

УДК 543.544.5.068.7:543.635.32

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОНОАЦЕТИЛ-ДИАЦИЛГЛИЦЕРОЛОВ МАСЕЛ СЕМЯН РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА *Celastráceae*

А.В. Туртыгин¹, В.И. Дейнека¹, Л.А. Дейнека¹, Н.А. Трусов², М.Ю. Третьяков¹

¹ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»), Биолого-химический факультет
Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

² Учреждение Российской академии наук Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН
Россия, 127276, Москва, Ботаническая ул., д. 4
deineka@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 16 января 2012 г

В работе рассмотрены методы определения видового состава триацилглицеролов масел семян двух видов растений семейства *Celastraceae* (бересклет и древогубец). Предложенное отнесение пиков подтверждено методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием (химическая ионизация при атмосферном давлении). Установлено, что основные жирные кислоты, образующие триацилглицеролы – уксусная, линоленовая, линолевая, олеиновая и пальмитиновая, причем масла семян древогубца более ненасыщенны по сравнению с маслами семян бересклетов, на долю триацилглицеролов, в состав которых входит один радикал уксусной кислоты, обычно приходится более 90 % от суммы триацилглицеролов.

Ключевые слова: масла семян, *Euonymus*, *Celastrus*, триацилглицеролы, видовой состав, ВЭЖХ, масс-спектрометрия

Туртыгин Александр Владимирович - аспирант кафедры общей химии Белгородского государственного университета.

Область научных интересов: исследование растительных масел методами ВЭЖХ.

Автор 21 публикации.

Дейнека Виктор Иванович - д.х.н., профессор кафедры общей химии Белгородского государственного университета.

Область научных интересов: аналитическая химия биологически активных веществ, физико-химические методы анализа, супрамолекулярная химия.

Автор более 350 публикаций.

Дейнека Людмила Александровна - к.х.н., доцент кафедры общей химии Белгородского государственного университета.

Область научных интересов: аналитическая химия и технология получения и очистки биологически активных веществ.

Автор более 280 публикаций.

Трусов Николай Александрович - к.б.н., научный сотрудник Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина.

Область научных интересов: биохимия растений, анатомия растений.

Автор 62 публикаций.

Третьяков Михаил Юрьевич - к.б.н., старший преподаватель кафедры старший преподаватель кафедры судебной экспертизы и криминалистики Белгородского государственного университета.

Область научных интересов: биохимия растений и ботаника.

Автор 85 публикаций.

Масла семян растений образованы, за редким исключением, в основном триацилглицеролами (ТАГ), – соединениями, в которых глицерин ацилирован высшими жирными кислотами (ВЖК) [1]. Масла могут различаться степенью ненасыщенности содержащихся в них радикалов ВЖК, долей незаменимых (эссенциальных)

ВЖК [2], а также присутствием и типом ВЖК с сопряженными двойными связями [3]. Высоко ненасыщенные масла на воздухе могут полимеризоваться, образуя нерастворимые пленки [4], что важно для лакокрасочной промышленности, а также могут быть использованы для создания биоразлагаемых полимерных материалов [5].

В свете известных энергетических проблем в современной науке интенсивно исследуется еще одно направление использования растительных масел: в результате их перестерификации (метанолом, этанолом и т.д.) получают «биодизель» – горючее на основе возобновляемых источников [6]. Такая переработка позволяет снизить вязкость горючего до требуемых пределов, хотя цена продукта заметно возрастает. Однако вязкость «триацилглицероловых» масел резко уменьшается, если в составе их ТАГ, кроме ВЖК, присутствует хотя бы один короткоцепочечный радикал, например, уксусной кислоты [7], что позволяет использовать его в качестве дизельного топлива.

В природе обнаружены растительные объекты, накапливающие масла с радикалом уксусной кислоты [8-9]; среди них – растения из семейства бересклетовые, довольно широко представленные в отечественной флоре [10]. Первая публикация по исследованию уникального масла семян бересклета датируется 1932 годом [8]; к настоящему времени известно, что масла семян бересклета (*Euonymus*) могут содержать в составе ТАГ один радикал уксусной кислоты [8]. Относительно масел семян древогубца (*Celastrus*, растения из того же семейства) сообщалось, что ТАГ этого масла образованы радикалами не только уксусной, но и муравьиной кислот, что не было подтверждено в последующих работах [11]. В целом, работ по исследованию указанных масел не так много, поэтому не удивительно, что исследований видового состава ТАГ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) нами в литературе не обнаружено.

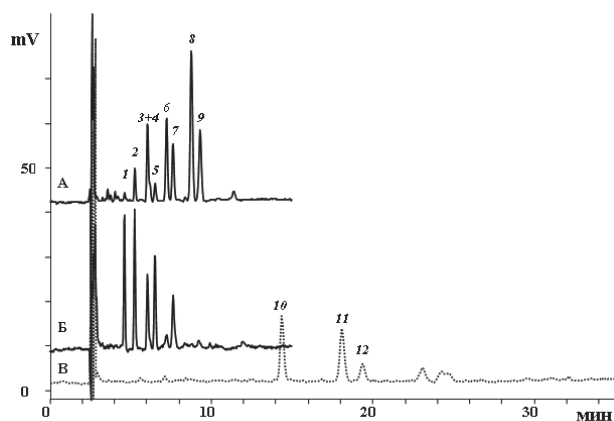


Рис. 1. Разделение триацилглицеролов масел бересклета и древогубца. Масло семян: А – бересклета (*Euonymus japonicus*), Б – древогубца (*Celastrus rugosus*), В – подсолнечника. Условия измерений: колонка – 4.6×250 мм Кромасил-100 5С18; подвижная фаза – 25 % ацетонитрила в ацетоне, 1 мл/мин; детектор – рефрактометрический. Отнесение пиков: 10 – Л₃, 11 – Л₂О, 12 – Л₂П, остальные – см. табл. 1

Данная работа посвящена исследованию видового состава ТАГ масел семян растений двух родов семейства бересклетовые – бересклет и древогубец.

Экспериментальная часть

Для градуировки хроматографической системы мы использовали смесь триацилглицеролов, полученных этерификацией глицерина смесью лауриновой и миристиновой кислот [12]. Семена (без присемянников) исследованных растений получены из плодов, выращенных в Главном ботаническом саду им. Н.В. Цицина РАН (г. Москва) в сезоне 2010 г. Масла экстрагировали из семян *n*-гексаном, который удаляли на вакуумном ротационном испарителе. Хроматографические исследования проводили с использованием стандартного оборудования [12]. Хроматограммы с масс-спектрометрическим детектированием записывали на оборудовании Agilent Infinity 1200 в режиме АРСІ (химическая ионизация при атмосферном давлении).

Результаты и их обсуждение

Компоненты масел семян древогубцев и бересклетов по удерживанию заметно отличаются от триацилглицеролов обычных масел (рис. 1). При этом оба масла образованы одинаковыми (пики № 1 - № 9) видами триацилглицеролов, но в случае древогубцев относительная доля менее удерживаемых компонентов существенно выше.

Для оценки состава триацилглицеролов можно воспользоваться определением эквивалентных углеродных чисел (ECN) [13]. Представленные в табл. 1 результаты не противоречат известным данным [8, 9, 11] о том, что состав триацилглицеролов масел исследуемого семейства отличается наличием в их составе одной ацильной группы с короткой углеродной цепью. Но такой подход не отличается высокой информативностью поскольку, как следует из представленных данных, величины эквивалентных углеродных чисел зависят от состава подвижной фазы, причем эта зависимость более выражена для ТАГ с меньшим значением ECN (табл. 1).

Первичное отнесение пиков (табл. 1) может быть выполнено с использованием инкрементного подхода [14], построенном на гипотезе аддитивности вкладов функциональных групп в суммарное удерживание для логарифмов факторов удерживания. Для этого по хроматограммам подсолнечного и льняного масел при заданном некотором составе подвижной фазы рассчитываем три инкремента. Торговые пищевые марки подсолнечного масла характеризуются постоянством триацилглицеролового состава [15]: три первых основных пика

Таблица 1

Параметры удерживания компонентов масел бересклетов и древогубцев (см. рис.1)

Номер пика (рис. 1)	Вид ТАГ	Параметры ТАГ*			Параметры удерживания					Массы****, а.е.м.	
		N(C)	N(d)	ECN	ECN (эксп.)			25 % CH ₃ CN		ТАГ	Иона
					20 %**	25 %	30 %	t _R , мин	lg k(i)***		
1	УЛн ₂	38	6	26	25.40	25.76	26.09	4.52	-0.132	654.97	655.5
2	УЛнЛ	38	5	28	27.57	27.90	28.16	5.14	-0.010	656.99	657.5
3	УЛ ₂	38	4	30	29.67	29.95	30.15	5.92	0.106	659.00	659.5
4	УЛнО	38	4	30	30.05	30.33	30.46	6.09	0.128	659.00	659.5
5	УЛнП	36	3	30	30.77	30.96	31.10	6.39	0.164	632.97	633.5
6	УЛО	38	3	30	32.02	32.26	32.37	7.09	0.237	661.02	661.5
7	УЛП	36	2	32	32.76	32.93	32.97	7.50	0.275	634.98	635.5
8	УО ₂	38	2	34	34.34	34.49	34.54	8.61	0.364	663.03	663.5
9	УОП	38	1	34	35.05	35.14	35.15	9.14	0.401	637.00	637.5

Примечания: * - N(C) – число атомов углерода в жирнокислотных радикалах; N(d) – число двойных связей в них, ECN – эквивалентные углеродные числа (N(C) - 2·N(d)); ** – экспериментальные значения для трех содержаний ацетонитрила в подвижных фазах; *** – lg k(i) – логарифм фактора удерживания соединения i; **** – ТАГ – молярная масса; М + Н⁺ – масса молекулярного иона, детектируемого масс-спектрометрическим детектором. УЛн₂ – ацетат-ди-α-линоленоат; УЛнЛ – ацетат-α-линоленоат-линолеат; УЛ₂ – ацетат-диглицилолеат; УЛнО – ацетат-α-линоленоат-олеат; УЛнП – ацетат-α-линоленоат-пальмитат; УЛО – ацетат-линолеат-олеат; УЛП – ацетат-линолеат-пальмитат; УЛП – ацетат-линолеат-пальмитат; УО₂ – ацетат-диолеат; УОП – ацетат-олеат-пальмитат.

соответствуют трилинолеату (Л₃), дилинолеату-олеату (Л₂О) и дилинолеату-пальмитату, а первые два из основных пиков на хроматограмме льняного масла – три-α-линоленоату (Лн₃) и ди-α-линоленоат-линолеату (Лн₂Л). В таком случае (для подвижной фазы 25 об.% CH₃CN и хроматографической колонки 250 × 4.6 мм Kromasil-100 5C18, защищенной предколонкой с аналогичной фазой) инкременты равны:

а) для замены α-линоленовой кислоты (Лн) линолевой (Л):

$$\Delta(\text{Лн} \rightarrow \text{Л}) = \lg k(\text{Лн}_2\text{Л}) - \lg k(\text{Лн}_3) = 0.107; \quad (1)$$

б) для замены линолевой кислоты олеиновой (О):

$$\Delta(\text{Л} \rightarrow \text{О}) = \lg k(\text{Л}_2\text{О}) - \lg k(\text{Л}_3) = 0.121; \quad (2)$$

в) для замены олеиновой кислоты пальмитиновой (П):

$$\Delta(\text{О} \rightarrow \text{П}) = \lg k(\text{Л}_2\text{П}) - \lg k(\text{Л}_2\text{О}) = 0.036. \quad (3)$$

Здесь k(i) – фактор удерживания i-го триацилглицерола, Л₂П – дилинолеат-пальмитат.

Однако для удерживания пар триацилглицеролов исследуемых смесей точно таких же (в пределах экспериментальной погрешности ±0.002) инкрементов найти не удастся (табл. 1). Поэтому отнесение пиков возможно только при предположении о том, что однотипные инкременты возрастают при уменьшении удерживания триацилглицеролов. Такой эффект может быть следствием несовпадения точек конвер-

генции (точка пересечений линий трендов относительно удерживания гомологов некоторого ряда) для различных рядов гомологов [16]. При этом именно положение точек конвергенции на карте относительного удерживания может быть использовано для подтверждения предложенного отнесения пиков (рис. 2). Так, например, линии

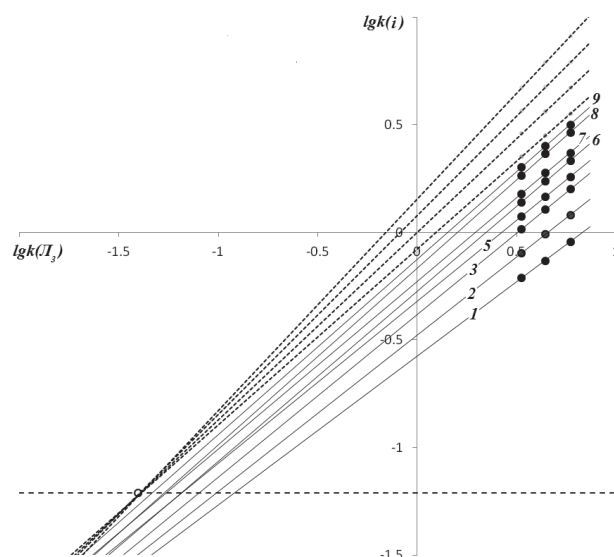


Рис. 2. Карта разделения триацилглицеролов с одним ацетильным радикалом. Номера на линиях трендов соответствуют номерам пиков на рис. 1; пунктиром указано удерживание триацилглицеролов, образованных лауриновой и миристиновой кислотами; горизонтальная пунктирная линия проведена через точку конвергенции

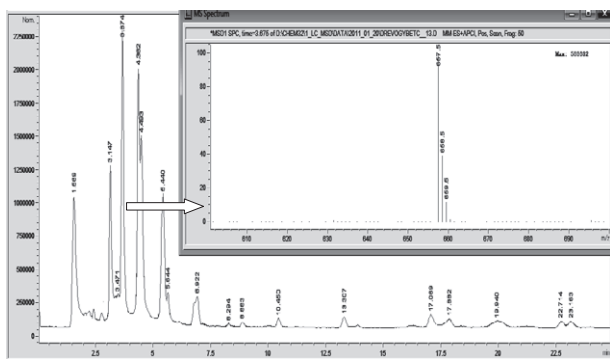


Рис. 3. Разделение триацилглицеролов масла семян древогубца и масс-спектр пика УЛнЛ (ацетата- α -линоленоата-линолеата, указан стрелкой). Условия измерений: колонка – 2.1×150 мм, SB-C18, 1.8 мкм; подвижная фаза – 25 % ацетонитрила в ацетоне; 0.150 мл/мин; детектор – АРСИ масс-спектрометрический

трендов различных ТАГ исследуемых масел пересекают горизонтальную линию, проведенную через точку конвергенции триацилглицеролов, образованных насыщенными кислотами (от трилаурата до тримирилата, - пунктирные линии трендов) в различных точках. И, несмотря на некоторую неравномерность распределения этих точек по горизонтали, смещение вправо можно рассматривать как добавку новой двойной связи [16] в структуру триацилглицерола. Нетрудно подсчитать, что у ТАГ, которому соответствует пик № 1, имеется шесть двойных связей, у пика № 2 – пять. У двух пар ТАГ (№ 5 и № 6) и (№ 7 и № 8) число двойных связей одинаково (по 3 и по 2 соответственно), что полностью соответствует предложенному отнесению. Кстати, тогда короткоцепочечный радикал не содержит С=C-связей.

Эффективность использованного в настоящей работе подхода для отнесения пиков была подтверждена прямым ВЭЖХ исследованием с использованием масс-спектрометрического детектирования в режиме химической ионизации при атмосферном давлении (рис. 3). Отметим, что такой способ детектирования оказался возможным только при использовании микроколонки (2.1×150 мм, SB-C18, 1.8 мкм, Agilent) с расходом подвижной фазы 0.1 мл/мин; для обычных аналитических колонок (4.6×250 мм) шум аналитического сигнала был чрезвычайно большим.

Найденные по площадям пиков на хроматограммах результаты исследования серии масел семян бересклетов и древогубцев (табл. 2), свидетельствуют о том, эти масла образованы в основном (более чем на 90 %, кроме одного случая) триацилглицеролами, в состав которых всходит один радикал уксусной кислоты. При этом ненасыщенность масел семян древогубца выше, чем бересклетов. Соответственно, получение трансгенных растений введением гена, кодирующего биосинтез ацетил-CoA *sn*-1,2-диацилглицерол ацилтрансферазы [17], позволит напрямую получать низкокалорийные масла, коммерчески доступные под названием SALATRIM (short and long acyltriglyceride molecule, [18]), получаемое методами перезтерификации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Akoh C.C., Min D.B. Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and biotechnology. CRC Press, 2002. 333 p.
2. Das UN. Essential fatty acids: Biochemistry, physiology, and pathology // Biotechnology J. 2006. V. 1. P. 420-439.

Таблица 2

Видовой состав триацилглицеролов масел семян бересклетов и древогубцев, моль % (± 0.5 %)

Номер пика (рис. 1)	Вид	Род										
		Бересклеты <i>Euonymus</i>								Древогубцы <i>Celastrus</i>		
		1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	УЛ _{н2}	1.0	1.9	1.3	1.3	0.4	2.3	1.9	3.6	19.4	8.0	9.2
2	УЛнЛ	4.6	6.3	3.3	3.6	3.7	7.1	4.4	8.7	22.6	21.3	22.8
3 + 4	УЛ ₂ + УЛНО	14.0	15.5	9.1	10.7	30.0	18.6	13.1	17.9	14.4	24.7	25.2
5	УЛнП	2.0	3.1	2.5	1.9	1.8	3.1	2.7	5.5	18.6	10.6	11.9
6	УЛО	16.1	14.2	14.7	16.6	14.2	16.9	15.5	19.4	3.2	8.6	9.1
7	УЛП	7.8	11.0	6.6	6.1	21.5	11.9	6.8	12.3	13.6	13.0	12.5
8	УО ₂	18.6	30.7	36.3	40.1	12.6	21.6	33.2	28.2	1.1	2.8	2.8
9	УОП	10.2	14.3	17.4	14.6	11.5	13.5	13.8	0.2	3.7	4.9	3.0
	Ост.**	25.7	3.0	9.0	5.1	4.5	5.0	8.6	4.4	3.4	6.2	3.6

Примечания: 1* – *maackii*, 2 – *macroptera*, 3 – *hamiltonianus*, 4 – *sieboldiana*, 5 – *sacrosanct*, 6 – *maximowicziana*, 7 – *bungeanus*, 8 – *europaeus*, 9 – *orbiculatus*, 10 – *scandens*, 11 – *rugosus*. Ост.** – остальные ТАГ. Обозначения ТАГ – см. табл.1.

3. Conjugated fatty acids in food and their health benefits / Benito P. et [al.] // J. Biosci. Bioengineering. 2005. V.100. P. 152-157.
4. A study of the mechanical and surface properties of the oil paint films treated with organic solvents and water / Hedley G. et [al.] // J. Therm. Anal. 1991. V.37. P. 2067-2088.
5. Mooney B.P. The second green revolution? Production of plant-based biodegradable plastics // Biochem. J. 2009. V.418. P. 219-232.
6. Jain S.K., Kumar S., Chaube A. Technical sustainability of biodiesel and its blends with diesel in C.I. engines: A Review // Intern. J. Chem. Engin. Applic. 2011. V. 2. P. 101-109.
7. Durrett T.P., Benning C., Ohlrogge J. Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels // Plant J. 2008. V. 54. P. 593-607.
8. Optically Active Aceto-triglycerides of Oil from *Euonymus verrucosus* Seed / R. Kleiman et [al.] // Lipids. 1966. V. 1. P. 286-287.
9. (S)-1,2-Diacyl.3-acetins: Optically Active Triglycerides from *Euonymus verrucosus* Seed Oil / R. Kleiman et [al.] // Lipids. 1967. V. 2. P.473-478.
10. Трусов Н.А. Морфолого-анатомическое строение плодов представителей семейства Celastraceae R.Br. в связи с их масличностью. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва. 2010. 20 с.
11. Composition of *Celastrus orbiculatus* Seed Oil / R.W. Miller et [al.] // Lipids. 1974. V. 9. P. 528-536.
12. Использование обращенно-фазовой ВЭЖХ в установлении подлинности жиров и масел / Дейнека В.И. и [др.] // Зав. лаб. 2008. Т. 74. № 3. С. 15-19.
13. Podlaha O., Töregård B. A system for identification of triglycerides in reversed phase HPLC chromatograms based on equivalent carbon numbers // J. High Resol. Chromatogr. 1982. V. 5. P. 553-558
14. Инкрементный подход при определении состава триглицеридов / В.И. Дейнека и [др.] // Хим.-фарм. ж. 2002. Т. 36, №7. С. 44-47.
15. Анализ растительных масел с использованием ВЭЖХ / В.И. Дейнека и [др.] // Ж. аналит. химии. 2003. Т. 58, № 12. С. 1294-1297.
16. Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Туртыгин А.В. Метод относительного анализа удерживания: обращено-фазовая ВЭЖХ триглицеридов // Сорбц. и хроматогр. процессы. 2008. Т. 8. Вып. 3. С. 465-477.
17. Isolation of a Gene Encoding a 1,2-Diacylglycerol-Sn-Acetyl-CoA Acetyltransferase From Developing Seeds of *Euonymus alatus* / A. Milcamps et [al.] // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 5370-5377.
18. Smith R.E., Finley J.W., Leveille G.A. Overview of Salatrim: a family of lowcalorie fats // J. Agric. Food Chem. 1994. V. 42. P. 432-434.

DETERMINATION OF MONOACETYLDIACYLGLYCEROLS OF *Celastrácea* PLANT SEED OILS

A.V. Turtygin¹, V.I. Deineka¹, L.A. Deineka¹, N.A. Trusov², M.Yu. Tret'jakov¹

¹ *Belgorod State Research University, Biological-Chemical Department,
Pobeda str. 85, Russian Federation, Belgorod, 308015*

² *Main Botanical Garden, Russian Academy of Science,
Botanicheskaya Street, 4, Russian Federation, Moscow, 127276
deineka@bsu.edu.ru*

In the paper some methods for triacylglycerols type determinations of two *Celastraceae* (spindle tree and American bittersweet) plant species were considered. The proposed identification has been proved by HPLC-APCI-MS method. The triacylglycerols were found to be mainly composed by acetic, α -linolenic, linoleic, oleic and palmitic acids, American bittersweet seed oil was more unsaturated compared to a spindle tree one: the portion of triacylglycerol with one acetic acid radical was commonly more than 90 % of the overall triacylglycerols.

Key words: seed oils, *Euonymus*, *Celastrus*, triacylglycerols, types of compositions, HPLC, APCI-MS