content of soybean by wide-line NMR. J. Am. Oil Chem. Soc. - № 44. - 1967. - P. 708 – 710.
172. Robertson J. A. Comparative study of methods of determining oil content of sunflower seed. / J. A. Robertson and W. R. Windham // J. Am. Oil Chem. Soc. - № 58. - 1981. - P. 993 – 996.
173. Min D. B. Crude fat analysis. In: Introduction to the Chemical Analysis of Foods (S. S. Neilson, ed.). / D. B. Min // Jones and Bartlett. – London. – 1994. - P. 81 – 192.
174. Bateman H. G. Method for extraction and separation by solid phase extraction of neutral lipids free fatty acids and polar lipid from minced microbial cultures. / H. G. Bateman, T. C. Perkins // J. Agric. Food Chem. - № 45. - 1997. - P. 132 – 134.
175. Schoolery J. N. Some quantitative applications of carbon-13 NMR spectroscopy. / J. N. Schoolery // Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectros. - № 11. - 1977. - P. 79 – 93.
176. Shiao T. Y. Determination of fatty acid composition of triacylglycerols by high resolution NMR spectroscopy. / T. Y. Shiao and M. S. Shiao // Bot. Bull. Acad. Sinica. - № 30. - 1989. - P. 191 – 199.
177. Ng S. <sup>13</sup>C NMR spectroscopic analysis of fatty acid composition of palm oil. J. / S. Ng and W. L. Ng // Am. Chem. Soc. - № 60. - 1983. - P. 266 – 268.
178. Wallenberg K. F. Quantitative high resolution <sup>13</sup>C NMR of the olefinic and carbonyl carbons of edible vegetable oils. / K. F. Wallenberg. // J. Am. Oil Chem. Soc. - № 67. - 1990. - P. 487 – 494.
179. David L. Acyl migration kinetics of 2-monoacylglycerols from soybean oil via <sup>1</sup>H NMR / L. David // J. Amer. Oil Chem. Soc. - 2007. - P. 343 – 348.

180. Falch E. Lipids from residual fish raw Material Quality assessment by advanced analytical methods/ E. Falch. // Doctoral Theses at NTNU. - 2005. - P. 238.
181. Gunstone F. D. The C-13 NMR spectra of oils containing linolenic acid. / F. D. Gunstone // Chem. Phys. Lipids. - № 56. - 1990. - P.201 – 207.
182. Gunstone F. D. High resolution NMR studies of fish oils. / F. D. Gunstone // Chem. Phys. Lipids. - 59. – 1991. - P. 83 – 89.
183. Aursand M. Positional distribution of 3 fatty acids in marine lipid triacylglycerols by high resolution 13C NMR spectroscopy. / M. Aursand, L. Jørgensen, H. Grasdalen // J. Am. Oil Chem. Soc. - № 72. - 1995. - P. 293 – 297.
184. Haase A. Introduction to NMR imaging. / A. Haase // Trends Food Sci. Technol. - № 3. - 1992. - P. 206 – 207.
185. Halloin J. M. Proton magnetic resonance imaging of lipids of pecan embryos. / J. M. Halloin // J. Am. Oil Chem. Soc. - № 70. - 1993. - P. 1259 – 1262.
186. Simoneau C. Measurement of fat crystallization using NMR imaging and spectroscopy. Trends Food Sci Technol. - № 3. - 1992. - P. 208 – 211.
187. Heil J. R. Use of magnetic resonance procedures for measurement of oils in French-style dressings. / J. R. Heil, W. E. Perkins, M. J. McCarthy // J. Food Sci. - № 55. - 1990. - P. 763 – 766.
188. Pilhofer G. M. Functionality of milk fat in foam formation and stability. / G. M. Pilhofer [et al.] // J. Dairy Sci. - № 77. - 1994. - P. 55 – 60.
189. Tingely J. M. Magnetic resonance imaging of fat and muscle distribution in meat. / J. M. Tingely [et al.] // Int. J. Food Sci. Technol. - № 30. - 1993. - P. 437 – 441.
190. Singh R. P. Heat and mass transfer in foods during deep fat frying. / R. P. Singh // Food Technol. - № 49. - 1995. - P. 134 – 137.
191. Gunstone F. D. NMR of lipids. In: Annual reports on NMR. / F. D. Gunstone // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1993.

192. Webb G. A. NMR in context In: Annual Reports on NMR Spectroscopy / G. A. Webb, P. S. Belton, M. J. McCarthy // Academic Press. - New York. - 1995. - P. 219.
193. Gunstone F. D. High resolution  $^{13}\text{C}$  NMR. A technique for the study of lipid structure and composition. / F. D. Gunstone // Prog. Lipid Res. - № 33. - 1994. - P. 19.
194. Bus J. F.  $^{13}\text{C}$ -NMR of methyl, methylene and carbonyl carbon atoms of methyl alkenoates and alkynoates. / J. Bus, I. Sies, M. S Lie-Ken-Jie // Chem. Phys. Lipids. - № 17. - 1976. - P. 501.
195. Pfeffer R. E. Analytical  $^{13}\text{C}$ -NMR: A rapid, nondestructive method for determining the cis, trans composition of catalytically treated unsaturated lipid mixtures. / R. E. Pfeffer, R. E. Luddy, and J. Unruh // J. Am. Oil Chem. Soc. - № 54. - 1977. - P. 380.
196. McDonald R. E. Identification of trans-diene isomers in hydrogenated soybean oil by gas chromatography, silver nitrate–thin layer chromatography, and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. // J. Agric. Food Chem. - 37. - 1989. - P. 637.
197. Mazzola E. P.  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectral confirmation of 6 and 7 trans-18:1 positional isomers. // J. Am. Oil Chem. Soc. - № 74. - 1997. - P. 1335 – 1337.
198. Дейнека В. И. Обращенно-фазовая ВЭЖХ в анализе масел с радикалами конъюгированных октадекатриеновых кислот / В. И. Дейнека и сопр. // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2005. - Т.5(4). - С. 507 – 517.
199. Фрейман Р.Э. Триеновая кислота из масел растений Ranunculaceae / Р.Э. Фрейман, А.Л. Маркман // Химия природных соединений. 1970. - №2. - С. 167 – 169
200. Дейнека В.И. Анализ растительных масел методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии / В. И. Дейнека, Л.А. Дейнека // Журн. аналит. химии. - 2004. - Т. 59. №9. - С. 895 – 898.

201. Kapoulas V. M. Detection of virgin olive oil adulteration with refined oils by second-derivative spectrophotometry / V. M. Kapoulas [et al.] // *Food Chemistry*. - № 23. - 1987. - P. 183.
202. Andrikopoulos N. K. HPLC Analysis of Phenolic Antioxidants, Tocopherols and Triglycerides. / V. M. Kapoulas, N. K. Andrikopoulos // *JAOCS*. - 1991. - P. 68.
203. Schuster R. Multicomponent Analyses of Fats and Oils Using Diode-Array Detection, Hewlett-Packard/ R. Schuster // *HPLC Application*. – No. 12.- 1988. – P. – 5954 - 6269.
204. Christina Bauer-Plank. Analysis of Triacylglyceride Hydroperoxides in Vegetable Oils by Nonaqueous Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection/ C. Bauer-Plank, L. Steenhorst-Slikkerveer. // *JAOCS*. - № 77. - 2000. - P. 477 – 482.
205. Vishwanath P. New Method for Spectrophotometric Determination of Triglycerides. / P. Vishwanath, J. Robert // *JAOCS*. – 1984. - P.61.
206. Kovats E. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil. Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. / E. Kovats // *Helv. Chim. acta*. - 1958. - P. 41.
207. Вигдергауз М.С. Развитие методов количественной интерпретации хроматограмм сложных смесей / М.С. Вигдергауз, И.М. Краузе // *Журн. аналит. химии*. - 1986. - Т. 41. № 11. - С. 2064 - 2074.
208. Ткачев А.В. Исследование летучих веществ растений / А. В. Ткачев. Новосиб. изд. «Офсет». - 2008г. – С. 969.
209. Набивач В.М. Использование корреляционных уравнений для предсказания величины удерживания в газовой хроматографии/ В. М. Набивач, В. П. Дмитриков // *Успехи химии*. - 62 (1). - 1993.
210. 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 // *J. Chromatogr.* - 1989. - V. 482. - P. 215 – 226.

- 211.Зенкевич И. Г. / Всероссийский симпозиум «Хроматография в химическом анализе и физико-химических исследованиях». 23 - 27 апреля 2007 г. Москва-Клязьма. Тезисы. №3.
- 212.Catharino R.R. Characterization of Vegetable Oils by Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting: Classification, Quality, Adulteration, and Aging / R.R. Catharino // *An. Chem.* - 2005. - V. 77. - P. 7429 – 7433.
- 213.Дейнека В.И. Инкрементный подход при определении состава триглицеридов. / В.И. Дейнека, В.М. Староверов, Г.М. Фофанов, Л.Н. Балятинская // *Журн. Хим.-фарм.* - 2002. - Т.36. №7. - С. 44 - 47.
- 214.Дейнека В.И. Использование обращено-фазовой ВЭЖХ в установлении подлинности жиров и масел / В.И. Дейнека [и сотр.] // *Зав. лаб.* - 2008. - Т.74, №3. - С. 15 - 19.
- 215.Дейнека В.И. Анализ растительных масел с использованием ВЭЖХ. / В.И. Дейнека и сотр. // *Журн. аналит. химии.* - 2003. - Т.58, №12. - С. 1294 - 1299.
- 216.Дейнека В.И. Инкрементный подход в расчете жирнокислотного состава триглицеридов. / В.И. Дейнека и сотр. // *Хранение и переработка сельхозсырья.* - 2002. - №11. - С. 20 - 23.
- 217.Дейнека В.И. Идентификация жирных кислот в составе триглицеридов масел семян растений с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ / В.И. Дейнека и сотр. // *Растительные ресурсы.* - 2004. - Т.40, №1. - С. 104 - 112.
- 218.Шатц В.Д. Высокоэффективная жидкостная хроматография./ В.Д. Шатц, О.В Сахартова // Рига: ЗИНАТНЕ. - 1988. - С. 390.
- 219.Курбатов С. В. Топологические индексы в химических расчетах - учебное пособие / С. В. Курбатов и сотр // Изд. «Самарский университет». - 2014. – С. 32.
- 220.Podlaha O. High Resol. Chromatogr.// *J. Chromatogr.* - 1982. - V. 5. - P. 553.
- 221.Miller R.W. Composition of Celastrus orbiculatus seed oil. / R.W. Miller [et al.] // *Lipids.* - 1974. - V.9. - P. 528.

222. Туртыгин А. В. Масла с конъюгированными двойными связями. Масла косточек вишен и родственных родов семейства Rosaceae / А. В. Туртыгин и соавт. // Науч. Ведомости БелГУ С. Естественные науки. 2010. - № 21 (92). - Выпуск 13. - С. 135 - 142.
223. Дейнека В.И. Метод относительного анализа удерживания: обращенно-фазовая ВЭЖХ триглицеридов / В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, А.В. Туртыгин // Сорбц. и хроматогр. процессы. -2008.- Т.8, Вып.3.- С.465-477.
224. Дейнека В.И.. Метод относительного анализа удерживания в ВЭЖХ. Сопоставление инкрементных зависимостей / В.И. Дейнека // Ж. физ. химии. - 2006. - Т. 80., №4. - С. 704 - 708.
225. Дейнека В.И. Метод анализа относительного удерживания в ВЭЖХ. Определение, применения и роль параметра  $I_{gP}$  системы н-октанол – вода. / В. И. Дейнека // Ж. физ. химии. - 2006. - Т. 80.- №6 - С. 1083 - 1088
226. Дейнека В.И. Экспериментальное обоснование метода относительного анализа удерживания в ВЭЖХ / В.И. Дейнека // Ж. физ. химии. - 2006. - Т. 80 -. №3. - С. 507 - 510.
227. Дейнека В.И. Карта хроматографического разделения и инкрементные зависимости в методе относительного анализа удерживания в ВЭЖХ / В.И. Дейнека // Ж. физ. химии. - 2006. - Т. 80. - №3 -. С. 511 - 516.
228. Дейнека В.И. Обращенно-фазовая ВЭЖХ в анализе растительных масел. Метод контроля подлинности и установления фальсификации облепихового масла / В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, В.Н. Сорокопудов // Хим.-фарм. ж. - 2009. -. Т.43, № 1. - С. 33 - 36.
229. Blangino E. Viscosity of Three Biodiesel Fuels: Experimental Data vs. Prediction Models / E. Blangino, S. D. Romano // Advanced Materials Research. - 2011. - Vol. 236-238.
230. Durrett T.P. Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. / T.P. Durrett, C. Benning, J. Ohlrogge // Plant J. - 2008. - V. 54 - P. 593 – 607.

231. Kleiman R. (S)-1,2-diacyl-3-acetins: Optically active triglycerides from *Euonymus verrucosus* seed oil / R. Kleiman R.W. and [et.al.] // *Lipids*. - 1966. - V.1. - P. 286.
232. Kleiman, R. Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Methyl Esters of Unsaturated Oxygenated Fatty Acids / R. Kleiman, G.F.Spencer // *J. Am. Oil Chem. Soc.* - 1973. - P. 50, 31 – 38.
233. Трусов Н. А. / Н. А. Трусов Автореф канд. биол. наук. Москва. - 2010. – С. 20.
234. Туртыгин А.В. Определение моноацетил-диацилглицеролов масел семян растений семейства Celastraceae/ А.В. Туртыгин, В.И. Дейнека, и сотр // *Аналитика и контроль*. - 2012. - Т. 16. - № 1.
235. Cunnane S.C. High alpha-linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans / S.C. Cunnane [et al.] // *Br. J. Nutr.* - 1993. - 69(2). - P. 443 - 453.
236. Kapoor R. Gamma linolenic acid: an antiinflammatory omega-6 fatty acid / R. Kapoor, Y.S. Huang // *Curr. Pharm. Biotechnol.* - 2006. 7(6). - P. 531 - 534.
237. Lee A.R. Pinolenic Acid Downregulates Lipid Anabolic Pathway in HepG2 Cells/ A.R. Lee, S.N Han // *Lipids*. - 2016. - № 51(7). - P. 847 - 855.
238. Longman A. J. An unusual desaturase in *Aquilegia vulgaris* / A. J. Longman and [et al.] // *Biochem. Soc. Trans.* - 2000.- 28(6). - P. 641 - 643.
239. Ефремов А.А. Перспективы малотоннажной переработки кедровых орехов в продукты пищевого и технического назначения / А. А. Ефремов // *Химия растительного сырья*. - 1998. - №3. - С. 83 - 86.
240. Zadernowski R. Chemical composition of *Pinus sibirica* nut oils/ R. Zadernowski, M. Naczek, S. Czaplicki // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* -2009,- №. 111.-P. 698–704.
241. Skakovskii E. D. NMR Analysis of oils from pine nuts. (*Pinus sibirica*) and seeds of common pine (*Pinus silvestris* L.) / E. D. Skakovskii, L. Yu. Tychinskaya [ et al.]//*Journal of Applied Spectroscopy*. - Vol. 74, No. 4. - 2007.

242. Дейнека В. И. Инкрементный подход при определении состава триглицеридов / В.И. Дейнека [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. - 2002. - Т. 36, № 7. - С. 44 - 47.
243. Дейнека В. И. Обращенно-фазовая ВЭЖХ в анализе масел с радикалами конъюгированных октадекатриеновых кислот. // Сорбц. хроматографич. проц. - 2005. - Т.5(4). - С. 507.
244. Дейнека В. И. Сопоставление эффективности методов ГЖХ и ВЭЖХ при дифференциации растительных масел, содержащих изомеры октадекатриеновых кислот / Дейнека В. И., Туртыгин А. В., Дейнека Л. А. // Аналитика и контроль. - 2016. - Т. 20, № 4. - С. 314 – 319.
245. Костенко М.О. Инкапсулирование антоцианов плодов бузины черной методом распылительной сушки. / М.О. Костенко, В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека. // Химия растительного сырья. - 2006. - №3. - С. 21.
246. Зинченко А. А. Стандартизация каротинсодержащих препаратов «Масло облепиховое» и «Аекол» // Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармакология. - 2005. - №2. - С. 64 - 70.
247. Туртыгин А. В. Определение состава триацилглицеринов в маслах семян граната методами обращенно-фазовой ВЭЖХ и спектрофотометрии / А. В. Туртыгин, В. И. Дейнека, Л. А. Дейнека // Ж. Анал. Хим. – 2013. - том 68, № 6. - С. 619 – 624.
248. ГОСТ 31757-2012 Масла растительные, жиры животные и продукты их переработки. Определение содержания твердого жира методом импульсного ядерно-магнитного резонанса.
249. Дейнека В. И. Применение обращенно-фазовой ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием для обнаружения фальсификации сливочного масла. / В.И. Дейнека [и сотр.] // Методы оценки соответствия. – 2007. - №6. – С. 10 – 11.
250. ГОСТ 32261-2013 Масло сливочное. Технические условия.
251. ГОСТ 31979-2012 «Молоко и молочные продукты. Метод обнаружения растительных жиров в жировой фазе газожидкостной хроматографией стеринов».

252. Индина И.В. Обращенно-фазовая ВЭЖХ в определении подлинности масла какао в шоколаде / И.В. Индина, А.В. Туртыгин, В.И. Дейнека, Дейнека Л.А. // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2013. - Т.13. Вып.1. - С. 23 - 32.
253. El-Hamdy A.H. High Performance reversed phase chromatography of Natural triglyceride mixtures: Critical pair separation. / A.H. El-Hamdy, Perkins E.G. // J. Amer. Oil Chem. Soc. – 1981. - Vol. 58. - P. 867 - 872. <https://doi.org/10.1007/BF02672960>.
254. Nguyen Van Anh. Determination of Sapium discolor seed oil estolides and triacylglycerines: Comparison of the substances separation by conventional and microcolumn (Milichrome A-02) chromatography. / Van Anh Nguyen Deineka V.I., Deineka L.A. / Vestnik VGU. Ser. Himiya. Biologiya. Farmaciya. – 2019. - № 1. - P. 20 - 26.
255. Martin A.J.P. A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. / A.J.P. Martin, R. L. M. Synge / Biochem. J. – 1941. - Vol. 35. - P. 1358 - 1368. doi: 10.1042/bj0351358.
256. Deineka V.I., Russ. J. Phys. Chem. A. – 2019. - Vol. 78(1). - P. 91 - 93.
257. Дейнека В.И. Использование MS Excel для обработки неразделенных пиков на хроматограммах / В.И. Дейнека, А.В. Туртыгин, Ван Ань Нгуен, Е.Ю. Олейниц, Л.А. Дейнека // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2020. - Т. 20. № 2. - С. 249-256.
258. Дейнека В.И. Использование MS Excel при обработке пиков триацилглицеринов на хроматограммах растительных масел. / В.И. Дейнека, А.В. Туртыгин, Ван Ань Нгуен, Е.Ю. Олейниц, Л.А. Дейнека // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2020. - Т. 20. № 2. - С. 257 - 265.

## Приложение 1

Таблица 1. Название жирных кислот, образующих природные триглицериды

условное обозначение	Название по женеvской номенклатуре	Название жирных кислот по тривиальной номенклатуре
C <sub>4:0</sub>	Бугановая	Масляная
C <sub>5:0</sub>	Пентановая	Валерьяновая
C <sub>6:0</sub>	Гексановая	Капроновая
C <sub>7:0</sub>	Гептановая	Энантовая
C <sub>8:0</sub>	Октановая	Каприловая
C <sub>9:0</sub>	Нонановая	Пеларгоновая
C <sub>10:0</sub>	Декановая	Каприновая
C <sub>12:0</sub>	Додекановая	Лауриновая
C <sub>14:0</sub>	Тетрадекановая	Миристиновая
C <sub>16:0</sub>	Гексадекановая	Пальмитиновая
C <sub>17:0</sub>	Гептадекановая	Маргариновая
C <sub>18:0</sub>	Октадекановая	Стеариновая
C <sub>20:0</sub>	Эйкозановая	Арахиновая
C <sub>22:0</sub>	Докозановая	Бегеновая
C <sub>24:0</sub>	Тетракозановая	Лигноцериновая
C <sub>26:0</sub>	Гексакозановая	церотиноваяс
C <sub>27:0</sub>	Гептакозановая	carboceric
C <sub>28:0</sub>	Октакозановая	montanic
C <sub>30:0</sub>	triacontanoic	melissic
C <sub>32:0</sub>	dotriacontanoic	lacceroic
C <sub>33:0</sub>	Tritriacontanoic	ceromelissic (psyllic)
C <sub>34:0</sub>	tettriacontanoic	geddic
C <sub>35:0</sub>	pentatriacontanoic	ceroplastic
C <sub>10:1(n-6)</sub>	цис-4-деценовая	obtusilic
C <sub>10:1(n-1)</sub>	цис-9- деценовая	caproleic
C <sub>12:1(n-7)</sub>	цис-5-lauroleic	lauroleic
C <sub>12:1(n-8)</sub>	цис-4-додеценовая	linderic
C <sub>14:1(n-5)</sub>	цис-9-тетрадеценовая	myristoleic

C <sub>14:1(n-9)</sub>	цис -5- тетрадеценовая	physeteric
C <sub>14:1(n-10)</sub>	цис -4-тетрадеценовая	tsuzuic
C <sub>16:1(n-7)</sub>	цис -9-гексадеценовая	Пальмитолеиновая
C <sub>16:1(n-10)</sub>	цис -6- гексадеценовая	sapienic
C <sub>18:1(n-12)</sub>	цис -6-октадеценовая	Петрозелиновая
C <sub>18:1(n-9)</sub>	цис -9- октадеценовая	Олеиновая
C <sub>tr18:1(n-9)</sub>	транс-9- октадеценовая	elaidic
C <sub>18:1(n-7)</sub>	цис -11- октадеценовая	vaccenic (asclepic)
C <sub>20:1(n-11)</sub>	цис -9-эйкозеновая	gadoleic
C <sub>20:1(n-9)</sub>	цис -11-эйкозеновая	Гондоиновая
C <sub>22:1(n-11)</sub>	цис -11-докозеновая	cetoleic
C <sub>22:1(n-9)</sub>	цис -13- докозеновая	Эруковая
C <sub>24:1(n-9)</sub>	цис -15- тетракозеновая	nervonic селахолевая
C <sub>18:2(n-6)</sub>	9,12-октадекадиеновая	Линолевая
C <sub>20:2</sub>	эйкозадиеновая	Эйкозадиеновая
C <sub>20:2</sub>	эйкозадиеновая	Эйкозадиеновая
C <sub>18:3(n-6)</sub>	6,9,12- октадекатриеновая	g- Линоленовая
C <sub>18:3(n-3)</sub>	9,12,15- октадекатриеновая	а- Линоленовая
C <sub>20:3(n-6)</sub>	8,11,14-eicosatrienoic	dihomo-g-linolenic
C <sub>20:3 (n-9)</sub>	5,8,11-eicosatrienoic	Mead acid
C <sub>18:4(n-3)</sub>	6,9,12,15-octadecatetraenoic	stearidonic
C <sub>20:4(n-6)</sub>	5,8,11,14-eicosatetraenoic	Арахидоновая arachidonic
C <sub>22:4(n-6)</sub>	7,10,13,16-docosatetraenoic	-
C <sub>20:4(n-3)</sub>	8,11,14,17-eicosatetraenoic	
C <sub>20:5(n-3)</sub>	5,8,11,14,17-eicosapentaenoic	EPA
C <sub>22:5(n-6)</sub>	4,7,10,13,16- docosapentaenoic	
C <sub>22:5(n-3)</sub>	7,10,13,16,19- docosapentaenoic	DPA
C <sub>22:6(n-3)</sub>	4,7,10,13,16,19- docosahexaenoic	DHA
C <sub>24:6(n-3)</sub>	6,9,12,15,18,21-tetracosenoic	nisinic

## Приложение № 2

**Таблица 2. Условия разделения липидов при помощи ТСХ**

№		Тип пластины	ПФ	Примечания
1	Липиды	силикагель	петролейный эфир (35 - 45°C) и бензола (4:7)	При этом фосфолипиды оставались в исходном положении, а за ними в порядке возрастания величин Rf следовали свободные кислоты, холестерин, триглицериды и эфиры холестерина [95]
	Полярные липиды	Merck, Darmstadt	Хлороформ/метанол/уксусная кислота /деионизированная вода  (170:30:20:7)	[95]
	Липиды		петролейного эфира (60-70 °C) и диэтилового эфира (92:8)	[95]
	Полярные липиды		смесью этилового эфира с метанолом (1:1)	[95]
	Неполярные липиды	силикагель	гексан - диэтиловый эфир - уксусная кислота (70:30:1)	[95], [100]
	Липиды сыворотки крови		петролейного эфира (50 - 70°C), метилэтилкетона и уксусной кислоты (95:4:1); с увеличением концентрации метилэтилкетона в смеси до соотношения 84:15:1 разделение улучшалось.	[95]

	Липиды, растительного масла		гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота; соотношение компонентов в смеси менялось в пределах от 90:10:1 до 60:40:2	Образцы, нанесенные в виде пятен на хроматографические пластинки с силикагелем, элюировали три или четыре раза в одном и том же направлении  [95], [107], [109]
	Липиды сыворотки крови		хлороформ – метанол - уксусная кислота - вода (25 : 10 : 3 : 2)	[95]
	Сыворотки крови нейтральных липидов		смесь гексан - диэтиловый эфир - уксусная кислота (165:15:1)	[95]
	Липиды, растительного и животных жиров		петролейный эфир (60 - 70°C) - диэтиловый эфир - уксусная кислота (90:10:1)	[95]
	Липиды	Silica gel G	метилацетат / изопропанол / хлороформ/метанол/0. 25% водный KCl (25:25:25:10:9, об.)  изогексан / диэтиловый эфир / уксусная кислота (85:15:1, об.)	две трети расстояния в первом составе ПФ.  После высыхания, пластинка была обработана обугливанием при 160 ° C в течение 15 минут после опрыскивания 3% водного ацетата меди  105
			петролейный эфир (60 - 70°C) - диэтиловый эфир - уксусная кислота (70:30:2)	разделяли касторовое и оливковое масла  [95]
	Жирные кислоты	Merck, Darmstadt	Хлороформ/метанол/д ионизированная вода	Определение в йодной камере

	фосфолипиды		65:25:4	[95]
	ТГ в молоке	silica-gel G type linear-K6, Whatman, Mardstone, UK).	Гексан/диэтиловый эфир/уксусная кислота (75:25: 1)	Проявлены 0.2% раствором 2',7'-dichlorofluorescein (дихлорфлуоресцеина) в этиловом спирте в УФ свете. [96]
	Неполярные ТГ		Mangold & Malins (1960) использовали гексан /диэтиловый эфир/ уксусная кислота (90 : 10 : 1.)	Обнаружение: пары йода, нагревание при 220 С, опрыскивание 50% серной кислотой, опрыскивание реагентами Stahl,1962; Dittmer & Lester, 1964; Siakotos & Rouser, 1965)
	Полярные Липиды		хлороформ/метанол/7 М -гидроксид аммония (65: 30: 4., по объему) в первом направлении, и хлороформ / метанол / уксусная кислота / вода (170: 25: 25: 4)	[100]
	Липиды	Silica gel G	хлороформ/метанол/ 30% -гидроксид аммония/вода 60: 35: 5: 2,5	Активированы при 105 С в течении 2 часов [107]
	Липиды	Al2O3	смесью петролейного и диэтилового эфиров (95:5)	удаётся разделить эфиры холестерина и триглицериды [98]
			смесью петролейный эфир - диэтиловый эфир - уксусная кислота (94,5:5:0,5)	свободные жирные кислоты, фосфолипиды и холестерин [95]
	Живогтные липиды	Silica gel G	Chloroform–methanol–water, 25:10:1	[99], [102]
		Silica gel H	Chloroform–methanol–acetic acid–water, 25:15:4:2	[99]

		Silica gel H	First developing system, pyridine–hexane, 3:1, v/v and second developing system, chloroform–methanol–pyridine–2 M ammonia, 35:12:65:1	[99]
	Растительные липиды	Silica gel G	Acetone–acetic acid–water, 100:2:1	[100]
		Silica gel G	Diisobutyl ketone–acetic acid, 40:25:3.7	[99]
	ТГ	Silica gel G	Гексан/диэтиловый эфир/уксусная кислота 80:20:2	[98], [99]
	Растительные липиды	Silica gel G	Benzene–diethyl ether–ethyl acetate–acetic acid, 80:10:10:0.2	[98], [99]
	Животные липиды	силикагель	петролейный эфир - диэтиловый эфир - уксусная кислота (85:15:1.5)	течение как минимум 1 час камера насыщалась парами растворителя [108]
	Эфирные масла	TLC Sil G F254 and HPTLC Sil G F254	толуол-этилацетат (93:7)	[109]
	Partial acylglycerol	Silica gel G 5% борной кислоты	Хлороформ ацетон 96:4	[99]
	Neutral plasmalogens	Silica gel G	Гексан- диэтиловый эфир, 95:5 (первый элюент)	[101]

			Гексан- диэтиловый эфир 80:20,	
	Полярные липиды	60 G254, Merck	хлороформ - метанол – вода (65:25:4)	[98]
	ТГ	силикагель, пропитанный нитратом серебра	смесь бензола и эфира (4:1)	[95]
		кизельгур, и сульфат кальция	Изопропанол-ацетонитрила, взятых в соотношении 3:2, насыщенную на 80 % , 0,5 % брома.	Отделение ТГ разной степени насыщенности [95]
		60 G, Merck	1,0-2,5% (об / об) метанолом в хлороформе,	в зависимости от различий в степени их ненасыщенности AgNO <sub>3</sub> -TLC [102]
	Моно- и диглицериды	силикагель	н-гексан— диэтиловый эфир— уксусная кислота— метанол (90 : 20 : 2 : 3)	диглицериды были разделены на две группы: 1,2- и 1,3-изомеры [100]
	моно-, ди- и трипальмитин	силикагель	смесью скеллизольва F и эфира (7:3)	[95]
	1,2-дистеарин от 1,3-дистеарина	силикагель	скеллизольва F и эфира в соотношении 3:2	[95]
	1- и 2-моноглицериды с помощью	силикагель	петролейный эфир (60 - 80°C) - диэтиловый эфир (9:1)	добавляя по каплям диэтиловый эфир, с тем чтобы состав подвижной фазы постепенно менялся и

	метода градиентного элюирования			конечное соотношение компонентов составляло 2:3
			тетрахлорид углерода – хлороформ - уксусная кислота (60: 40 : 0,5)	Добавляли Этиловый спирт от 0 до 1,5%
	1- и 2- моноглицери ды с помощью метода градиентного элюирования	оксиапатита	метилизобутилкетон	при 10°C
2	Диеновые и триеновые эфиры жирных кислот	0.25 mm Kieselgel 60 (20x20 cm, Merck, Darmstadt)	Н- гептан:диэтиловый эфир 7:3	[95]
	Тетраеновые эфиры жирных кислот		Гексан/диэтиловый эфир 8:2	Подготовка пластины к работе: 10% растворе нитрата серебра в течении 30 мин, затем просушиваю в темноте в токе горячего воздуха [112]
	Разделение цис- транс- изомеров метиловых эфиров моноеновых кислот	0.25 mm Kieselgel 60 (20x20 cm, Merck, Darmstadt)  AgNO <sub>3</sub>	н- гептан:диэтиловый эфир 9:1	Подготовка пластины к работе: выдерживают пластины в 20% растворе нитрата серебра в течении 20 мин, затем просушиваю в темноте в токе горячего воздуха [112]

### Приложение 3

Таблица 3. Условия разделение масел и жиров методом ГЖХ

	Образец	колонка	НФ	ПФ	Источники
1	Сливочное масло	15 m 0.25 mm; 0.1 mm	PhMeSi 65%	H2	[40]
2	Смесь синтетических ТАГ	25 m 0.32 mm; 0.25 mm	DiMeSi	He	[59]
3	Пальмовое масло	25 m 0.25 mm; 0.1 mm	DiMeSi	H2	[42]
4	Пальмовое, хлопковое, соевое масла	25 m 0.25 mm; 0.12 mm	PhMeSi 50%	H2	[45]
5	Оливковое масло	25 m 0.25 mm; 0.1 mm	CB-TAP, PhMeSi	He	[36]
6	Плазма крови	25 m 0.25 mm; 0.12 mm	PhMeSi 50% RSL-300	H2	[61]
7	Сливочное масло	25 m 0.25 mm; 0.1 mm	PhMeSi 65% PU 4550/11	H2	[62]
8	Пальмовое масло	15 m 0.53 mm; 0.1 mm	PhMeSi 65%	He	[38]
9	Оливковое, соевое масло	25 m 0.25 mm; 0.1 mm	PhMeSi 50% OV-1o	H2	[37]

10	Плазма крови	25 m60.25 mm; 0.1 mm	PhMeSi 65% Quadrex 400	He	[64]
11	Арахисовое, оливковое,	25 m60.25 mm; 0.1 mm	PhMeSi 50% OV-1o-OH	H <sub>2</sub>	[60]
12	Козий жир	2.5 m60.25 mm; 0.1 mm	PhMeSi 65% RTx-65	He	[68]
13	Hydrocarbons	0.25 мм x 30 м x  0.25 мкм	DB-5	He	[76]
14	Метилловые эфиры подсолнечного масла	50 м x  0.25 мм  x 0.2 мкм	CPT <sup>TM</sup> -Sil 88	He	[77]
15	Сливочное масло	50 cm x 2 mm	Packed column  3% OV-1 on 100 120 mesh GasChromQ	H <sub>2</sub>	[79]
16	Сливочное масло	5 m x 0.5 mm UltiMetal column	Capillary column  HT-SimDist CB, df = 0.15 ~tm (Chrompack)	H <sub>2</sub>	[79]
17	Липиды	25 m x 0.25 mm i.d. x 0.1 mm	65% phenyl-35% dimethyl- polysiloxane  stationary phase  TAP column, Chrompack, Middelburg,  The Netherlands	He	[80]
18	ТАГ	----		He	[80]

19	ДАГ	25 m x 0.25 mm i.d. x 0.1 mm	TAP	He	[80]
20	ДАГ	25 m x 0.32 mm i.d. x 0.1 mm	SE52 (неполярная)	He	
21	МАГ		TAP (полярные)	He	[80]
22	ЖК (метиловых эфиров)	30 m x 0.25 mm i.d. x 0.2 mm	OV 275, 285 полярные	He	[80]
23	ЖК (метиловых эфиров)	15 m x 0.32 mm x 0.2 mm	Carbowax20M	He	[80]
24	Метилвые эфиры жирных кислот	25 mx0.25 mm 0.20 $\mu$ m	CP-Wax 58 CB (Chrompack)	H <sub>2</sub>	[81]
25	Метилвые эфиры жирных кислот	60 m x 0.25 mm, 0.20 мкм	TR-CN100	Nitrogen	[82]
26	Биотопливо Смесь моно-, ди-, триацилглицеролов и кислот	10 m x 0.32 mm (id) x 0.1 $\mu$ m	Varian Select™ Biodiesel for Glycerides	He H <sub>2</sub>	[83]
27	Метилвые эфиры	60m x 0.25 mm i.d.,	CP-Sil 5 CB	He	[78]
28	picolinyl esters	0.25 $\mu$ m	low bleed MS		[78]
29	hydrocarbons				[78]

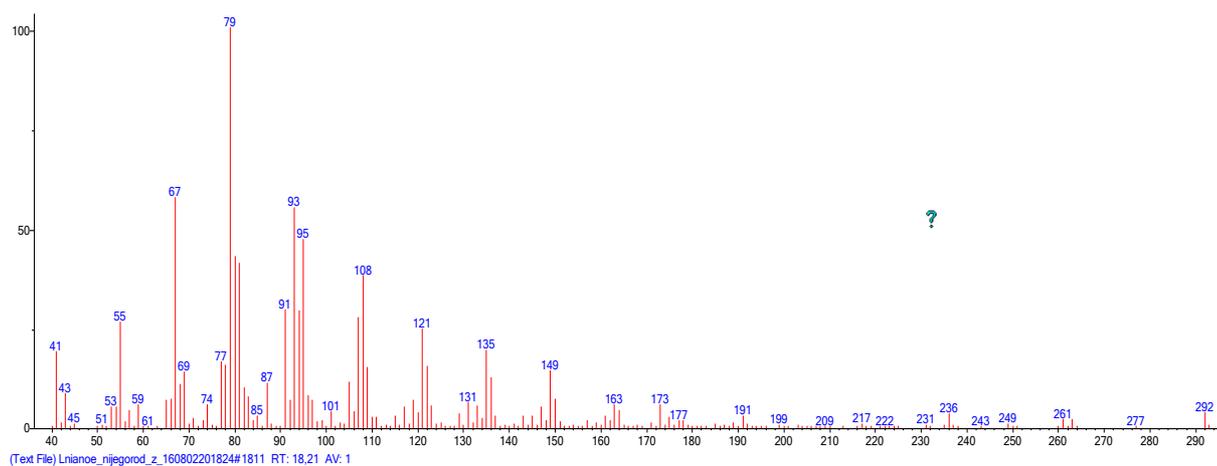


Рис.1. Масс-спектр метилового эфира линоленовой кислоты C18:3<sup>A9,12,15</sup>

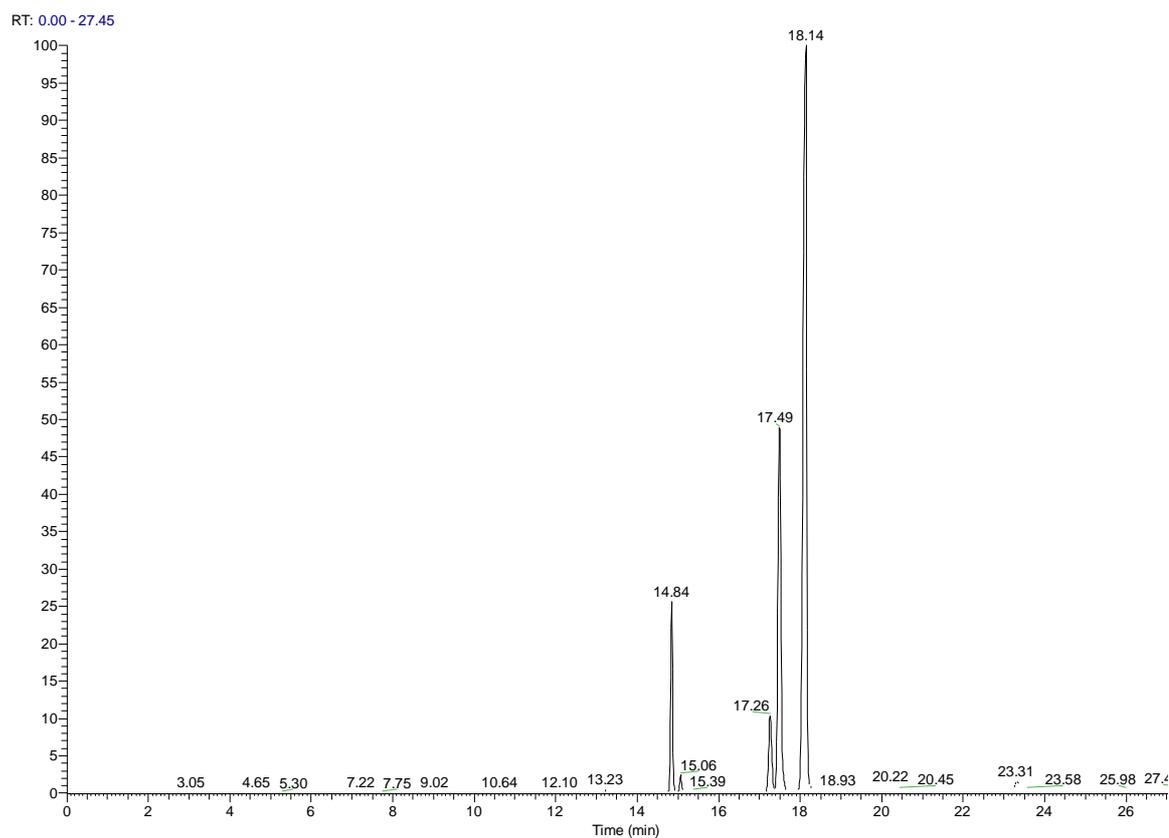


Рис.2. Хроматограмма метиловых эфиров фальсифицированного масла облепихи.

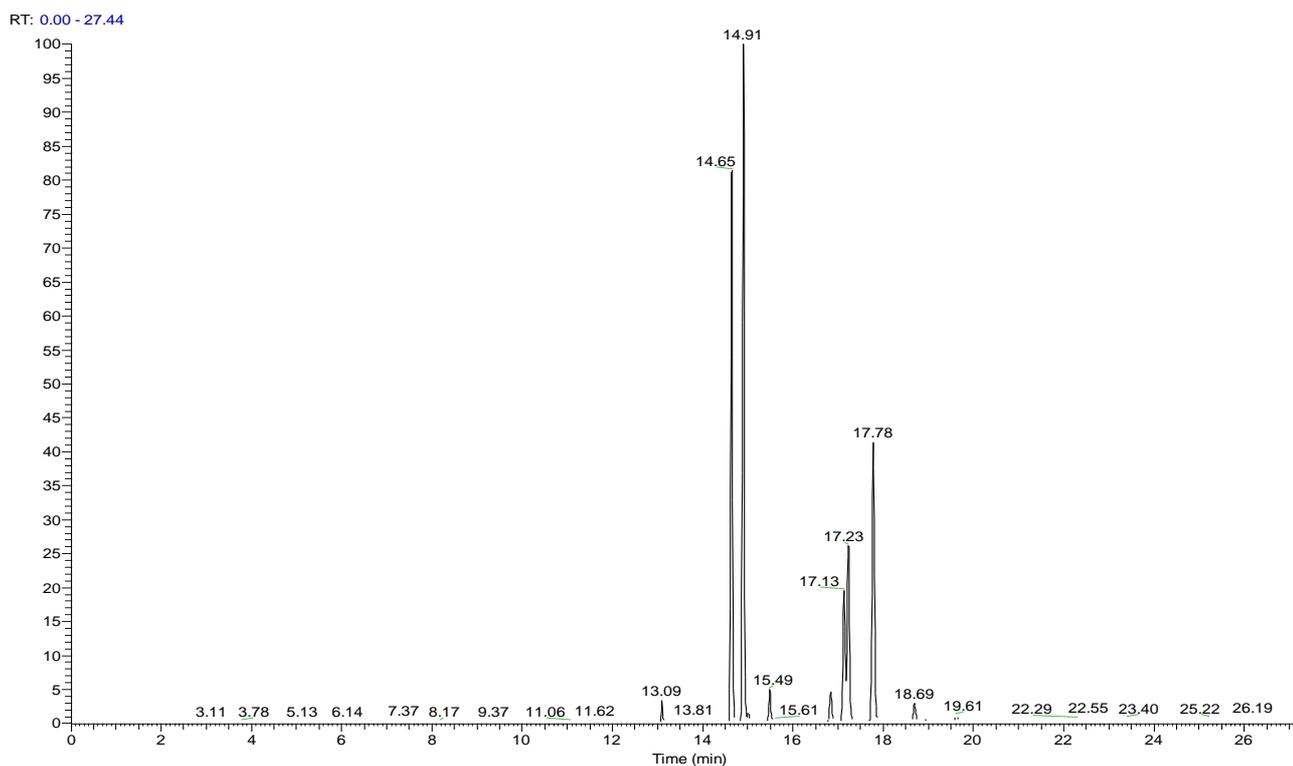


Рис.3. Хроматограмма метиловых эфиров масла облепихи.

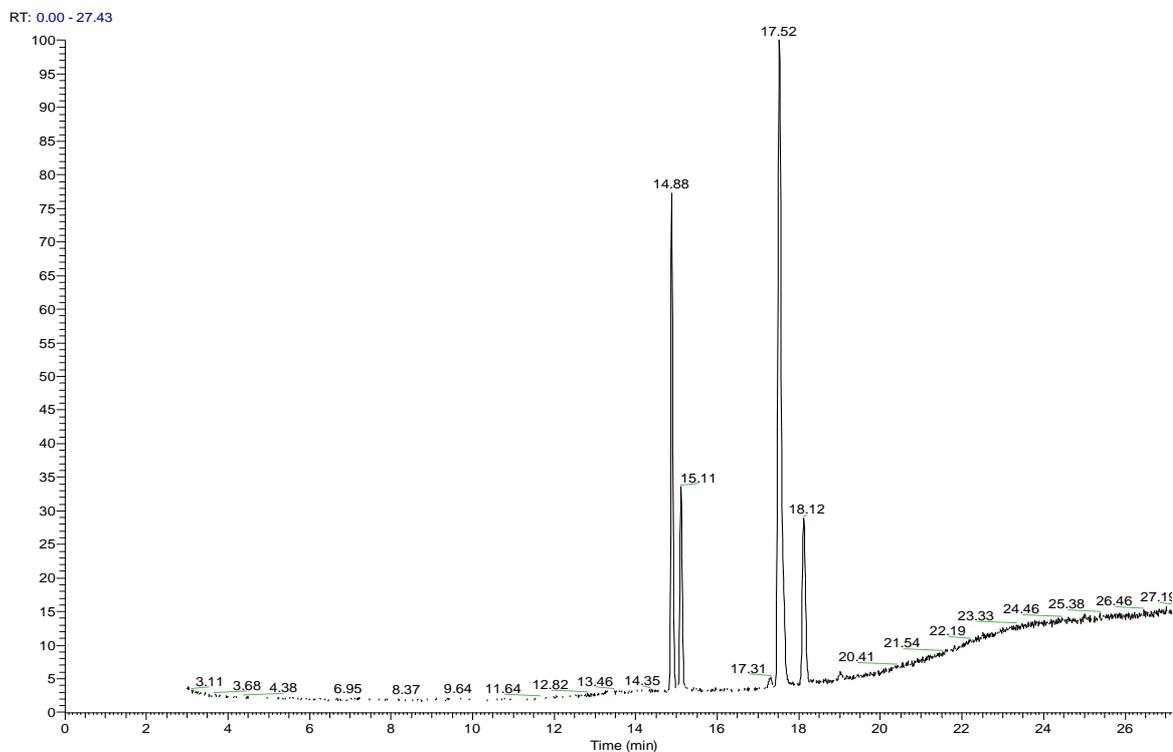


Рис.4. Хроматограмма метиловых эфиров масла авокадо.

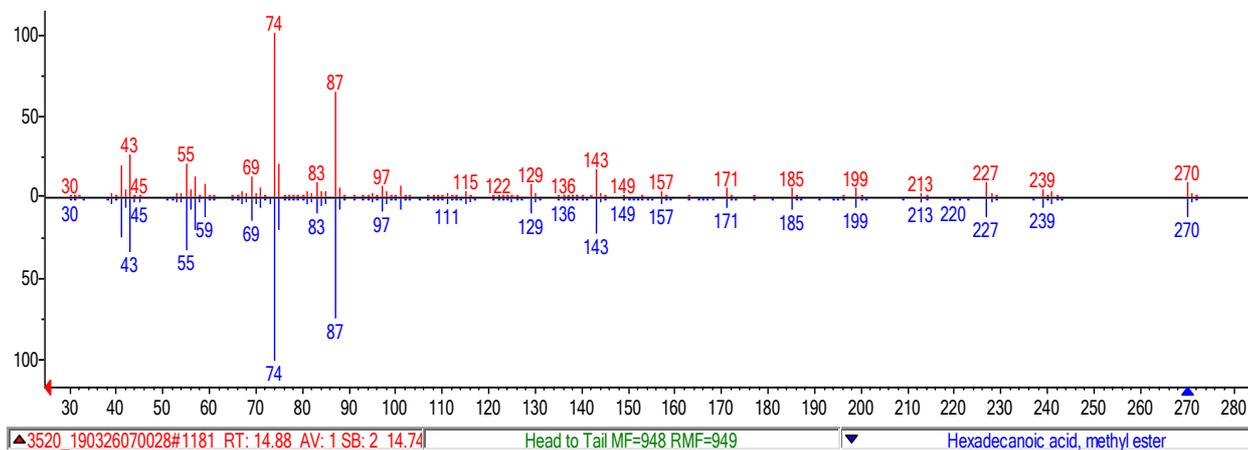


Рис.5. Масс-спектр метилового эфира пальмитиновой кислоты в сопоставлении с библиотекой данных NIST.

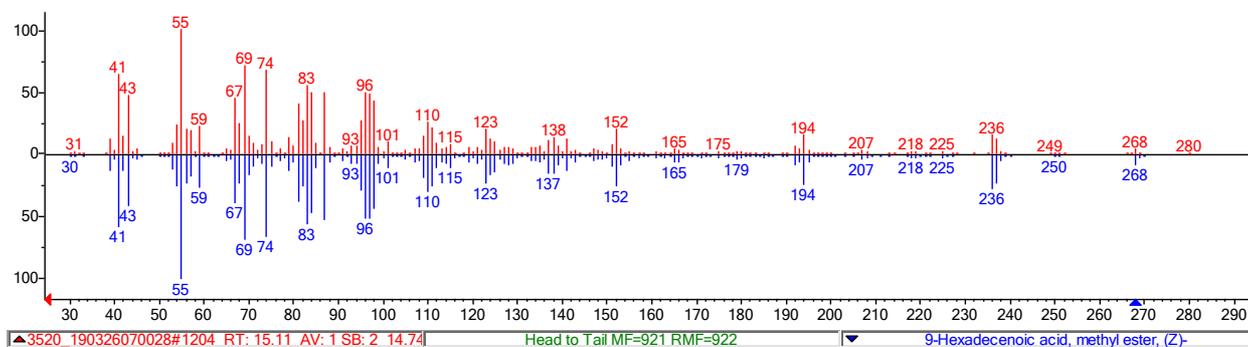


Рис.6. Масс-спектр метилового эфира пальмитолеиновой кислоты в сопоставлении с библиотекой данных NIST.

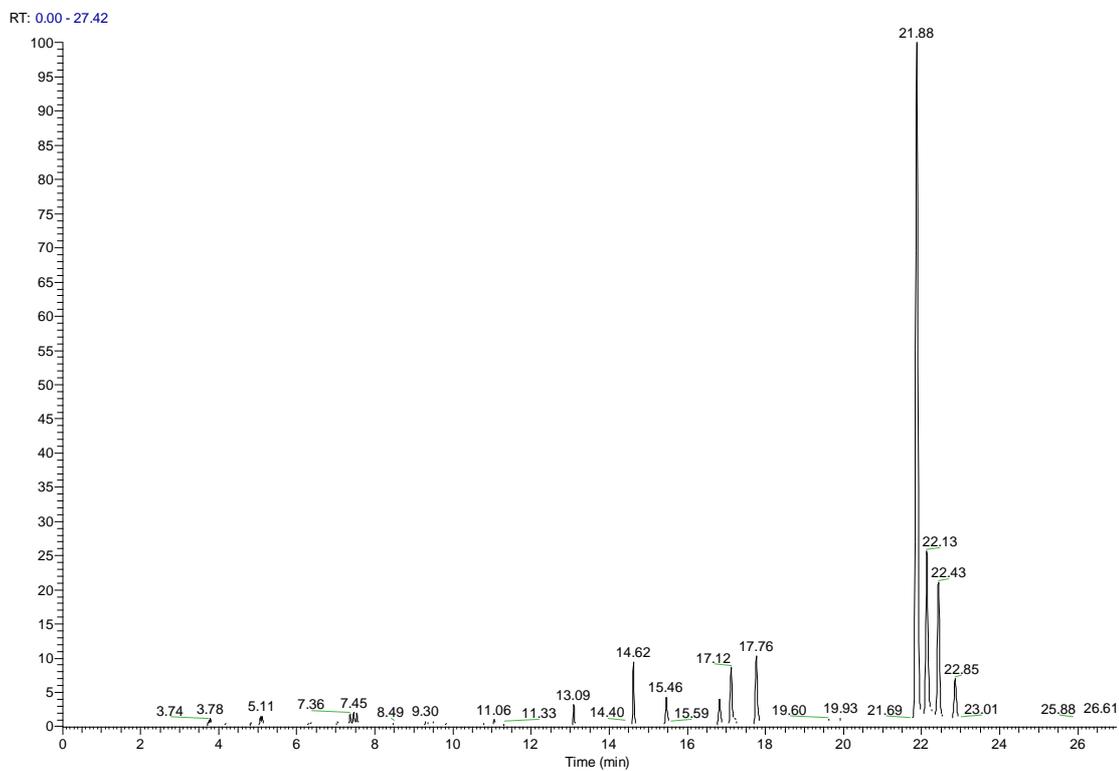


Рис.7. Хроматограмма метиловых эфиров масла косточек граната.

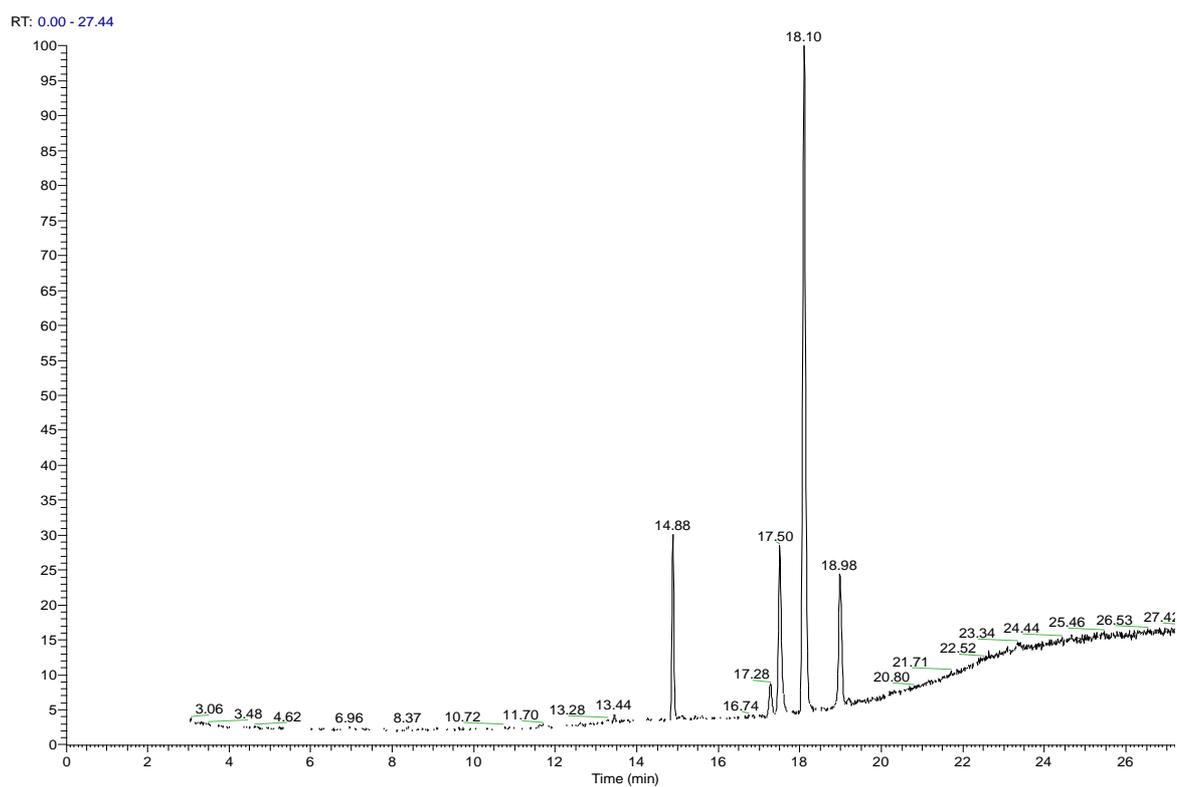
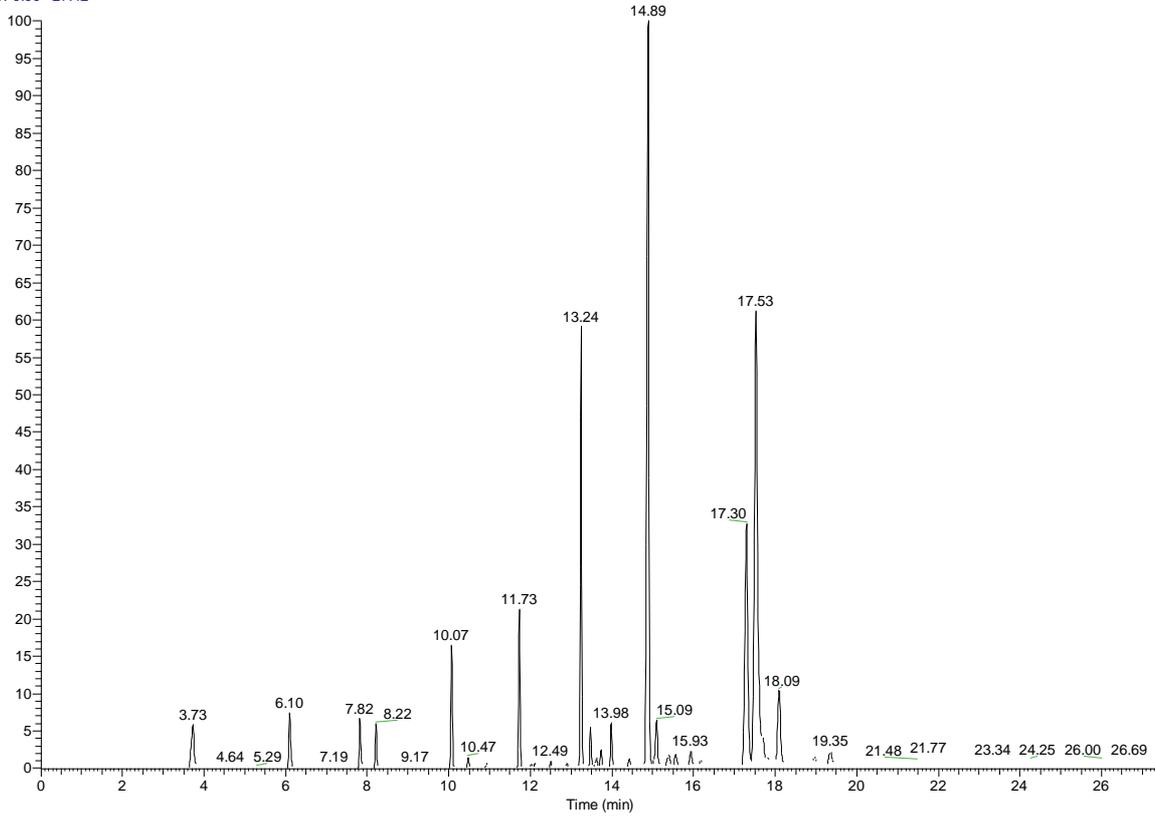


Рис.8. Хроматограмма метиловых эфиров масла грецкого ореха.

RT: 0.00 - 27.42



NL:  
7.45E8  
TIC MS  
hotikovskiy  
\_19012403  
0915

Рис.9. Хроматограмма метиловых эфиров молочного жира (из творога).

RT: 0.00 - 27.45

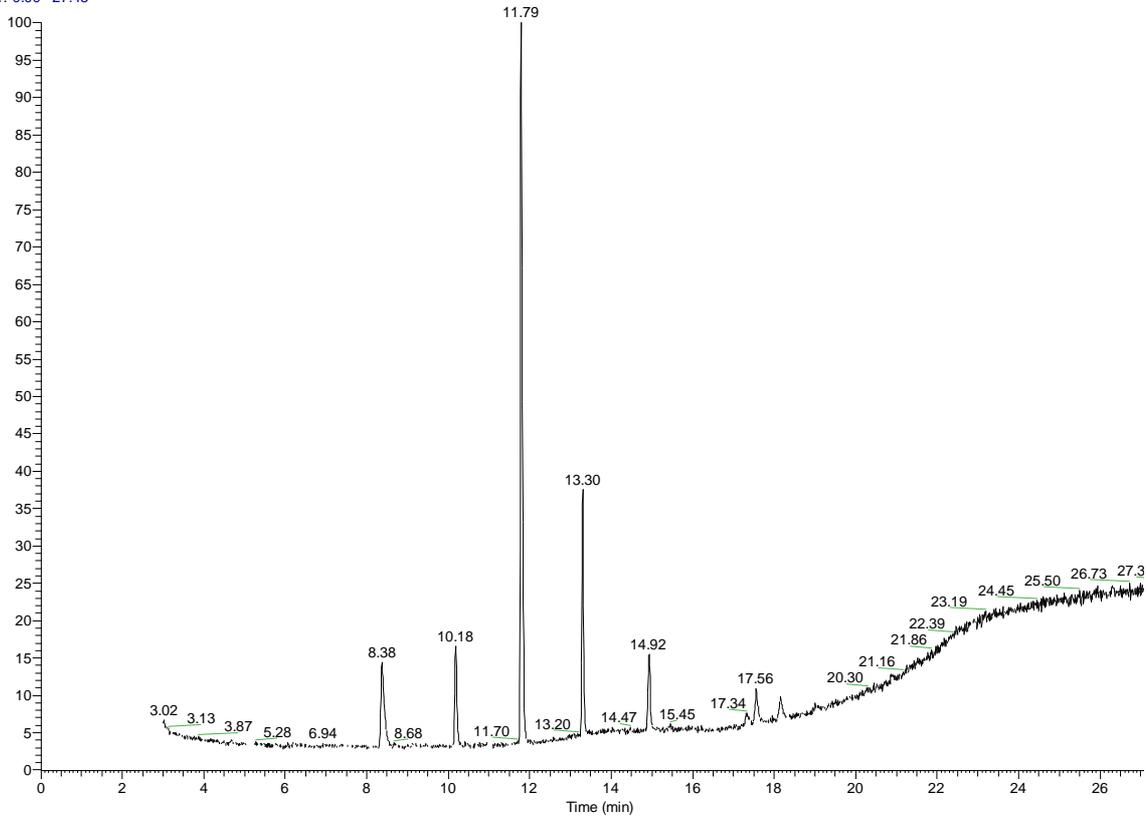


Рис.10. Хроматограмма метиловых эфиров кокосового масла.

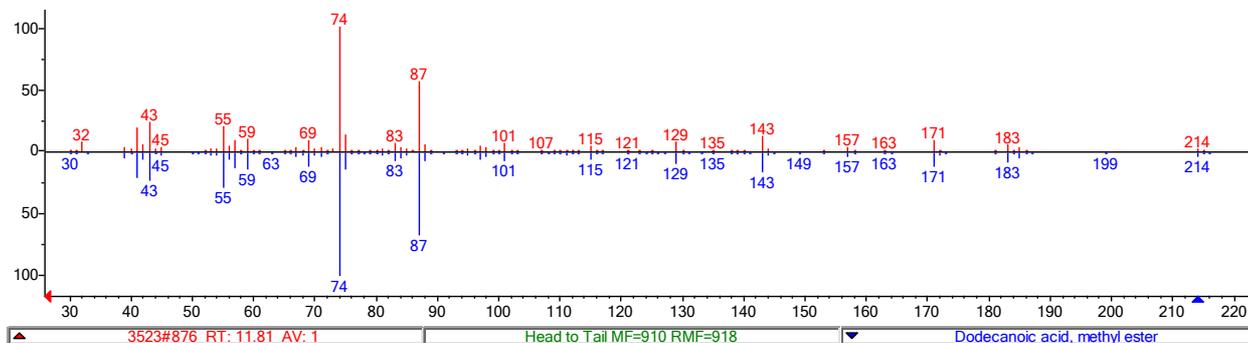


Рис. 11. Масс-спектр метилового эфира лауриновой кислоты в сопоставлении с библиотекой данных NIST.

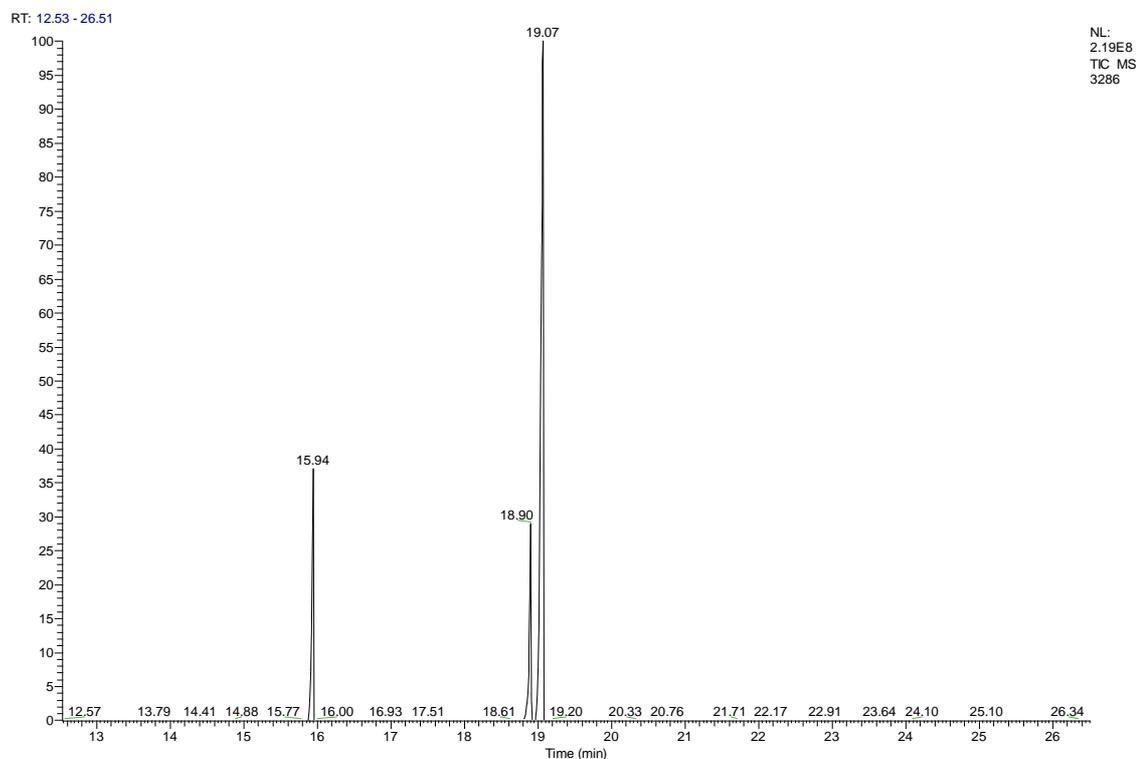


Рис. 12. Хроматограмма метиловых эфиров масла какао (В работе использовалась колонка TG-5 silMS фирмы «Thermo Scientific», с геометрическими размерами 30м/0,25мм/0,25мкм с НЖФ 5% фенил 95% метилсилоксан. При этом изменился порядок удерживания стеариновой кислоты на олеиновую).

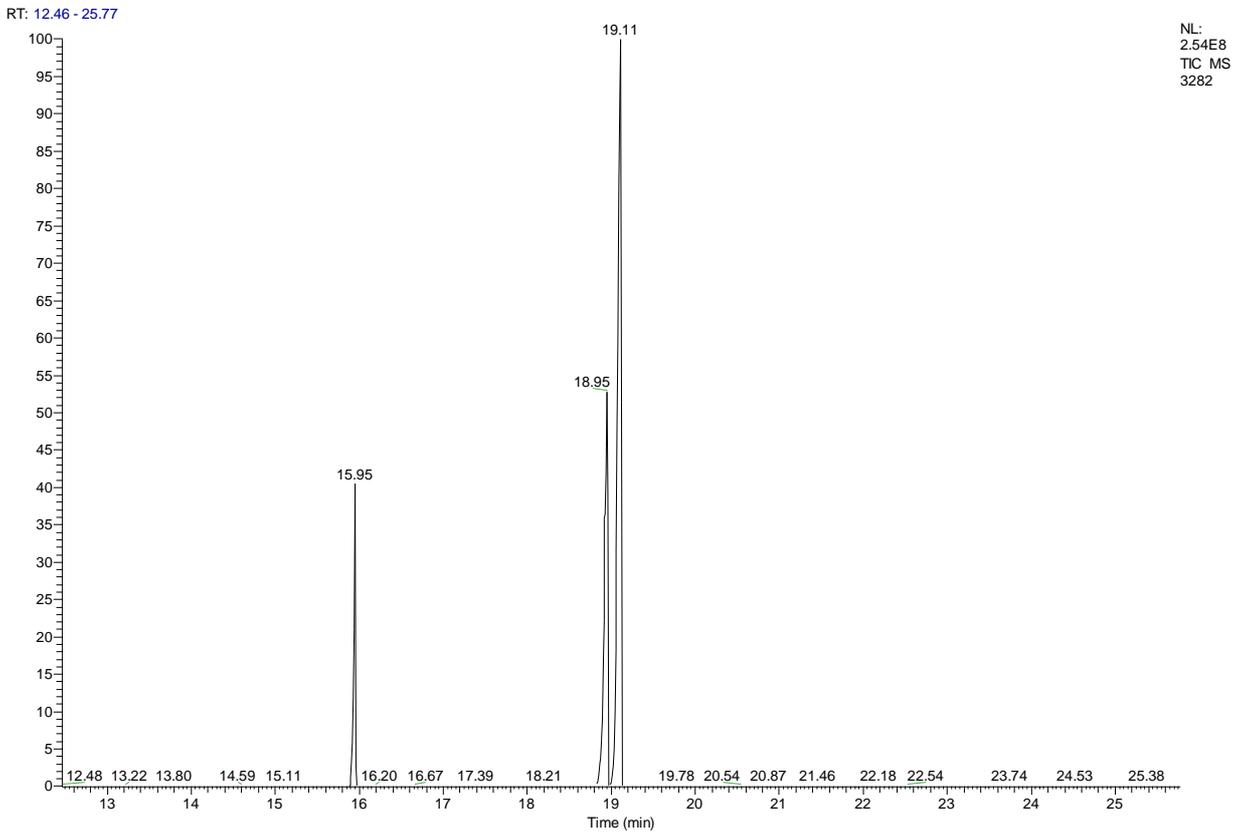


Рис.13. Хроматограмма метиловых эфиров конфет с заменителем какао масла.

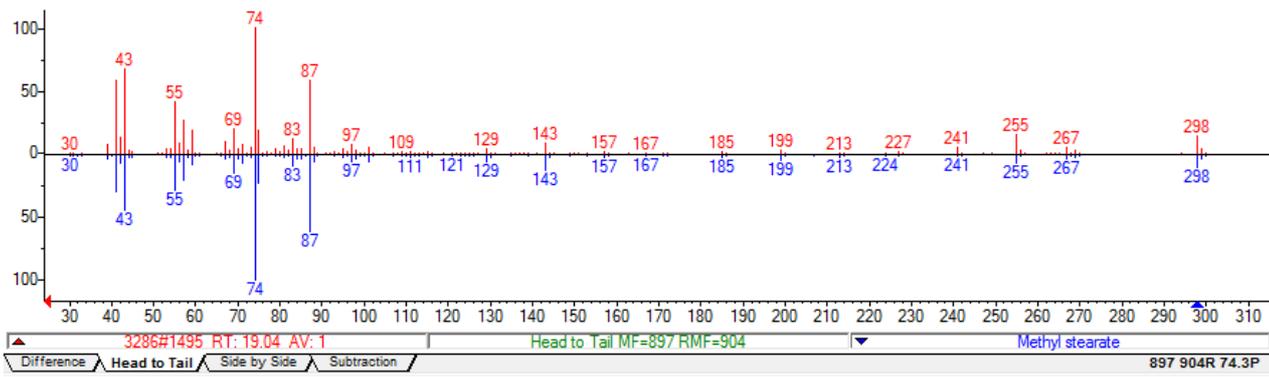


Рис.14. Масс-спектр метилового эфира стеариновой кислоты в сопоставлении с библиотекой данных NIST.

## Приложение 5

Таблица 4. Расчет коэффициента чувствительности для состава подвижной фазы 15 % - об ацетонитрила в ацетоне.

№	ТАГ	n(D) theor	delta n(D)	Коэффициент чувствительн ости (Кч)	S('эсп)	S(теор)	mol % trigl	Время, мин	logk	
1	Ln3	1,501	0,145200943	0,910468901	14	12,746	0,36513363	6,18	0,1534	
2	Ln2L	1,496	0,140200943	0,942939043	97	91,465	2,62007687	7,03	0,2447	
3	Ln2O	1,492	0,136200943	0,970631628	30	29,119	0,83413122	8,12	0,3396	
4	Ln2P	1,489	0,133200943	0,992492546		0	0	8,50	0,3683	
5	Ln2S	1,488	0,132200943	1		0	0	9,92	0,4611	
6	LnL2	1,484	0,128200943	1,031201019	474	488,79	14,0016867	7,98	0,3282	
7	LnLO	1,48	0,124200943	1,064411749	297	316,13	9,05575762	9,43	0,4310	
8	LnLP	1,485	0,129200943	1,023219645	116	118,69	3,40005185	9,90	0,4597	
9	LnLS	1,484	0,128200943	1,031201019		0	0	11,65	0,5525	
10	LnO2	1,484	0,128200943	1,031201019	202	208,30	5,96696353	11,27	0,5338	
11	LnOP	1,481	0,125200943	1,055910122	47	49,63	1,42161989	11,86	0,5625	
12	LnOS	1,48	0,124200943	1,064411749		0	0	6,45	0,1841	
13	LnP2	1,477	0,121200943	1,09075837		0	0	12,50	0,5912	
14	LnPS	1,477	0,121200943	1,09075837		0	0	14,87	0,6840	
15	LnS2	1,477	0,121200943	1,09075837		0	0	17,80	0,7768	
16	L3	1,488	0,132200943	1	192	192	5,49996479	9,25	0,4195	
17	L2O	1,484	0,128200943	1,031201019	602	620,78	17,7827329	11,04	0,5224	
18	L2P	1,481	0,125200943	1,055910122		0	0	11,62	0,5511	
19	L2S	1,48	0,124200943	1,064411749		0	0	13,78	0,6438	
20	LO2	1,48	0,124200943	1,064411749	474	504,53	14,4526233	13,31	0,6252	
21	LOP	1,477	0,121200943	1,09075837	192	209,43	5,99913263	14,03	0,6539	
22	LOS	1,477	0,121200943	1,09075837	95	103,62	2,96832083	16,78	0,7467	
23	LP2	1,473	0,117200943	1,127985319		0	0	14,83	0,6826	
24	LPS	1,473	0,117200943	1,127985319		0	0	17,75	0,7754	
25	LS2	1,473	0,117200943	1,127985319		0	0	21,37	0,8681	
26	O3	1,477	0,121200943	1,09075837	340	370,86	10,623464	16,18	0,7280	
27	O2P	1,473	0,117200943	1,127985319	155	174,84	5,00834025	17,11	0,7567	
28	O2S	1,473	0,117200943	1,127985319		0	0	20,58	0,8495	
29	OP2	1,469	0,113200943	1,167843125		0	0	18,11	0,7854	
30	OPS	1,469	0,113200943	1,167843125		0	0	21,81	0,8782	
31	OS2	1,469	0,113200943	1,167843125		0	0	26,40	0,9710	
32	P3	1,464	0,108200943	1,221809528		0	0	19,17	0,8141	
33	P2S	1,465	0,109200943	1,210620892		0	0	23,13	0,9069	
34	PS2	1,465	0,109200943	1,210620892		0	0	28,03	0,9997	
35	S3	1,465	0,109200943	1,210620892		0	0	34,10	1,0924	
	Суммарное значение					3490,93	100			