

## Определение эстолидов и триацилглицеринов масла семян *Sapium discolor*: сопоставление разделения веществ в условиях традиционной и микроколоночной (Милихром А-02) хроматографии

Ань Ван Нгуен<sup>1</sup>, \*В.И. Дейнека<sup>1</sup>, Лонг Куок Фам<sup>2</sup>, Фьонг Лан Доан<sup>2</sup>,  
Л.А. Дейнека<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Российская Федерация, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

<sup>2</sup>Институт химии природных продуктов, Вьетнамская академия наук и технологий, Вьетнам, 122300, г. Ханой, Кауззэй ул. Хоанг Куок Вьет, 18

\*Адрес для переписки: Дейнека Виктор Иванович, E-mail: [deineka@bsu.edu.ru](mailto:deineka@bsu.edu.ru)

Поступила в редакцию 14 января 2018 г., после доработки – 5 февраля 2018 г.

Разработаны условия разделения и УФ-детектирования эстолидов (триацилглицерины с одним олигомерным радикалом кислоты) и триацилглицеринов масла семян *Sapium discolor* в условиях традиционной аналитической и микроколоночной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для разделения использовали колонки, заполненные сорбентом Kromasil 100-5C18, и подвижные фазы системы «пропанол-2 – ацетонитрил». С использованием инкрементного подхода рассчитан и в дальнейшем подтвержден анализом электронных и масс-спектров видовой состав компонентов масла. Показано, что масло содержит радикалы традиционных α-линоленовой, линолевой, олеиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот и двух необычных, параметры которых удовлетворяют литературным данным об их строении. Благодаря присутствию во всех эстолидах радикала кислоты с хромофором состава  $O=CO R_1-CH=CH-CH=CHR_2$  возможно чувствительное селективное детектирование эстолидов при длине волны 266 нм. Этот способ детектирования является хорошим дополнением к детектированию при 210 нм, позволяющему обнаруживать не только эстолиды, но и триацилглицерины, хотя и примерно со втрое сниженной чувствительностью. Экспериментально оценено снижение суммарной эффективности (по числу теоретических тарелок) при переходе от колонок с диаметром 4-4.6 мм к микроколоночной ВЭЖХ и предложен способ разделения неразделенных пиков возникающих при этом за счет использования специальной программы *Magicplot student 2.7.2*, с хорошими характеристиками результатов определения относительных количеств эстолидных компонентов масла.

**Ключевые слова:** обращенно-фазовая ВЭЖХ, микроколоночная ВЭЖХ, триацилглицерины, эстолиды, УФ-детектирование, разделение сложных пиков, *Magicplot student 2.7.2*.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2018, vol. 22, no. 1, pp. 20-27

DOI: 10.15826/analitika.2018.22.1.003

## Determination of *Sapium discolor* seed oil estolides and triacylglycerines: comparison of the substances separation by conventional and microcolumn (Milichrome A-02) chromatography

Anh Van Nguyen<sup>1</sup>, \*V.I. Deineka<sup>1</sup>, Long Quoc Pham<sup>2</sup>, Phuong Lan Doan<sup>2</sup>,  
L.A. Deineka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Belgorod National Research University, Pobeda str., 85, Belgorod, Russian Federation, 308015.

<sup>2</sup>Institute of Natural Products Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Viet Nam, 122300

\*Corresponding address: Victor I. Deineka, E-mail: [deineka@bsu.edu.ru](mailto:deineka@bsu.edu.ru)

Submitted 14 January 2018, received in revised form 05 February 2018

Methods for the separation and UV detection of *Sapium discolor* seed oil estolides and triacylglycerols by traditional analytical as well as by microcolumn reversed-phase high-performance liquid chromatography approaches were developed. For the separation, the columns filled with Kromasil 100-5C18 sorbent were used together with the "propanol-2 – acetonitrile" mobile phase systems. The oil composition was calculated on the basis of the incremental approach. The propositions were confirmed by the mass-spectrometric and the electronic spectra data. The oil was shown to be composed of the traditional  $\alpha$ -linolenic, linoleic, oleic, palmitic and stearic acids, and two unusual acids that match the literature data about their structure. Due to the presence of the acid radical with the chromophore  $O=COR_1-CH=CH-CH=CHR_2$  composition in all estolides, the sensitive and the selective detection of the compounds was possible at the wavelength of 266 nm. This method of detection was a good alternative to the detection at 210 nm, allowing the detection of not only the estolides but also the triacylglycerols, although with approximately threefold reduced sensitivity. The experiment indicated the reduction of the total efficiency (as a number of theoretical plates) in the swap of traditional by microcolumn HPLC, and the subsequent method was proposed to separate the unseparated peaks that occur during this exchange by using the Magicplot student 2.7.2 software. This was achieved with good performance results of the qualitative and quantitative determination of the relative amounts of estolides in the oil.

**Key words:** RP-HPLC, HPLC, microcolumn chromatography, triacylglycerols, estolides, UV detection, deconvolution of complex peaks, Magicplot student 2.7.2.

## Введение

Масла, образованные высшими жирными кислотами с сопряженными двойными связями в целом, и масло семян видов *Sapium* в частности, представляют большой интерес как для фармации [1, 2], так и для получения биодизеля [3, 4]. В работе [5] подчеркивали, что официальный метод определения масел, основанный на получении из них метиловых эфиров жирных кислот, имеет существенный недостаток перед методом определения масел в виде исходных триацилглицеринов (ТАГ) при помощи обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). При этом, однако, одна из проблем ОФ ВЭЖХ растительных масел связана с детектированием, поскольку из-за отсутствия в большинстве радикалов жирных кислот эффективных хромофоров наиболее популярный спектрофотометрический детектор оказывается мало применимым. Тем не менее, использование УФ-детектирования при анализе обычных растительных масел известно в литературе [6, 7]: определение ТАГ выполняют при возможно более коротких длинах волн (около 205 нм), для чего необходимы высококачественные растворители. Но при количественном определении существуют проблемы, связанные с зависимостью отклика детектора от степени ненасыщенности радикалов ТАГ, которые трудно учесть *a priori*. В этом отношении масла с сопряженными двойными связями являются идеальными, поскольку максимумы абсорбции батохромно смещаются, попадая в ближний УФ-диапазон.

Ранее в нашей лаборатории (в НИУ БелГУ) было показано, что использование микроколоночной хроматографии на базе отечественных приборов Милихром возможно для разделения ТАГ традиционных для РФ пищевых масел [8], и цель настоящей работы – оценка возможности использования прибора Милихром, снабженного только спектро-

фотометрическим детектором, для определения растительных масел с сопряженными двойными связями на примере масла семян *Sapium discolor* Champ. Ex Benth.

## Экспериментальная часть

Для разделения ТАГ растительных масел использовали хроматографические системы: (1) Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием; микроколоночный хроматограф (2) Милихром-А02 (ЗАО «ЭкоНова») со спектрофотометрическим детектором и хроматограф (3) Shimadzu LC-20 для полупрепаративного выделения отдельных компонентов. Применяли хроматографические колонки для системы (а) 4.6 × 250 мм Kromasil 100-5C18 – для записи хроматограмм со спектрофотометрическим детектированием, и (b) 2.1 × 150 мм Kromasil 100-5C18 – при масс-спектрометрическом детектировании в системе (1); 2 × 75 мм Kromasil 100-5C18 – при записи хроматограмм в условиях системы (2); 10 × 250 мм Supelcosil™LC-18 – для системы (3).

Все эксперименты проводили в изократическом режиме, хроматограммы записывали, хранили и обрабатывали, используя специализированные программные продукты ChemStation Agilent для системы (I), Мультихром 1.5 для системы (II) и LCsolution для системы (III). Для графического разделения смежных пиков использовали программу *Magicplot student 2.7.2*, с аппроксимацией пиков не модифицированными Гауссианами.

ТАГ обозначали по общепринятой схеме, указывая буквами радикалы кислот без дифференциации их положения в молекуле. Буквенные обозначения радикалов кислот: **Э** –  $\alpha$ -элеостеариновой – (9Z,11E,13E)-октадека-9,11,13-триеновой; **А** – 8-гидроксиокта-5,6-диеновой; **Х** – (2E,4Z)-дека-2,4-диеновой; **У** – декатриеновой, образованной из Х за счет повышения ненасыщенности; **Лн** –  $\alpha$ -линоле-

новой – (9Z,12Z,15Z)-октадека-9,12,15-триеновой; Л – линолевой – (9Z,12Z)-октадека-9,12-диеновой; О – олеиновой – (9Z)-октадека-9-еновой; П – пальмитиновой (C16:0) и С – стеариновой (C18:0). Формула, например, Л<sub>2</sub>О обозначает ТАГ с двумя радикалами линолевой кислоты и с одним радикалом олеиновой кислот. Формула эстолидов включает комбинации либо АХ, либо АУ с двумя другими обычными радикалами: АХЛ<sub>2</sub> – обозначает эстолид, в котором комбинация кислот А и Х дополнена двумя радикалами линолевой кислоты.

Факторы удерживания рассчитывали с использованием «мертвого» времени, найденного по удерживанию нитрата натрия.

В работе использовали масло семян *Sapium dicolor* Champ. Ex Benth, собранных в горных районах северного Вьетнама, масло семян момордики харангия, выращенной в Белгороде и льняное масло (Botanica).

## Результаты и их обсуждение

Переход от стандартной аналитической хроматографической колонки размером 4.6 × 250 мм к микроколонке размером 2 × 75 мм благоприятен в том смысле, что удается уменьшить практически на порядок расход дорогостоящих растворителей. Если при этом сохраняется размер частиц сорбента, упакованных в колонку, то только вследствие уменьшения длины колонки число теоретических тарелок должно уменьшиться более чем в 3 раза. Но реальное уменьшение оказалось еще больше, что видно из сопоставления графиков Ван-Деемтера для трех хроматографических систем (рис. 1) на примере ТАГ (αЭ)<sub>2</sub>Л:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (1)$$

где  $H$  – высота эквивалентной теоретической тарелки, мкм;  $A$  – константа, связанная с так называемой «вихревой» диффузией;  $B$  – константа, связанная с продольной диффузией;  $C$  – константа, связанная с «сопротивлением» массопереносу,  $u$  – линейная скорость подачи подвижной фазы, см/мин [9].

На рис. 1 графики для систем 1а и 1b не совпадают, хотя это связано с тем, что данные приведены для объемной скорости подвижной фазы. При отнесении результатов к одинаковой линейной скорости (обратно пропорциональной площади поперечного сечения колонки) они практически совпадают, и это не удивительно вследствие заполнения колонок одним и тем же сорбентом одним и тем же производителем. Экспериментальные точки для системы 2 (рис. 1) имеют минимум, достичь которого на хроматографе Agilent оказалось весьма проблематично, при этом все они располагаются заметно выше точек, найденных в условиях 1а и 1b. Это указывает на дополнительную потерю эффективности, что может быть следствием, напри-

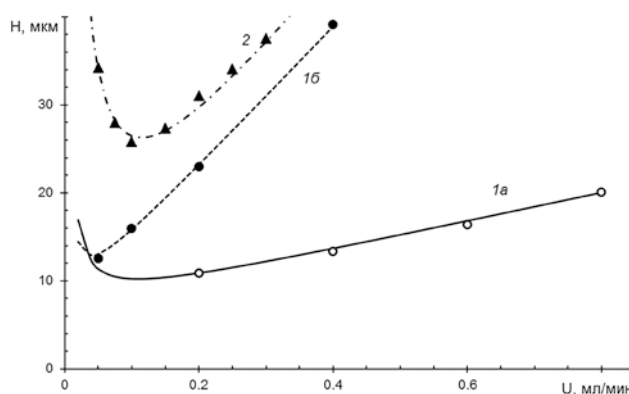


Рис. 1. График по уравнению Ван-Деемтера для трех хроматографических систем. Тестовое вещество: (Э)<sub>2</sub>Л; марка стационарной фазы Kromasil 100-5C18; колонки: 1а – 4.6 × 250 мм (Agilent), 1b – 2.1 × 150 мм (Agilent), 2 – 2.0 × 75 мм (Миллихром). Подвижная фаза: 45 % пропанола-2 и 55 % ацетонитрила. Температура термостатов колонок – 35 °С

Fig. 1. Van Deemter plot for the three chromatographic systems. Test substance: (Э)<sub>2</sub>L (di-α-eleostearat-linoleate); stationary phases Kromasil 100-5C18; columns: 1а – 4.6 × 250 mm (Agilent), 1b – 2.1 × 150 mm (Agilent), 2 – 2.0 × 75 mm (Milihrom). Mobile phase: 45% of propanol-2 and 55% of acetonitrile. Temperature of column oven – 35 °C

мер, иного способа введения пробы с остановкой потока в системе 2. Но очевидно, что наивысшая эффективность (по числу теоретических тарелок) в системе 2 достигается при скорости подачи подвижной фазы 100 мкл/мин. Именно эта скорость была использована при записи хроматограмм в настоящей работе.

Одна из проблем при количественном определении ТАГ растительных масел методом ОФ ВЭЖХ – существование так называемых проблемных пар ТАГ: соединений с близкими временами удерживания, полное (на уровне базовой линии) разделение которых труднодостижимо. Понятно, что при переходе к микроколоночной хроматографии проблема не исчезает, а усугубляется. Но решение может быть получено использованием специальных программ, способных суммировать неразделенных пиков представить в виде набора индивидуальных составляющих. Одной из таких программ является бесплатно распространяемая программа MagicPlotStudent 2.0 (<https://magicplot.com/downloads.php>), использованная в настоящей работе.

Пример эффективности использования программы представлен на рис. 2 и в табл. 1, где приводятся части хроматограмм с двумя ближайшими пиками и результат их количественного определения. Из очищенного масла момордики методом полупрепаративной ВЭЖХ выделили два компонента триацилглицеринового комплекса: три-α-элеостеарат (Э<sub>3</sub>) и ди-α-элеостеарат-линолеат (Э<sub>2</sub>Л). Для получения хроматограмм с хорошо разделенными

Таблица 1

Параметры исходных пиков и пиков после разделения в ПО MagicPlotStudent 2.0

Table 1

Parameters of the initial peaks and those after the peaks separation by Magicplot student 2.7.2 software

Условия хроматографического разделения		Для подвижных фаз, с объемной долей пропанола-2					
		20 %		60 %		80 %	
		Э <sub>3</sub>	Э <sub>2Л</sub>	Э <sub>3</sub>	Э <sub>2Л</sub>	Э <sub>3</sub>	Э <sub>2Л</sub>
$R_s$		2.12		0.78		0.46	
Времена удерживания, мин	На хроматограмме по ПО «Мультихром 1.5»	6.87	8.43	1.86	1.99	1.53	
	После разделения в ПО «MagicPlotStudent 2.0»	6.87	8.43	1.86	1.99	1.45	1.53
Доля в сумме площадей двух пиков	На хроматограмме по ПО «Мультихром 1.5»	39.9	60.1	36.1	63.9	Не разделены	
	После разделения в ПО «MagicPlotStudent 2.0»	39.0	61.0	37.9	62.1	39.2	60.8

пиками этих веществ и с не полностью разделенными пиками использовали три состава подвижных фаз с различной концентрацией пропанола-2 (от 20 до 80 % об.) в ацетонитриле. При этом оказалось (табл. 1), что соотношение площадей, найденное для  $R_s = 2.12$  (вариант а на рис. 2), оказалось примерно таким же (различие меньше 1 %), как и в случае с  $R_s = 0.46$  (вариант в на рис.2), что подтверждает эффективность применения предложенного способа разделения пиков.

Разделение компонентов масла *Sapium discolor* представляет интерес, во-первых, тем, что в отличие от большинства обычных растительных масел, образованных триацилглицеринами (ТАГ), это масло может содержать в качестве основных компонентов эстолиды (estolides): производные глицерина, аци-

лированного тремя жирными кислотами, одна из которых также ацилирована четвертым радикалом. Такое возможно в том случае, когда «начальный» ТАГ содержит один радикал кислоты (для другого вида рода *Sapium* – *S. sebiferum* только в положении *sn*-3 [10]), заканчивающийся спиртовой группой, по которой происходит дополнительное ацилирование. Во-вторых, один из радикалов эстолида (как и в масле *S. sebiferum* [10-12] и в масле еще одного представителя семейства Euphorbiaceae – *Sebastiania commersoniana* [13]) может содержать две сопряженные C=C-связи, дополнительно находящиеся в сопряжении с карбоксильной карбонильной группой, что приводит к появлению максимума абсорбции в УФ-диапазоне (266 нм) – рис. 3.

В настоящей работе для анализа компонентов масла *S. discolor* вначале была использована система 1а, как система с наивысшей эффективностью. При использовании двух длин волн детектирования (210 нм и 266 нм) удается записать хроматограммы масла семян *S. discolor* и льняного масла (рис. 4).

Известно, что льняное масло имеет достаточно постоянный качественный состав; оно содержит ТАГ, образованные α-линоленовой, линолевой, олеиновой, пальмитиновой и стеариновой кислотами [14]. Хроматографический профиль ТАГ масла (порядок элюирования видов ТАГ, но не их степень разделения) практически не зависит от состава подвижной фазы и марки стационарной обращенной

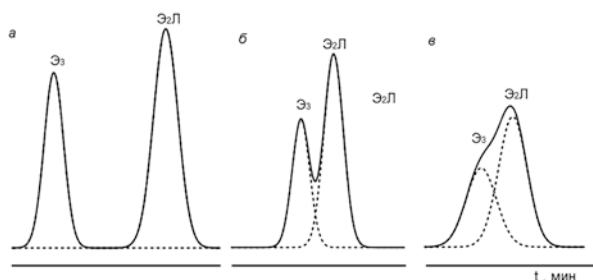


Рис. 2. Фрагменты хроматограмм с парой пиков с различной степенью разделения. Соединения Э<sub>3</sub> – три-α-элеостеарат, Э<sub>2Л</sub> – ди-α-элеостеарат-линолеат; хроматографическая система 2; подвижные фазы системы пропанол-2 – ацетонитрил, содержащие: а – 20, б – 40 и в – 80 об. % пропанола-2. Времена удерживания приведены в табл. 1

Fig. 2. Parts of chromatograms of peak pairs with different degrees of separation. Compounds Э<sub>3</sub> – tri-α-eleostearate, Э<sub>2Л</sub> – di-α-eleostearat-linoleate; chromatographic system 2; mobile phases of system propanol-2 – acetonitrile, with а – 20, б – 40 and в – 80 vol.% of propanol-2. For the retention times see Table 1

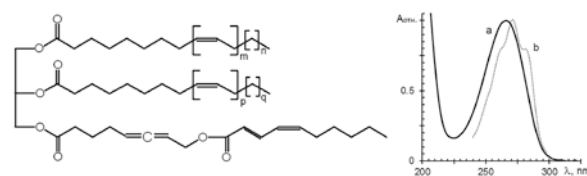


Рис. 3. Структура и электронный спектр эстолидов (и три-α-элеостеарата)

Fig. 3. Structure and electronic spectrum of estolides (and tri-α-eleostearate)

Таблица 2

Параметры удерживания и масс-спектров компонентов масел семян *Sapium discolor* в условиях 1а

Table 2

Parameters of retention and mass-spectra of *Sapium discolor* seed oil components for system 1a

Мас-ло	№ пика <sup>1</sup>	ТАГ	t <sub>R</sub>	lg k	Инкременты, Δ(i→j)						M/z [M + 1] <sup>+</sup>
					Y→X	AX→Лн	Лн→Л	Л→О	О→П	П→С	
Семян <i>Sapium discolor</i>	1*	АУЛн <sub>2</sub>	7.25	0.316							899.5
	1	АХЛн <sub>2</sub>	8.40	0.408	0.091						901.5
	2*	АУЛнЛ	8.92	0.444							901.5
	2	АХЛнЛ	10.42	0.533	0.089		0.126				903.5
	3*	АУЛ <sub>2</sub>	11.09	0.568			0.124				903.7
	4*	АУЛнО	11.53	0.589				0.145			903.5
	5*	АУЛнР	12.30	0.625					0.035		877.6
	3	АХЛ <sub>2</sub>	13.10	0.658	0.090		0.125				905.5
	4	АХЛнО (+Лн <sub>3</sub> )	13.61	0.678	0.089	0.270		0.145			905.7 (873.7)
	5	АХЛнП	14.57	0.714	0.089				0.036		879.5
	5**	Э <sub>3</sub>	15.59	0.748							873.6
	6	АХЛО (+Лн <sub>2</sub> Л)	17.32	0.802		0.269	0.124	0.144			907.7 875.5
	7	АХЛП	18.60	0.838					0.036		881.5
	8	АХЛнС	19.08	0.850						0.136	907.7
9	(н/о) ЛнЛ <sub>2</sub>	22.31	0.927		0.269	0.125				887.5	
10	АХО <sub>2</sub>	23.16	0.945				0.143			909.5	
11	АХЛС +АХОС	24.48	0.972						0.134	909.5 911.6	
12	Л <sub>3</sub>	28.88	1.051			0.124				879.6	
13	ЛнЛО	30.09	1.070		0.268		0.143			879.5	
14	ЛнЛП	32.44	1.105		0.267			0.035		857.5	
Средние значения					0.090	0.269	0.125	0.144	0.035	0.135	
Льняное	Средние значения						0.125	0.143	0.035	н/о	

Примечания: <sup>1</sup> – номера пиков на рис. 4; н/о – не определяли; пустые клетки указывают на отсутствие соответствующих инкрементов.

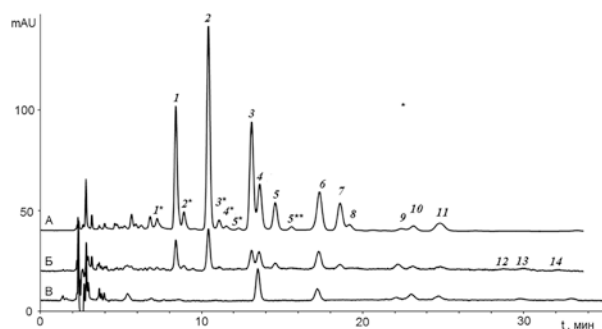


Рис. 4. Разделение компонентов масла семян *Sapium discolor* (А, 266 нм) и (Б, 210 нм) на фоне хроматограммы масла льняного (В, 210 нм) в условиях 1а

Fig. 4. Separation of *Sapium discolor* seed oil components (A, 266 nm) and (B, 210 nm) against the background of linseed oil chromatogram (B, 210 nm) for the system 1a

фазы, и определяется ростом эквивалентных углеродных чисел. Рис. 4 показывает, что масло семян *S. discolor* имеет компоненты, быстрее элюирующиеся по сравнению даже с три-α-линоленоатом (Лн<sub>3</sub>). Эстолидный характер основных компонентов масла семян *S. discolor* подтвержден записью электронных спектров в кювете детектора, имеющих максимум абсорбции в диапазоне, соответствующем литературным данным (266 нм), хорошей распознаваемостью состава компонентов по инкрементному подходу [15] при полной согласованности с параметрами масс-спектров (табл. 2). Инкременты, рассчитанные для льняного масла, полностью совпали (при экспериментальной погрешности порядка 0.002) с инкрементами соответствующих пар ТАГ из масла семян *S. discolor*, т.е. при переходах внутри пар соответствующих ТАГ происходят одинаковые замены радикалов кислот. Это позволяет легко рассчитать ТАГ состав масла семян *S. discolor*

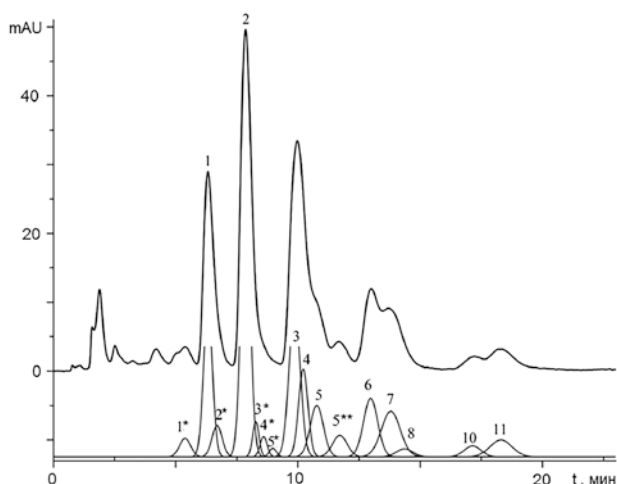


Рис. 5. Разделение эстолидов масла семян *Sapium discolor* (условия 2, 266 нм) и результат применения программы Magicplot student (внизу)

Fig. 5. Separation of *Sapium discolor* seed oil estolides (system 2, 266 nm), and the result of Magicplot student software (at the bottom)

и установить, что оно образовано набором обычных кислот ( $\alpha$ -линоленовой, линолевой, олеиновой, пальмитиновой и стеариновой) и двух необычных, строение которых не может быть доказано использованными в работе методами (кроме того, что одна из кислот имеет  $\omega$ -гидроксильную группу, а вторая – содержит хромофор из двух С=C-связей, находящихся в сопряжении между собой и с карбонильной группой) и поэтому принято соответствующим литературным данным [10-12].

Очевидно и то, что детектирование при 266 нм в несколько раз более чувствительно по сравнению с детектированием при 210 нм для эстолидов. При этом из хроматограммы исчезают ТАГ, не содержащие соответствующую пару радикалов кислот. Хроматограмма на рис. 4а напоминает хроматограмму, полученную для масла другого вида *S. sebiferum* [11]. Только доля компонентов, приходящаяся на эстолиды заметно выше в нашем случае. Из-за неразделенности некоторых пиков строгое количественное соотношение между долями, приходящимися на ТАГ и эстолиды, в нашем случае определить затруднительно, но доля ТАГ не превышает 20-30 моль %.

Заметным отличием между составами масел двух видов *Sapium* является появление в нашем случае еще одной группы пиков, что может быть объяснено только увеличением степени ненасыщенности сопряженной 2,4-декадиеновой кислоты, причем эта дополнительная С=C-связь не находится в сопряжении с предыдущим хромофором. Такая гипотеза была подтверждена анализом кислот, образующихся при низкотемпературном гидролизе масла этанольным раствором щелочи – перед определяемой детектированием при 266 нм декадиеновой кислотой обнаруживается другая кисло-

та, со спектром, от нее отличающимся только в более коротковолновой области.

В работе [16] указывалось, что в гидролизате масла семян *S. discolor* в отличие от гидролизата масла семян *S. sebiferum* находят небольшое количество  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты, что подтверждается и в настоящей работе: пик № 5б приобретает спектр сопряженной триеновой кислоты, рис. 4, и по удерживанию совпадает с пиком (Э)<sub>3</sub> из масла момордики харантия [17].

Хроматограмма, записанная в условиях 2, представлена на рис. 5.

Несмотря на то, что эффективность разделения пиков заметно снизилась, определение основных компонентов масла не вызывает особых проблем, а с использованием программы *MagicPlot Student* удается определить все компоненты, которые видны при детектировании при 266 нм на рис. 5 (табл. 3). Впрочем, определить все компоненты, элюирующиеся одним пиком в условиях 2 без их разделения в условиях 1а, было бы сложно. На хроматограмме не виден только пик № 9 на рис. 5, состав которого не удалось определить. При этом доля площадей пиков для определения методами 1а и 2 оказалась достаточно близкой, показывая эффективность предложенного метода разделения пиков в условиях пониженной эффективности разделения всех компонентов. Отметим также, что несмотря на специфический способ записи хроматограммы (с остановкой потока и, как следствие, неизбежностью затрат некоторого времени для выхода системы на стационарный режим элюирования) инкрементные соотношения хорошо сохраняются и в случае микроколоночной хроматографии, табл. 3.

## Выводы

Предложен вариант использования образцово-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием в комбинации с компьютерным разделением пиков с близкими временами удерживания, который позволил определить состав эстолидов масла семян *Sapium discolor* не только в варианте традиционной аналитической хроматографии, но и в варианте микроколоночной хроматографии с использованием хроматографа Милихром-А02.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность Министерству Науки и Технологий Вьетнама (44/2014/HD-NDT) за финансовую поддержку исследования.

## Acknowledgements

The authors are thankful to The Ministry of Science and Technology, Vietnam (44/2014/HD-NDT) for the financial support of the present research.

Таблица 3

Параметры удерживания и мольная доля индивидуальных веществ в сумме эстолидов масла семян *Sapium discolor* в условиях 2 (и 1а) при детектировании при 266 нм

Table 3

Retention parameters and mole fraction of individual substances in the sum of *Sapium discolor* seed oil estolides for systems 2 and 1a at 266 nm detection

№ пика <sup>1</sup>	Виды эстолидов	$t_R$ , мин	lg $k$	Инкременты, $\Delta(i \rightarrow j)$					$\alpha^2$ , %	
				Y→X	Лн→Л	Л→О	О→П	П→С	1а	2
1а	АУЛн <sub>2</sub>	5.38	0.446						1.5	1.4
1	АХЛн <sub>2</sub>	6.31	0.538	0.092					13.1	13.3
2*	АУЛнЛ	6.64	0.566		0.120				2.9	2.4
2	АХЛнЛ	7.86	0.658	0.091	0.120				25.8	26.1
3*	АУЛ <sub>2</sub>	8.28	0.685		0.119				1.8	1.4
4*	АУЛнО	8.54	0.701			0.135			1.0	0.7
5*	АУЛнР	8.98	0.727				0.026		0.5	0.3
3	АХЕЛ <sub>2</sub>	9.87	0.775	0.091	0.118				16.8	17.2
4	АХЛнО	10.22	0.793	0.092		0.136			8.3	8.3
5	АХЛнП	10.77	0.819	0.092			0.026		5.8	5.1
6	$\alpha\text{Э}_3$	11.72	0.861						1.9	1.0
7	АХЛО	12.98	0.912		0.118	0.136			8.4	9.0
8	АХЛП	13.71	0.938				0.027		7.1	6.1
9	АХЛнС	14.32	0.959					0.140	1.2	2.1
10	АХО <sub>2</sub>	17.15	1.045			0.134			1.6	1.8
11	АХЛС	18.31	1.076					0.138	3.3	3.9

Примечания: <sup>1</sup> – номера пиков на рис. 5; <sup>2</sup> – мольная доля, рассчитанная по площадям пиков в условиях 1а и 2; пустые клетки указывают на отсутствие соответствующих инкрементов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Koba K., Belury M.A., Sugano M. Potential health benefits of conjugated trienoic acids // *Lipid Technol.* 2007. V. 19, № 9. P. 200-203.
- Kumar P., Bhatt R.P., Singh L. Evaluation of *In-vitro* antibacterial and anticandidal activity of *Sapium sebiferum* L. // *J. Appl. Pharmac. Sci.* 2011. V. 01, № 8. P. 191-193.
- Production and selected fuel properties of biodiesel from promising non-edible oils: *Euphorbia lathyris* L., *Sapium sebiferum* L. and *Jatropha curcas* L. / W. Rui [et al.] // *Bioresource Technol.* 2011. V. 102. P. 1194-1199.
- Liu Y., Xin H.-L., Yan Y.-J. Physicochemical properties of stillingia oil: Feasibility for biodiesel production by enzyme transesterification // *Ind. Crops Prod.* 2009. V. 30. P. 431-436.
- Применение обращено-фазовой ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием для обнаружения фальсификации сливочного масла / В.И. Дейнека и др. // *Методы оценки соответствия.* 2007. № 6. С. 10-11.
- Quantitation of triacylglycerols in plant oils using HPLC with APCI-MS, evaporative light scattering, and UV detection / M. Holčapek [et al.] // *J. Sep. Sci.* 2005. V. 28. P. 1315-1333.
- UV spectral properties of lipids as a tool for their identification / E. Angioni [et al.] // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2002. V. 104. P. 59-64.
- Дейнека В.И., Дейнека Л.А. Анализ растительных масел методом микроколонной высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Ж. аналит. химии* 2004. Т. 59, № 9. С. 895-898.
- Katz E., Ogan K.L., Scott R.P.W. Peak dispersion and mobile phase velocity in liquid chromatography: the pertinent relationship for porous silica // *J. Chromatogr.* 1983. V. 270. P. 51-75.
- Christie W.W. The glyceride structure of *Sapium sebiferum* seed oil // *Biochim. Biophys. Acta*, 1969. V. 187. P. 1-5.
- High-performance liquid chromatographic investigations of stillingia oil // K. Aitzetmüller [et al.] // *J. Chromatogr.* 1992. V. 602. P. 165-173.
- Structure of an optically active allene-containing tetraester triglycerides isolated from the seed oil of *Sapium sebiferum*. / H.W. Sprecher [et al.] // *Biochem.* 1965. V. 4. P. 1856-1863.
- Spitzer V., Tomberg W., Pohlentz G. Structure analysis of an allene-containing estolide tetraester triglyceride in the seed oil of *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) // *Lipids.* 1997. V. 32. P. 549-557.
- Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use / C.I.G. Tuberoso [et al.] // *Food Chem.* 2007. V. 103. P. 1494-1501.
- Инкрементный подход при определении состава триглицеридов / В.И. Дейнека и др. // *Хим.-фарм. ж.* 2002. Т. 36, № 7. С. 44-47.
- Crossley A., Hilditch T.P. The component acids of some authentic and commercial stilling oils // *J. Sci. Food Agric.* 1950. V. 1. P. 292-300.
- Comparison of Separation of Seed Oil Triglycerides Containing Isomeric Conjugated Octadecatrienoic Acid Moieties by Reversed-Phase HPLC / A.V. Nguyen [et al.] // *Separations.* 2017. V. 4, № 37.

## REFERENCES

1. Koba K., Belury M.A., Sugano M. Potential health benefits of conjugated trienoic acids. *Lipid Technology*. 2007, vol. 19, no. 9, pp. 200-203. DOI: 10.1002/lite.200700067
2. Kumar P., Bhatt R.P., Singh L. Evaluation of *In-vitro* antibacterial and anticandidal activity of *Sapium sebiferum* L. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2011, vol. 01, pp. 191-193.
3. Wang R., Hanna M.A., Zhou W.-W., Bhadury P.S., Chen Q., Song B.-A., Yang S. Production and selected fuel properties of biodiesel from promising non-edible oils: *Euphorbia lathyris* L., *Sapium sebiferum* L. and *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technology*, 2011, vol. 102, pp. 1194-1199. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(11).4933-41
4. Liu Y., Xin H.-L., Yan Y.-J. Physicochemical properties of stillingia oil: Feasibility for biodiesel production by enzyme transesterification. *Industrial Crops and Products*, 2009, vol. 30, pp. 431-436. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.08.004>
5. Deineka V.I., Deineka L.A., Anisimovitch I.P., Turtygin A.V. [Utilization of reversed-phase HPLC with refractometric detection for detection of adulteration of butter]. *Metody otsenki sootvetstviia* [Methods of Conformity Assessment], 2007, no. 6, pp. 10-11 (in Russian).
6. Holčapek M., Lísá M., Jandera P., Kabátová N. Quantitation of triacylglycerols in plant oils using HPLC with APCI-MS, evaporative light-scattering, and UV detection. *Journal of Separation Science*, 2005, vol. 28, pp. 1315-1333. DOI: 10.1002/jssc.200500088.
7. Angioni E., Lercker G., Fregac N.G., Carta G., Melis M.P., Murru E., Spada S., Bannia S. UV spectral properties of lipids as a tool for their identification. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2002, vol. 104, pp. 59-64. DOI: 10.1002/1438-9312(200201)104:1<59::AID-EJLT59>3.0.CO;2-I.
8. Deineka V.I., Deineka L.A. Analysis of Vegetable Oils by Microcolumn High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 2004, vol. 59, pp. 895-898. DOI: 10.1023/B:JANC.0000040709.11986.f2
9. Katz E., Ogan K.L., Scott R.P.W. Peak dispersion and mobile phase velocity in liquid chromatography: the pertinent relationship for porous silica. *Journal of Chromatography*, 1983, vol. 270, pp. 51-75. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)96351-4.
10. Christie W.W. The glyceride structure of *Sapium sebiferum* seed oil. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1969, vol. 187, pp. 1-5. DOI: 10.1016/0005-2760(69)90125-8.
11. Aitzetmüller K., Xin Y., Werner G., Grönheom M. High-performance liquid chromatographic investigations of stillingia oil. *Journal of Chromatography*, 1992, vol. 602, pp. 165-173. DOI: 10.1016/0021-9673(92)85358-Z.
12. Sprecher H.W., Maier R., Barber M., Holman R.T. Structure of an optically active allene-containing tetraester triglycerides isolated from the seed oil of *Sapium sebiferum*. *Biochemistry*, 1965, vol. 4, pp. 1856-1863. DOI: 10.1021/bi00885a024.
13. Spitzer V., Tomberg W., Pohlentz G. Structure analysis of an allene-containing estolide tetraester triglyceride in the seed oil of *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae). *Lipids*, 1997, vol. 32, pp. 549-557. DOI: 10.1007/s11745-997-0070-8.
14. Tuberoso. C.I.G., Kowalczyk A., Sarritzu E., Cabras P. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chemistry*, 2007, vol. 103, pp. 1494-1501. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.08.014.
15. Deineka V.I., Staroverov V.M., Fofanov G.M., Balyatinskaya L.N. An Increment Approach to the HPLC Analysis of Triglycerides. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2002, vol. 36, no. 7, pp. 392-395. DOI: 10.1023/A:1021004516406.
16. Crossley A., Hilditch T.P. The component acids of some authentic and commercial stillingia oils. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 1950, vol. 1, pp. 292-300. DOI: 10.1002/jsfa.2740011003.
17. Nguyen A.V., Deineka V., Deineka L., Ngoc A.V.T. Comparison of Separation of Seed Oil Triglycerides Containing Isomeric Conjugated Octadecatrienoic Acid Moieties by Reversed-Phase HPLC // *Separations*, 2017, vol. 4, no. 37. DOI:10.3390/separations4040037.