

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНОВ МАСЛА СЕМЯН *CALENDULA OFFICINALIS*

А. В. Нгуен, В. И. Дейнека, Л. А. Дейнека

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Поступила в редакцию 16.11.2018 г.

Аннотация. Методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Милихром А-02 со спектрофотометрическим детектором и с колонкой 75×2 мм со стационарной фазой Kromasil 100-5C18 с дополнительным использованием программы Magicplot student (для разделения «проблемных» пиков) определен видовой состав триацилглицеринов и рассчитан жирнокислотный состав масла семян *Calendula officinalis* L. четырех сортов с различной окраской лепестков цветков. При этом для контроля эффективности предложенного метода полученные результаты сопоставляли с результатами анализа этих же масел в условиях традиционной аналитической хроматографии – на хроматографе Agilent 1200 Infinity с диодно матричным и масс-спектрометрическим детектированием и с колонкой 250×4.6 мм со стационарной фазой Kromasil 100-5C18. Для определения видового состава триацилглицеринов (ТАГ) использовали инкрементный подход с последующим пересчетом на жирнокислотный состав, и результаты определения водового состава триацилглицеринов были подтверждены методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Установлено, что все исследованные масла имели близкий состав с доминированием радикалов календовой (*8E, 10E, 12Z*-откадека-8,10,12-триеновой) кислоты (60.2 – 61.1 моль %) с характеристическим электронно-колебательным спектром с максимум абсорбции в диапазоне длин волн 265 – 275 нм. Существенно меньшим оказался вклад обычных для масел семян растений линолевой (28.0 – 28.8 моль %), олеиновой (3.0 – 3.4 моль %), пальмитиновой (1.8 – 2.0 моль %) и стеариновой (0.6-0.8 моль %) кислот. Также в составе масла заметна доля, приходящаяся на сопряженную диеновую гидроксикислоту (с максимум абсорбции около 235 нм), при этом наличие гидроксильной группы в составе ТАГ масла подтверждено анализом ИК-спектров. В условиях микроколоночной хроматографии детектирование ТАГ с радикалами β -календовой (*8E, 10E, 12E*-откадека-8,10,12-триеновой) становится проблематичным из-за низкой концентрации таких соединений. С учетом предложенного в работе коэффициента селективности замещения положений в триацилглицеринах различными кислотами установлено нестатистическое распределение радикалов кислот по видам ТАГ.

Ключевые слова: микроколоночная ВЭЖХ, масло семян, триацилглицерины, календовые кислоты, *Calendula officinalis*.

Сопряженные октадекатриеновые кислоты (СОК) обладают уникальной биологической активностью, включая антиканцерогенный и атерогенный эффекты, усиление иммунной системы, антидиабетическое действие, способность существенно уменьшать ожирение человека при метаболическом синдроме и т.д. [1-8]. К числу таких масел относится и масло семян календулы (*Calendula officinalis* L.), популярного декоративного растения, которое выращивают в том числе и в России. Из семян этого растения добывают жирное масло, которое не следует путать с масляным экстрактом под названием «масло календу-

лы» [9]. Истинное масло семян календулы образовано главным образом двумя из семи известных природных сопряженных октадекатриеновых кислот, - α -календовой (*8E, 10E, 12Z*-октадека-8,10,12-триеновой) и β -календовой (*8E, 10E, 12E*-октадека-8,10,12-триеновой, в виде примеси) кислотами [10, 11]. Для определения видового состава набора ТАГ растительных масел чаще всего используется метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с рефрактометрическим детектированием (ОФ ВЭЖХ). Но ТАГ масел, образованных радикалами кислот с сопряженными двойными связями, могут быть обнаружены и спектрофотометрическим детектором. А это открывает возможность использова-

ния для определения таких масел отечественного микроколоночного хроматографа Милихром. При этом переход к микроколоночной ВЭЖХ с колонкой размером 2×75 мм позволяет съэкономить на дорогостоящих компонентах подвижной фазы, как и на цене самой колонки. Однако вследствие неизбежного уменьшения эффективности колонки (по числу теоретических тарелок из-за четырехкратного уменьшения длины по сравнению с колонками традиционной длины 250 мм) разделение «проблемных пар» (т.е. пар с близкими временами удерживания) ТАГ становится более сложной задачей. Но ранее [12] нами было показано, что использование специальной программы MagicPlot Student, позволяет в значительной мере решить указанную проблему.

Информация по видовому составу ТАГ этого масла ограничена двумя публикациями, выполненными в нашей лаборатории [11, 13]. При этом известно, что уровень накопления различных веществ в растениях может зависеть от сорта и условий выращивания [14, 15].

Цель настоящей работы - определение видового состава ТАГ и расчета жирнокислотного состава масел семян календулы, различающихся окраской цветков (по данным производителя семян), методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии с привлечением программы MagicPlot Student.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для неводной обращено-фазовой ВЭЖХ использовали хроматографические системы: 1) Милихром-А02 (ЗАО "ЭкоНова") со спектрофотометрическим детектором и 2) Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами (для сравнения). Хроматографические условия: колонки: 2×75 мм Kromasil 100-5C18 (для системы (1)); и в двух вариантах для системы (2): 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18 (2а, при только спектрофотометрическом детектировании) и 2.1×150 мм Kromasil 110-5C18 (2б, при спектрофотометрическом и масс-спектрометрическом детектировании). Подвижная фаза: 40 об. % пропанол-2 и 60 об. % ацетонитрила; скорость подвижной фазы: 200 мкл/мин (системы 1 и 2б) и 0.8 мл/мин (система 2а). Температура термостата колонки: 30°C. Длина волны детектирования 270 нм.

Все эксперименты проводили в изократическом режиме, хроматограммы записывали, хранили и обрабатывали используя программы Мультихром 1.5 (условия 1) и ChemStation (условия

2). Для графического разделения «проблемных» пиков использовали программу Magicplot student 2.7.2 (<https://magicplot.com/downloads.php>), с аппроксимацией пиков немодифицированными Гауссианами.

Мерное время хроматографических систем определяли по удерживанию нитрата натрия. Инкременты рассчитывали по разности логарифмов факторов удерживания двух ТАГ с одной заменой радикала кислоты:

$$\Delta(X \rightarrow Y) = \lg k(ABY) - \lg k(ABX).$$

Масс-спектрометрическое детектирование осуществляли в смешанном режиме: химической ионизации при атмосферном давлении и ионизации с электрораспылением в стандартных для режимов условиях, при напряжении на фрагменторе 80 В; сканировали положительно заряженные ионы.

Масла выделили из семян календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.), момордики харангии (*Momordica charantia* L.) и катальпы (*Catalpa ovata* G. Don.). Семена момордики харангии и катальпы получили из растений, выращенных в Белгороде. Семена 4-х сортов календулы: «Снежная королева» (цветы почти белой окраски), «Солнце Египта» (красной окраски), «Летний сон» (желто-оранжевой окраски) и календула махровая (желто-оранжевой окраски) были приобретены в магазине для садоводов-огородников (ООО ТК "Агрофирма АЭЛИТА"). Масла экстрагировали из семян гексаном при комнатной температуре и очищали методом твердофазной экстракции с использованием насадочных картриджей ДИАПАК С (БиохимМак СТ, Москва). Касторовое масло (БиоЛайн, Россия) было приобретено в розничной продаже и использовано без предварительной пробоподготовки.

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

ИК-спектры записывали на спектрометре IR Prestige в тонкой пленке.

ТАГ обозначали по общепринятой схеме, указывая буквами радикалы кислот (без дифференциации положения радикалов в молекуле). Буквенные обозначения радикалов кислот: К – радикал α -календовой C18:3^{8E11E13Z} (8E, 10E, 12Z-октадека-8,10,12-триеновой); Д – 10E, 12Z-9-гидроксиоктадека-10,12-диеновой, Л – радикал линолевой (C18:2^{9Z12Z}), О – радикал олеиновой (C18:2^{9Z}), П – радикал пальмитиновой (C16:0) и С – стеариновой (C18:0) кислот.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определение видового состава ТАГ масла семян календулы

Хроматограммы масла семян календулы на фоне масла семян момордики, записанные в системе 1, представлены на рис. 1. Для разделения «проблемных пиков» эти хроматограммы были обработаны в программе *MagicPlot* для обнаружения индивидуальных ТАГ. При использовании инкрементного подхода (и в качестве масла сравнения масла семян момордики) [16] был определен видовой состав ТАГ исследуемого масла. Параметры удерживания ТАГ и их отнесение по инкрементному подходу представлены в табл. 1.

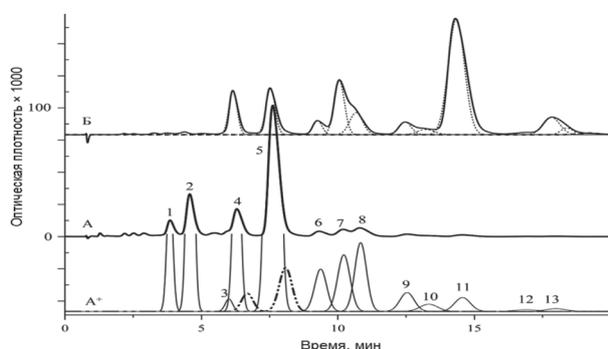


Рис. 1. Хроматограммы масел семян *Calendula officinalis* (А) и *Momordica charantia* (Б). Масло семян: А - *Calendula officinalis*, Б - *Momordica charantia*. Колонка: 100-5С18-Кромасил - 75×2 мм. Подвижная фаза: 70% об. ацетонитрила и 30% изопропанола, скорость поток 200 мкл/мин. Температура термостата колонки 30°С. Детектор 270 нм. Отнесение пиков см. табл.1.

На хроматограмме обнаруживаются тринадцать основных ТАГ с одинаковыми электронными спектрами, что свидетельствует о присутствии в масле сопряженной триеновой кислоты только с одним типом хромофора. Из представленных данных (табл. 1) следует, что, в соответствие с инкрементным подходом, одинаковым изменениям структуры ТАГ соответствуют одинаковые инкременты – для замены α -календовой кислоты на линолевую (0.095 логарифмических единиц), линолевой на олеиновую (0.137), олеиновой на пальмитиновую (0.027) и пальмитиновой на стеариновую (0.134). При этом инкременты для замены обычных кислот совпадают с аналогичными инкрементами для масла семян момордики.

Отметим, что теоретически может существовать много изомеров октадекатриеновых кислот с различным положением двойных связей в цепи атомов углерода, а также с различной *цис-транс*-конфигурацией этих связей. Но, в семенах растений обнаружены только два позиционных изомера: октадека-9,11,13-триеновые и октадека-8,10,12-триеновые кислоты, при этом средняя С=C-связь имеет только *транс*-конфигурацию. Поэтому для каждого из позиционных изомеров возможны только четыре изомера с различными конфигурациями С=C-связей, но только три типа электронных спектров поглощения (рис 2). Такое соотношение связано с тем, что изомеры с конфигурациями *9Z,11E,13E*- и *9E,11E,13Z*- октадека-9,11,13-триеновых кислот, которые могут различаться по удерживанию, имеют одинаковые хромофоры. При исследовании основных ТАГ

Таблица 1.

Параметры удерживания триацилглицеринов масла семян *Calendula officinalis*

№ пиков*	ТАГ**	t_R , мин	lgk	Инкременты, $\Delta(X \rightarrow Y)$			
				К→Л	Л→О	О→П	П→С
1	К,Д	3.85	0.684				
2	КДЛ	4.61	0.777	0.093			
3	КДО	6.06	0.913		0.136		
4	К ₃	6.30	0.932				
5	К,Л	7.64	1.024	0.093			
6	КЛ ₂	9.33	1.118	0.094			
7	К,О	10.22	1.161		0.137		
8	К,П	10.84	1.188			0.027	
9	КЛО	12.54	1.255	0.094			
10	КЛП	13.34	1.284			0.028	
11	К,С	14.55	1.323				0.135
12	КО ₂	16.98	1.393		0.138		
13	КЛС	17.95	1.418	0.095			0.135
Средние значения:				0.094	0.137	0.027	0.135
Средние значения***:				0.098	0.137	0.027	0.134

Примечания: * - нумерация пиков ТАГ в табл.1; Символы радикалов кислот: К – радикал календовой; Д – 9-ОН-10Е,12Z-октадекадиеновой, Л – линолевой, О – олеиновой, П – пальмитиновой и С – стеариновой кислот; *** - для масла семян момордики.

масел не только семян календулы, но и катальпы (с основной – катальповой кислотой - 18:3^{9E,11E,13Z}) и момордики (с основной α-элеостеариновой кислотой 18:3^{9Z,11E,13E}) были получены идентичные электронные спектры поглощения, что подтверждает литературные данные по конфигурации основной кислоты масла календулы (календовой - 18:3^{8E,10E,12Z}) [10].

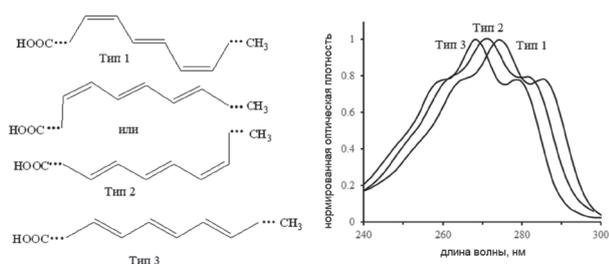


Рис. 2. Три типа хромофоров в структурах цис/транс-изомеров природных сопряженных октадекатриеновых жирных кислот и их электронные спектры поглощения. Тип 1: Z,E,Z - пунико-вая и жакарандовая кислоты; тип 2: Z,E,E и E,E,Z - катальповая, α-элеостеариновая и календовая кислоты; тип 3: E,E,E - β-элеостеариновая и β-календовая кислоты.

Но при этом для пиков № 1 и 2 на рис.1 и рис.3 (электронные спектры более надежно регистрируются в условиях 2а) получены спектры с максимумами не только в диапазоне 250-300 нм, но и в более коротковолновом диапазоне (около 230 нм), характерном для сопряженных диеновых кислот [17].

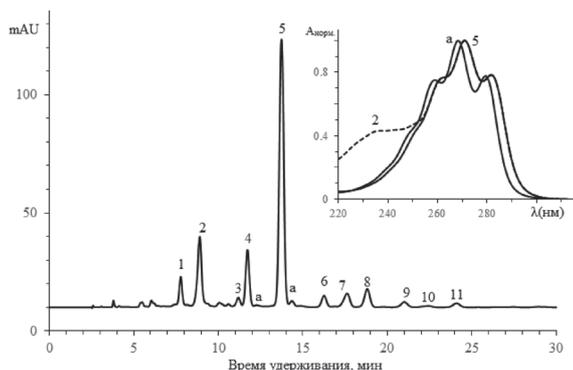


Рис 3. Разделение ТАГ масла семян *Calendula officinalis* (№ 4) методом ОФ-ВЭЖХ; Элюент 55% об. ацетонитрила и 45% изoproпанола, скорость потока: 1 мл/мин. Температура колонки 30оС, Колонка: 250×4.6 мм Kromasil 100-5C18.

Меньшие времена удерживания для этих пиков (по сравнению ТАГ, содержащими радикалы октадекатриеновых кислот) указывают на большую гидрофильность ТАГ, например, за счет присоединения воды по двойной связи в положении

8 календовой кислоты с образованием 10E,12Z-9-гидрокси-10,12-октадекадиеновой кислоты [18]. Такое предположение было подтверждено записью ИК-спектров масла семян календулы и масел сравнения - семян момордики и катальпы как образцов, не содержащих гидроксокислоты, и касторового масла, как образца, образованного в основном гидроксокислотой, - по появлению характеристической для широкой полосы поглощения, характеристичной для валентных колебаний ОН-групп, связанных водородной связью (при записи в тонкой пленке), в диапазоне 3300 – 3100 см⁻¹, рис.4.

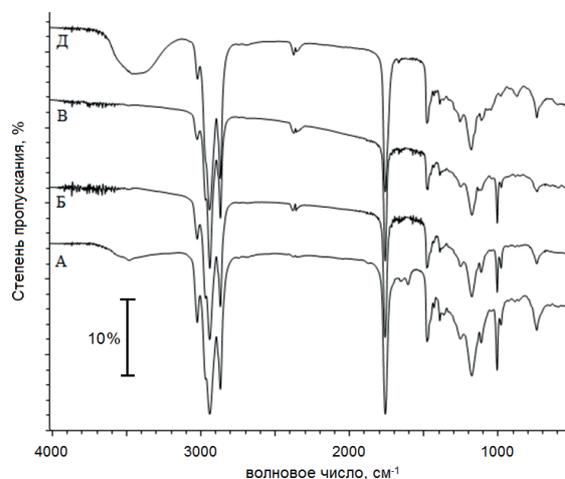


Рис. 4. ИК-спектры масел семян в тонкой пленке. Масла: А – семян календулы, Б – масла семян момордики, В – масла семян катальпы, Д – касторового масла.

Количественное определение ТАГ и жирно-кислотной состава

Спектрофотометрическое детектирование (на характеристических для сопряженных триеновых соединений длинах волн) удобно для количественного анализа при очевидном предположении о пропорциональности оптической плотности числу радикалов таких кислот в каждом из ТАГ и независимости электронных спектров поглощения от числа радикалов в молекуле (т.е. при отсутствии супрамолекулярного стэкинга полиеновых соединений [19]). Результаты, полученные пересчетом по площадям пиков на хроматограмме, представлены в табл. 2 и табл. 3. Отнесение полностью соответствует результатам, полученным нами ранее в условиях традиционной ВЭЖХ (условия 2а) с масс-спектрометрическим детектированием (условия 2б) [11], за исключением проблем с детектированием минорных пиков, образованных с участием радикалов β-календовой кислоты.

Таблица 2.

Видовой состав триацилглицеринов масел семян четырех сортов *Calendula officinalis*

ТАГ	M/z [M+H ⁺]	α, доля ТАГ, моль %						χ(i)
		1*	2*	3*	4*	4**	4***	
K ₂ D	891.6	2.1	1.9	2.2	2.9	2.9	6.6	0.45
KDL	893.6	12.2	10.5	13.0	13.5	13.2	6.0	2.19
KDO	895.6	2.0	1.6	1.2	1.2	1.7	0.7	2.57
K ₃	873.6	5.8	6.5	6.4	7.0	6.8	22.2	0.31
K ₂ L	875.5	58.1	58.8	56.0	55.2	55.3	30.6	1.80
KL ₂	877.7	5.2	5.3	5.1	5.1	5.2	14.1	0.37
K ₂ O	877.7	4.9	4.0	4.2	3.9	3.9	3.4	1.13
K ₂ P	851.7	3.2	4.7	4.8	4.7	4.8	2.1	2.24
KLO	879.5	2.2	3.1	3.2	3.3	3.2	3.2	1.02
KLP	853.7	2.2	1.2	1.2	1.2	1.0	2.0	0.53
K ₂ C	879.5	0.7	0.9	1.2	1.2	1.2	0.6	1.98
KO ₂	-	0.2	0.2	0.8	0.2	0.3	0.2	1.52
KLC	881.7	1.1	1.4	0.7	0.7	0.5	0.6	0.81

Примечание: * - сорта календулы: 1 – «Снежная королева», 2 – «Солнце Египта», 3 – «Летний сон», 4 – махровая, ** - результаты для системы 2, *** - результаты расчета по модели равномерного распределения

Таблица 3.

Жирнокислотный состав триацилглицеринов масел семян четырех сортов *Calendula officinalis*

Кислота	Доля кислот в составе ТАГ, мол. %, ± 0.2				
	1*	2*	3*	4*	Ср. знач.
Календовая (Кл)	60.2	61.1	60.4	60.6	60.6
Линолевой (Л)	28.8	28.5	28.1	28.0	27.9
Диеновая** (Д)	5.4	4.6	5.5	5.9	5.4
Олеиновой (О)	3.2	3.1	3.4	3.0	3.2
Пальмитиновой (П)	1.8	2.0	2.0	2.0	1.9
Стеариновой (С)	0.6	0.8	0.6	0.6	0.6

Примечание: * - сорта календулы: 1 – «Снежная королева», 2 – «Солнце Египта», 3 – «Летний сон», 4 – махровая, ** - 10E, 12Z - 9-ОН-10,12-октадекадиеновая (Д)

На основании полученных результатов рассчитан состав видов ТАГ масла, среди которых основными являются вещества, мольная доля которых мало изменяется при переходе от одного сорта к другому и можно составить порядок долей ТАГ, записанный в порядке убывания:

$$\alpha(K_2L) \gg \alpha(KDL) > \alpha(K_3) \geq \alpha(KL_2) \geq \alpha(K_2P) \geq \alpha(K_2O).$$

При этом и жирнокислотный состав оказался довольно близким для всех исследованных сортов календулы, табл.3.

Отметим, что важной характеристикой активности ферментов, отвечающих за синтез ТАГ из индивидуальных кислот, является распределение радикалов кислот по молекулам ТАГ. При этом специфика биосинтеза может быть определена сопоставлением экспериментальных данных, $\alpha(i)_{\text{эксн.}}$, и результатов расчетов (по жирнокислотному составу), выполненных при предположении о равномерном распределении кислот по ТАГ, $\alpha(i)_{\text{теор.}}$. Отношение между такими значениями можно использовать в качестве показателя специфичности биосинтеза видов ТАГ:

$$\chi(i) = \frac{\alpha(i)_{\text{эксн.}}}{\alpha(i)_{\text{теор.}}}$$

Если этот параметр окажется меньше единицы, то такой ТАГ синтезируется реально в относительно меньшем количестве, в противном случае биосинтез такого вида ТАГ является предпочтительным.

Предложенный подход был применен к образцу №4 масла семян календулы. Сравнивая существенно различающиеся $\chi(K_2L)$ и $\chi(K_3)$ можно сделать вывод об относительно маловероятном замещении одного из положений в ТАГ каталыповой кислоты; соответственно, все $\chi(K_2X)$ оказываются больше 1. Диеновая кислота образует только два ТАГ с χ больше 1, при этом небольшое значение для $\chi(K_2D)$ может указывать на то, что один из радикалов календовой кислоты оказывается также в невыгодном положении. Впрочем, такой анализ был бы хорошим дополнением к анализу с использованием селективного ферментного анализа положений радикалов жирных кислот в триацилглицеринах [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исследование, выполненное в этой работе показало, что возможен анализ ТАГ растительных масел, содержащих радикалы с сопряженными связями, методом неводной обращенно-фазовой микроколоночной ВЭЖХ с использованием хроматографа Милихром-А02 и с привлечением программы Magicplot student для разделения проблемных пиков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hennessy A.A., Ross P.R., Fitzgerald G.F., Stanton C. // *Lipids*. 2016. Vol. 51, pp. 377–397.

2. Yasui Y., Hosokawa M., Kohno H., Tanaka T., Miyashita K. // *Chemotherapy*. 2006. Vol. 52, pp. 220–225.
3. Chou Y.-C., Su H.-M., Lai T.-W., Chyuan J.-H., Chao P.-M // *Nutrition*. 2012. Vol. 28, pp. 803–811.
4. Tsuzuki T., Kawakami Y. // *Carcinogenesis*. 2008. Vol. 29, pp. 797–806.
5. Yasui Y., Hosokawa M., Sahara T., Suzuki R., Ohgiya S., Kohno H., Tanaka T., Miyashita K. // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*. 2005. Vol. 73, pp. 113–119.
6. Kobori M., Ohnishi-Kameyama M., Akimoto Y., Yukizaki C., Yoshida M // *J. Agric. Food Chem*. 2008. Vol. 56, pp. 10515–10520.
7. Sun Z., Wang H., Ye S., Xiao S., Liu J., Wang W., Jiang D., Liu X., Wang J. // *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2012. Vol. 99, pp. 1–8.
8. Muley B.P., Khadabadi S.S., Banarase N.B. // *Tropical J. Pharm. Res*. 2009. Vol. 8, pp. 455-465. Available online at <http://www.tjpr.org>.
9. Рыбакова О.В., Сафонова Е.Ф., Сливкин А.И., Фролова О.В. // *Вестник ВГУ. Сер.: Химия, Биология, Фармация*. 2007. № 2. С. 174–177.
10. Król B., Paszko T., Król A. // *Farmacia*. 2016. Vol. 64, pp. 881–886.
11. Nguyen Van Anh, Deineka V., Deineka L., Ngoc Vu Thi Anh. // *Separations*. 2017. Vol. 4, 37.
12. Нгуен Ань Ван, Дейнека В.И., Фам Лонг Куок, Доан Фьонг Лан, Дейнека Л.А. // *Аналитика и контроль*. 2018. Т. 22. № 1. С. 20–27.
13. Дейнека В.И. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2005. Т.5. Вып.4. С. 507–517.
14. Dulf F.V., Pamfil D., Baciú A.D., Pintea A. // *Chem. Central J*. 2013. Vol. 7, 8.
15. Martin R.J., Porter N. G., Deo B. // *Agronomy N.Z*. 2005. Vol. 35, pp. 129-137.
16. Дейнека В.И., Староверов В.М., Фофанов Г.М., Белятинская Л.Н. // *Хим.-фарм. ж*. 2002. Т. 36. С. 44–47.
17. Hopkins C.Y., Chisholm M.J // *J. Am. Oil Chem. Soc*. 1964. Vol. 41, pp. 42–44.
18. Badami R.C., Morris L.I., College B., London W. // *J. Am. Oil Chem. Soc*. 1965. Vol. 42, pp. 1119–1121.
19. Simonyi M., Bikádi Z., Zsila F., Deli J. // *Chirality*. 2003. Vol. 15, pp. 680-698.
20. Brockerhoff H. A stereospecific analysis of triglycerides // *J. Lipid Res*. 1965. Vol. 6, pp. 10-15.

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

*Нгуен В. А., Аспирант кафедры общей химии,
e-mail: vananhkhoahoasp2@gmail.com*

Дейнека В. И., д.х.н., профессор кафедры общей химии

e-mail: deineka@bsu.edu.ru

Дейнека Л. А., к.х.н. доцент кафедры общей химии

e-mail: deyneka@bsu.edu.ru

*Belgorod State National Research University
Nguyen V. A., Post-graduate student of Common
Chemistry Dept.*

e-mail: vananhkhoahoasp2@gmail.com

*Deineka V. I., PhD., DSci., Full Professor of
Common Chemistry Dept.*

e-mail: deineka@bsu.edu.ru,

*Deineka L. A., PhD., DSci., assistant professor of
Common Chemistry Dept.*

e-mail: deyneka@bsu.edu.ru

DETERMINATION OF TRIACYLGLYCERINES OF *CALENDULA OFFICINALIS* SEED OIL

A. V. Nguyen, V. I. Deineka, L. A. Deineka

Belgorod National Research University

Abstract. The method of microcolumn high-performance liquid chromatography on microcolumn chromatograph Milichrom A-02 with 75 × 2 mm column with stationary phase Kromasil 100-5C18 was used for triacylglycerol (TAG) species composition. The program Magicplot student was utilized for the separation of "problem" peaks. The TAG species composition as well as the fatty acid composition of the seed oils of the four varieties with different colors of the petals was calculated. For elucidation of the method effectivity th obtained data were compared to that of the oil analysis by conventional analytical HPLC on chromato-

graph Agilent 1200 Infinity with diode array and mass-spectrometric detections with 250 × 4.6 mm Kromasil 100-5C18 column. To determine the species content of triacylglycerols, an incremental approach was used, followed by conversion to fatty acid composition, and the results of the analysis were confirmed by HPLC with mass spectrometric detection. It is established that all the studied oils had close composition with the dominance of calendic (8E,10E,12Z-octadeca-8,10,12-trienoic) acid (60.2 – 61.1 моль %) having specific electronic-vibrational spectrum with absorption maximum in the range of 265 – 275 nm. The contribution of linoleic (28.0 – 28.8 mole %), oleic (3.0 – 3.4 mole %), palmitic (1.8 – 2.0 mole %) and stearic (0.6 – 0.8 mole %) acids, common for plant seed oils, was significantly lower. Also the oil composition has a noticeable proportion of conjugated hydroxydienoic acid substituents resulted in water addition to calendic acid with electronic absorption spectrum maximum near 235 nm, while the presence of OH-group in the oil was confirmed by IR spectrum analysis. But in the case of microcolumn HPLC the detection of TAG with substituents of β-calendic (8E,10E,12E-octadeca-8,10,12-trienoic) acid is rather problematic because of low concentration of this type TAG. Taking into account the values of proposed substitution selectivity coefficient the non-statistical distribution of fatty acid substituents was revealed.

Keywords: microcolumn HPLC, seed oil, triacylglycerides, calendic acid, *Calendula officinalis*.

REFERENCES

1. Hennessy A.A., Ross P.R., Fitzgerald G.F., Stanton C., *Lipids*, 2016, Vol. 51, pp. 377–397. DOI: 10.1007/s11745-016-4135-z.
2. Yasui Y., Hosokawa M., Kohno H., Tanaka T., Miyashita K., *Chemotherapy*, 2006, Vol. 52, pp. 220–225. DOI: 10.1159/000094865
3. Chou Y.-C., Su H.-M., Lai T.-W., Chyuan J.-H., Chao P.-M., *Nutrition*, 2012, Vol. 28, pp. 803–811. DOI: 10.1016/j.nut.2011.11.019.
4. Tsuzuki T., Kawakami Y., *Carcinogenesis*, 2008, Vol. 29, pp. 797–806. DOI: 10.1093/carcin/bgm298.
5. Yasui Y., Hosokawa M., Sahara T., Suzuki R., Ohgiya S., Kohno H., Tanaka T., Miyashita K., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*, 2005, Vol. 73, pp. 113–119. DOI: 10.1016/j.plefa.2005.04.013.
6. Kobori M., Ohnishi-Kameyama M., Akimoto Y., Yukizaki C., Yoshida M., *J. Agric. Food Chem.*, 2008, Vol. 56, pp. 10515–10520. DOI: 10.1021/jf8020877.
7. Sun Z., Wang H., Ye S., Xiao S., Liu J., Wang W., Jiang D., Liu X., Wang J., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 2012, Vol. 99, pp. 1–8. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.
8. Muley B.P., Khadabadi S.S., Banarase N.B., *Tropical J. Pharm. Res.* 2009. Vol. 8, pp. 455-465. Available online at <http://www.tjpr.org>.
9. Rybakova O.V., Safonova E.F., Slivkin A.I., Frolova O.V., *Vestnik VGU. S. Himiya, Biologiya, Farmaciya*, [Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy] 2007, No.2, pp. 174-177.
10. Król B., Paszko T., Król A., *Farmacia*, 2016, Vol. 64, pp. 881–886.
11. Nguyen Van Anh, Deineka V., Deineka L., Ngoc Vu Thi Anh, *Separations*, 2017, Vol. 4, 37. DOI:10.3390/separations4040037.
12. Nguyen Van Anh, Deineka V.I., Pham Long Quoc, Doan Phuong Lan, Deineka L.A., *Analitika i control*, [Analytics and Control], 2018, vol. 22, no. 1, pp. 20-27. DOI: 10.15826/analitika.2018.22.1.003.
13. Deineka V.I., *Sorbcionnye Hromatograficheskie Processy*, [Sorption and chromatographic processes], 2005, Vol. 5, No. 4, pp. 507–517.
14. Dulf F.V., Pamfil D., Baciú A.D., Pinteá A., *Chem. Central J.* 2013. Vol. 7, 8. DOI: 10.1186/1752-153X-7-8.
15. Martin R.J., Porter N. G., Deo B., *Agronomy N.Z.* 2005. Vol. 35, pp. 129-137.
16. Deineka V.I., Staroverov V.M., Fofanov G.M., Balyatinskaya L.N., *Pharm. Chem. J.*, 2002, Vol.36, pp.392-395. DOI: 10.1023/A:102100451.
17. Hopkins C.Y., Chisholm M.J., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1964, Vol. 41, pp. 42–44. DOI: 10.1007/BF02661901.
18. Badami R.C., Morris L.I., Colledge B., London W., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1965, Vol. 42, pp. 1119–1121. DOI: 10.1007/BF02636925.
19. Simonyi M., Bikádi Z., Zsila F., Deli J., *Chirality*, 2003, Vol. 15, pp. 680-698. DOI: 10.1002/chir.10282.
20. Brockerhoff H. A stereospecific analysis of triglycerides, *J. Lipid Res.*, 1965, Vol. 6, pp. 10-15. DOI: 10.1007/BF02531179.