

УДК 543.544 : 547.915

ГАЗО-ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ЛИПИДОВ

А. Г. Верещагин

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1349
II. Газо-жидкостная хроматография метиловых эфиров жирных кислот	1350
1. Условия разделения метиловых эфиров	1350
2. Синтез метиловых эфиров для хроматографического разделения	1351
3. Ввод пробы и температура разделения	1353
4. Твердый носитель	1354
5. Хроматография на неполярных жидкых фазах	1355
6. Хроматография на полярных жидкых фазах	1356
7. Идентификация жирных кислот	1358
8. Количественное определение жирных кислот	1362
9. Определение радиоактивности жирных кислот при газо-хроматографическом разделении	1364
III. Газо-жидкостная хроматография свободных жирных кислот и их производных (кроме метиловых эфиров)	1365
1. Разделение свободных жирных кислот	1365
2. Разделение углеводородов, спиртов, альдегидов и аминов	1366
3. Разделение глицеридов	1366

I. ВВЕДЕНИЕ

Липиды и входящие в их состав алифатические спирты, альдегиды и кислоты принадлежат к числу наиболее сложных групп природных веществ, поэтому в течение последних десятилетий исследователи во многих странах стремились применить к изучению этих соединений различные виды хроматографического анализа: адсорбционную, вытеснительную, распределительную и обращенно-фазовую хроматографию. Этими методами удалось значительно расширить наши представления о строении и обмене липидов в живых организмах. Однако применению этих видов анализа в химии липидов мешали многие недостатки: большая затрата времени для достижения удовлетворительного разделения, недостаточная воспроизводимость анализа и большая его трудоемкость, совпадение величин распределения насыщенных и ненасыщенных липидов и т. д.

В поисках метода эффективного разделения сложных смесей липидов животного организма, которые могут насчитывать 60 и более различных компонентов, английские биохимики Джеймс и Мартин открыли в 1952 г. совершенно новый вид хроматографии — газо-жидкостную хроматографию¹. В данном случае разделение смеси основано на различном распределении компонентов между двумя фазами — неподвижной жидкой фазой, нанесенной на твердый носитель хроматографической колонки, и проходящим через колонку газом. При давлениях, близких к атмосферному, газы по сравнению с жидкостями имеют значительно меньшую плотность и вязкость, поэтому сопротивление колонки газовому потоку сравнительно невелико. Это обстоятельство позволяет достичь большой скорости анализа при весьма высокой эффективности разделения, которая обеспечивается интенсивным массообменом

ном на поверхности неподвижной фазы. Концентрацию выходящих из колонки органических паров можно непрерывно автоматически регистрировать, определяя те или иные их физические свойства. Преимущества газо-жидкостной хроматографии выдвинули ее сейчас на передний край среди других разновидностей хроматографии. Данный обзор не содержит подробного изложения теоретических основ газо-жидкостной хроматографии и описания хроматографической аппаратуры; соответствующие сведения можно найти в ряде руководств²⁻⁹.

Методом газо-жидкостной хроматографии разделяют метиловые эфиры жирных кислот, свободные кислоты, спирты, альдегиды, кетоны, амины, нитрилы и углеводороды, отчасти триглицериды, производныеmono- и диглицеридов и т. д. Для перечисленных соединений газо-жидкостная хроматография является наилучшим способом разделения и количественного определения. Этот метод успешно используется и для изучения алифатических радикалов с длинной цепью (остатков кислот, спиртов, альдегидов и т. д.), которые входят в состав нелетучих липидов: восков, фосфолипидов, гликолипидов, сульфолипидов, липопротеидов и т. д. В течение последних 10 лет газо-жидкостной хроматографии липидов посвящено большое количество экспериментальных исследований и несколько обзорных статей¹⁰⁻¹⁷.

В настоящем обзоре мы поставили своей целью осветить современное состояние этого весьма актуального вопроса. Статья не охватывает многочисленные работы, в которых газо-жидкостная хроматография использовалась лишь для анализа липидов и которые не содержат оригинального материала по теории или технике данного метода. Почти не затронуты также исследования, посвященные алифатическим соединениям с короткой цепью (до C₈), стеринам, эфирным маслам и другим производным изопрена. В обзор включены наиболее существенные работы по газо-жидкостной хроматографии метиловых эфиров жирных кислот, свободных кислот, глицеридов и некоторых других липидов, опубликованные до 1 июля 1963 г.

II. ГАЗО-ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ МЕТИЛОВЫХ ЭФИРОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

1. Условия разделения метиловых эфиров

В первых газо-хроматографических исследованиях для определения кислотного состава липидов использовали хроматографию свободных жирных кислот¹. Однако уже в 1953 г. было обнаружено, что применение менее полярных производных жирных кислот — метиловых эфиров — имеет ряд преимуществ: достигаются более высокая эффективность разделения при меньшей температуре и времени анализа, а также более точные данные при идентификации и количественном определении^{18, 19}. В настоящее время газо-жидкостную хроматографию метиловых эфиров высших жирных кислот можно считать стандартным методом исследования состава и строения природных и синтетических липидов²⁰. Этот метод охватывает самые различные жирные кислоты в пределах от C₁ до C₃₀ и выше: насыщенные, разветвленные, ненасыщенные (*цис-* и *транс*-изомеры), окси-, эпоксикето-кислоты и т. д. Современные методы позволяют быстро превратить все эти кислоты в метиловые эфиры с количественным выходом. Полученные эфиры разделяют на заполненных сорбентом или капиллярных колонках, нагретых до 150—300°; колонку набивают твердым носителем (обычно кизельгуром) с нанесенной на него высококипящей неполярной или полярной жидкостью фазой. В качестве газа-носителя используют азот, гелий или аргон, которые проходят через колонку со скоростью 30—100 мл/мин. Метиловые эфиры обнаруживают и количественно

ТАБЛИЦА 1

Газо-жидкостная хроматография метиловых эфиров высших жирных кислот

Твердый носитель	Жидкая фаза и ее содержание	Температура, °С	Газоноситель	Скорость газа, мл/мин	Детектор	Состав пробы и длительность анализа, мин.	Ссылки на литературу
Стерхамол 52—85 меш	DC-силикон	210	N ₂	5,5	Катарометр	C ₈ —C ₃₄	21
Целит 545 50—100 мк Целит 545 100—210 меш	Альбезон L 10—20%	197—231	N ₂	20—30	То же	C ₁₂ —C ₂₈ 80—180	22
Целит 545, 140—170 меш	Альбезон L 20%	197	Ar	60	Ионизационный	C ₁₂ —C ₂₈ 72	23
То же	Полиэтиленгликоль адипат, 24%	180	Ar	40	То же	C ₁₂ —C ₁₈ 70	23
Капиллярная колонка 30—60 м × × 0,25 мм	Полиэтиленгликоль-сукцинат, 20%	203	He	200	Катарометр	C ₁₀ —C ₂₆ 38	24
То же	Альбезон L	200	Ar	0,5—1	Ионизационный	Цис-транс-изомеры метиллиноволеата и метиллиноволената, 60	25
	Диэтиленгликоль-сукцинат	168—188	Ar	0,5—1	То же	То же, 40	25

определяют при помощи катарометра или ионизационного детектора. В табл. 1 приведено несколько примеров разделения метиловых эфиров.

В следующих разделах этой главы будут более детально описаны: синтез метиловых эфиров, условия хроматографического разделения, а также методы идентификации, количественного анализа и определения радиоактивности этого класса соединений.

2. Синтез метиловых эфиров для хроматографического разделения

В настоящее время существуют две группы методов синтеза метиловых эфиров жирных кислот для хроматографических целей: 1) каталитическая переэтерификация липидов в растворе метанола; 2) омыление липидов, выделение жирных кислот и их этерификация.

а. *Переэтерификация жирных кислот*. Для осуществления метанолиза липиды растворяют в абсолютном метаноле; в случае неполного растворения прибавляют бензол или толуол²⁶. Чтобы обеспечить качественный выход эфиров, все применяемые реактивы должны быть тщательно очищены от сопутствующих загрязнений²⁷. Условия реакции, применявшиеся различными авторами, приведены в табл. 2.

ТАБЛИЦА 2

Условия переэтерификации триглицеридов в метаноле

Катализатор	Длительность, часы	Температура, °С и газовая среда	Выход эфиров, %	Ссылки на литературу
5% HCl	2	64—65 воздух	—	28
0,8 n-HCl	2	64—65 воздух	—	23
5% HCl	2	80—100 воздух	95	26
5% H ₂ SO ₄	18	64—65 воздух	—	29 *
0,005% Na	0,5	— —	96	30
0,1 n-Na или K	1,5—2	64—65 азот	98	31 *
1% Na	2 мин	60 азот	99	32

* Метанолиз фосфолипидов и эфиров стеринов.

Как видно из табл. 2, метанолиз в основной среде заканчивается гораздо быстрее, чем в кислой; при этом каталитическая активность HCl и H_2SO_4 одинакова, а K по своей активности превосходит Na^{31} . В 1%-ном растворе Na в первичных спиртах алкоголиз триглицеридов проходит полностью за 2^m минут, где $m=1 \div 6$ — число атомов углерода в молекуле спирта³². В отсутствие кислорода выход метиловых эфиров несколько повышается. Метанолиз фосфолипидов и эфиров стеринов требует большего времени и большего избытка метанола и катализатора, чем метанолиз триглицеридов. Окончательная очистка метиловых эфиров перед хроматографией может быть достигнута фракционированной перегонкой³³, возгонкой в вакууме^{26, 34} или же адсорбционной хроматографией на колонке кремнекислоты³¹ и в тонком слое³². Полученные метиловые эфиры можно полностью защитить от окисления, в течение длительного времени сохраняя их в темноте в атмосфере инертного газа при температуре ниже 0° в бензольном растворе³⁵.

б. *Этерификация свободных жирных кислот.* Условия переэтерификации вполне пригодны для проведения этерификации жирных кислот, выделенных омылением липидов (см., например³⁶). Однако существуют и более быстрые методы этерификации, занимающие не более нескольких минут^{15, 16}.

Уже в течение ряда лет метиловые эфиры получают этерификацией кислот диазометаном³⁷. Раньше недостатками этого метода считали опасность диазометана в обращении и возможность образования пиразолинов — продуктов присоединения CH_2N_2 к двойным связям жирных кислот²⁶. В последнее время было обнаружено, что свежеприготовленный раствор CH_2N_2 в смеси CH_3OH и эфира (1:9) позволяет получать метиловые эфиры за 10 мин. с количественным выходом и без всякой примеси продуктов разрушения или полимеризации; метанол в данной реакции играет, по-видимому, роль катализатора³⁸. В другой работе рекомендуется синтезировать эфиры, выдерживая жирные кислоты в слабом растворе диазометана при -34° в течение двух с половиной дней³⁹. Этерификация жирных кислот в растворе трехфтористого бора в метаноле заканчивается всего за 2 минуты, но выход метиловых эфиров не превышает 80—85%; эпоксикислоты и кислоты с сопряженными двойными связями не могут быть этерифицированы этим методом⁴⁰. Активность CH_2N_2 , HCl и BF_3 в реакции образования эфиров высших жирных кислот очень близка^{35, 41}. Для обеспечения количественного выхода более летучих эфиров низших кислот ($\text{C}_1 \text{— } \text{C}_{10}$) следует применять диазометан⁴¹ и использовать доказан в качестве растворителя⁴² или же вместо метиловых эфиров получать этиловые эфиры⁴³.

Для синтеза метиловых эфиров 2-оксикислот из цереброзидов мозга и эфиров ацетатов этих кислот успешно применена реакция с 2,2-диметоксипропаном в подкисленном метаноле^{44, 45}. Эпоксикирные кислоты при омылении разрушаются, переходя в соответствующие диоксикислоты; в случае присутствия эпоксикислот в липидах следует использовать метанолиз в растворе натрия⁴⁶.

Существуют и другие методы синтеза эфиров. Так, гидрогенолизом триглицеридов с алюмогидридом лития получен свободный глицерин и LiAl -алкоголят высших спиртов, соответствующих отдельным жирным кислотам. Продукты ацетилирования этих соединений — три-ацетин и ацетаты жирных спиртов — определяли газо-жидкостной хроматографией⁴⁷. Для получения эфиров летучих и нелетучих органических кислот предложена реакция Ag -солей с иодистым метилом в атмосфере инертного газа в течение 8 часов; выход метиловых эфиров составлял 96—100%⁴⁸.

3. Ввод пробы и температура разделения

Летучие компоненты жидкой фазы и пары воды удаляют из колонки, выдерживая ее при температуре на 5—10° выше рабочей в токе газа-носителя в течение 48—96 час.²⁴. Иногда колонку с твердым носителем, содержащим 10—50% жидкой фазы, стабилизируют нагреванием до 300° при 10 мм рт. ст. в течение 5 часов⁶.

Ввод пробы в колонку производят с максимальной быстротой, предпочтительно без перерыва тока газа-носителя. Если для анализа имеется мало материала, пробу растворяют в летучих органических веществах типа метилтридеканоата²³. Описано приспособление для ввода малых проб метиловых эфиров в хроматографическую колонку с замкнутой системой инъекции⁴⁹.

Перед началом хроматографического разделения введенные в колонку метиловые эфиры жирных кислот, жидкые или твердые при обычной температуре, необходимо перевести в парообразное состояние^{15, 16, 46, 50}. Для этого многие модели хроматографов снабжены испарительными камерами, где поддерживается температура на 50—100° выше температуры колонки²⁴. При использовании капиллярных колонок эта разность температур может достигать 150°^{25, 51}. Если испарение пробы на входе колонки происходит не мгновенно, то эффективность разделения снижается, особенно для компонентов с большей величиной удерживаемого объема V_R ⁴⁹. Эфиры насыщенных и ненасыщенных кислот обычно не изменяются при испарении⁵². Однако ненасыщенные кислоты с сопряженными двойными связями и гидроксильными группами могут в испарительной камере подвергаться *цис*-*транс*-изомеризации или дегидрироваться⁵³. Эфиры кислот тунгового масла, содержащие более 70% элеостеариновой кислоты, полимеризуются в хроматографической колонке при высоких температурах¹⁵.

Правильный выбор рабочей температуры и ее регулирование в течение всего опыта определяют эффективность разделения и точность количественного определения жирных кислот. Высокую температуру в колонке иногда создают при помощи паровой бани, содержащей высококипящие жидкости типа полиэтиленгликоля, т. кип. 197°²²; однако чаще всего пользуются воздушным термостатом.

Температурный режим газо-хроматографического разделения зависит от состава метиловых эфиров пробы и химической природы жидкой фазы колонки. Наилучшие результаты разделения эфиров кислот до С₃₀ включительно на неполярных жидких фазах (Альционе М и L, Силиконе) достигаются при температуре колонки 250—300°^{16, 21, 54}. При еще более высоких температурах скорость хроматографии возрастает, но эффективность разделения снижается^{23, 25}. На полиэфирных фазах температурный порог редко превышает 200—210°^{16, 39, 43}, дальнейшее нагревание может вызвать унос жидкой фазы из колонки, приводящий к порче детектора⁵⁵. На капиллярных колонках разделение одной и той же смеси достигается при температуре на 40—50° ниже, чем на заполненных сорбентом колонках^{12, 25, 56, 57}.

Температура колонки оказывает значительное влияние на удерживаемый объем отдельных компонентов. Так, на полиэфирной колонке метилстеарат не отделяется от метилолеата при 125°, но хорошо отделяется при 158—168°¹². «Фактор разделения» — отношение удерживаемого объема (V_R) компонента смеси к V_R предыдущего компонента⁵⁸ — с повышением рабочей температуры для эфиров насыщенных кислот и жирных кислот с разветвленной цепью снижается, а для ненасыщенных эфиров (по отношению к предшествующим насыщенным эфирам) — возрастает⁵⁷; эту закономерность можно использовать для хроматографической идентификации жирных кислот. При разделении смеси метиловых эфиров на полярной колонке без предварительной калибровки

катарометра повышение температуры приводило к завышенным результатам для легко летучих компонентов и заниженным значениям для эфиров с большим временем удерживания; с падением температуры пропорциональность в значительной степени выравнивалась^{24, 51} (см. раздел II, 8, а).

Если смесь метиловых эфиров содержит компоненты, резко различающиеся по своей летучести, то анализ такой смеси при одной температуре колонки становится невозможным. В подобных случаях более летучие C₂—C₁₀ эфиры определяют при 100—120°, а метиловые эфиры высших жирных кислот разделяют при 180—200°; при этом эфиры низших кислот выходят как один пик в начале хроматограммы^{15, 58—60}. В последнее время хроматографию производных низших и высших кислот осуществляют в условиях автоматического программирования рабочей температуры колонки^{15, 61}.

Для получения достоверных количественных данных катарометр следует тщательно термостатировать⁵¹. Обычно температура катарометра на 25—75° превышает температуру колонки²⁴. В некоторых случаях такой температурный градиент создают для ионизационных детекторов^{25, 50}.

Срок работы одной колонки значительно увеличивается, если снижать температуру колонки до 100°, когда колонка не используется^{11, 25}.

4. Твердый носитель

В газо-жидкостной хроматографии липидов для нанесения жидкой фазы чаще всего используют различные сорта кизельгуря (диатомовой земли) — Целит-545^{22, 30, 62} или Хромосорб W^{33, 55, 63—65}, а также другие материалы — стерхамол²¹, толченый огнеупорный кирпич⁴⁶, стеклянные шарики⁶⁶, эмбасел³⁴ или хлористый натрий¹⁹. В различных исследованиях применяли носители с размером частиц 50—150 меш; диапазон зернения для одной колонки не должен превышать 20 меш. Перед нанесением жидкой фазы твердый носитель отмывают концентрированной соляной кислотой, затем раствором KOH, раствором NH₄OH, водой и тщательно высушивают^{51, 67}. Иногда рекомендуют обрабатывать носитель парами дихлордиметилсилина^{66, 68, 69}; однако такая процедура может способствовать задержке метиловых эфиров в полимерной колонке⁷⁰.

Хроматографические колонки набивают носителем с нанесенной на него жидкой фазой при помощи вибратора и под давлением того газа, который используется в процессе разделения^{24, 51}. В других случаях для набивания создают вакуум внутри колонки²².

Природа твердого носителя оказывает значительное влияние на характер разделения метиловых эфиров: так, полиэтиленгликольсукинат на Целите не обеспечивает разделения эфиров линоленовой и арахиновой кислот; если ту же фазу нанести на Хромосорб W, то эфир арахиновой кислоты выходит на хроматограмме между пиками линолеата и линолената⁷¹. С другой стороны, применение Хромосорба R и Целита-545, пропитанных поливинилацетатом, дало сходные результаты при разделении искусственной смеси метиловых эфиров жирных кислот⁶⁶. Значительного разрушения метил-*цис*-9,10-эпоксиоктадеканоата на колонке с силиконовым маслом при 235° можно избежать, используя в качестве твердого носителя Целит вместо огнеупорного кирпича C-22⁴⁶.

Метиловые эфиры насыщенных и ненасыщенных кислот могут адсорбироваться при разделении на колонке стерхамола или кизельгуря, пропитанного неполярной или полярной жидкой фазой. Позднее газ-носитель десорбирует эфиры и выносит их из колонки. Так, при применении стерхамола 8% радиоактивности метилпальмитата-1-C¹⁴ элюируется позже основного пика. Для понижения адсорбирующей спо-

собности стерхамол обрабатывали гексаметилдисилазаном или 2%-ным раствором лаурата Na, а кизельгур промывали соляной кислотой и раствором KOH в метаноле. После такой обработки адсорбция метилпальмитата- I-C^{14} снижалась до 4%⁷².

5. Хроматография на неполярных жидкых фазах

В работах по газовой хроматографии метиловых эфиров высших жирных кислот раньше других жидкых фаз стали применять не содержащие полярных групп высококипящие вакуумные смазки кремнийорганической или парафиновой природы — силикон DC 550, Альцион M, Альцион L и полибутилен^{1, 18, 22, 54, 58, 73}.

Значения удерживаемого объема метиловых эфиров определяются различиями в парциальном давлении пара этих соединений, когда они растворены в жидкой фазе колонки; парциальное давление, в свою очередь, зависит от природы и величины сил взаимодействия между молекулами эфира и жидкой фазы.

При концентрации паров органического вещества в потоке 3—5 мкг/мл и ниже между эфирами жирных кислот и молекулами неполярных фаз действуют исключительно дисперсионные силы Лондона, которые ослабевают при снижении молекулярного веса и разветвлении алифатической цепи²³. Эти фазы обеспечивают полное разделение эфиров *n*-насыщенных кислот, различающихся по длине цепи на 1 атом углерода (фактор разделения 1,56), в диапазоне от C_1 до C_{34} ^{58, 74}. Время удерживания сравнительно велико, и для метилстеарата обычно превышает 60 мин. Эфиры кислот с разветвленной цепью выходят из колонки раньше неразветвленных эфиров с тем же числом атомов углерода^{14, 23}; изо-формы разветвленных кислот движутся быстрее соответствующих антено-форм^{11, 75, 76 *}.

Для отделения эфиров ненасыщенных кислот перед хроматографией используют бромирование; бромированные эфиры (кроме бромидов метилолеата) не летучи при температуре разделения⁵⁸. Длину цепи ненасыщенной кислоты можно определить препартивным выделением данного эфира и последующим каталитическим гидрированием; полученный насыщенный эфир идентифицируют по величине удерживаемого объема⁷⁷. Переэтерификации при гидрировании метиловых эфиров с катализатором Адамса можно избежать, проводя реакцию в метаноле⁷⁸. Другие методы идентификации изложены в разделе II, 7, б.

При разделении на неполярных жирных фазах эфиры ненасыщенных жирных кислот располагаются на хроматограмме впереди эфиров соответствующих насыщенных кислот. Насыщенные и мононенасыщенные эфиры разделяются полностью; ди- и триенасыщенные эфиры образуют смешанный пик, который частично отделяется от пика мононенасыщенных эфиров⁷⁹. Разделения метиллинолеата и метиллиниолената не было достигнуто даже на капиллярной колонке «Альцион L» эффективностью 200 000 теоретических тарелок⁵⁶. При сокращении расстояния между карбоксильной группой и двойной связью величина удерживаемого объема V_R мононенасыщенных эфиров несколько возрастает^{23, 58}. На капиллярной колонке полибутилена частично разделены изомеры метиллинолеата — эфиры 8,11-, 9,12-, 10,13- и 11,14-октадекадиеновых кислот⁷³. Полиненасыщенные эфиры с сопряженными двойными связями выходят из колонки медленнее, чем эфиры с изолированными связями⁶. Изомеры метиллинолеата и метиллиниолената с сопряженными связями хорошо разделялись на колонке с Альционом L, в то время как исходные эфиры совершенно не отделяются друг от друга в этих условиях³⁴.

* У изо-форм разветвленных кислот алифатическая цепь оканчивается изопропильной группой, а у антено-форм — изобутильной группой.

Неполярные жидкие фазы с успехом применяют для разделения геометрических изомеров ненасыщенных кислот, образующихся при гидрировании в промышленных условиях; при этом величина V_R *цис*-изомеров моно-, ди- и триненасыщенных эфиров с изолированными или сопряженными двойными связями меньше, чем у соответствующих *транс*-изомеров^{12, 22, 23, 58, 63}. На капиллярной колонке Альзона Л с ионизационным детектором геометрические изомеры метиллиноволеата разделены на *цис,цис*-, *цис,транс*- и *транс,цис*+*транс,транс*-формы; *цис,цис,цис*-метиллиноволеат двигался впереди *транс,транс,транс*-изомера. Достигнуто также разделение геометрических изомеров октадека-диеновых кислот с сопряженными двойными связями²⁵.

На колонке из силикона метиловый эфир *цис*-9,10-эпоксиоктадекановой кислоты из уредоспор ржавчинного гриба отделили от продукта ацетилирования — ацетоксиоксиоктадеканоата⁴⁶. Было описано также разделение метиловых эфиров 2-окси-кислот⁴⁵.

В настоящее время неполярные жидкие фазы применяют главным образом для предварительного фракционирования метиловых эфиров по числу атомов углерода, для определения *цис*- и *транс*-изомеров и для сравнительной идентификации. Для изучения состава сложных смесей жирных кислот из природных источников чаще всего используют газо-жидкостную хроматографию на полярных жидким фазах.

6. Хроматография на полярных жидким фазах

a. *Приготовление колонок.* Полярные жидким фазы предложены для разделения эфиров насыщенных и ненасыщенных кислот в 1958 г.^{80, 81}. Первые полярные фазы, которые представляют собой производные адипиновой кислоты — полиэтиленгликоль+адипат (LAC-1-296) и полиоксиалкан-адипат (реоплекс 400), — широко применяются до сих пор. Подобные полиэфиры $[-O-CO(CH_2)_n-CO-O-]_m$ синтезируют поликонденсацией янтарной³⁰, адипиновой^{23, 82} и других двусосновых кислот с этиленгликолем или иным многоатомным спиртом при 150—180°, обычно в присутствии катализатора (*p*-толуолсульфокислоты, хлористого цинка и т. д.) и в атмосфере инертного газа; продукт растворяют в спирте или ацетоне и очищают от примеси катализатора и свободных кислот ионообменной хроматографией на амберлите IR-120 или дуолите A-4^{30, 65, 67, 70, 73}. Для выделения более термостойкой высокомолекулярной фракции полиэфиры можно переосадить гексаном из ацетонового раствора³⁰, упругость пара жидкой фазы при рабочей температуре не должна превышать 0,5 мм рт. ст.⁸³.

В качестве полярной жидкой фазы используют также поливинил-акетат (винилит АYAC) с молекулярным весом 1500—23 000. Преимущество этого полиэфира состоит в том, что при нагревании он выделяет только небольшое количество уксусной кислоты, которая при препартивном разделении легко удаляется из собранных фракций; уровень фона катарометра в таких условиях не превышает 0,2 мВ⁵⁵. На колонках с поливинилацетатом происходило разложение диметилмалоната; при использовании силиконового масла распада не наблюдалось⁸⁴. В последние годы для хроматографии метиловых эфиров применены ацилированные β -циклодекстрины, которые отличаются низким содержанием кислорода, отсутствием полярных концевых групп, однородным молекулярным весом и термостойкостью до 236°^{85, 86}.

Полярную жидкую фазу в количестве 5—25% наносят на твердый носитель и материал колонки кондиционируют, как описано в разделе II, 3. В данном случае стабилизацию колонки следует проводить особенно тщательно, поскольку полиэфиры неустойчивы при высоких температурах. При недостаточном кондиционировании или излишне высокой температуре жидккая фаза, попадая в детектор, выводит его из

строя. Улетучивание фазы из колонки приводит к снижению эффективности разделения, а также вызывает дрейф и «шум» нулевой линии детектора. Поступающий в колонку газ-носитель следует тщательно высушивать во избежании гидролиза полиэфиров^{30, 67}. Если колонка хорошо стабилизирована и правильно эксплуатируется, срок ее службы может достигать нескольких месяцев²³.

б. *Свойства полярных жидких фаз.* Между поляризуемыми двойными связями ненасыщенных жирных кислот и сложно-эфирными группами полярных жидких фаз возникает межмолекулярное притяжение, которое усиливается с ростом числа двойных связей в алифатической цепи. Это притяжение специфически замедляет ненасыщенные метиловые эфиры на хроматограмме и они располагаются после соответствующих насыщенных эфиров, т. е. в порядке, обратном тому, который наблюдается при хроматографии на неполярных жидким фазах²³.

Вследствие ослабления дисперсионных взаимодействий Лондона на полиэфирных колонках величина удерживаемого объема метиловых эфиров насыщенных кислот при равной температуре и одинаковом весовом содержании жидкой фазы снижается в 2—3 раза по сравнению с колонками Альезона L, а хроматографическое разделение соответственно ускоряется¹⁵. Свободная энергия сольватации CH_2 -групп также снижается, и величина фактора разделения эфиров, различающихся на CH_2 -группу, становится меньше, чем на неполярных колонках: 1,40 вместо 1,56²³. Эфиры разветвленных насыщенных кислот, распределение которых управляемо силами Лондона, располагаются впереди соответствующих насыщенных эфиров с прямой цепью, как и в случае неполярных фаз^{33, 87}. Расположение двойных связей в цепи и их геометрическая конфигурация оказывают здесь на величину V_R значительно более слабое влияние, чем при использовании неполярных жидким фаз²³.

С увеличением числа двойных связей в цепи растворимость метиловых эфиров ненасыщенных жирных кислот во всех полярных жидким фазах возрастает. По этой причине моно-, ди- и триненасыщенные эфиры выходят из колонки (в указанном порядке) вслед за насыщенными эфирами с тем же числом атомов углерода. В то же время различия в полярности полиэфиров разного состава оказывают значительное влияние на эффективность разделения.

При уменьшении числа атомов углерода в остатке двуосновной кислоты, связанном с полиэтиленгликолем, или при укорочении одноосновного кислотного остатка в ацилированных β -циклодекстринах полярность полиэфира и разделяющая способность колонки возрастают; одновременно снижается термостойкость жидкой фазы и абсолютный удерживаемый объем метиловых эфиров^{14, 86}. Метилолеат может полностью отделяться от метилстеарата на колонках с полиэтиленгликоль-сукцинатом и частично — на колонках с полиэтиленгликоль-адипатом^{12, 24, 30, 51}. На сильно полярных фазах относительное удерживание ненасыщенных эфиров возрастает в такой степени, что пик триненасыщенного метилового эфира накладывается на пик насыщенного эфира, содержащего на 2 углеродных атома больше. Так, на колонках с полиэтиленгликоль-сукцинатом или полиэтиленгликоль-пентаэритрит-адипатом (LAC-2-R446) соотношение удерживаемых объемов метиллиниолената и метилового эфира арахидовой кислоты равно единице; с возрастанием полярности колонки при увеличении содержания жидкой фазы и рабочей температуры это соотношение становится больше единицы. Для разделения подобных пар метиловых эфиров обычно используют менее полярные полиэфирные фазы — полиэтиленгликоль-адипат, бутандиол-сукцинат и диэтиленгликоль-себацинат^{24, 30, 51, 88}.

Выдерживание полиэфирной колонки при высокой температуре в течение нескольких недель приводит к снижению полярности фазы¹⁵; при этом появляется возможность разделения на выдержанной колонке таких пар метиловых эфиров, которые не отделялись друг от друга на «свежей» колонке того же полиэфира³³.

в. *Разделение на полярных жидкых фазах.* Применение полиэфирных фаз дало наилучшие результаты при анализе метиловых эфиров жирных кислот растительного и животного происхождения, различающихся по длине цепи от C_1 до C_{30} и числу двойных связей от 1 до 6¹⁴.

На колонках β -циклогексадекстрин-валерата, -бутират, -пропионата и -ацетата разделены 9 разветвленных метил-, диметил- и trimetилизомеров метилгептадеканоата³⁶.

Ненасыщенные эфиры с одинаковым числом атомов углерода и двойных связей, различающиеся по расположению связей в цепи, плохо делятся на заполненной сорбентом колонке, но могут быть разделены при использовании капиллярных колонок. Так, 8,11-, 9,12-, 10,13- и 11,14-изомеры метиллиноволеата на капиллярной колонке полиэтиленгликоль-глутарата полностью отделялись друг от друга и от метиловых эфиров стеариновой, олеиновой и линоленовой кислот; на обычной колонке полиэтиленгликоль-адипата происходило лишь разделение 11,14-изомера и суммы 8,11+9,12-изомеров. При удалении двойной связи от карбоксила величина V_R несколько возрастила, но метиловые эфиры олеиновой и петрозелиновой кислот на обеих колонках не могли быть разделены⁷³. Метиловые эфиры линоленовой и линоловой кислот с со-пряженными двойными связями хорошо отделялись от соответствующих эфиров с изолированными связями³⁴.

На заполненной сорбентом колонке *цис*-, *транс*-изомеры ненасыщенных кислот не разделяются^{12, 63}. На капиллярной колонке полиэтиленгликоль-сукцинат удалось отделить метилолеат от метилэлаидата, у которого величина V_R была меньше. Геометрические изомеры метиллиноволеата разделены на *транс*, *транс*-*цис*, *цис*+*цис*, *транс*- и *транс*, *цис*-формы, а изомеры метиллиноволената — на *транс*, *транс*, *транс*-, моно-*транс*-, ди-*транс*-, *цис*, *цис*, *цис*- +ди-*транс*- и моно-*транс*+моно-*цис*-формы. Разделение геометрических изомеров метиллиноволеата с со-пряженными двойными связями было столь же эффективным, как и на неполярной колонке²⁵.

Описана хроматография на полиэфирной колонке метил-*цис*-9,10-эпоксиоктадеканоата и его производных⁴⁶. На полиэфире сукцината разделены метиловые эфиры *эрритро*- и *трехо*-ди-бромоктадекановых кислот, из которых *трехо*-форма с большим дипольным моментом обнаруживала более высокое значение удерживаемого объема. Величина V_R *трехо*-формы в 20 раз превышала значение V_R метилстеарата⁶⁴.

7. Идентификация жирных кислот

Методы идентификации жирных кислот, входящих в состав сложной природной смеси, можно разбить на две основные группы: 1) идентификация по хроматографическим данным, полученным при различных условиях полярности жидкой фазы, состава твердого носителя, вида детектора, температуры разделения, скорости газа и т. д.; 2) идентификация путем сочетания хроматографических и нехроматографических методов (окислительное расщепление, галоидирование или катализитическое гидрирование двойных связей; спектрофотометрия в ИК или УФ свете, масс-спектрометрия и т. д.).

а. *Газо-хроматографическая идентификация.* Величины удерживаемых объемов V_R метиловых эфиров жирных кислот значительно меняются в зависимости от параметров опыта; в целях идентификации отдельные компоненты смеси обычно характеризуют по численному значению относительного

удерживаемого объема $V_R^{\text{отн}}$, которое равно отношению V_R данного эфира к V_R известного вещества (метилого эфира миристиновой, пальмитиновой или стеариновой кислоты⁵¹). Величину V_R измеряют от середины пика воздуха²⁸. Наиболее простой метод хроматографической идентификации — это идентификация по величине $V_R^{\text{отн}}$; однако ввиду возможного содержания в одной хроматографической полосе двух или нескольких различных компонентов такая идентификация при анализе сложных смесей жирных кислот иногда оказывается не вполне надежной¹⁴. Идентификация разветвленных и ненасыщенных кислот по величине фактора разделения описана в разделе II, З.

Процесс газо-хроматографического разделения липидов, как и другие процессы распределительной хроматографии, следует правилу аддитивности^{58, 60, 89}. По этому правилу прибавление новой функциональной группировки меняет величину коэффициента распределения только в зависимости от природы этой группировки и ее распределения в фазах хроматографической системы, но независимо от состава остальной части молекулы. На неполярных и полярных фазах величины $\log_{10}V_R^{\text{отн}}$ в гомологических рядах метиловых эфиров насыщенных *n*-жирных кислот⁵¹, разветвленных насыщенных кислот, изо-и (+)-антеизо-разветвленных кислот⁸⁷, мононенасыщенных кислот^{51, 87}, ди-, три- и полиненасыщенных кислот²³, бромированных жирных кислот⁶⁴, одно- и двухосновных кислот с короткой цепью⁷⁷ и т. д., а также углеводородов⁹⁰, алифатических альдегидов⁹¹, триглицеридов⁹² и других липидов образуют в системе координат против значений числа атомов углерода в алифатической цепи *m* семейство параллельных прямых. Для метиловых эфиров с одинаковой длиной цепи установлена линейная зависимость между $\log_{10}V_R^{\text{отн}}$ и числом двойных связей⁵¹. Функциональная зависимость для насыщенных кислот описывается уравнением вида $\log_{10}V_R^{\text{отн}} = a + bm$, где *a* и *b* — константы, зависящие от параметров опыта^{19, 21}. При увеличении температуры разделения тангенсы углов между параллельными прямыми и осью абсцисс уменьшаются⁹³. Жирные кислоты можно идентифицировать, используя линейную зависимость между $\log_{10}V_R^{\text{отн}}$ и *m*, если известен гомологический ряд, членами которого они являются.

Если гомологическая принадлежность неизвестна, то метиловый эфир идентифицируют по величине $V_R^{\text{отн}}$ на колонках с неполярной и полярной жидкостью на основе закономерности, обнаруженной Джеймсом для насыщенных и ненасыщенных кислот с прямой цепью и изолированными двойными связями. Этот автор показал, что между величинами $\log_{10}V_R^{\text{отн}}$ метиловых эфиров данного гомологического ряда на колонках с Альзоном L и полиэтиленгликоль-адипатом существует линейная зависимость, причем насыщенные, моно-, ди-, три- и полиненасыщенные жирные кислоты образуют ряд параллельных прямых. Положение точки пересечения найденных значений $\log_{10}V_R^{\text{отн}}$ с той или иной из этих прямых позволяет характеризовать неизвестную кислоту по числу атомов углерода и двойных связей. Точки пересечения, соответствующие эфирам с одинаковой длиной цепи, но различающимся по ненасыщенности, лежат вдоль перпендикуляра, который проведен к прямой для эфиров насыщенных кислот в точке, отвечающей метиловому эфиру насыщенной жирной кислоты с данным числом атомов углерода²³. Аналогичные закономерности получены при разделении смеси жирных кислот на двух полизэфирных колонках различной полярности⁹⁶.

Значение $V_R^{\text{отн}}$ в целях идентификации можно выразить числом атомов углерода насыщенной жирной кислоты; эта величина получила название «углеродного числа»⁷⁵ или «эквивалентной длины цепи» (ЭДЦ)⁹⁴. Для вычисления ЭДЦ неидентифицированного пика хроматограммы строят эталонную прямую зависимости $\log_{10}V_R^{\text{отн}}$ метиловых эфиров нормальных насыщенных жирных кислот от числа атомов углерода *m* для данных условий разделения, а затем по этой прямой определяют величину *m*, соответствующую найден-

ному значению $\log_{10} V_R^{\text{отн}}$ идентифицируемого компонента; полученная величина m и является ЭДЦ данного метилового эфира. При отсутствии эталонной прямой ЭДЦ можно вычислить из уравнения:

$$\text{ЭДЦ} = (s_2 - s_1) \frac{\log_{10}(t_x : t_{s_1})}{\log_{10}(t_{s_2} : t_{s_1})} + s_1$$

где s_1 и s_2 — ЭДЦ стандартных метиловых эфиров: t_x, t_{s_1} и t_{s_2} — $V_R^{\text{отн}}$ исследуемого эфира и стандартов⁹³. Очевидно, что для насыщенных эфиров величины ЭДЦ на полярных и неполярных фазах совпадают и равны числу атомов углерода в алифатической цепи. Включение двойной связи или определенной функциональной группы в молекулу дает известный инкремент ЭДЦ по сравнению с ЭДЦ насыщенного эфира с той же длиной цепи, характеризующий данную связь или группу. Величины инкрементов ЭДЦ для некоторых заместителей приведены в табл. 3.

ТАБЛИЦА 3

Величины инкрементов эквивалентной длины цепи для различных функциональных групп при газо-жидкостной хроматографии метиловых эфиров жирных кислот на неполярных и полярных жидкых фазах

Заместители	Альзон	Полиэтилен-гликоль-адипат	Ссылки на литературу
9,10- <i>цис</i> -двойная связь	-0,3	+0,4	94
9,10—12,13- <i>цис</i> -двойные связи	-0,4	+1,0	93
9,10—11,12- <i>транс</i> -сопряженные двойные связи	+0,7	+2,6	94
Циклопропеновое кольцо	-0,4	+1,0	93
-COOCН ₃ -группа	+2,6	+7,3	94
9-CН ₃ -группа	-0,7	-0,8	93
4-CO-группа	+1,3	+1,8	93
9-CO-группа	+1,4	+5,7	93
12-OH-группа	+1,7	+6,3	94
9,10-(OH) ₂ -группа	+3,3	+11,8	94
9,10- <i>цис</i> -эпокси-группа	+2,0 *	+4,0 **	46

* Хроматография на колонке силикона.

** Хроматография на колонке 1,4-бутандиол-сукцината.

Определив значения ЭДЦ неизвестного компонента на колонках с неполярной и полярной жидкими фазами, можно идентифицировать данный компонент и входящие в его состав функциональные группы. Величины ЭДЦ были использованы для идентификации 9 изомеров разветвленных С₁₇-жирных кислот на полярных фазах — ацилированных β-циклогексстринах⁹⁵.

В последнее время разработаны методы, позволяющие определить не только число, но и расположение изолированных двойных связей в цепи жирных кислот по величине $V_R^{\text{отн}}$ на жидким фазах, обладающих высокой полярностью^{96, 97, 98}. Значение $V_R^{\text{отн}}$ на полимерных фазах при смещении двойных связей из центрального положения к карбоксильному или метильному концу алифатической цепи возрастает таким образом, что при отложении величины $\log_{10} V_R^{\text{отн}}$ метиловых эфиров ненасыщенных кислот против числа атомов углерода параллельные прямые между точками, которые соответствуют жирным кислотам с одинаковым числом несопряженных двойных связей, можно провести только в том случае, когда у этих кислот одинаковое число атомов углерода от центра двойной связи, наиболее удаленной от карбоксильной группы, до конечной метильной группы включительно, т. е. когда наращивание метиленовых групп в гомологическом ряду идет только с карбоксильного конца цепи⁹⁶. Аналогичные ряды параллельных прямых

получены группированием ненасыщенных жирных кислот с одинаковым числом атомов углерода между центром ближайшей к карбоксилу двойной связи и COOH-группой, а также кислот одинаковой ненасыщенности с равным числом атомов углерода, у которых двойные связи регулярно смещаются от карбоксильного конца алифатической цепи к метильному⁹⁷. Сравнивая при помощи таких графиков найденные величины $\log_{10} V_R^{\text{отн}}$ со значениями $\log_{10} V_R^{\text{отн}}$ эфиров с известным расположением двойных связей, определили строение полиненасыщенных кислот китового жира⁹⁸.

б. *Сочетание хроматографии с нехроматографическими методами.* При газо-жидкостной хроматографии на неполярных жидкых фазах не происходит разделения эфиров жирных кислот с одинаковым числом атомов углерода и двойных связей, но с различным расположением связей в цепи; на полиэфирных фазах разделение таких эфиров также подчас невозможно (метилолеат — метилпетрозелинат). Для идентификации ненасыщенных кислот в подобных случаях служит окисление по двойным связям с последующим газо-хроматографическим определением полученных продуктов.

Олеиновую, линоловую и другие жирные кислоты окисляли KMnO₄ в уксусной кислоте при — 70°, избыток перманганата разрушали метабисульфитом, а полученные дву- иmonoосновные кислоты в виде их метиловых эфиров разделяли на колонке с Альзоном М. В продуктах окисления олеиновой кислоты обнаружили азелайнную и пеларгоновую кислоты. Наличие многочисленных побочных продуктов окисления показывает, что в данном случае разрыв цепи ненасыщенных кислот происходил не только по двойным связям⁷⁷. Этот же метод использовали для идентификации ненасыщенных кислот из рыбьих жиров⁶⁹. Окисление смесью KMnO₄—KIO₄ также давало много вторичных продуктов разрушения⁹⁹. При окислении ненасыщенных кислот надмуравиной кислотой, гидрировании полученных ненасыщенных диокси-кислот с Pd-катализатором и разрыве диокси-групп смесью KMn₄—KIO₄ с образованием всех возможных одно- и двуосновных кислот побочные продукты окисления не возникали. Жирные кислоты с тройными связями в этой системе реакций почти не подвергались разрушению¹⁰⁰.

Разрыв цепи ненасыщенных кислот можно осуществить при помощи окислительного или восстановительного озонолиза. В первом случае жирные кислоты озонируют в растворе хлороформа при — 60° и озонид разлагают водой с одновременным окислением конечных атомов углерода до карбоксила под действием Ag₂O. Полученные кислоты превращают в метиловые эфиры и разделяют при помощи газо-жидкостной хроматографии с программированным температурным режимом^{101, 102}. Окислительным озонолизом продуктов распада полиненасыщенных жирных кислот с несопряженными двойными связями можно выделить малоновую кислоту, которая образуется при отщеплении группы —CH₂CH₂CO— периодатное окисление разрушает малоновую кислоту¹⁰³.

Наиболее достоверные данные для установления структуры ненасыщенных кислот получены методом восстановительного озонолиза. Образовавшиеся при низкой температуре озониды разлагают H₂ в присутствии Pd-катализатора или путем восстановления трифенилfosфином; при этом в местах разрыва двойных связей возникают альдегидные группы. Газо-жидкостную хроматографию альдегидов и диальдегидов проводят на приборе с пламенно-ионизационным детектором, так как малоновый диальдегид плохо обнаруживается ионизационным детектором^{61, 68, 104}.

В нескольких работах для идентификации кислот после разделения использована спектроскопия в ИК свете (обнаружение транс-изомеров)³³ и масс-спектрометрия¹⁰⁵, а также сочетание газо-жидкостной хроматографии с другими видами хроматографии^{33, 76}.

8. Количественное определение жирных кислот

Газо-жидкостная хроматография позволяет проводить количественное определение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот с гораздо большей быстротой и точностью, чем любой другой метод химии липидов. Для осуществления количественного анализа смеси жирных кислот требуется соблюдение прямой пропорциональности между величиной сигнала хроматографического детектора, с одной стороны, и весовой концентрацией данного метилового эфира, а также метиловых эфиров жирных кислот различного строения, с другой¹⁰. Мерой количества компонента в газовой хроматографии обычно служит относительная площадь соответствующего пика дифференциальной хроматограммы. Существует ряд методов измерения площадей пиков: 1) определение веса бумаги; 2) планиметрия; 3) вычисление произведения высоты пика на ширину пика на половине высоты; 4) вычисление произведения высоты пика на его удерживаемый объем; 5) непрерывное определение при помощи интегратора во время хроматографического разделения. Если наиболее широким распространением вследствие простоты и достаточной надежности пользуется метод 3⁵⁹, то интегрирование превосходит все другие методы по быстроте и высокой точности достигаемых результатов¹⁰⁶.

В своей первой работе по газо-жидкостной хроматографии Джеймс и Мартин определяли свободные жирные кислоты, используя титрационную ячейку с раствором щелочи, содержащим кислотноосновной индикатор; изменение окраски последнего при поглощении летучих кислот из хроматографической колонки регистрировали колориметром, соединенным с самопищущим потенциометром, в виде интегральной кривой. Высота каждой ступени соответствовала молярному содержанию данной жирной кислоты¹.

Позднее те же авторы применили в качестве детектора весы Мартина для измерения плотности газа, что позволило уменьшить размер проб⁵⁸. Весы дают показания, прямо пропорциональные массе разделяемых органических веществ, и, следовательно, не требуют калибровки для различных метиловых эфиров; однако до последнего времени весы Мартина применялись сравнительно редко вследствие сложности конструкции^{22, 28, 54}.

Удовлетворительные результаты получены при использовании пламенно-ионизационного детектора, где величина сигнала линейно зависит от концентрации жирных кислот в смеси¹⁰⁷. Тем не менее, на практике наиболее часто применяется катарометр и ионизационный детектор Лавлока; на их работе мы остановимся подробнее.

а. *Катарометр*. Катарометр, измеряющий разность между теплопроводностями неорганического газа-носителя и органического вещества, был впервые использован для газо-хроматографического анализа метиловых эфиров высших жирных кислот в 1953 г.¹⁸. Чувствительность катарометра $\sim 10^{-6}$ г. С повышением температуры разделения детектор теряет чувствительность, что вынуждает увеличивать объем пробы¹⁵. Для определения абсолютного количества жирных кислот в пробе применяют метод внутреннего стандарта. К определенному объему образца перед анализом прибавляют аликовое количество метилгептадеканоата, который обычно не содержится в биологических материалах, и вычисляют соотношение площадей пиков метиловых эфиров пробы и стандарта^{35, 36, 51}.

В ряду жирных кислот между логарифмом площади пика и логарифмом соответствующего весового количества наблюдалась линейная зависимость³⁷. Было проведено сравнительное количественное определение состава жирных кислот хроматографией с катарометром, а также стандартными нехроматографическими методами^{108, 109}. Оказалось,

что на полиэфирных жидкых фазах при измерении более летучих насыщенных компонентов катарометр давал завышенные результаты, а для эфиров с высоким значением удерживаемого объема — заниженные^{30, 110, 111}. Это явление пытались объяснить более интенсивной переэтерификацией высококипящих компонентов с полиэфирами колонки при высокой температуре разделения; действительно, при снижении нагрева колонки до 200°, различие в результатах, полученных различными методами, значительно уменьшалось⁵¹. Однако позднее тот же эффект наблюдался при хроматографии на неполярной жидкой фазе (Альезоне), где возможность переэтерификации была исключена^{112, 113}. Другие авторы объясняли наблюдаемые различия неточным измерением площадей пиков при большой величине удерживаемого объема²⁴.

В результате подробного исследования стандартных смесей метиловых эфиров известного состава было показано, что в гомологическом ряду жирных кислот отсутствует пропорциональность между молекулярным весом и удельной теплопроводностью. Так, если площадь пика, приходящаяся на 1 мг вещества, для метилкаприната принять за 1,00, то для метилстеарата эта величина составит только 0,84¹¹². Были предложены следующие эмпирические уравнения для внесения поправки на теплопроводность: $\log A = m \log M + \log K$, где A — площадь пика, M — вес вещества, m — число атомов углерода и K — константа¹¹⁴; $R = 24,68 + 5,79m + 0,075m^2$, где R — относительный молярный сигнал детектора по отношению к сигналу для метилпальмитата¹¹⁵; $\log y = -0,001007 \cdot x - 0,161$, где y — поправочный фактор, x — относительный удерживаемый объем¹¹⁶. В работе Кауфмана обнаружена линейная зависимость между величиной калибровочного фактора (отношения весового содержания метилового эфира к площади пика) и числом атомов углерода в данном гомологическом ряду жирных кислот¹⁰⁶.

Все эти исследования показали, что при работе с катарометром точные количественные результаты можно получить только после тщательной калибровки детектора при помощи стандартной смеси метиловых эфиров для данных условий величины пробы, силы тока в чувствительном элементе, скорости тока газа-носителя, температуры и природы колонки^{35, 48}; после длительной работы на одной и той же колонке калибровку повторяют или же определяют по графику поправки, соответствующие новым значениям V_R ¹¹⁶. В качестве эталона при калибровке детектора можно использовать весы Мартина¹¹.

б). Ионизационный детектор. В 1958 г. Лавлок¹¹⁷ предложил новый тип детектора, где органические вещества обнаруживаются и количественно определяются за счет их ионизации метастабильными атомами аргона, возникшими под действием ионизирующего излучения. В детекторе происходят следующие реакции:

- 1) $\text{Ar} + \beta\text{-частицы} \rightarrow \text{Ar}^+ + e^-$
- 2) $\text{Ar} + e^- \xrightarrow{\text{высокое напряжение}} \text{Ar}^* (11,6 \text{ eV})$
- 3) органическое вещество + Ar^* \rightarrow органическое вещество⁺ + $e^- + \text{Ar}$
- 4) e^- $\xrightarrow{\text{к аноду}}$ ток ионизации

При облучении проходящего через детектор аргона β -частицами Sr^{90} наряду с образованием ионов аргона возникают метастабильные атомы аргона с потенциалом возбуждения (11,6 eV) выше потенциала ионизации большинства органических соединений. Ионизация органических веществ приводит к усилению тока ионизации, которое регистрируется самопишущим потенциометром. Высокая чувствительность ионизационного детектора (10^{-9} g) позволяет применять для разделения малые количества веществ, что значительно увеличивает эффективность колонки. Для эфиров с молекулярным весом 150 и выше площадь пика соответствует весовому содержанию данного метилового эфира в смеси, поэтому детектор не требует калибровки^{12, 35, 118}.

Линейная зависимость сигнала детектора от концентрации вещества в потоке в определенных пределах была подтверждена при анализе стандартных смесей метиловых эфиров высших жирных кислот^{63, 119, 120}. Относительная ошибка измерения концентрации для максимального пика не превышала 1%³⁵. Для проверки линейности сигнала C₄—C₁₀-свободные жирные кислоты разделяли на неполярной колонке с Аль-езоном L; если карбоксильная группа занимала большой объем в молекуле кислоты, то сигнал ионизационного детектора был несколько меньше того сигнала, который соответствовал бы весовому содержанию компонента¹¹³. Площади пиков низших жирных кислот пропорциональны их молярному проценту¹¹⁸. Заметное отклонение от нормы неоднократно наблюдалось при анализе образцов, содержащих метиллиновенат⁶⁰. Так, содержание линоленовой кислоты в масле льна по данным спектрофотометрии в УФ свете составляло 46,4%, а по данным газовой хроматографии с ионизационным детектором 54,2%⁵⁰. Причина такого поведения линоленовой кислоты пока остается нераскрытым.

Несмотря на перечисленные осложняющие обстоятельства, ионизационный детектор, благодаря высокой чувствительности, простоте и надежности в работе, превосходит детекторы других типов. В настоящее время этот детектор чаще других используется при количественном определении метиловых эфиров высших жирных кислот.

9. Определение радиоактивности жирных кислот при газо-хроматографическом разделении

Для биологических исследований с использованием меченых атомов необходимо не только качественное и количественное определение отдельных соединений, но и измерение их радиоактивности. К настоящему времени предложен ряд методов для разрешения этой задачи в применении к газо-жидкостной хроматографии. Все эти методы можно разбить на две группы: во-первых, препаративное улавливание выходящих из колонки отдельных фракций и определение их радиоактивности после окончания хроматографического разделения и, во-вторых, одновременное измерение и регистрация массы и радиоактивности фракций на выходе колонки в течение самого разделения.

Ловушками для препаративного сбора фракций служат обычно короткие стеклянные трубки, наполненные покрытыми силиконовым маслом кристаллами антрацена^{70, 121}, трубки, содержащие смоченную толуолом вату и выдерживаемые при комнатной температуре¹³², коллекторы с градиентом охлаждения¹²³, змеевиковые холодильники с нанесенным на внутренние стенки стеклянным порошком⁶⁹ или специальные микропористые фильтры¹²⁴. При использовании ионизационного детектора разрушения пробы в детекторе практически не происходит; это дает возможность полностью собирать метиловые эфиры, вышедшие из колонки¹¹⁷. По мере улавливания фракций ловушки меняют от руки^{121, 122} или при помощи автоматического коллектора фракций⁷⁰. Собранные метиловые эфиры элюируют раствором сцинтиляторов [2,5-дифенилоксазола и *p*-втор-2(5-фенилоксазолил)-бензола] в толуоле и просчитывают на сцинтиляционном спектрометре до достижения заданной точности. Обычно улавливается ~90% радиоактивности, введенной в колонку¹²²; остальная часть активности выходит из колонки позже вследствие задержки, вызываемой переэтерификацией метиловых эфиров с полиэфирной жидкостью колонки и их адсорбцией на твердом носителе^{65, 72}. Эту задержку можно понизить, если перед нанесением жидкости обработать носитель соляной кислотой и раствором щелочи, удалить из жидкости катализатор переэтерификации (*p*-толуолсульфокислоту) и проводить разделение при минимально-возможной температуре^{65, 70, 72}. Метод сбора фракций приме-

няется для работы с образцами, обладающими низкой радиоактивностью.

Если активность отдельных метиловых эфиров превышает 1000 имп/мин., следует использовать более быстрые методы непрерывной регистрации радиоактивности¹²⁵. Выходящие из колонки пары сгущаются в охлажденном растворе сцинтиллятора, циркулирующем с большой быстротой под действием тока газа в замкнутой системе трубок между окошками одного или двух фотоумножителей спектрометра. Радиоактивность раствора регистрируется в виде интегральной кривой, где высота отдельной ступени пропорциональна активности данного метилового эфира; эту кривую совмещают во времени с дифференциальной кривой регистрации массы, идентифицируют пики и определяют удельную радиоактивность каждого эфира. Эффективность счета на такой установке достигает 80% для C¹⁴ и 28% для H³^{126, 127}. Если удерживаемые объемы соседних компонентов на дифференциальной хроматограмме близки по величине (метилстеарат — метилолеат), то такие эфиры не могут быть раздельно определены на интегральной кривой радиоактивности⁷⁰.

По другому методу липиды на выходе колонки сжигают над CuO до CO₂ и воды, воду поглощают активированным MgClO₄ или восстанавливают до водорода, а активность C¹⁴O₂ определяют на пропорциональном или сцинтилляционном счетчике, получая дифференциальную кривую записи радиоактивности^{128, 129}.

III. ГАЗО-ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ (КРОМЕ МЕТИЛОВЫХ ЭФИРОВ)

1. Разделение свободных жирных кислот

Газо-жидкостная распределительная хроматография была предложена в 1952 г. Джеймсом и Мартином как метод разделения летучих C₁—C₁₂ свободных *n*-жирных кислот¹. Для работы служила колонка с кизельгуром, пропитанным смесью силиконового масла и стеариновой кислоты 9:1; эту кислоту включали в состав жидкой фазы для подавления димеризации жирных кислот, молекулы которых обладают высокой полярностью. Ассоциацию карбоксильных групп и образование димеров, которое снижает летучесть кислот и приводит к появлению несимметричных размытых зон на хроматограмме, можно также несколько уменьшить, изменяя величину исследуемой пробы и концентрацию жидкой фазы в колонке, а также рабочую температуру⁶. В настоящее время в свободном виде разделяют почти исключительно низшие жирные кислоты^{14, 130}. Имеется лишь несколько работ, посвященных газовой хроматографии свободных высших жирных кислот. Условия разделения этих кислот приведены в табл. 4.

ТАБЛИЦА 4
Газо-жидкостная хроматография свободных высших жирных кислот

Твердый носитель	Жидкая фаза и ее содержание	Температура, °C	Газ-носитель	Скорость газа, мл/мин	Детектор	Состав пробы и время анализа, мин.	Ссылки на литературу
Целит-545, 50—100 меш	Альезон L, 20%	300	N ₂	12	Катарометр	C ₁₄ —C ₂₂ , 90	22
Целит-545, 60—80 меш	Полиэтиленгликольадипат, 25% + H ₃ PO ₄ , 2%	220—235	He	30—40	Катарометр	C ₈ —C ₂₀ , 60—80	131
Кизельгур	Реоплекс-400, 5—20%	165	Ar	35—50	Ионизационный	C ₄ —C ₁₈ , 90	132
Стеклянные шарики: 0,75—1,00 мм	Полиэтиленгликоль-суксинат, 1% + H ₃ PO ₄ , 0,4%	140—200	Ar	60	Ионизационный	C ₆ —C ₁₈ , 40	82

Как показывает табл. 4, димеризацию свободных кислот подавляли путем использования полярных жидкых фаз, содержащих нелетучую минеральную кислоту^{82, 131}. Свободные жирные кислоты в малых концентрациях могли разделяться на колонке с неполярной фазой; при этом повышение рабочей температуры снижало асимметрию пиков²². На полиэфирной колонке асимметрия пиков возрастала при увеличении температуры и снижении концентрации жидкой фазы¹³². При всех условиях разделения наблюдалось значительное растягивание тыловой части пика (образование «хвостов»).

По сравнению с соответствующими метиловыми эфирами свободные кислоты обнаруживали более высокие значения удерживаемых объемов V_R^{20} ; разделение насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот было менее четким, а количественное определение с катарометром было затруднено вследствие различий в удельной теплопроводности между кислотами и метиловыми эфирами^{82, 132}.

2. Разделение углеводородов, спиртов, альдегидов и аминов

Высшие углеводороды, содержащиеся во многих растительных и животных продуктах, обычно отделяют путем адсорбции от остальных липидов как наименее полярную фракцию и без дальнейшей обработки разделяют на колонке с неполярной жидкой фазой при 270—300°^{133, 134}. При этом не наблюдается различий в величине V_R между насыщенными и ненасыщенными углеводородами с одинаковой длиной цепи¹³⁵. Углеводороды обладают значительно большей летучестью, чем спирты: величины V_R углеводородов с четным числом атомов углерода C_{2m} совпадают с V_R первичных алифатических спиртов, имеющих на 4 атома углерода меньше: C_{2m-4}^{90} . Обычно в организмах содержатся нормальные углеводороды C_{16} — C_{34} с преобладанием или четных, или нечетных компонентов^{133, 136}. Иногда спирты или метиловые эфиры кислот восстанавливают до углеводородов, а последние определяют методом газо-жидкостной хроматографии^{134, 135}.

Свободные жирные спирты можно разделить на колонке с неполярной жидкой фазой^{136, 137}, причем спирты с различной степенью ненасыщенности не отделяются друг от друга¹³⁵. На колонках с полярными полиэфирами свободные спирты разделяются плохо вследствие переэтерификации с веществом жидкой фазы¹³⁸; ацетаты насыщенных и ненасыщенных C_5 — C_{18} жирных спиртов хорошо делились на полиэфирных фазах¹³⁹. При повышенной температуре колонки (180°) достигалось отделение друг от друга соединений с одинаковым числом атомов углерода, содержащих одну сложно-эфирную связь: метилового эфира одноосновной кислоты и ацетата первичного спирта, например, метиллаурата и ундекилатетата; при 130° такое разделение было невозможно¹⁴⁰.

Алифатические альдегиды из плазмалогенов мозга при метанолизе в присутствии HCl образуют диметилацетали, которые можно разделить на колонках с полярной и неполярной жидкой фазой^{91, 138}.

Жирные амины при хроматографии с применением неполярной фазы реагировали с материалом колонки; взаимодействие прекращалось после обработки твердого носителя раствором KOH в метаноле¹⁴¹.

3. Разделение глицеридов

Моно-, ди- и особенно триглицериды вследствие высокого молекулярного веса мало летучи, поэтому газо-жидкостная хроматография этих соединений пока остается на стадии предварительных опытов. Условия разделения триглицеридов содержатся в табл. 5.

Данные табл. 5 показывают, что при высокой температуре, которая требуется для анализа триглицеридов, можно использовать лишь не-

ТАБЛИЦА 5

Газо-жидкостная хроматография триглицеридов

Твердый носитель	Жидкая фаза и ее содержание	Температура, °С	Газ-носитель	Скорость газа, мл/мин	Детектор	Состав пробы и время анализа, мин.	Ссылки на литературу
Хромосорб W	Силикон, 30%	347	He	200	Катарометр	C ₂₀ —C ₄₂ , 90	142
То же	Силиконовый каучук, 2%	Программированный режим, 100—360	He	145	То же	C ₁₈ —C ₅₂ , 25	143
То же	Метилсиликоновый каучук, 2,25%	То же, 220—325	N ₂	150	Пламенно-ионизационный	C ₂₈ —C ₆₀ , 30—50	92

полярные силиконовые жидкие фазы. Эти фазы делят триглицериды только по числу атомов углерода в молекуле без разделения компонентов с различной ненасыщенностью; полиэфирные фазы в данном случае неприменимы вследствие недостаточной термостойкости.

Удовлетворительное газо-хроматографическое разделение триглицеридов открыло бы наиболее прямой и короткий путь к изучению состава и строения этих липидов, поэтому попытки такого рода исследований предпринимались неоднократно. Сначала разделение триглицеридов сливочного и кокосового масел было достигнуто только до тримиристина C₄₂, причем наблюдалось образование многочисленных продуктов разложения¹⁴², а затем глицериды пальмоядерового масла и лярда разделили до C₅₂¹⁴³. В последнее время из масел семян различных растений и сливочного масла выделили фракции триглицеридов C₂₆—C₆₀, различающиеся на 2 атома углерода, а также триглицериды нечетных и разветвленных жирных кислот. Примеси продуктов термического разложения в начале хроматограммы не наблюдалось⁹². Этот метод использован для исследования фракций триглицеридов, полученных молекулярной дистилляцией¹⁴⁴.

Газо-жидкостная хроматографияmono- и диглицеридов осуществляется только после перевода их в летучие производные, например ацетаты. В виде ацетатов удалось разделить моноглицериды до моноарахина и диглицериды до пальмитомиристина. При этом ацетаты 1-моно- и 1,3-диглицеридов элюировались быстрее, чем производные 2-моно- и 1,2-диглицеридов, соответственно¹⁴⁵. Для определения 1- и 2-моно-глицеридов их смесь обрабатывают метансульфонилхлоридом, а затем раствором иодистого натрия в ацетоне; полученные аллиловые эфиры жирных кислот разделяют на колонке с неполярной жидкой фазой при 240° за 60 мин. В растворе NaI происходит миграция кислотного остатка 2-моноглицерида в крайнее положение, поэтому 1- и 2-моноглицериды дают продукты одинакового состава. Жирные кислоты 2-моно-глицеридов определяют после отделения 1-моноглицеридов периодатным окислением¹⁴⁶. Этот метод может найти применение при изучении хода специфического гидролиза триглицеридов липазой поджелудочной железы⁶.

* * *

Последние годы ознаменовались непрерывным и все более быстрым ростом газо-хроматографического метода в теоретическом и экспериментальном направлении, а также все более широким применением этого вида хроматографии к изучению самых разнообразных проблем химии и биохимии жирных кислот и липидов.

Тем не менее, газо-хроматографическое разделение еще не является универсальным средством, которое позволяло бы решить любые

вопросы, поставленные развитием науки перед исследователем. Этот метод, как и любой другой, имеет определенные ограничения, и только при умелом сочетании газо-жидкостной хроматографии с тонкослойной, распределительной и другими разновидностями хроматографии, а также с нехроматографическими методами анализа — молекулярной и ядерной спектроскопией, масс-спектрометрией, рентгеноструктурным анализом, специфическим ферментативным гидролизом, радиоизотопным методом и т. п.— можно надеяться на успешное преодоление всех трудностей, связанных с изучением химического строения липидов растений, животных и микроорганизмов и с исследованием роли липидов в процессах обмена веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. T. James, A. J. P. Martin, Biochem. J., **50**, 679 (1952).
2. К. Филлипс, Хроматография газов, М., ИЛ, 1958.
3. А. Кейлеманс, Хроматография газов, М., ИЛ, 1959.
4. Э. Байер, Хроматография газов, М., ИЛ, 1961.
5. Газовая хроматография, сб. докладов на II Международном симпозиуме в Амстердаме, под ред. Д. Дести, М., ИЛ, 1961.
6. H. R. Burghfield, E. E. Stoggs, Biochemical applications of gas chromatography, Academic Press, N. Y., 1962, стр. 488.
7. Г. Шай, Теоретические основы хроматографии газов, М., ИЛ, 1963.
8. И. М. Богдановский, Лабораторные хроматографы, ЦИНТИЭлектропром, М., 1963.
9. А. А. Жуховицкий, Н. М. Туркельтуб, Газовая хроматография, М., Гостоптехиздат, 1962.
10. A. T. James, in D. Glick (ed.), Methods of biochemical analysis, **8**, 1 (1959).
11. J. W. Farquhar, W. Insull, P. Rosen, W. Stoffel, E. H. Ahrens, Nutrition Revs., **17**, № 8, part II (1959) Supplement.
12. S. R. Lipsky, R. A. Landowne, J. E. Lovelock, Anal. Chem., **31**, 852 (1959).
13. S. R. Lipsky, R. A. Landowne, Ann. Rev. Biochem., **29**, 649 (1960).
14. H. P. Kauffmann, G. Mankel, K. Lehmann, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **63**, 1109 (1961).
15. A. Prévot, Bull. Soc. Chim. France, **1962**, 667.
16. A. Prévot, Там же, **1963**, 314.
17. Н. А. Малафеев, И. П. Юдина, Н. М. Жаворонков, Усп. химии, **31**, 710 (1962).
18. F. Cropper, A. Heywood, Nature, **132**, 1101 (1953).
19. F. Cropper, A. Heywood, in D. H. Desty (ed.), Vapour phase chromatography, Butterworths, London, 1957, стр. 316.
20. T. D. Heyer, Chem. & Ind., **1963**, 660.
21. M. A. Khan, B. T. Whitham, J. Appl. Chem., **8**, 549 (1958).
22. R. Beertius, D. Dijkstra, J. Keppeler, J. Recourt, Ann. N. Y. Acad. Sci., **72**, 616 (1959); см.⁵, стр. 347.
23. A. T. James, J. Chromatog., **2**, 552 (1959).
24. S. R. Lipsky, R. A. Landowne, M. Godet, Biochim. biophys. acta, **31**, 336 (1959).
25. C. Litchfield, R. Reiser, A. F. Isbell, J. Am. Oil Chem. Soc., **40**, 302 (1963).
26. W. Stoffel, F. Chu, E. H. Ahrens, Anal. Chem., **31**, 307 (1959).
27. F. T. Lindgren, A. V. Nichols, N. Freeman, R. Wills, J. Lipid Res., **3**, 390 (1962).
28. W. Insull, E. H. Ahrens, Biochem. J., **72**, 27 (1959).
29. E. G. Trams, L. Guifrida, A. Karmen, Nature, **193**, 680 (1962).
30. B. M. Craig, N. L. Murty, J. Am. Oil Chem. Soc., **36**, 549 (1959).
31. F. Luddy, R. Barford, R. W. Riemenschneider, Там же, **37**, 447 (1960).
32. E. J. Gauglitz, L. W. Lehman, Там же, **40**, 197 (1963).
33. P. Magidman, S. F. Herb, R. A. Barford, R. W. Riemenschneider, Там же, **39**, 137 (1962).
34. N. W. R. Daniels, J. W. Richmond, Nature, **187**, 55 (1960).
35. R. B. Iden, E. J. Kahler, J. Am. Oil Chem. Soc., **39**, 171 (1962).
36. J. Tinoco, A. Shannon, P. Miljanich, R. L. Lyman, R. Okey, Anal. Biochem., **3**, 514 (1962).
37. A. Jart, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **61**, 541 (1959).
38. H. Schlenk, J. Gellerman, Anal. Chem., **32**, 1412 (1960).

39. R. G. Binder, T. H. Applewhite, G. O. Kohler, L. A. Goldblatt, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **39**, 513 (1962).
 40. L. Metcalfe, A. A. Schmitz, *Anal. Chem.*, **33**, 363 (1961).
 41. L. R. Mattick, M. L. Vorbeck, *Tam же*, **33**, 1514 (1961).
 42. H. P. Kaufmann, G. Mankel, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **65**, 179 (1963).
 43. S. Anselmi, L. Boniforti, R. Monacelli, *Olearia*, **14**, 47 (1960).
 44. N. S. Radin, A. K. Hajra, J. Akahori, *J. Lipid Res.*, **1**, 250 (1960).
 45. J. Kishimoto, N. S. Radin, *Tam же*, **4**, 130 (1963).
 46. A. P. Tulloch, B. M. Craig, G. A. Ledingham, *Canad. J. Microbiol.*, **5**, 485 (1959).
 47. L. A. Horrocks, D. G. Cornwell, *J. Lipid Res.*, **3**, 165 (1962).
 48. C. Gehrke, D. Goerlitz, *Anal. Chem.*, **35**, 76 (1963).
 49. A. Renshaw, L. A. Biran, *J. Chromatog.*, **8**, 343 (1962).
 50. F. L. Kauffman, T. J. Weiss, G. D. Lee, B. N. Rockwood, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **38**, 495 (1961).
 51. C. H. Orr, J. Callen, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **72**, 649 (1959).
 52. W. Stoffel, W. Insull, E. H. Ahrens, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **99**, 238 (1958).
 53. L. J. Morris, R. T. Holman, K. Fontell, *J. Lipid Res.*, **1**, 412 (1960).
 54. R. Beerthius, J. Keppler, *Nature*, **179**, 731 (1957).
 55. I. Hornstein, L. Elliott, P. Crowe, *Nature*, **184**, 1710 (1959).
 56. S. R. Lipsky, J. E. Lovelock, R. A. Landowne, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 1010 (1959).
 57. R. A. Landowne, S. R. Lipsky, *Biochim. biophys. acta*, **47**, 589 (1961).
 58. A. T. James, A. J. P. Martin, *Biochem. J.*, **63**, 144 (1956).
 59. F. Francesco, *Riv. ital. sostanze grasse*, **38**, 128 (1961).
 60. M. L. Vorbeck, L. R. Mattick, F. A. Lee, C. S. Pederson, *Anal. Chem.*, **33**, 1512 (1961).
 61. O. S. Privett, C. Nickell, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **39**, 414 (1962).
 62. R. A. Landowne, S. R. Lipsky, *Biochim. biophys. acta*, **27**, 667 (1958).
 63. F. L. Kauffman, G. D. Lee, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **37**, 385 (1960).
 64. R. A. Stein, *J. Chromatog.*, **6**, 118 (1961).
 65. M. Pascaud, *Tam же*, **10**, 125 (1963).
 66. I. Hornstein, P. F. Crowe, *Anal. Chem.*, **33**, 310 (1961).
 67. J. Corse, R. Teranishi, *J. Lipid Res.*, **1**, 191 (1960).
 68. R. A. Stein, N. Nicolaides, *Tam же*, **3**, 476 (1962).
 69. W. T. Roubal, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **40**, 213 (1963).
 70. A. Karmen, L. Giuffrida, R. L. Bowman, *J. Lipid Res.*, **3**, 44 (1962).
 71. F. Poy, *Riv. ital. sostanze grasse*, **39**, 137 (1962).
 72. H. Bühring, *J. Chromatog.*, **11**, 452 (1963).
 73. R. A. Landowne, S. R. Lipsky, *Biochim. biophys. acta*, **46**, 1 (1961).
 74. E. R. Adlard, B. T. Whitham, см.⁵ стр. 325.
 75. F. P. Woodford, C. M. van Gent, *J. Lipid Res.*, **1**, 188 (1960).
 76. R. Jensen, J. Sampugna, *J. Dairy Sci.*, **45**, 435 (1962).
 77. A. T. James, J. Webb, *Biochem. J.*, **66**, 515 (1957).
 78. R. Poukka, L. Vasenius, O. Furpeinen, *J. Lipid Res.*, **3**, 128 (1962).
 79. A. T. James, *Olii miner., grassi e saponi, colorie vernici*, **34**, 539 (1957).
 80. C. H. Orr, J. Callen, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 249 (1958).
 81. S. R. Lipsky, R. A. Landowne, *Biochim. biophys. acta*, **27**, 666 (1958).
 82. P. Jowett, B. J. Horrocks, *Nature*, **192**, 966 (1961).
 83. S. R. Lipsky, R. A. Landowne, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **72**, 666 (1959).
 84. R. G. Ackman, M. A. Bannerman, F. A. Vandenheuvel, *Anal. Chem.*, **32**, 1209 (1960).
 85. D. M. Sand, H. Schlenk, *Tam же*, **33**, 1624 (1961).
 86. H. Schlenk, J. Gellerman, D. Sand, *Tam же*, **34**, 1529 (1962).
 87. J. C. Hawke, R. Hansen, F. Shorland, *J. Chromatog.*, **2**, 547 (1959).
 88. D. Lefort, C. Paquot, A. Pourchez, *Oléagineux*, **18**, 557 (1963).
 89. A. J. P. Martin, *Biochem. Soc. Symp.*, **3**, 4 (1950).
 90. P. Maziak, *C. r.*, **252**, 1507 (1961).
 91. G. H. Gray, *J. Chromatog.*, **4**, 52 (1960).
 92. A. Kuskis, M. McCarthy, *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **40**, 679 (1962).
 93. T. K. Miwa, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **40**, 309 (1963).
 94. T. K. Miwa, K. L. Mikolajczak, F. R. Earle, I. A. Wolff, *Anal. Chem.*, **32**, 1739 (1960).
 95. J. Gellerman, H. Schlenk, *Tam же*, **34**, 1531 (1962).
 96. R. G. Ackman, *Nature*, **194**, 970 (1962).
 97. R. G. Ackman, R. D. Burgher, *J. Chromatog.*, **11**, 185 (1963).
 98. R. G. Ackman, R. D. Burgher, P. M. Janggaard, *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **41**, 1627 (1963).
 99. J. Nowakowska, E. Melvin, R. Wiebe, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **34**, 411 (1957).

100. F. D. Gunstone, P. Sykes, Chem. a. Ind., **1960**, 1130.
101. J. Cason, P. Tays, J. Biol. Chem., **234**, 1401 (1959).
102. W. Stoffel, E. H. Ahrens, J. Lipid Res., **1**, 139 (1960).
103. T. C. L. Chang, C. C. Sweely, Там же, **3**, 170 (1962).
104. O. S. Privett, M. L. Blank, O. Romanus, Там же, **4**, 260 (1963).
105. B. Hallgren, S. Stenhammar, R. Ryhage, Acta Chem. Scand., **12**, 1351 (1958).
106. H. P. Kaufmann, A. Seher, G. Mankel, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **64**, 501 (1962).
107. L. S. Ettre, F. J. Kabot, J. Chromatog., **11**, 115 (1963).
108. L. Malin, Lab. Pract., **8**, 226 (1959).
109. R. Guillaumin, N. Drouhin, Rev. fran^ç. corps gras, **9**, 415 (1962).
110. G. D. Michaelis, P. Wheeler, G. Fukayama, L. W. Kinsell, Ann. N. Y. Acad. Sci., **72**, 633 (1959).
111. S. F. Herb, P. Magidman, R. W. Riemenschneider, J. Am. Oil Chem. Soc., **37**, 127 (1960).
112. J. Killheffer, E. Jungermann, Там же, **37**, 456 (1961).
113. C. J. F. Böttcher, G. F. G. Clemens, C. M. van Gent, J. Chromatog., **3**, 582 (1960).
114. I. Sorenson, P. Soltoft, Acta chem. scand., **12**, 814 (1958).
115. L. A. Horrocks, D. G. Cogswell, J. B. Brown, J. Lipid Res., **2**, 92 (1961).
116. H. M. Edwards, J. E. Marion, J. Am. Oil Chem. Soc., **40**, 299 (1960).
117. J. E. Lovelock, J. Chromatog., **1**, 35 (1958).
118. J. E. Lovelock, A. T. James, E. A. Piper, Ann. N. Y. Acad. Sci., **72**, 720 (1959).
119. Ю. В. Ганин, Б. П. Котельников, Э. Н. Мартынова, Маслоб.-жир. пром., **1961**, № 3, 29.
120. П. М. Шербаков, Б. П. Котельников, Ю. В. Ганин, Там же, **1961**, № 12, 25.
121. A. Karmen, H. Tritch, Nature, **186**, 150 (1960).
122. H. Meinertz, V. P. Dole, J. Lipid Res., **3**, 140 (1962).
123. H. Schlenk, D. M. Sand, Anal. Chem., **34**, 1676 (1962).
124. A. K. Hajra, N. S. Radin, J. Lipid Res., **3**, 131 (1962).
125. H. J. Dutton, J. Am. Oil Chem. Soc., **38**, 631 (1961).
126. G. Popják, A. Lowe, D. Moore, L. Brown, F. Smith, J. Lipid Res., **1**, 29 (1959).
127. G. Popják, A. Lowe, D. Moore, Там же, **3**, 364 (1962).
128. A. T. James, E. A. Piper, J. Chromatog., **5**, 265 (1961).
129. A. Karmen, I. McCaffrey, R. L. Bowman, J. Lipid Res., **3**, 372 (1962).
130. А. Н. Король, Химия и техн. топлив и масел, **1963**, № 7, 62.
131. L. Metcalfe, Nature, **188**, 142 (1960).
132. W. Stuve, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **63**, 325 (1961).
133. Z. Krantz, J. Lamberton, K. Murgay, A. Redcliffe, Australian J. Chem., **13**, 498 (1960).
134. D. T. Downing, Z. H. Krantz, J. A. Lamberton, Там же, **14**, 253 (1961).
135. W. E. Link, H. M. Hickman, R. A. Morrisette, J. Am. Oil Chem. Soc., **36**, 20, 300 (1959).
136. P. Mazliak, С. г., **251**, 2393 (1960).
137. М. И. Дементьева, в кн. Методы исследования продуктов нефтепереработки и нефтехимического синтеза, под ред. А. Н. Александрова, Л., Гостоптехиздат, 1962, стр. 154—229.
138. J. W. Farquhar, J. Lipid Res., **3**, 21 (1962).
139. C. Paquot, D. Lefort, A. Pourchez, Rev. fran^ç. corps gras, **7**, 391 (1960).
140. D. Lefort, C. Paquot, A. Pourchez, Oleagineux, **16**, 253 (1961).
141. W. E. Link, R. A. Morrisette, A. D. Cooper, C. F. Smullin, J. Am. Oil Chem. Soc., **37**, 364 (1960).
142. F. H. Fryer, W. Ormand, G. Crump, Там же, **37**, 590 (1960).
143. V. R. Huebner, Там же, **38**, 628 (1961).
144. M. J. McCarthy, A. Kuskis, J. M. R. Beveridge, Canad. J. Biochem. Physiol., **40**, 1693 (1962).
145. V. R. Huebner, J. Am. Oil Chem. Soc., **36**, 262 (1959).
146. A. G. McInnes, N. H. Tattie, M. Kates, Там же, **37**, 7 (1960).

Институт физиологии растений
АН СССР
им. К. А. Тимирязева