

УДК 543.544.5.068.7

## МАСЛА С КОНЬЮГИРОВАННЫМИ ДВОЙНЫМИ СВЯЗЯМИ: МАСЛА КОСТОЧЕК ВИШЕН И РОДСТВЕННЫХ РОДОВ СЕМЕЙСТВА *ROSACEAE*

**А. В. Туртыгин, И. П. Анисимович  
Л. А. Дейнека, В. И. Дейнека  
В. Н. Сорокопудов, С. М. Шевченко**

Белгородский  
государственный  
университет,  
Россия, 308015 г. Белгород, ул. Победы, 85  
E-mail: deineka@bsu.edu.ru

В работе представлены результаты исследования масел семян косточек некоторых видов вишни, черешни и черемухи. Хроматографическим и спектрофотометрическим методом показано, что в исследованных маслах в состав триглицеридов входят радикалы октадекатриеновой кислоты с сопряженными двойными связями –  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты, относящиеся к компонентам с высокой биологической активностью. Приведены индексационные уравнения, которые могут быть использованы для поиска других источников этой кислоты.

Ключевые слова: триглицериды,  $\alpha$ -элеостеариновая кислота, масла семян, *Cerasus sp.*, *Prunus avium*, *P. padus*.

### Введение

Среди растительных и животных масел, которые могут различаться степенью ненасыщенности триглицеридов или уровнем накопления сопутствующих минорных биологически активных веществ, особо выделяются масла, содержащие сопряженные (конъюгированные) двойные связи. Изначально интенсивные исследования велись по изучению биологической активности конъюгированной линолевой кислоты (CLA), несколько геометрических изомеров которой обнаруживаются в мясной и молочной продукции [1]. При этом в ряде исследований были обнаружены уникальные свойства этих соединений, включающие антиканцерогенный и атерогенный эффекты, усиление иммунной системы, антидиабетическое действие, способность существенно уменьшать ожирение человека при метаболическом синдроме и т.д. Потребление 1.8 г CLA в сутки в течение 12 недель приводит к снижению массы жира в организме здоровых людей (обычное потребление CLA не превышает 0.3 г в сутки). Однако, повышение потребления CLA до рекомендуемого (около 3 г в сутки) уровня за счет потребления животных жиров конфликтует с нежелательным увеличением потребления насыщенных жиров, поэтому необходим иной путь решения данной проблемы. Опыты по введению специальных подкормок в диету крупного рогатого скота приводили лишь к относительно небольшому увеличению накопления CLA. Стандартные химические методы, к сожалению, неэффективны как по затратам времени, так и по выходу целевых продуктов; то же было обнаружено и для исследованных ферментативных методов синтеза. И лишь метод фотоизомеризации соевого масла в присутствии йода позволяет получить продукцию с высоким (до 20 %) уровнем CLA [1]. Тем не менее, на рынке предлагается масло под торговым брендом «100 % Tonalin Pure Safflower Oil» (<http://www.tonalinclareview.com/>), содержащее около 80 % CLA; о происхождении этого масла удастся лишь найти информацию о том, что оно получено из сафлорового масла по патентованной технологии. С другой стороны, для растительных объектов хорошо известны масла, образованные радикалами пяти конъюгированных октадекатриеновых кислот и одной сопряженной октадекатетриеновой - паринаровой [2] кислоты. Эти масла обладают биологической активностью, подобной маслам с CLA [3].

Масла с конъюгированными октадекатриеновыми кислотами намного более доступны и могут быть получены в больших количествах на основе отечественного сырья. В настоящей работе исследовали масло косточек вишен и родственных растений (черешни и черемухи), в которых накапливаются триглицериды, содержащие радикалы  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты [4]; такое масло может быть получено из отходов различных технологий переработки плодов вишен и черешни.



### Экспериментальная часть

Для обращено-фазовой ВЭЖХ использовали хроматографическую систему, составленную из насоса Beckman 110B, крана дозатора Rheodyne 7125 с петлей объемом 20 мкл, детекторов рефрактометрического (R-401, Waters) и спектрофотометрического (LC/9563 Nicolet). Для регистрации и обработки хроматограмм использовали ПП Мультихром 1.5 (Ampersand Ltd. 2005). Хроматографические условия: колонка 250 × 4.6 мм, Кромасил-100 5C18, защищенная предколонкой 10 × 4.6 мм, Кромасил-100 5C18.5 мкм. В работе использовали подвижные фазы систем «ацетонитрил – ацетон» или «ацетонитрил – пропанол-2, скорость подачи элюента 1 мл/мин. Спектрофотометрические исследования выполняли в кварцевых кюветах (спектрофотометр СФ-56).

Экстракцию масел из измельченных с кварцевым песком содержимого косточек плодов проводили исчерпывающей экстракцией последовательными порциями н-гексана при комнатной температуре; контроль полноты экстракции спектрофотометрический при 280 нм. Порции экстракта объединяли, и растворитель удаляли в вакуумном ротационном испарителе. Образцы растительного материала были получены из ботанического сада БелГУ: вишня антипка *Cerasus mahaleb* (L.) Mill., в. степная *C. fruticosa* Pall. (*Prunus fruticosa* Pall.), в. бессея (песчаная) *Cerasus besseyi* (Bailey) Sok., в. обыкновенная *C. vulgaris* Mill, черешня *Prunus avium* L., черемуха обыкновенная *Prunus padus* L.

### Результаты и их обсуждение

Элеостеариновые кислоты ( $\alpha$ -изомер, 9c11t13t, как основной компонент, и  $\beta$ -изомер, 9t11t13t, как примесь, схема) относятся к группе природных сопряженных октадекатриеновых кислот, встречающихся в маслах семян некоторых растений ряда семейств.

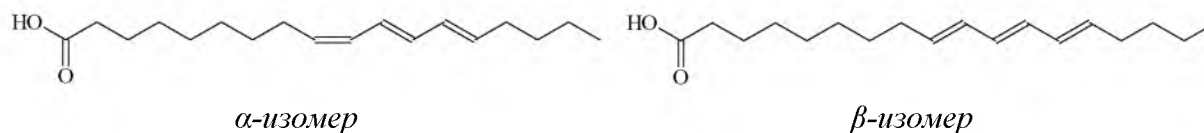


Схема. Строение элеостеариновых кислот

Из традиционных для Белгорода растений  $\alpha$ -элеостеариновую кислоту накапливают в масле семян валериана лекарственная (около 50% от кислот, входящих в состав триглицеридов), вишня, черешня и черемуха. И хотя абсолютное содержание  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты в этом случае заметно ниже (до 20 % в масле косточек), перспективность данного сырья очевидна, поскольку косточки являются отходом переработки соответствующих плодов.

Хроматограммы, использованные для идентификации триглицеридов в настоящей работе, представлены на рис.1. В качестве масла сравнения использовали масло семян яблок, поскольку для всех растений трибы яблоневые состав масел практически одинаков: триглицериды образованы радикалами линолевой и олеиновой с небольшим количеством радикалов пальмитиновой и стеариновой кислот [5], следовательно на хроматограмме появятся в порядке элюирования четыре основных пика с небольшими пиками-сателлитами, соответствующими замене радикала олеиновой кислоты на пальмитиновую: трилинолеат –  $L_3$ , дилинолеат-олеат –  $L_2O$  (+  $L_2P$ ), линолеат-диолеат –  $LO_2$  (+  $LOP$ ), и триолеат –  $O_3$  (+  $O_2P$ ). Для записи таких соединений, не имеющих хромофоров в обычном диапазоне УФ-спектра, может быть использован рефрактометрический детектор (рис. 1, хроматограмма А); при этом могут быть определены времена удерживания этих компонентов, присутствующих и во множестве других масел, и рассчитаны два базовые инкремента – для замены линолевой кислоты на олеиновую ( $0.103 \pm 0.002$ ) и олеиновой на пальмитиновую ( $0.033 \pm 0.002$ ), и оценен инкремент для замены пальмитиновой кислоты на стеариновую ( $0.093 \pm 0.004$ ). Тогда легко осуществляется предположительная идентификация триглицеридов масла вишни антипки (табл. 1; рис. 1, хроматограмма Б) при записи хроматограммы с реф-

рактометрическим детектированием: в этом масле обнаруживаются триглицериды, содержащие радикалы одной менее липофильной, чем линолевая, кислоты, например, октадекатриеновой.

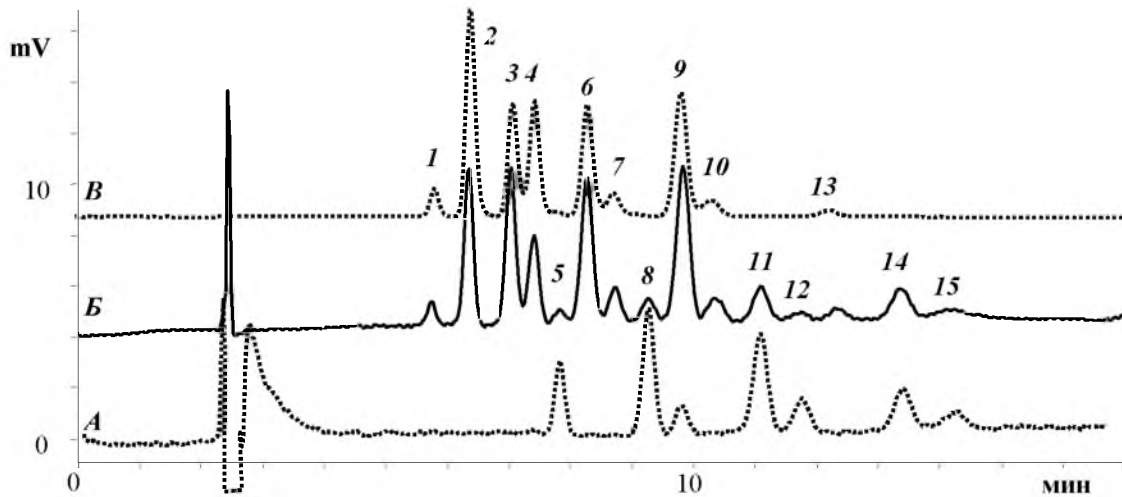


Рис. 1. Хроматограммы масла семян вишни антипки и яблока. Описание в тексте

Для исследуемых в работе масел такое предположение может быть легко проверено, поскольку спектр экстракта исследуемого масла характерен именно для радикалов  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты (рис.2, [2]). Но в таком случае при замене рефрактометрического детектора на спектрофотометрический ( $\lambda = 280 \text{ нм}$ ) из всех пиков на хроматограмме Б, (рис.1, отнесение пиков – в табл.1) будут видны только пики триглицеридов, в состав которых входят радикалы конъюгированных кислот, что может подтвердить справедливость их отнесения (хроматограмма В, рис.1).

Таблица 1

**Параметры удерживания триглицеридов масла семян косточек вишни антипки**

№*	Состав триглицеридов	$t_R$ , мин	Инкременты				
			$\Delta(X \rightarrow L)$	$\Delta(X \rightarrow L)$	$\Delta(X \rightarrow L)$	$\Delta(X \rightarrow L)$	$\Delta(П \rightarrow С)$
1	$X_3$	5.73	0.136				
2	$X_2L$	6.32	0.207	0.071			
3	$XL_2$	7.01	0.278	0.071			
4	$X_2O$	7.39	0.313		0.105		
5	$X_2П+L_3$	7.80	0.347	0.069		0.034	
6	$XLO$	8.24	0.381	0.069			
7	$XLП$	8.70	0.414			0.033	
8	$L_2O$	9.24	0.450		0.103		
9	$XO_2+L_2П$	9.80	0.484		0.103	0.034	
10	$XOP$	10.4	0.515			0.031	
11	$LO_2$	11.1	0.553		0.103		
12	$LOП$	11.7	0.584			0.031	
13	$XOC+LP_2$	12.3	0.611				0.095
14	$O_3$	13.4	0.655		0.102		
15	$O_2П$	14.1	0.684			0.029	

\* – нумерация пиков по хроматограмме на рис. 1.

Действительно, при замене детектора исчезли пики триглицеридов, не содержащих по высказанному предположению радикалов  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты. Изменилось также и соотношение высот пиков, причем строго в соответствии с предположенным числом радикалов  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты в одной молекуле триглицерида. Поэтому отнесение пиков, выполненное расчетным путем в табл. 1, может считаться доказанным.

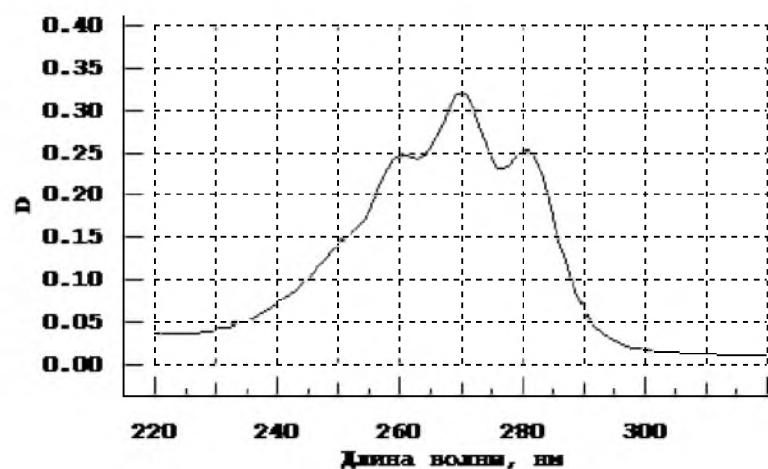


Рис. 2. Спектр раствора масла семян косточек вишни антипки

Хроматограммы некоторых образцов исследованных масел косточек вишен, записанные в элюенте системы «ацетон - ацетонитрил», представлены на рис. 3.

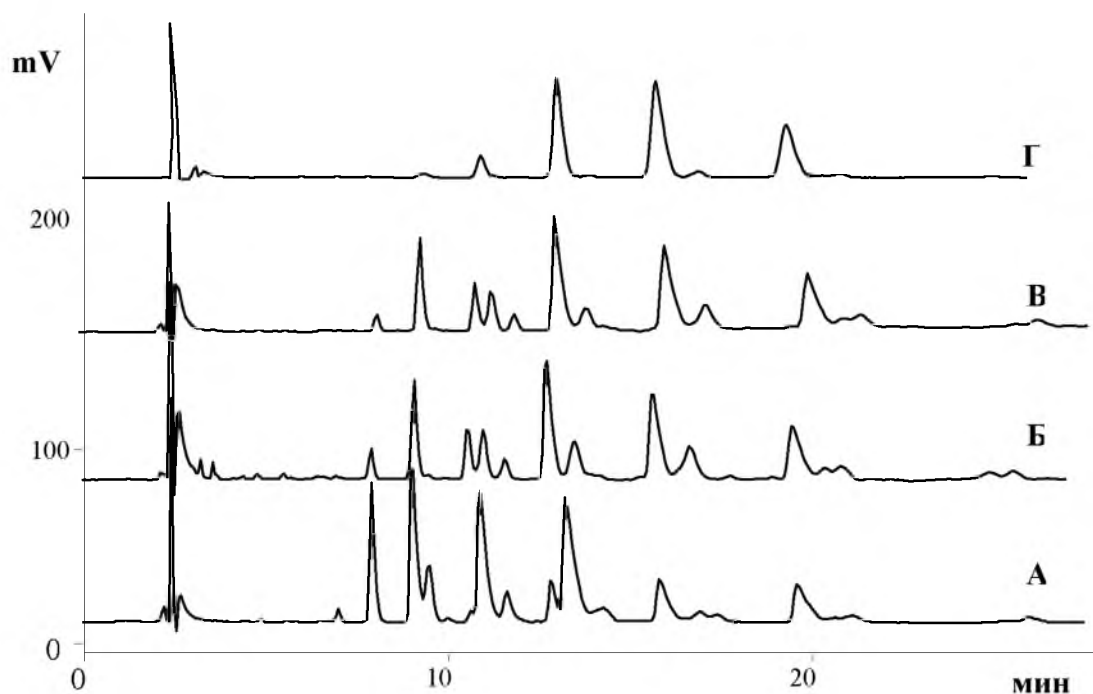


Рис. 3. Удерживание триглицеридов масел из косточек вишни различных сортов в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ.

Подвижная фаза: 25 % ацетонитрила в ацетоне. Образцы масел:

А – вишня антипка; Б – вишня обыкновенная; В – вишня степная; Г – вишня бессея

На всех хроматограммах на рис. 3, кроме хроматограммы масла вишни бессея, присутствуют триглицериды, в состав которых входит  $\alpha$ -элеостеариновая кислота. Причем наибольшая доля на такие триглицериды (т.е. и на  $\alpha$ -элеостеариновую кислоту) приходится в масле семян вишни антипки. Кстати, именно эту вишню, особенно ядра семян, любят склевывать птицы.

Хроматографический профиль масла семян черешни принципиально не отличается от масла семян вишен, рис. 4.

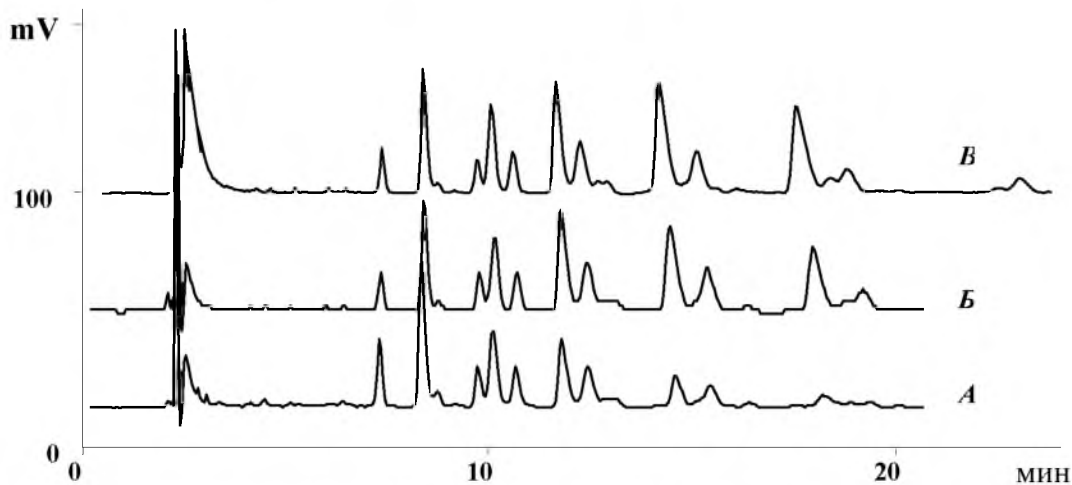


Рис. 4. Удерживание триглицеридов масел из косточек трех (А, Б и В) сортов черешни

Подобные хроматограммы были получены и при исследовании масла косточек черешни с тем лишь исключением, что количественное соотношение триглицеридов колебалось в большом интервале. Для количественного анализа триглицеридного состава был использован метод поправок на площади пиков с учетом чувствительности детектора к жирнокислотному составу индивидуальных триглицеридов [6], в котором использовали расчетные значения коэффициентов преломления триглицеридов, полученные в программном продукте ACD/ChemSketch 12.0.

Таблица 2

**Видовой состав триглицеридов масла косточек вишен и родственных растений**

		Триглицеридный состав, мол.%								
		Черешня			Вишня			Черемуха		
		1	2	3	А*	1	2	Ст**	1	2
1	Э <sub>3</sub>	<0.2	0.3	0.2	1.0	0.4	<0.2	0.2	<0.2	0.6
2	Э <sub>2</sub> Л	2.8	7.7	2.6	8.9	4.0	2.5	1.6	0.9	5.4
3	Э <sub>2</sub> О	0.8	2.1	0.8	6.1	0.8	0.5	0.3	<0.2	0.9
4	Э <sub>2</sub> П	<0.2	0.3	0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	0.4
5	ЭЛ <sub>2</sub>	10.5	<b>22.3</b>	9.5	<b>14.3</b>	<b>13.6</b>	8.3	10.2	7.2	<b>25.1</b>
6	ЭЛО	9.3	<b>14.2</b>	9.0	<b>16.0</b>	8.1	6.1	5.8	10.0	<b>19.4</b>
7	ЭЛП	4.7	6.3	4.0	4.1	3.4	2.2	2.2	1.0	1.2
8	ЭО <sub>2</sub>	<0.2	<0.2	3.6	<b>19.3</b>	5.3	4.5	4.8	2.1	0.9
9	ЭОП	<0.2	<0.2	1.4	4.2	0.3	0.2	1.5	0.9	0.9
10	Л <sub>3</sub>	3.4	5.6	2.8	0.8	6.7	5.4	5.4	5.8	7.8
11	Л <sub>2</sub> О	<b>14.2</b>	<b>13.3</b>	<b>12.2</b>	4.8	<b>19.7</b>	<b>16.6</b>	<b>19.2</b>	<b>23.5</b>	<b>15.8</b>
12	Л <sub>2</sub> П	8.8	8.6	3.8	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	2.1	4.1
13	ЛО <sub>2</sub>	<b>15.1</b>	7.0	<b>17.2</b>	7.5	<b>17.8</b>	<b>20.2</b>	<b>19.7</b>	<b>29.5</b>	12.3
14	ЛОП	7.9	6.0	5.4	1.5	6.8	6.8	7.8	1.1	2.1
15	ЛОС	2.1	2.3	2.4	0.5	0.3	2.4	4.0	<0.2	0.6
16	О <sub>3</sub>	<b>13.3</b>	3.1	<b>16.9</b>	9.8	11.0	<b>19.4</b>	<b>15.0</b>	<b>14.0</b>	0.2
17	О <sub>2</sub> П	4.7	1.0	4.6	1.3	1.9	4.8	2.4	1.8	<0.2
18	О <sub>2</sub> С	1.5	<0.2	2.3	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2

А\* – антипка; Ст\*\* – степная

В табл. 2 полужирными начертаниями выделены по три триглицерида, с относительно большими долями в рассматриваемых маслах. Тогда становится очевидным, что исследованные масла являются линолево-олеиновыми, как и масла семян многих других растений семейства розоцветные [5], с отличительной для исследованных растений особенностью – присутствием α-элеостеариновой кислоты. Из всего исследо-



ванного списка выпадает вишня бессея, которая, как и вишня войлочная [5], по жирнокислотному составу ближе к остальным растениям подсемейства сливовые. И если персиковое, абрикосовое и миндальное масла используются в настоящее время в качестве косметических масел, то преимущество масел вишни, черешни и черемухи благодаря присутствию в них конъюгированной триеновой кислоты, пока мало используется. По триглицеридному составу масел был рассчитан жирнокислотный состав, представленный в табл. 3.

Таблица 3

**Жирнокислотный состав триглицеридов масла косточек вишен и родственных растений**

№	Кислоты	Жирнокислотный состав триглицеридов, мол. %								
		Черешня			Вишня			Черемуха		
		1	2	3	А*	1	2	Ст**	1	1
1	$\alpha$ -Элеостеариновая	10.8	21.8	16.0	30.7	14.0	9.3	9.7	12.2	21.1
2	Линелевая	40.6	50.5	33.7	26.7	42.7	35.6	38.9	46.2	53.1
3	Олеиновая	39.6	21.1	44.8	40.1	40.2	50.3	46.1	40.0	22.4
4	Пальмитиновая	7.8	5.8	4.3	2.1	2.7	4.0	4.0	1.2	2.5
5	Стеариновая	1.2	0.8	1.8	0.4	0.4	0.8	1.3	0.4	0.9

А\* – антипка; Ст\*\* – степная.

При гидролизе масел в мягких условиях (20%-ный спиртовой раствор NaOH при комнатной температуре, 6 ч) в гидролизате обнаруживается кислота, по характеристическому УФ-спектру соответствующая  $\alpha$ -элеостеариновой. Ее удерживание не совпадает с удерживанием обычных октадекатриеновых кислот ( $\alpha$ -линоленовой и  $\gamma$ -линоленовой из масла семян черной смородины и пинолеиновой из «кедрового» масла), рис. 5, при этом и соотношение площадей пиков индивидуальных кислот в гидролизате масла черешни согласуется с приведенными в табл.3 результатами.

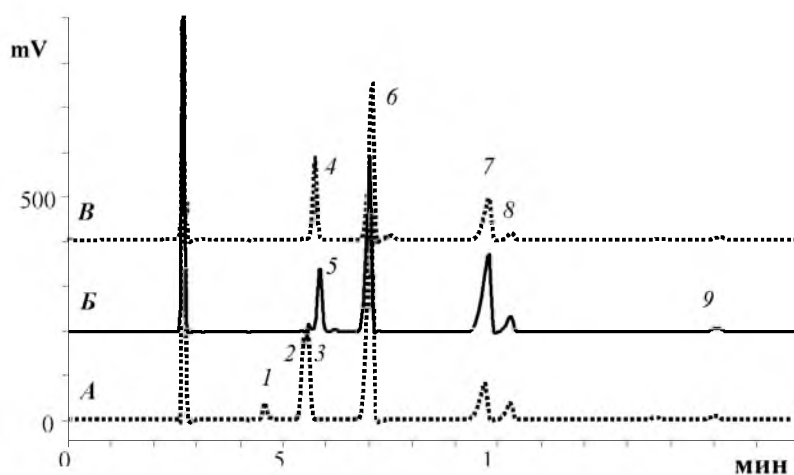


Рис. 5. Разделение жирных кислот гидролизатов масел

Подвижная фаза: 10% ацетона и 1 % уксусной кислоты в ацетонитриле, 1 мл/мин.

Гидролизаты: А – льняного масла, Б - масла черешни, В – кедрового масла. Кислоты:

1 – стеариноновая (С14:0), 2 –  $\alpha$ -линоленовая, 3 –  $\gamma$ -линоленовая, 4 – пинолеиновая, 5 –  $\alpha$ -элеостеариновая; 6 – линолевая, 7 – олеиновая, 8 – пальмитиновая, 9 – стеариновая

Наконец, по результатам проведенных исследований были определены индексационные уравнения удерживания триглицеридов (табл. 4, рис. 5), содержащих радикалы  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты, по методу относительного анализа удерживания [7] с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ и рефрактометрического детектирования. По предлагаемому методу индексационные уравнения – функции, связывающие факторы удерживания триглицеридов (i) с фактором удерживания реперного соединения – трилинолеата,  $L_3$ :

$$\lg k(i) = a \lg k(L_3) + b.$$

Такой подход является существенно более надежным по сравнению с индексацией по методу Ковача [8], поскольку «точечная» (т.е. определенная только для одного состава подвижной фазы) индексация не может быть надежной вследствие несоответствия координат точек конвергенции для различных рядов гомологов [9]. В то же время индексационные уравнения не привязаны к составу подвижной фазы, и в ряде случаев могут быть общими для различных марок стационарных фаз [7].

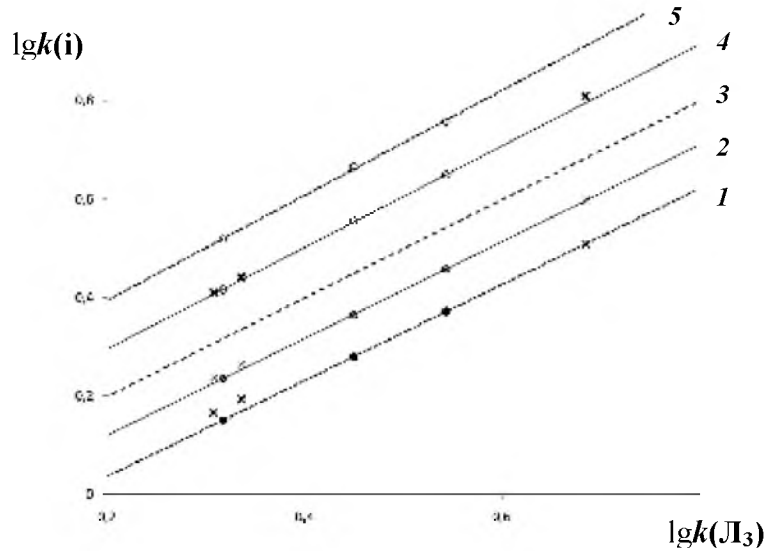


Рис. 6. Карта разделения некоторых триглицеридов масла черешни  
 Элюентные системы: «ацетон – ацетонитрил» - кружки, «пропанол-2 – ацетонитрил» - крестики.  
 Триглицериды *i*: 1 – Э<sub>2</sub>Л, 2 – ЭЛ<sub>2</sub>, 3 – Л<sub>3</sub>, 4 – Л<sub>2</sub>О, 5 – ЛО<sub>2</sub>

Экспериментальные данные для элюентной системы «ацетон - ацетонитрил», отмеченные на карте кружками, рис. 6, связаны прямолинейной зависимостью, при этом данные, полученные в другой системе «пропанол-2 – ацетонитрил» заметно отличаются от них, требуя для описания иных индексационных коэффициентов, табл.4.

Таблица 4

**Параметры индексационных уравнений для триглицеридов, содержащих радикалы α-линоленовой кислоты относительно трилинолеата**

№	Образец	Коэффициенты индексационных уравнений			
		Система «ацетон – ацетонитрил»		Система «пропанол-2 – ацетонитрил»	
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
1	Э <sub>2</sub> Л	0.9750	-0.1586	0.9090	-0.1134
2	ЭЛ <sub>2</sub>	0.9848	-0.0775	0.9548	-0.0568
3	ЭЛО	1.0183	+0.0135	1.0133	+0.0298
4	ЭЛП	0.9997	+0.0541	1.0221	+0.0596
5	Л <sub>2</sub> О	1.0328	+0.0892	1.0586	+0.0847
6	Л <sub>2</sub> П	1.0045	+0.1365	1.1068	+0.1026
7	ЛО <sub>2</sub>	1.0636	+0.1825	1.1199	+0.1680
8	ЛОП	1.0478	+0.2226	1.1318	+0.1964

При примерно равном среднем содержании масла в косточках вишен – 27±3 %, черешен – 29±3 % и черемухи – 31±4 % на α-элеостеариновую кислоту может приходиться от 2 до 6 % от массы косточки плода, что позволяет рассматривать косточки ряда исследованных растений в качестве источника конъюгированных жирных кислот, являющегося отходом ряда производств по переработке плодов растений.



### Заключение

Таким образом, косточки плодов ряда видов вишен, черешни и черемухи содержат масло, в состав триглицеридов которого входят триглицериды с радикалами  $\alpha$ -элеостеариновой кислоты, обладающей высокой биологической активностью. Наиболее богатым источником этой кислоты среди исследованных объектов являются косточки вишни антипки (*Cerasus mahaleb* (L.) Mill.).

*Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (государственный контракт № НК -511П).*

### Список литературы

1. Jain V.P., Proctor A., Lall R. Pilot-Scale Production of Conjugated Linoleic Acid-Rich Soy Oil by Photoirradiation // *J. Food Sci.* – 2008. – Vol. 73. – P. E183- E192.
2. Дейнека В.И. Обращено-фазовая ВЭЖХ в анализе масел с радикалами конъюгированных октадекатриеновых кислот // *Сорбционные и хроматографические процессы.* – 2005. – Т. 5 (4). – С. 507-517.
3. Koba K., Belury M.A., Sugano M. Potential health benefits of conjugated trienoic Acids // *Lipid Technol.* – 2007. – Vol. 19. – P. 200-203.
4. Дейнека В.И., Габрук Н.Г., Дейнека Л.А., Манохина Л.А. Триглицеридный состав масел косточек семи родов семейства розовых // *Химия природн. соединений.* – 2002. – №5. – С. 333-335.
5. Дейнека В.И., Григорьев А.М., Дейнека Л.А., Ермаков А.М., Сиротин А.А., Староверов В.М. Анализ компонентного состава антоцианов плодов и жирных кислот масел семян некоторых видов семейства *Rosaceae* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Растительные ресурсы.* – 2005. – Вып.1. – С. 91-98.
6. Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Габрук Н.Г., Фофанов Г.М., Манохина Л.А., Сидельникова Н.А. Анализ растительных масел с использованием ВЭЖХ // *Ж. аналит. химии.* – 2003. – Т. 58, № 12. – С. 1294-1299.
7. Дейнека В.И. Карта хроматографического разделения и инкрементные зависимости в методе относительного анализа удерживания в ВЭЖХ // *Ж. физ. химии.* – 2006. – Т. 80, № 3. – С. 511-516.
8. Kovats E. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone // *Helvetica Chimica Acta.* – 1958. – Vol. 41. – P. 1915-1932.
9. Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Шаркунова Н.А. Инкрементные соотношения при анализе удерживания каротиноидов. Использование ортогонального разделения // *Сорбц. хром. процесс.* – 2009. – Т. 9, Вып. 3. – С. 374-382.

## CONJUGATE DOUBLE BOND OILS: CHERRY PIT OILS AND AFFINED PLANTS FROM THE ROSACEAE FAMILY

**A. V. Turtyguin, I. P. Anisimovitch  
L. A. Deineka, V. I. Deineka  
V. N. Sorokopudov, S. M. Shevchenko**

*Belgorod State University, Pobedy St., 85, Belgorod, 308015, Russia  
E-mail: deineka@bsu.edu.ru*

The research data on pit oils got from some species of cherry, gean and bird cherry are presented in this paper. By dint of chromatographic and spectrophotometric methods it is fixed that triglycerides consisting of the examined oils include radicals of the conjugated octadecatrienoic ( $\alpha$ -eleostearic) acid, being a highly biological active compound. The authors of this article presents index equations which can be used for searching another sources of the acid.

Key words: triglycerides,  $\alpha$ -eleostearic acid, seed oils, *Cerasus* sp., *Prunus avium*, *P. padus*.