

УДК 543.54:665.35

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИГЛИЦЕРИДНОГО И ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ

*В.А. Хлебников, В.Н. Сорокопудов,
С.В. Рыбалко, В.И. Дейнека
г. Белгород*

Количественный и качественный анализ триглицеридного состава масел является довольно сложной процедурой в исследованиях. Обычными хроматографическими методами (ТСХ, колоночная хроматография) удается разделить масла на триглицериды, диглицериды, моноглицериды. Полное разделение триглицеридов практически невозможно даже при использовании ВЭЖХ вследствие соэлюирования так называемых проблемных триглицеридов (образцов, имеющих различный состав, но близкое время удерживания). Триглицеридный состав масел рассчитывают косвенным путем, используя ферментативный гидролиз суммы триглицеридов с последующим количественным определением выделившихся кислот и пересчетом на начальный состав [1]. Однако пересчеты возможны, строго говоря, при определенных теоретических положениях, а не экспериментальных данных. Часто при этом используются предположения о статистическом распределении радикалов кислот в соответствующих положениях триглицеридов. Однако в работе [2] было показано, что при строго статистическом распределении радикалов, но изменяющемся соотношении жирных кислот, синтезируемых в растении на различных стадиях его развития, итоговый результат не подчиняется статистическому распределению. В работе [3] было показано, что использование расчетных значений коэффициентов преломления различных триглицеридов позволяет получить градуировочную зависимость, общую для масел с различной степенью насыщения, что является обоснованием применения метода для прямого исследования триглицеридного состава.

Данная работа является продолжением исследований Белгородской флоры с целью поиска потенциальных источников эссенциальных кислот [4-6]. В работе также начато исследование растительного материала, собранного в Ботаническом саду БелГУ. Барбарис *Berberis vulgaris* L. относится к давно культивируемым в нашей области декоративным растениям; магония падуболистная *Mahonia aquifolia* L., относящаяся к тому же семейству *Berbericaceae*, известна хорошей урожайностью съедобных ягод, богатых антоцианами, т.е. является потенциальным источником для получения натуральных красителей. На сайте <http://www.bagkf.de/sofa/>, где собран обширнейший материал по литературным данным об определении жирнокислотного состава масел семян растений различных семейств, тем не менее отсутствует информация о жирнокислотном составе масла семян магонии.

Экспериментальная часть

Семена извлекали из спелых плодов растений барбариса и магонии падуболистной, выращенных в Ботаническом саду БелГУ в сезоне 2004 г. Навеску семян (~ 0,5 г) растирали с кварцевым песком и заливали 5 мл ацетона. Настаивали в течение 30 мин. Экстракт отфильтровывали с использованием патрона или через бумажный фильтр при экстракции семян измельченных без добавления кварцевого песка.

Анализ выполняли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на оборудовании фирмы «Gilson» с рефрактометрическим детектором R-401 (Waters Millipore). Колонка: 250×4 мм, Кромасил С18, при скорости подачи подвижной фазы системы ацетонитрил-ацетон 1 мл/мин. Ввод пробы осуществляли краном дозатором Rheodyne 7125 с петлей объемом 20 мкл. Для регистрации и обработки хроматограмм использовали систему «ЮНИХРОМ 97» (ООО «Новые аналитические системы»).

Результаты и обсуждение

Хроматограммы экстрактов масел семян барбариса и магонии представлены на рис. 1 и 2. По характеру хроматограммы оба масла относятся к высоконенасыщенным (высыхающим) маслам, образованным теми же жирнокислотными радикалами, что и льняное масло.

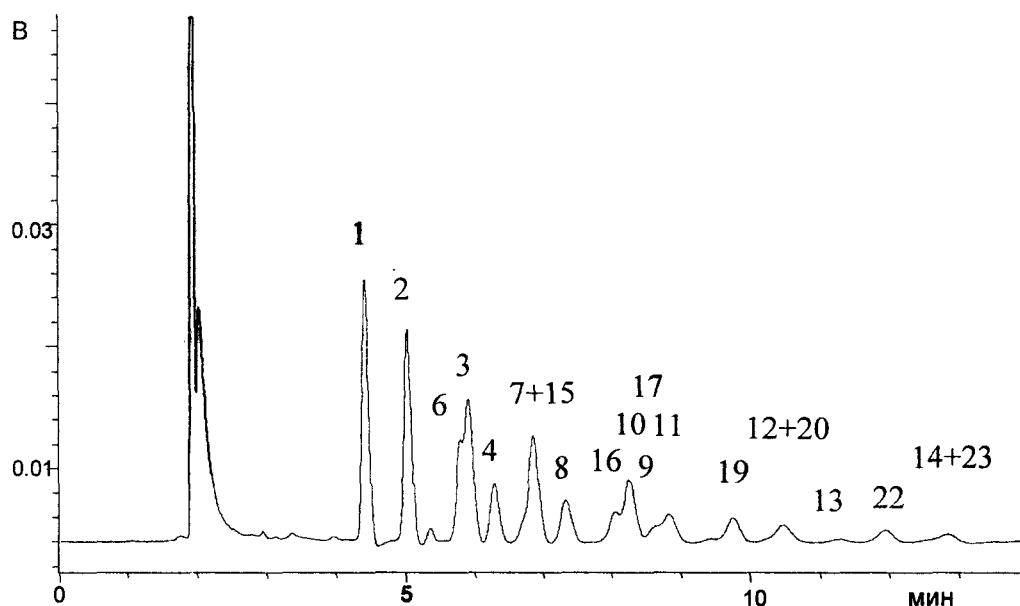


Рис. 1. Хроматограмма разделение триглицеридов масла магонии падуболистной
Подвижная фаза: 90% CH₃COCH₃, 10% CH₃CN, номера пиков см. табл. 1

В табл. 1 представлены возможные виды относительно быстро элюирующихся триглицеридов как комбинации 5 радикалов жирных кислот: α-линоленовой (9-цис, 12- цис, 15-цис-октадекатриеновой, Ln), линолевой (9-цис, 12- цис-октадекадиеновой, L), олеиновой (9-цис-октадекаеновой, O), пальмитиновой (гексадекановой, П) и стеариновой (октадекановой, С).

Таблица 1

Параметры триглицеридов масла *Mahonia aquifolia*

№	ТАГ Состав	t _R , мин		lgk		n _D	Доля ТАГ по площади пиков, %	
		Эксп.	Расч.	Эксп.	Расч.		Без поправки	С поправкой
1	Ln ₃	4.422	4.422	0.083	0.083	1.501	17.1	16.4
2	Ln ₂ L	5.033	5.023	0.181	0.179	1.496	15.7	15.5
3	Ln ₂ O	5.917	5.904	0.292	0.291	1.492	10.8	11.0
4	Ln ₂ P	6.30	6.286	0.332	0.331	1.489	5.3	5.5
5	Ln ₂ S		7.329		0.426	1.488	0.1	0.1
6	LnL ₂	5.8	5.773	0.279	0.276	1.492	8.1	8.3

7	LnLO*	6.88	6.873	0.387	0.387	1.488	11.6	12.2
8	LnLP	7.35	7.35	0.427	0.427	1.485	4.7	5.0
9	LnLS		8.651		0.522	1.484	0.3	0.3
10	LnO ₂	8.282	8.294	0.497	0.498	1.484	7.0	7.5
11	LnOP	8.853	8.909	0.535	0.538	1.481	4.1	4.6
12	LnOS		10.59		0.633	1.48	1.0	1.1
13	LnP ₂		9.585		0.579	1.477	0.1	0.19
14	LnPS		11.43		0.673	1.477	0.5	0.6
15	L ₃	6.71	6.71	0.372	0.372	1.488	0.4	0.4
16	L ₂ O	8.082	8.083	0.483	0.483	1.484	3.5	3.8
17	L ₂ P	8.665	8.678	0.523	0.524	1.481	1.0	1.1
18	L ₂ S	10.52	10.30	0.629	0.618	1.480	1.0	1.1
19	LO ₂	9.788	9.856	0.59	0.594	1.48	0.8	0.9
20	LOP	10.52	10.62	0.629	0.635	1.477	1.0	1.1
21	LOS	12.55	12.72	0.722	0.729	1.477	0.5	0.6
22	O ₃	11.99	12.15	0.699	0.705	1.477	1.9	2.1
23	O ₂ P	12.9	13.14	0.736	0.746	1.473	0.7	0.8

* – соотношение между долями проблемных триглицеридов было оценено по хроматограммам в более медленных элюентах

В соответствии с инкрементной моделью [7,8] (или любым из вариантов эквивалентных углеродных чисел) удерживание каждого из триглицеридов может быть рассчитано с учетом инкрементных соотношений, соответствующим замене одного радикала на другой. При использовании в качестве реперного триглицерида наиболее часто встречающегося в растительных маслах триглицерида L₃ (трилинолеата) удерживание других образцов может быть рассчитано с использованием четырех инкрементов:

$$\begin{aligned}\Delta(\text{Ln} \rightarrow \text{L}) &= \lg(\text{XYL}) - \lg(\text{XYLn}); \\ \Delta(\text{L} \rightarrow \text{O}) &= \lg(\text{XYO}) - \lg(\text{XYL}); \\ \Delta(\text{O} \rightarrow \text{П}) &= \lg(\text{XYP}) - \lg(\text{XYO}); \\ \Delta(\text{П} \rightarrow \text{С}) &= \lg(\text{XYS}) - \lg(\text{XYP});\end{aligned}$$

где $\lg(\text{XYZ})$ – логарифмы коэффициентов удерживания веществ, рассчитанные по формуле:

$$\lg k = \lg \frac{t_r - t_0}{t_0};$$

где t_r – время выхода удерживаемого вещества, а t_0 – «мертвый» объем колонки.

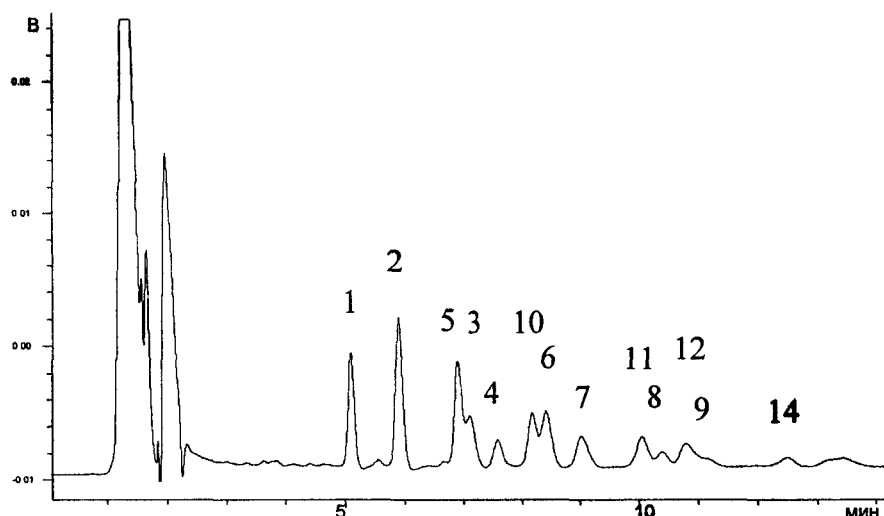


Рис. 2. Хроматограмма разделение триглицеридов масла барбариса обыкновенного
Подвижная фаза: 85% CH₃COCH₃, 15% CH₃CN, номера пиков см. табл. 2

Инкременты определяли экспериментально по параметрам удерживания триглицеридов масла с известным триглицеридным составом, например, подсолнечного, оливкового и льняного [8], составы которых вносили в таблицу в качестве параметров. Обратный пересчет по формуле:

$$t_r = t_0(10^{\lg k} + 1);$$

использовали для расчета времен удерживания соответствующих триглицеридов. Расчетные времена выхода определяемых триглицеридов сопоставляли с полученными экспериментальными временами удерживания веществ для идентификации пиков и качественного определения триглицеридного состава масла.

Значения инкрементов, полученные для данной подвижной фазы 90% CH_3COCH_3 , 10% CH_3CN , составили: $\Delta(\text{Ln} \rightarrow \text{L}) = 0,096$; $\Delta(\text{L} \rightarrow \text{O}) = 0,111$; $\Delta(\text{O} \rightarrow \text{П}) = 0,040$; $\Delta(\text{П} \rightarrow \text{С}) = 0,094$ со средней погрешностью $\pm 0,002$.

В таблице 1 приведены также расчетные значения коэффициентов преломления индивидуальных триглицеридов (программа ACDLabs). Для заданного состава подвижной фазы (соотношения объемов ацетонитрила и ацетона) рассчитывали коэффициент преломления:

$$n_D^* = x_1 \cdot n_D(1) + x_2 \cdot n_D, \quad (2)$$

где n_D^* – коэффициент преломления соответствующего вещества, а x_i его мольная доля в смеси. Для подвижной фазы 10 об.% ацетонитрила и 90 об.% ацетона $n_D^* = 1,356$. Поскольку отклик рефрактометрического детектора прямо пропорционален разности коэффициентов преломления вещества и среды, то вводили поправочные коэффициенты на чувствительность детектора по отношению к конкретным триглицеридам. С учетом этих коэффициентов определяли исправленную площадь пиков. По полученным значениям производили расчеты жирнокислотного состава, учитывающие вклады каждого жирнокислотного радикала в триглицериды. Так, для триглицерида дилиноленоат-линолеат (Ln_2L) учитывали двойной вклад в общее содержание по α -линоленовой кислоте; вклад линолевой в данном случае вдвое меньше. Расчетный жирнокислотный состав представлен в табл. 3.

Таблица 2

Параметры триглицеридов масла *Berberis vulgaris*

ТАГ		t_R , мин		Lgk		n_D	Доля ТАГ по площади пиков, %	
№	Состав	Эксп.	Расч.	Эксп.	Расч.		Эксп.	Расч.
1	Ln_3	5.13	5.14	0.195	0.196	1.501	15.5	10.1
2	Ln_2L	5.93	5.94	0.293	0.294	1.496	24.8	16.2
3	Ln_2O	7.14	7.16	0.410	0.411	1.492	10.7	7.0
4	Ln_2P	7.62	7.65	0.449	0.451	1.489	7.1	4.6
5	LnL_2	6.94	6.94	0.393	0.393	1.492	21.1	13.7
6	LnLO	8.44	8.47	0.508	0.510	1.488	14.4	9.4
7	LnLP	9.05	9.09	0.547	0.549	1.485	10.2	6.6
8	LnO_2	10.42	10.47	0.624	0.627	1.484	4.8	3.1
9	LnOP	11.20	11.28	0.663	0.666	1.481	2.4	1.6
10	L_3	8.20	8.20	0.492	0.492	1.488	12.2	8.0
11	L_2O	10.08	10.12	0.606	0.609	1.484	9.7	6.4
12	L_2P	10.83	10.89	0.645	0.648	1.481	10.0	6.5
13	L_2S	13.22	13.30	0.749	0.752	1.480	1.6	1.0
14	LO_2	12.53	12.63	0.721	0.726	1.480	4.1	2.7
15	LOP	13.46	13.64	0.758	0.765	1.477	4.9	3.2

Аналогичный подход был использован и для анализа состава масла семян *Berberis vulgaris*. Хроматограмма масла (рис. 2) показывает, что триглицериды образованы теми же жирнокислотными радикалами, что и в случае масла семян магонии: наблюдается некоторое отличие в соотношении количеств триглицеридов в проблемных группах при заметно меньшем содержании α -линоленовой кислоты.

При смене состава элюента изменяются инкременты. Так для подвижной фазы состава 85% CH_3COCH_3 и 15% CH_3CN : $\Delta(\text{Лн} \rightarrow \text{Л}) = 0,099$; $\Delta(\text{Л} \rightarrow \text{О}) = 0,117$; $\Delta(\text{О} \rightarrow \text{П}) = 0,040$ и $\Delta(\text{П} \rightarrow \text{С}) = 0,104$.

Таблица 3

Жирнокислотный состав масел семян растений семейства *Berberidaceae*

№	Кислота	Мольная доля, %, ± 1.5 %			
		<i>Mahonia aquifolia</i>	<i>Berberis vulgaris</i>	<i>Berberis buxifolia</i> Lam.	<i>Berberis iziensis</i>
		получено в данной работе		Данные с сайта http://www.bagkf.de/sofa/	
1	α -Линоленовая	52.3	40.1	36.8	30.0
2	Линолевая	19.8	39.1	29.1	37.0
3	Олеиновая	20.2	13.0	23.5	19.4
4	Пальмитиновая	6.4	7.5	8.5	0.2
5	Стеариновая	1.3	0.3	1.9	3.1

Сопоставляя данные, полученные в данной работе, с литературными, можно сделать вывод о перспективности использования семян магонии падуболистной в качестве источника эссенциальных жирных кислот – α -линоленовой и линолевой при комплексной переработке плодов растений семейства *Berberidaceae*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Laakso, P. Analysis of triacylglycerols: approaching the molecular composition of natural mixtures / P. Laakso // Food Rev. Int. – 1996. – Vol. 12. – P. 199-250.
2. Дейнека, В. И. Триглицеридный состав масел семян некоторых растений / В. И. Дейнека // Химия природных соединений. – 2003. – № 6. – С. 433-436.
3. Анализ растительных масел с использованием ВЭЖХ / В. И. Дейнека, Л. А. Дейнека, Н. Г. Габрук, Г. М. Фофанов, Л. А. Манохина, Н. А. Сидельникова // Журнал аналитической химии. – 2003. – Т. 58, № 12. – С. 1294-1299.
4. Deineka, V. I. Triglyceride Types of Seed Oils. I. Certain Cultivated Plants of the Solanaceae Family / V. I. Deineka, L. A. Deineka // Chemistry of Natural Compounds. – 2004. – Vol. 40. – P. 184-185.
5. Deineka, V. I. Type Composition of Triglycerides from Seed Oils. II. Triglycerides from Certain Cultivated Plants of the Rosaceae Family / V. I. Deineka, L. A. Deineka // Chemistry of Natural Compounds. – 2004. – Vol. 40. – P. 293-294.
6. Deineka, V. I. Type Composition of Triglyceride Seed Oils. III. Triglycerides from Certain Plants of the Ranunculaceae Family / V. I. Deineka, A. A. Sirotnin, N. V. Ospishcheva // Chemistry of Natural Compounds. – 2004. – Vol. 40. – P. 295-296.
7. Инкрементный подход при определении состава триглицеридов / В. И. Дейнека, В. М. Староверов, Г. М. Фофанов, Л. Н. Баятинская // Химико-фармакологический журнал. – 2002. – Т. 36, № 7. – С. 44-47.
8. Инкрементный подход в расчете жирнокислотного состава триглицеридов / В. И. Дейнека, Г. М. Фофанов, В. А. Хлебников, Л. Н. Баятинская // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2002. – № 11. – С. 20-23.