

ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНЫХ И ЭТЕРИФИЦИРОВАННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПРИ ИХ СОВМЕСТНОМ ПРИСУТСТВИИ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

М.Н. Лютикова, аспирант, Ю.П. Туров, доцент,

Э.Х. Ботиров, профессор

кафедра Химии, Сургутский государственный университет Ханты-Мансийского
автономного округа – Югры, г. Сургут, 628412 Россия

e-mail: m.lyutikova@mail.ru

Предложена методика фракционирования и количественного определения с помощью метода хромато-масс-спектрометрии свободных и этерифицированных жирных кислот при одновременном их присутствии в природных многокомпонентных системах на примере анализа дикорастущих ягод брусники и клюквы. Проведена оценка метрологических характеристик методики анализа жирных кислот и их эфиров.

Ключевые слова: ГХ/МС (газовая хромато-масс-спектрометрия), жирные кислоты, этерифицированные жирные кислоты, брусника, клюква, количественное определение, метрологические характеристики.

Анализ состава жирных кислот липидов является одним из важных способов определения пищевой ценности продуктов питания, в том числе и растительного происхождения. Жирные кислоты, в частности, ненасыщенные и полиненасыщенные, имеют большое значение для нормального функционирования организма человека. Ненасыщенные жирные кислоты являются структурными элементами фосфолипидов и липопroteидов клеточных мембран и входят в состав соединительной ткани и оболочек нервных клеток, участвуют в транспортировке и окислении холестерина, предотвращают возникновение тромбов, обеспечивают эластичность сосудов, участвуют в обмене витаминов группы В, стимулируют защитные функции, участвуют в образовании гормонов и гормоноподобных веществ (простагландинов), играющих важную роль в регулировании многих процессов в организме [1].

Такие кислоты, как олеиновая, линолевая, линоленовая, относятся к группе витаминоподобных биологически активных соединений. Данные кислоты рекомендуются в профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний, проявляют гипохолестеринемическое действие. В организме линолевая кислота метаболически превращается в арахидоновую кислоту, а линоленовая – в эйкозапентаеновую, проявляющие высокую физиологическую активность в лечении болезни Альцгеймера, рака толстого кишечника и молочной железы [1, 2].

Многие из числа ненасыщенных жирных кислот относятся к числу незаменимых, т.е. в организме человека не синтезируются, а поэтому должны поступать с пищей. Источником таких биологически активных соединений являются морские и пресноводные гидробионты, рыба, многие растения.

По сравнению с другими видами сырья, содержание жирных кислот в растениях невелико. Растение синтезирует вещества, прежде всего, для себя. Кроме функции обеспечения хозяина энергией, многие жирные кислоты и их метаболиты обладают бактерицидными и фунгицидными свойствами, то есть выполняют защитную функцию. Насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты входят в состав ацильных липидов растительной ткани. Липиды, в свою очередь, активно изменяют обмен веществ в осенний период и повышают устойчивость растений к низким температурам [3, 4]. По этой причине изучение природных липидов, в частности, липидов растений, важно для установления химического состава липидов и понимания их роли в процессах метаболизма у растений.

Нужно отметить, что качественный и количественный анализ состава липидов растительного происхождения сопряжен с определенными сложностями.

В настоящее время применяется много методов анализа жирных кислот, наиболее распространенным из которых является метод газовой хромато-масс-спектрометрии их метиловых эфиров с использованием пламенно-ионизационного или масс-селективного детектора [5–8]. Этот метод обеспечивает высокую чувствительность и надежность результатов при анализе индивидуальных жирных кислот и их сложных смесей, характерных для биологических объектов. Однако природное растительное сырье с химической точки зрения представляет собой сложную многокомпонентную систему. В растениях жирные кислоты (ЖК) могут присутствовать не только в свободном состоянии, но и в виде их метиловых, этиловых и других эфиров. Это может приводить к ошибкам в количественном

определении содержания ЖК в растительных образцах. Кроме того, присутствие в растении большого количества летучих компонентов терпенового ряда усложняет анализ. Поэтому совершенствование существующих методов анализа жирных кислот и разработка новых методов до сих пор остается важной задачей.

Цель исследования заключалась в разра-

ботке метода определения жирных кислот и их эфиров при совместном присутствии в составе растительного сырья. В качестве объектов исследования были выбраны ягоды брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.) и клюквы болотной (*Oxycoccus palustris*), произрастающих в природных условиях северной части Тюменской области (табл. 1).

Таблица 1. Объекты анализа

Образец	Место сбора	Степень зрелости (окраска)
Брусника обыкновенная (<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.)	Тюменская область, Ханты-Мансийский автономный округ, Сургутский район, окрестности г. Когалыма (в 10-15 км)	зрелая (ярко-красная)
Клюква болотная (<i>Oxycoccus palustris</i>)		зрелая (темно-красная)

Экспериментальная часть

Подготовка растительных образцов к анализу (рис. 1). Навеску свежих ягод (50 г) измельчали и приливали 20-30 мл воды для облегчения процедур экстракции. К гомогенизированной ягодной водной смеси добавляли ~10%-ый раствор NaOH. pH смеси поддерживали на уровне 10-11. Полученный водный раствор при pH 10-11 экстрагировали хлороформом (3×25 мл, по 10 мин). Слои хлороформа объединяли и высушивали безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали упариванием в вакууме. В результате такой процедуры получили суммарный экстракт основных и нейтральных соединений.

После отделения хлороформных слоев при pH ~10-11 водную ягодную смесь подкисляли ~10%-ым раствором HCl до значения pH ~2. Экстрагировали хлороформом (3×25 мл). Объединенные хлороформные слои высушивали безводным сульфатом натрия. Отфильтрованный суммарный экстракт «кислых» соединений концентрировали в вакууме. Таким образом, получали хлороформный экстракт соединений, обладающих кислотными свойствами.

Концентрированный хлороформный экстракт (3 мл), содержащий основные и нейтральные соединения (полученный при экстрагировании хлороформом при pH ~10-11), хроматографировали на колонке (1.0×25 см) с силикагелем марки КСКГ (фракция 0.16-0.25 мм). В качестве элюента использовали гексан, затем бензол. Собирали фракции по 15 мл, концентрировали и проводили ГХ/МС-анализ.

Условия анализа ГХ/МС. Анализ гексановой и бензольной фракций, а также кислого хлороформного экстракта проводили на газовом хроматографе Trace GC Ultra с квадрупольным масс-спектрометром DSQ II. Использовали 30-метровую кварцевую капиллярную колонку TR-5MS с неподвижной фазой – сополимер 5%-дифенил-95%-полисилфениленсилоксан (внутренний диаметр 0.25 мм; толщина пленки неподвижной фазы 0.25 мкм).

Условия хроматографического разделения подобраны экспериментально. Использовали программируемый режим температур термостата – нагрев от 40 до 280°C со скоростью 30°C/мин. Температура испарителя 270°C. Газ-носитель – гелий (расход 1 мл/мин) в режиме без деления потока; объем вводимой пробы 1 мкл. Энергия ионизации 70 эВ. Режим снятия масс-спектров: диапазон развертки 40–400 Да, скорость развертки 3 скана/с.

Идентификация и количественное определение жирных кислот и их эфиров. Идентификацию соединений осуществляли сравнением экспериментальных масс-спектров с библиотечными (NIST 98 и 2005). Степень совпадения экспериментального масс-спектра с библиотечным по отдельным компонентам составляет 89–97%. В дополнение при идентификации пользовались литературными данными [9, 10].

Анализ жирных кислот проводили в диапазоне концентраций 0.01–300 мкг/мл, так как концентрация жирных кислот в ягодах невелика. Количественное определение осуществляли с помощью метода внутреннего стандарта, в качестве такового использовали дейтерометилловый эфир тридекановой кислоты.

Для оценки метрологических характеристик методики анализа жирных кислот и их эфиров использовали стандартную модельную смесь метиловых эфиров (МЭ) жирных кислот (стеариновой, нанодекановой, арахисовой, генэйкозановой, бегеновой) (Sigma Algrich, чистота 99%), *n*-гексан квалификации «х.ч. для хроматографии» (Panreac, Испания).

Концентрации компонентов рассчитывали по градуировочным графикам, построенным с использованием стандартных образцов. Для построения графиков и расчета коэффициентов корреляций использовали программный пакет Microsoft Excel 2010, при вычислении статистических характеристик руководствовались нормативными документами [11–14].

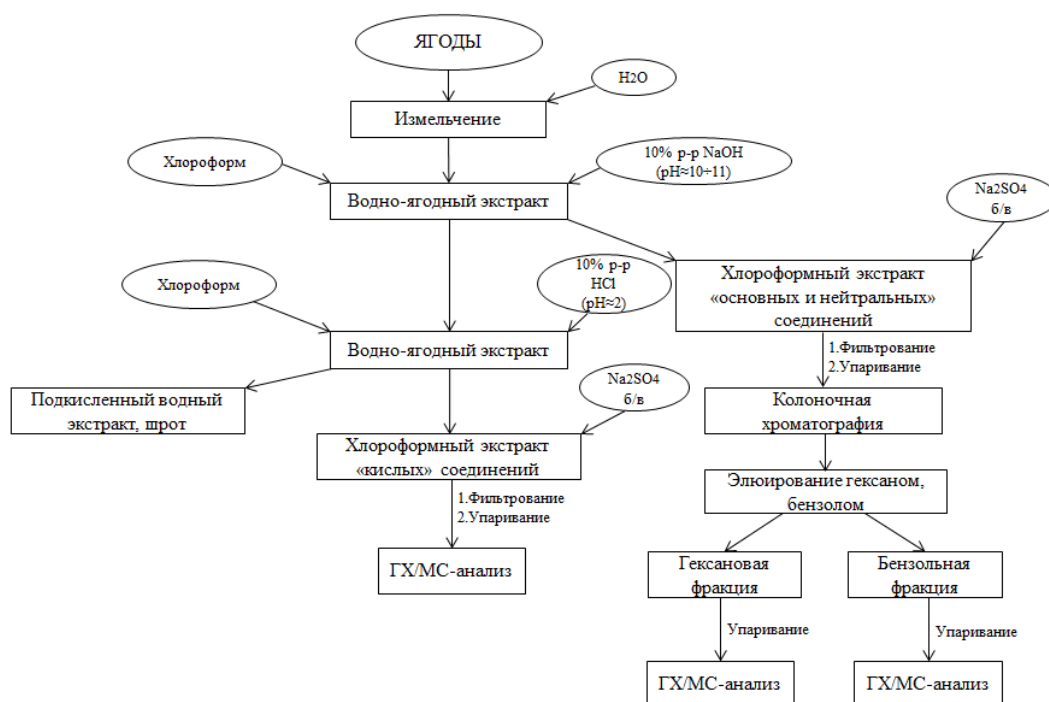


Рис. 1. Схема экстрагирования и фракционирования жирных кислот и их эфиров, содержащихся в ягодах брусники и клюквы.

Результаты и их обсуждение

Как показал ГХ/МС-анализ, жирные кислоты, присутствующие в ягодах брусники и клюквы, содержатся в хлороформном кислотном экстракте. Эфиры жирных кислот идентифицированы в гексановой фракции, полученной после колоночной хроматографии хлороформного экстракта основных и нейтральных соединений. В бензольную фракцию переходят

терпеновые соединения. Таким образом, удастся получить хроматограммы экстрактов с удовлетворительным разрешением пиков определяемых соединений ($R_s > 1,5$), что позволяет установить даже их следовые количества.

В качестве примера на рис. 2 и 3 представлены хроматограммы экстрактов ягод брусники.

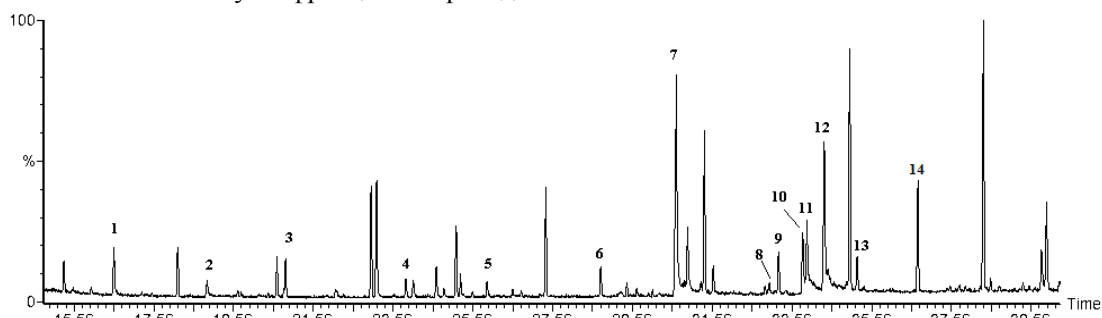


Рис. 2. Хроматограмма кислого хлороформного экстракта ягод брусники (1–14 – пики жирных кислот, расшифровка которых приведена в табл. 2).

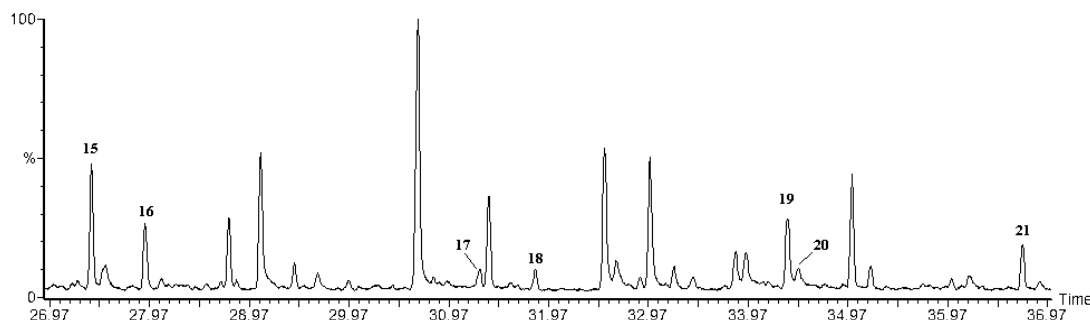


Рис. 3. Хроматограмма гексанового экстракта ягод брусники (15–21 – пики эфиров жирных кислот, расшифровка которых приведена в табл. 2).

По данным ГХ/МС, в ягодах в свободном виде присутствуют практически все кислоты с

числом атомов углерода от 12 до 20, включая жирные кислоты с нечетным числом атомов

углерода. Время выхода составляет 16.26–36.31 мин (рис. 2). Эфиры насыщенных и ненасыщенных жирных кислот выходят в промежутке 27.29–36.72 мин (рис. 3). В табл. 2 приведены данные по количественному содержанию идентифицированных компонентов, полученные интегрированием пиков молекулярных ионов.

Чисто химическими методами в каждом из растительных образцов определяется более 80 химических соединений (альдегиды, кетоны, спирты, фенольные соединения, жирные кислоты и их метаболиты). При анализе таких многокомпонентных систем провести градуировку и оценить метрологические характеристики методики по всем примесным компонентам не представляется возможным. Поэтому метрологические характеристики методики анализа

жирных кислот и их эфиров оценивали на примере модельной смеси метиловых эфиров жирных кислот.

В табл. 3 приведена информация по оценке линейной зависимости и пределам обнаружения определяемых соединений. Коэффициенты корреляции по модулю близки к 1, что является подтверждением линейной зависимости между концентрациями определяемых соединений и площадями их хроматографических пиков. Линейная зависимость сохраняется в диапазоне концентраций определяемых соединений 0.01–300 мкг/мл. Пределы обнаружения определяемых соединений, рассчитанные по 3s-критерию (утроенное значение стандартного отклонения шумового сигнала), составили 0.005 мкг/мл.

Таблица 2. Результаты ГХ/МС-анализа свободных и этерифицированных жирных кислот в ягодах брусники и клюквы

№ пика на хро- мато- грамме	Компонент	Концентрации отдельных компонентов, мг на 100 г свежих ягод (мг %)	
		Брусника	Клюква
Жирные кислоты			
1	Каприновая C10	2.73±0.22	1.19±0.14
2	Ундекановая C11	1.75±0.15	1.12±0.13
3	Лауриновая C12	1.51±0.18	0.89±0.11
4	Тридекановая C13	1.34±0.19	3.39±0.43
5	Миристиновая C14	1.85±0.27	7.88±0.95
6	Пентадекановая C15	3.89±0.68	1.13±0.14
7	Пальмитиновая C16	20.63±2.37	3.37±0.31
8	Маргариновая C17	0.49±0.09	0.97±0.12
9	Пальмитолеиновая C16:1 (9)	3.11±0.67	0.74±0.09
10	Линолевая C18:2 (9,12)	12.29±1.97	17.84±2.14
11	Олеиновая C18:1 (9)	13.22±1.64	30.19±3.62
12	Стеариновая C18	16.44±1.78	1.26±0.15
13	Линоленовая C18:3 (9,12,15)	5.93±1.13	4.56±0.55
14	Арахиновая C20	13.14±1.23	0.56±0.07
Эфиры жирных кислот			
15	Миристиновая кислота, метиловый эфир	5.19±0.19	1.79±0.11
16	Миристиновая кислота, изопропиловый эфир	1.87±0.08	4.13±0.32
17	Пальмитиновая кислота, этиловый эфир	1.97±0.39	1.21±0.07
18	Стеариновая кислота, этиловый эфир	1.42±0.14	1.96±0.21
19	Олеиновая кислота, метиловый эфир	4.89±0.21	6.37±0.38
20	Линолевая кислота, метиловый эфир	0.91±0.11	2.16±0.13
21	Линоленовая кислота, метиловый эфир	3.06±0.18	4.32±0.24

Примечания: 1) приведено среднее значение ± доверительный интервал при n = 5 и P = 0.95;
2) жирным шрифтом выделены соединения, идентифицированные в данном растении впервые.

Таблица 3. Оценка основных характеристик определения метиловых эфиров (МЭ) жирных кислот (n = 6, P = 0.95)

Определяемое соединение	Уравнение регрессии	Коэффициент корреляции	Предел количественного определения
МЭ стеариновой кислоты	$y = 1.67 \cdot 10^3 x$	0.9995	0.008 мкг/мл
МЭ нанодекановой кислоты	$y = 2.32 \cdot 10^3 x$	0.9995	0.008 мкг/мл
МЭ арахидовой кислоты	$y = 2.49 \cdot 10^3 x$	0.9994	0.009 мкг/мл
МЭ гонейкозановой кислоты	$y = 2.59 \cdot 10^3 x$	0.9994	0.008 мкг/мл
МЭ бегеновой кислоты	$y = 2.45 \cdot 10^3 x$	0.9994	0.01 мкг/мл

Для оценки повторяемости пробу метиловых эфиров жирных кислот с известным содержанием определяемых соединений делили на 6 частей, каждую из которых затем хроматографировали, и рассчитывали метрологические

характеристики – средеквадратичное отклонение повторяемости (S_r), дисперсию (σ_r), предел повторяемости ($r_{(6)}$) доверительный интервал ($\pm\delta$) и относительную ошибку определения (ϵ) (табл. 4).

Таблица 4. Оценка повторяемости результатов ($n = 6$, $P = 0.95$)

Определяемое соединение	$C_{\text{среднее}}$, мкг/мл	σ_r	S_r	$\pm\delta$	ϵ , %	$r_{(6)}$
МЭ стеариновой кислоты	10.1	0.0058	0.08	0.21	2.03	0.0234
МЭ нанодекановой кислоты	10.1	0.0138	0.12	0.31	3.05	0.0556
МЭ арахисовой кислоты	10.2	0.0199	0.14	0.36	3.51	0.0802
МЭ генэйкозановой кислоты	10.1	0.0132	0.11	0.28	2.80	0.0532
МЭ бегеновой кислоты	10.1	0.0116	0.11	0.28	2.80	0.0467

Для сопоставления разностей параллельных результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, рассчитывали предел повторяемости r_n для n результатов параллельных определений, регламентированных нормативными документами [11–14]. Для $n = 6$ использовали следующую формулу расчета:

$$r_{(6)} = 4.03 \cdot \sigma_r$$

Полученные результаты между собой согласуются, что дает основание говорить о сходимости результатов повторных анализов с при-

нятой доверительной вероятностью. Относительная ошибка определения стандартной смеси метиловых эфиров жирных кислот не превышает 5%.

Таким образом, согласно результатам статистической обработки полученных данных, данная методика пробоподготовки и анализа позволяет определять содержание жирных кислот и их эфиров при одновременном присутствии в растительном сырье в диапазоне концентраций 0.01–300 мкг/мл.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Шабров А.В. Биохимические основы действия микрокомпонентов пищи / Под ред. В.А. Дадали. М.: Авваллон, 2003. 184 с.
2. Гроза Н.В., Голованов А.Б., Наливайко Е.А., Мягкова Г.И. Терапевтическая роль полиненасыщенных жирных кислот и их производных в патофизиологических процессах // Вестник МИТХТ. 2012. Т. 7. № 5. С. 3–16.
3. Филиппова Г.Г. Основы биохимии растений. Минск: БГУ, 2004. 136 с.
4. Семенов А.А. Очерк химии природных соединений. Новосибирск: Наука, Сибирская издательская фирма РАН, 2000. 664 с.
5. Межгосударственный стандарт ГОСТ 30418-96. Масла растительные. Метод определения жирнокислотного состава. Введ. 01.01.98. Минск: Изд-во стандартов, 1996. 7 с.
6. ГОСТ Р 51483-99. Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме. Введ. 01.01.2001. М., 2000. 8 с.
7. Рудаков О.Б. Развитие метода интерпретации хроматограмм при идентификации растительных масел // Химия растительного сырья. 2001. № 4. С. 77–82.
8. Рогачев А.Д. Фитохимическое исследование *Rhododendron adamsii* Rehder: автореф. дис. ... канд. хим. наук. Новосибирск, 2009. 20 с.
9. Преч Э., Бюльман Ф., Аффольтер К. Определение строения органических соединений. Таблицы спектральных данных. Пер. с англ. М.: Мир, Бином. Лаборатория знаний, 2006. 438 с.
10. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2003. 493 с.
11. ГОСТ Р ИСО 5725-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. М.: Госстандарт России, 2002.
12. РМГ 61-2003. ГСИ. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. М.: ИПК Изд-во стандартов, 2004.
13. ГОСТ Р 52361-2005. Контроль объекта аналитический. Термины и определения. М.: ИПК Изд-во стандартов, 2005.
14. РМГ 76-2004. Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа. М.: Технорматив, 2012.

APPLICATION OF CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY TO DETERMINE FREE AND ESTERIFIED FATTY ACIDS IN THEIR COMBINED PRESENCE IN PLANT RAW MATERIALS

M.N. Lyutikova[@], Yu.P. Turov, E.H. Botirov

Surgut State University, Surgut, 628412 Russia

[@]Corresponding author e-mail: m.lyutikova@mail.ru

In comparison with other types of matter, plants have a small content of fatty acids (FA). They perform energetic, structural and protective functions. Lipids actively change metabolism in the autumn time and increase the resistance of plants to low temperatures. For this reason the study of plant lipids is important to determine the chemical composition of lipids and understand of their role in the metabolism of plants. Analysis of the lipid composition of plant is connected with some complications. Plants can contain fatty acids not only in the free form, but also in the form of their esters. This can lead to errors in the quantitative determination of FA in plant samples. In addition, the presence of a significant variety of chemical compounds in plants complicates the analysis.

The article describes the results of a study on fatty acids and their esters in cowberries and cranberries by gas chromatography-mass spectrometry. It is shown that during the fractionating of berry extracts, fatty acids are in the chloroform extract of the acids, and their esters are in the hexane fraction. Thus, we can obtain the chromatogram of extracts with a clear picture of the peaks of identified compounds ($R_s > 1.5$). The linear dependence remains in the range of identified compounds 0.01–300 mg/mL. Evaluation of the metrological characteristics of the analysis techniques was performed with a pattern mixture of methyl esters of fatty acids as an example.

Key words: GC/MS (gas chromatography and mass spectrometry), fatty acids, esterified fatty acids, cow-berry, cranberry.