

ИНКРЕМЕНТНЫЙ ПОДХОД ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ СОСТАВА ТРИГЛИЦЕРИДОВ

¹ Белгородский государственный университет;² ФГУП БГ НИИ ТМП, Белгород

Жиры являются одними из основных классов соединений в экстрактах растительного сырья с широким спектром применения от пищевого до парфюмерного [1, 2]. Важнейшими компонентами жиров являются триглицериды — эфиры жирных кислот и глицерина. Данная работа посвящена изучению закономерностей удерживания жирных кислот и триглицеридов растительных масел методом ВЭЖХ.

Обычная схема определения триглицеридов сложна и громоздка — предполагает выделение индивидуальных компонентов смеси с последующим анализом гидролизата на жирнокислотный состав. При теоретическом рассмотрении удерживания триглицеридов обычно используется модель “эквивалентного числа атомов углерода”, позволившая достичь значительных успехов в идентификации сложных смесей [3]. В данной работе показана возможность применения инкрементной модели для этих же целей.

Экспериментальная часть

Хроматографические исследования проводили в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ на оборудовании фирмы Gilson с рефрактометрическим детектором R-401 (Waters Millipore). Ввод пробы (20 мкл) осуществляли при помощи крана-дозатора Rheodyne 7125.

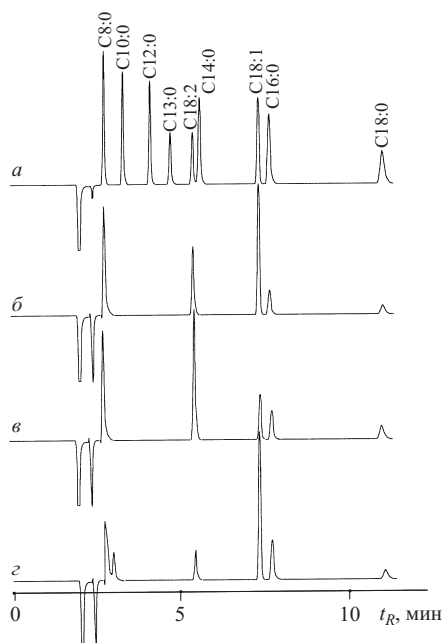


Рис. 1. Разделение жирных кислот в элюенте состава $\text{CH}_3\text{CN} : \text{CH}_3\text{COCH}_3$ (81,8 : 18,2 об. %): а — смесь стандартных кислот; б — гидролизат персикового масла; в — гидролизат масла из семян тыквы; г — гидролизат оливкового масла.

Для регистрации хроматограмм использовали электронный интегратор Shimadzu C-R3A.

В работе использовалась колонка размером 250 × 4,6 мм, заполненная сорбентом Диасфер-110-С18; 6 мкм (Россия). Все хроматографические исследования проводили при расходе элюента 1 мл/мин.

Для приготовления элюентов использовали растворители ацетон (х.ч.), ацетонитрил (ч.), диэтиловый эфир (фарм.), хлористый метилен (х.ч.) без дополнительной очистки.

Результаты и их обсуждение

Жирные кислоты. Для определения обычных жирных кислот использовались элюенты на основе ацетонитрила с добавками: ацетона (рис. 1), а также диэтилового эфира или хлористого метилена (10 – 30 об. %). При этом удерживание жирных кислот от C8 : 0 до C20 : 0 закономерно увеличивается по мере роста длины углеродной цепи. В качестве характеристики этой закономерности обычно используют уравнение

$$\lg k' = \lg((t_R - t_0)/t_0), \quad (1)$$

где t_R — время удерживания данного компонента, t_0 — время, соответствующее “мертвому объему”. В данной работе t_0 варьировали с целью получения линейной зависимости в координатах n (число атомов углерода в молекуле предельной кислоты) — $\lg(t_R - t_0)$:

$$\lg(t_{R(n)} - t_0) = a + bn. \quad (2)$$

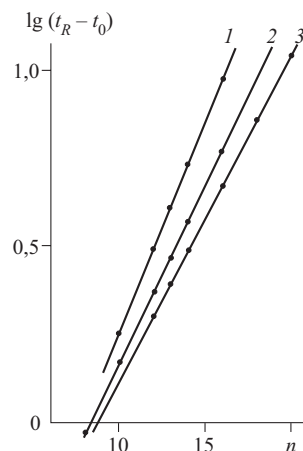


Рис. 2. Зависимость логарифма исправленного времени удерживания от числа углеродных атомов (n) насыщенных жирных кислот в элюентах $\text{CH}_3\text{CN} - \text{CH}_3\text{COCH}_3$, содержащих 18,2 (1); 23,1 (2) и 28,5 (3) об. % ацетона.

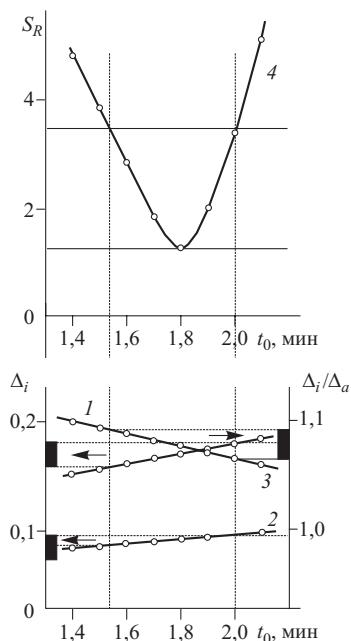


Рис. 3. Доверительные интервалы при уровне значимости 0,01 для Δ_d (1), Δ_a (2), Δ_d/Δ_a (3) по неопределенности в определении “мертвого объема” t_0 по s_R (4)

Значение b , полученное при этом, определяется как инкремент на одну CH_2 -группу. Но для исследования удерживания реальных жиров, содержащих, как правило, кислоты с четным количеством атомов углерода, удобнее использовать вдвое большую величину $\Delta_b = 2b$ — инкремент, соответствующий переходам, например от пальмитиновой к стеариновой кислотам.

По данным хроматографического поведения кислот рассчитывались также: инкремент перехода от линолевой кислоты (18:2) к олеиновой (18:1), Δ_a , (как разность $\lg k'$ соответствующих кислот), инкремент перехода от олеиновой к пальмитиновой, Δ_c , и инкремент перехода от олеиновой к стеариновой, $\Delta_d = \Delta_b + \Delta_c$.

Полученные результаты (рис. 2) свидетельствуют о том, что, как и следовало ожидать [4], логарифм исп-

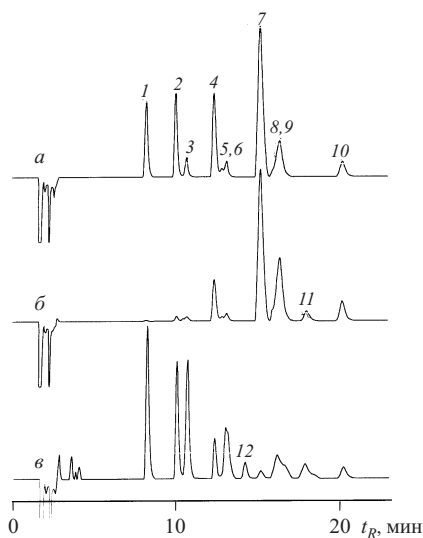


Рис. 4. Разделение триглицеридов персикового (а), оливкового (б) и тыквенного (в) масел в элюенте состава CH_3COCH_3 – CH_3CN 10 : 90 об. %

равленного времени удерживания линейно зависит от числа атомов углерода с высокими коэффициентами корреляции (более 0,9995 во всех исследованных рядах и элюентах). Но вследствие высокой концентрации триглицеридов, необходимой для рефрактометрического детектирования, возникают сложности в получении точных значений инкрементов. Причина тому — перегрузка колонки, сказывающаяся в некоторой асимметрии пиков триглицеридов на хроматограммах и в варьировании времен удерживания ($\sim 0,5\%$) в зависимости от концентрации жира. Использование критерия Фишера при сопоставлении среднеквадратичных отклонений для различных пробных значений t_0 , позволяет оценить неопределенность определения Δ_b , в 7–10%, в то время как отношение инкрементов при этом имеет неопределенность порядка 1–2% (рис. 3).

Таблица 1

Инкременты удерживания жирных кислот

Элюент: добавка к CH_3CN , об. %	Δ_a	Δ_b	Δ_c	Δ_d
15- CH_2Cl_2	$0,172 \pm 0,006$	$0,190 \pm 0,006$	$0,056 \pm 0,009$	$0,246 \pm 0,008$
30- CH_2Cl_2	$0,148 \pm 0,004$	$0,150 \pm 0,004$	$0,064 \pm 0,003$	$0,214 \pm 0,005$
20- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$	$0,175 \pm 0,005$	$0,172 \pm 0,005$	$0,037 \pm 0,003$	$0,209 \pm 0,006$
28,6- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$	$0,154 \pm 0,004$	$0,146 \pm 0,004$	$0,041 \pm 0,003$	$0,185 \pm 0,007$
16,8- CH_3COCH_3	$0,212 \pm 0,003$	$0,240 \pm 0,004$	$0,056 \pm 0,002$	$0,296 \pm 0,006$
18,2- CH_3COCH_3	$0,205 \pm 0,003$	$0,227 \pm 0,004$	$0,061 \pm 0,002$	$0,288 \pm 0,006$
20- CH_3COCH_3	$0,192 \pm 0,004$	$0,208 \pm 0,004$	$0,057 \pm 0,003$	$0,265 \pm 0,007$
28,5- CH_3COCH_3	$0,182 \pm 0,004$	$0,198 \pm 0,005$	$0,040 \pm 0,003$	$0,233 \pm 0,008$
30- CH_3COCH_3	$0,174 \pm 0,003$	$0,196 \pm 0,003$	$0,050 \pm 0,003$	$0,246 \pm 0,006$
40- CH_3COCH_3	$0,171 \pm 0,004$	$0,184 \pm 0,004$	$0,037 \pm 0,003$	$0,221 \pm 0,007$
90- $\text{CH}_3\text{COCH}_3^*$	$0,107 \pm 0,002$	$0,100 \pm 0,002$	$0,034 \pm 0,003$	$0,134 \pm 0,005$
100- $\text{CH}_3\text{COCH}_3^*$	$0,091 \pm 0,002$	$0,082 \pm 0,002$	$0,033 \pm 0,002$	$0,115 \pm 0,004$

* с пересчетом по удерживанию триглицеридов.

Таблица 2

Коэффициенты линейной корреляции между инкрементами по уравнению 3

Элюенты	a_1	b_1	s_R	a_2	b_2	s_R
Все из таблицы 1	-0,066	1,442	0,0081	-0,041	1,577	0,016
Система $\text{CH}_3\text{COCH}_3 : \text{C}$ H_3CN	-0,025	1,236	0,0043	-0,062	1,695	0,0087
Система $\text{CH}_3\text{COCH}_3 : \text{C}$ H_3CN^*	-0,037	1,296	0,0037	-0,026	1,507	0,0078

* — с учетом данных по удерживанию триглицеридов.

Прямая экстраполяция инкрементов, полученных для кислот, на удерживание триглицеридов, невозможна в связи с изменением класса соединений. Но можно предположить справедливость экстраполяции относительных характеристик удерживания при одинаковых изменениях в составах кислот и триглицеридов по уравнениям:

$$\Delta_i = a_i + b_i \Delta_a \quad (3)$$

Статистическая обработка результатов, представленных в табл. 1, показывает, что между Δ_a и Δ_b существует довольно тесная корреляция даже при совместном рассмотрении удерживания в элюентах со всеми использованными модификаторами ($s_R = 0,0081$, табл. 2). Между Δ_a и Δ_d связь также линейна, но разброс результатов очевиден ($s_R = 0,016$). Для подвижных фаз только системы ацетон – ацетонитрил s_R уменьшается вдвое. Углы наклона линейной корреляции $\Delta_b = a_1 + b_1 \Delta_a$ и $\Delta_d = a_2 + b_2 \Delta_a$ во всех случаях заметно больше 1, что указывает на теоретическую возможность изменения селективности разделения как кислот (и триглицеридов) при изменении состава подвижной фазы. Следовательно, и “эквивалентное число атомов углерода” зависит от состава элюента даже для одной и той же колонки.

Растительные масла. Для проверки выполнения инкрементной модели в удерживании триглицеридных

компонентов наиболее удобным объектом оказывается персиковое масло. Это масло образовано в основном олеиновой и линолевой кислотами, содержащимися в сопоставимых количествах (рис. 1, а) (а также пальмитиновой и стеариновой кислотами, присутствующими в относительно меньших количествах). Эти две кислоты могут образовать четыре комбинации — четыре триглицерида (без учета положения): трилинолеат (ЛЛЛ), дилинолеатолеат (ЛЛО), линолеатдиолеат (ЛОО) и триолеат (ООО). При сохранении инкрементной модели три последовательных инкремента должны быть одинаковыми. Сопоставление параметров удерживания основных сигналов на хроматограмме (рис. 4, а), представленное в табл. 3, позволяет отнести сигналы 1, 2, 4 и 7, различие в удерживании которых практически постоянно, к сигналам от ЛЛЛ, ЛЛО, ЛОО и ООО, соответственно. Инкремент Δ_a при этом составляет 0,107. Три почти одинаковых инкремента со средним значением 0,036, очевидно, должны соответствовать Δ_c . Инкремент Δ_b (0,100) можно определить, сопоставляя времена удерживания последних сигналов.

Экспериментальное значение $\Delta_b = 0,100$ лишь немного меньше получаемого по экстраполяции на основе удерживания самих кислот (0,107). Для $\Delta_d = 0,136$ экстраполяцией получаем несколько меньшую величину: 0,119. Это позволяет подтвердить применимость инкрементного подхода даже при переходе от самих кислот к триглицеридам с использованием всего набора экспериментальных результатов. Как видно (табл. 2), инкременты, полученные для жирных кислот, хорошо согласовываются с инкрементами, полученными для триглицеридов. При этом среднее квадратичное отклонение даже уменьшается с $4,29 \cdot 10^{-3}$ до $3,73 \cdot 10^{-3}$ для корреляции $\Delta_b - \Delta_a$, и с $8,67 \cdot 10^{-3}$ до $7,82 \cdot 10^{-3}$ для корреляции $\Delta_d - \Delta_a$.

Отнесение сигналов персикового масла подтверждается результатами исследования состава оливкового масла, относительное содержание линолевой кислоты в котором значительно меньше, чем олеиновой (рис. 1, б).

Таблица 3

Параметры удерживания триглицеридов в элюенте $\text{CH}_3\text{COCH}_3 : \text{CH}_3\text{CN} 90 : 10$ об. %

Состав	Инкрементная модель	$\lg(t_R - t_0)$	$t_{R\text{расч.}}, \text{ мин}$	Отнесение по хроматограммам	$t_{R\text{экс.}}, \text{ мин}$
ЛЛЛ	А	0,805	8,23	№ 1, рис. 4, а	8,23
ЛЛО	Б	0,911	10,0	№ 2, рис. 4, а	10,00
ЛЛП	Б + 0,036	0,948	10,7	№ 3, рис. 4, а	10,66
ЛОО	В	1,018	12,3	№ 4, рис. 4, а	12,28
ЛЛС	Б + 0,136	1,047	13,0	№ 5, рис. 4, а	—
ЛОП	В + 0,036	1,054	13,2	№ 6, рис. 4, а	13,11
ЛПП	В + 0,072	1,090	14,16	№ 12, рис. 4, в	14,15
ООО	Г	1,127	15,25	№ 7, рис. 4, а	15,24
ЛОС	В + 0,136	1,154	16,11	№ 8, рис. 4, а	—
ООП	Г + 0,036	1,163	16,40	№ 9, рис. 4, а	16,38
ЛПС	В + 0,172	1,190	17,34	—	—
ОПП	Г + 0,072	1,199	17,66	№ 11, рис. 4, б	17,70
ООС	Г + 0,136	1,263	20,17	№ 10, рис. 4, а	20,15

При этом основным должен быть сигнал от триолеата, что и подтверждается экспериментально (рис. 4, б). Напротив, в масле семян тыквы с преимущественным содержанием линолевой кислоты (рис. 1, в), преобладающий сигнал соответствует трилинолеату (рис. 4, в).

Полученные результаты позволяют составить таблицу удерживания всех возможных триглицеридов на основе линолевой, олеиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот с расчетными временами удерживания меньше 20 мин (табл. 3). Все (кроме триглицерида ЛПС) обнаружены на хроматограммах либо персикового, либо олеинового, либо тыквенного масел. Отметим, что отнесение триглицеридов олеинового масла соответствует литературным данным ([2], стр. 376).

Таким образом, в данной работе показано, что для определения состава жиров можно воспользоваться

исследованием соотношений инкрементов для самих кислот с последующей экстраполяцией полученных результатов на удерживание триглицеридов, их образовавших. Это позволяет контролировать состав растительных масел без предварительных обработок и исключить возможность фальсификаций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Б. Г. Ляпков, Д. Б. Меламед, *Журн. аналит. химии*, **45**(3), 434 – 451 (1990).
2. Б. Н. Тютюнников, *Химия жиров*, Пищевая промышленность, Москва (1990).
3. O. Podlaha and V. Töregård, *J. Chromatogr.*, **482**(2), 215 – 226 (1989).
4. В. Д. Шатц, О. В. Сахартова, *Высокоэффективная жидкостная хроматография*, Зинатне, Рига (1988), сс. 65 – 84.

Поступила 18.03.02