

УДК 547.915

СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ПРИРОДНЫХ ТРИГЛИЦЕРИДОВ

А. Г. Вещагин

В обзоре изложены современные представления о структурном анализе триглицеридов природных жиров методами переэтерификации, липазного гидролиза, определения стереоизомерии и установления полиморфизма их кристаллов. Показаны возможности практического применения перечисленных методов в жировом анализе.

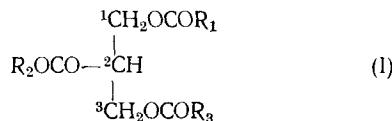
Библиография — 172 наименования.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1995
II. Установление нестатистического характера распределения ацильных остатков в природных триглицеридах методом переэтерификации	1996
III. Структурный анализ триглицеридов методом липазного гидролиза	2000
IV. Определение абсолютной конфигурации триглицеридов	2007
V. Полиморфизм триглицеридов	2016

I. ВВЕДЕНИЕ

В течение долгого времени полагали, что природные жиры — это смеси простых, однокислотных триглицеридов (I), в которых алкильные группы R одинаковы ($R_1=R_2=R_3$)



Однако в начале XX века из ряда жиров выделили кристаллизацией смешанно-кислотные триглицериды (I, $R_1 \neq R_2 \neq R_3$, $R_1 \neq R_3$). Возникла проблема строения триглицеридов. Гипотеза статистического распределения ацильных остатков RCO в триглицеридах, согласно которой вероятность образования того или иного индивидуального триглицерида определяется лишь молярной концентрацией составляющих его жирных кислот в данном жире и тем, сколько раз встречаются эти кислоты в данном триглицериде, была вскоре оставлена, и поиски закономерностей глицеридной структуры природных жиров продолжаются до сих пор.

В настоящем обзоре последовательно рассматривается развитие работ в области позиционного распределения ацильных остатков в триглицеридах: от первоначального обнаружения нестатистического характера строения природных жиров путем их переэтерификации, к установлению неэквивалентности 1,3- и 2-положений глицеридов методом липазного гидролиза и, наконец, к недавнему открытию стереоспецифиности строения триглицеридов животных и растений. Последний раздел обзора посвящен полиморфизму глицеридов, который, в сочетании с их химическим синтезом (см. II, 3), также применяется для установления структуры индивидуальных триглицеридов природных жиров.

II. УСТАНОВЛЕНИЕ НЕСТАТИСТИЧЕСКОГО ХАРАКТЕРА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АЦИЛЬНЫХ ОСТАТКОВ В ПРИРОДНЫХ ТРИГЛИЦИЕРИДАХ МЕТОДОМ ПЕРЕЭТЕРИФИКАЦИИ

1. *Переэтерификация триглицеридов* — это свободное перераспределение (рандомизация) ацильных остатков между глицеридами при определенных физических и химических воздействиях, в результате которого строение глицеридов вместо ориентированного становится статистическим. Переэтерификация — старейший метод структурной химии природных триглицеридов, поскольку прямой причиной самой постановки проблемы их строения было открытие сильных изменений точки плавления и иных свойств жиров после рандомизации. При собственно переэтерификации исходные и конечные продукты являются триглицеридами; в зависимости от того, мигрируют ли ацилы внутри одного глицерида или же между разными триглицеридами, различают соответственно интра- и интермолекулярную переэтерификацию. При глицеролизе — переэтерификации жира с избытком глицерина — возникает много моно- и диглицеридов. Помимо теоретического, переэтерификация имеет также большое практическое значение: изменение полиморфизма, точки плавления, текстуры, диапазона пластичности и других свойств жира при рандомизации и глицеролизе сильно влияет на его перевариваемость и пригодность для производства маргаринов, моноглицеридных эмульгаторов и других технических продуктов с заданными свойствами¹⁻⁶.

Для переэтерификации⁶⁻³¹ жир, не содержащий влаги, свободных кислот и перекисей, обрабатывают: 1) без катализатора при 300°; 2) со щелочными катализаторами при 100—140° с 0,03—0,3% метилата Na; при 30° с 0,6% CH₃ONa в течение часа (для смеси масла и гексана 3:2) или при 20° с 0,005% трет.-бутилата Li в течение 12—15 час. (для смеси жира и диметилфорамида 1:10); 3) с кислотным катализатором β-нафтилсульфокислотой и 4) с оловом и его солями Sn, SnCl₂ или Sn(OH)₂ при 225°^{2, 3, 6, 9, 10}. В конце реакции катализатор нейтрализуют, а глицериды очищают¹¹. Самый эффективный катализатор реакции — метилат Na, однако при высокой температуре полной рандомизации состава получить нельзя; в более мягких условиях возникает чисто статистическая смесь глицеридов¹³. Статистическую смесь триглицеридов можно также получить переэтерификацией метиловых эфиров жирных кислот с триацетином (Ac₃)⁸, а переэтерификация масла какао с тристеарином-¹⁴C и ³H-пальмитатом дает равномерно меченные ¹⁴C- и ³H-триглицериды¹². Из правила мультиплликаторов Лагранжа для системы из 2 каких-либо жирных кислот A и B максимум содержания глицерида A₂B [A₂B] достигается при [A]=2[B]: тогда [A₂B]=44,4%, [A₃]=29,7%, [AB₂]=22,2% и [B₃]=3,7%. Эти расчеты применяют в подборе концентраций кислот для синтеза смеси глицеридов нужного состава^{4, 7}.

Как уже упоминалось, переэтерификация сильно меняет свойства, состав и строение триглицеридов. Изменения числа Бемера и температуры плавления зависят от отклонения концентрации глицеридов, содержащих только насыщенные (S) ацилы ([S₃]), в данном жире от статистического уровня². Заметные изменения происходят и в фазовой структуре триглицеридов (см. V, 3). В быстро застывшем расплаве свиного жира, содержащего 25% 2-пальмитоолеостеарина (2-ПОС), образуются крупные грубые кристаллы β'-3-полиморфной формы этого глицерида, препятствующие применению жира в кондитерской промышленности; после переэтерификации содержание 2-ПОС снижается до статистического уровня (3,4%), возникают легкоплавкие S₂U*-глицериды растительного типа

* S₂U — динасыщенно-мононенасыщенные триглицериды.

(U — ненасыщенный ацил), кристаллизующиеся в β' -2-форме, зернистость продукта исчезает и его эмульгирующая способность улучшается^{4, 14}. Изменить свойства жира в нужную сторону можно также направленной переэтерификацией, при которой рандомизация жидких масел типа хлопкового сочетается с низкотемпературной кристаллизацией, удаляющей из смеси насыщенные кислоты в виде осадка S_3 ^{4, 7}.

Переэтерификация природных и искусственных жиров обычно увеличивает общее число индивидуальных триглицеридов различной полярно-

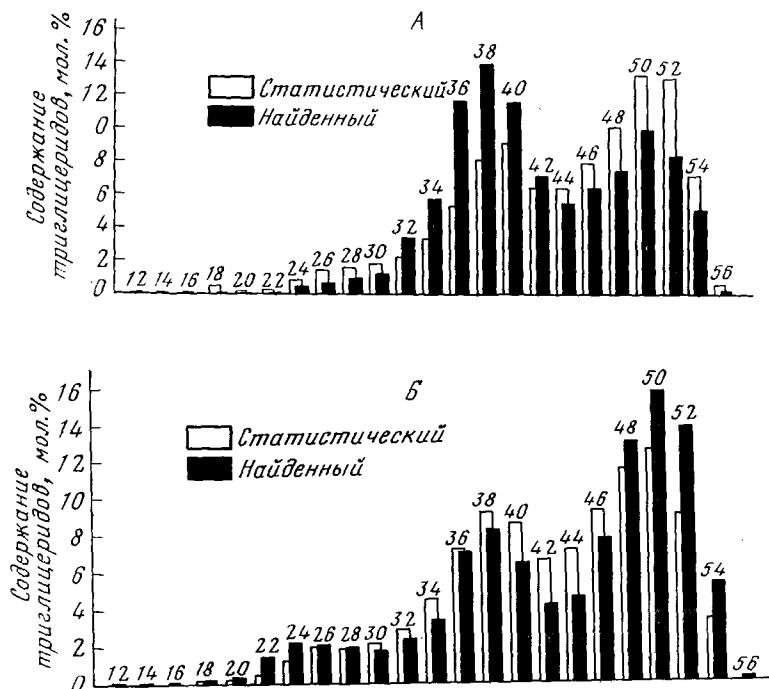


Рис. 1. Состав триглицеридов нативного (A) и переэтерифицированного (B) молочного жира¹³; 12—56 — число атомов углерода в отдельных фракциях

сти^{15—18}. В оливковом масле появляются новые глицериды ОПЛ и ОСЛ (Л — остаток линолевой кислоты), а из смеси C_3 и O_3 возникает более сложная статистическая смесь ССС, ОСС, СОС, СОО, ОСО и ООО^{11, 19}. Строение переэтерифицированных жиров обычно близко к статистическому независимо от наличия растворителя в реакционной смеси. Однако селективные физико-химические параметры реакции (преимущественная реэтерификация кислот с более длинной цепью, различия в реакционной способности 1- и 2-оксигрупп глицерина и др.) часто отклоняют распределение ациллов в рандомизированном масле от вычисленного теоретически^{2, 19, 21}. Такие отклонения найдены, в частности, в составе переэтерифицированных жиров, богатых летучими кислотами — кокосового масла и особенно рандомизированного молочного жира, который заметно отличается от исходного жира (рис. 1, A) по содержанию триглицеридов с общим числом атомов углерода в сумме ациллов $m=50—54$ (рис. 1, B)^{13, 19}. Состав равновесных смесей, полученных переэтерификацией C_3 , O_3 и $Э_3$ ($Э$ — элаидат) или смеси метиловых эфиров жирных кислот с Ac_3 , отвечает статистическому^{8, 17, 22}. Содержание фракций разной полярности при переэтерификации жидких масел (сафлорового и оливкового)

меняется не столь значительно, как при рандомизации твердого масла какао^{12, 18, 21}. Переэтерификация подсолнечного и хлопкового масла вызывала статистическое распределение ненасыщенных ацилов в отдельных группах триглицеридов²³. Состав молочного жира, свиного жира, соевого и оливкового масла после переэтерификации отвечал статистическому распределению^{10, 15}. Если содержание S в положении 2 глицеридов ($[S]_2$) после рандомизации какого-либо растительного масла снижается, то это указывает, что в данном масле присутствует примесь жиров, полученных этерификацией²⁰.

2. *Глицеролиз триглицеридов*. Для глицеролиза жир нагревают с избытком глицерина и 0,1%-ной NaOH в токе инертного газа. Окончание реакции и наступление динамического равновесия определяют по растворимости смеси в 2—5 частях метанола. Содержание в смеси глицерина, 1(3)- и 2-моноглицеридов [1(3)-МГ и 2-МГ], 1,3- и 1,2(2,3)-диглицеридов [1,3-ДГ и 1,2(2,3)-ДГ] и триглицеридов (ТГ) для расчета константы равновесия K_e реакции глицеролиза определяют адсорбционной хроматографией, измерением гидроксильного и кислотного числа и числа омыления, а также периодатным окислением^{16, 24}. Расчетом K_e был установлен один из кардинальных фактов химии триглицеридов — неравноценность их 1- и 2-положений в реакциях ацилирования^{25—29}. Если бы глицеролиз проходил строго количественно и вероятность этерификации производных глицерина, содержащих свободные первичные (R_pOH) и вторичные (R_sOH) гидроксильные группы, была одинаковой, то по молярному содержанию этерифицированных (*a*) и свободных OH-групп (*b*) в смеси можно было бы вычислить статистические концентрации ТГ, ДГ, МГ и свободного глицерина, равные $a^3 \cdot 10^{-4}$, $3a^2b \cdot 10^{-4}$, $3ab^2 \cdot 10^{-4}$ и $b^3 \cdot 10^{-4}$ соответственно^{4, 26}. В этом случае в положении равновесия $R_pOH + R_sOOCR \rightleftharpoons R_sOH + R_pOOCR$ соотношения молярных концентраций позиционных изомеров в МГ и ДГ составили бы $[1(3)-M\Gamma] = 2[2-M\Gamma]$; $[1,2(2,3)-D\Gamma] = 2[1,3-D\Gamma]$, а значение K_e , вычисленное по уравнениям $K_e = [1(3)-M\Gamma]/2[2-M\Gamma] = [1,2(2,3)-D\Gamma]/2[1,3-D\Gamma]$, было бы равно 1. Однако найденные при обычном глицеролизе (175—180°) равновесные концентрации составили $[1(3)-M\Gamma]/[2-M\Gamma] = 88:12$ и $[1,2(2,3)-D\Gamma]/[1,3-D\Gamma] = 40—60$, а найденная $K_e = 3,0 \pm 0,6$. Следовательно, свободная энергия первичной OH-группы глицерина при этерификации $\Delta F = -RT \ln K_e$ превышает свободную энергию вторичной группы на 1,2 ккал/моль, а вероятность этерификации первичной OH-группы втрое больше, чем вторичной OH-группы^{26, 27}. Состав равновесной смеси, вычисленный при $K_e =$

ТАБЛИЦА 1
Найденный и вычисленный состав равновесной смеси продуктов глицеролиза*, вес. %²⁴

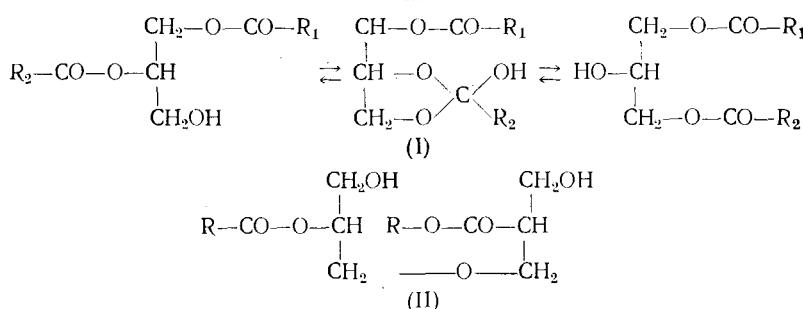
Компоненты	Найдено	Вычислено	
		$K_e = 3,4$	$K_e = 1$
Глицерин	6,5	6,5	6,5
1(3)-Моноглицериды	36,5	39,5	28,3
2-Моноглицериды	4,4	5,1	14,2
1,2 (2,3)-Диглицериды	15,6	14,1	27,0
1,3-Диглицериды	32,7	26,9	13,5
Триглицериды	4,8	7,9	10,5

* Масло льна (1 моль) и глицерин (1,85 моля) нагревали до 240° в течении 2 часов с 0,1% Na_3PO_4 .

$=3,4$, хорошо совпадает с найденным, а вычисленный при $K_e = 1$ — сильно от него отличается (табл. 1)²⁴. Увеличение количества атомов углерода m и снижение числа двойных связей e в ацильном остатке уменьшают скорость ацильной миграции, но не влияют на значение K_e ²⁵. Замещение одной из первичных OH-групп не меняет скорости этерификации другой первичной группы. При снижении температуры реакции K_e возрастает²⁶.

Механизм переэтерификации и глицеролиза изучен еще мало³⁰⁻³². Возможно, что собственно переэтерификация является частным случаем глицеролиза, где под влиянием катализатора и свободных OH-групп воды, служащими инциаторами реакции, в смеси непрерывно образуются и исчезают следы глицерина, МГ и ДГ, что приводит к динамическому равновесию (рандомизации) кислотных остатков⁴. Возможно, что промежуточным продуктом ацильной миграции служит циклический ортоэфир (I, схема 1)³¹.

Схема 1



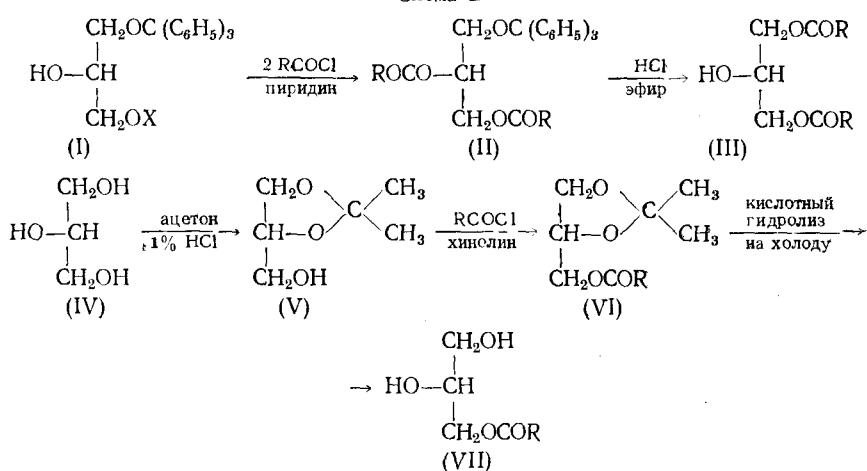
Изучение миграции ацилов МГ и ДГ в эфирном растворе HCl показало, что эта реакция требует следов воды. При переэтерификации 2-МГ в смеси содержится *бис*-(глицерил-2-ацил)-1(3)-эфир (II), а при переэтерификации 1(3)-МГ и 1,3-ДГ образуются их соответствующие производные. Согласно одной точке зрения, в растворе возникает равновесная смесь 2-МГ и II, после чего происходит разрыв простой эфирной связи с одновременной интрамолекулярной миграцией ацила и образованием 1(3)-МГ³⁰. По мнению другого автора, II является не промежуточным, а вторичным продуктом реакции, который синтезируется при соединении МГ или ДГ с соответствующими хлоргидринами этих глицеридов, образующимися из них под действием HCl³².

Химический синтез триглицеридов определенного строения (смеси стереоизомеров, см. IV, 8) для сравнения триглицеридов по точке плавления, полиморфизму и т. д. с природными триглицеридами с целью идентификации последних принадлежит, наряду с переэтерификацией, к наиболее ранним методам исследования жиров³³⁻³⁷. Для синтеза однокислотных триглицеридов (ААА) используют прямую одностадийную этерификацию избытка жирной кислоты глицерином в присутствии *p*-толуолсульфокислоты. Получение двух- и трехкислотных триглицеридов требует многоступенчатого синтеза с защитой тех или иных OH-групп на отдельных стадиях, а также препаративного выделения, очистки и идентификации промежуточных продуктов^{5, 34}.

Симметричные триглицериды АВА получают соединением 1,3-ДГ кислоты А, которые легко отделить кристаллизацией равновесной смеси диглицеридов от более легкоплавких 1,2(2,3)-ДГ, с избытком хлорангидрида кислоты В при нагревании в хлороформ-пиридиновом растворе³⁶. При этой реакции отсутствует миграция ацилов, которая весьма значи-

тельна, если катализатором служит *p*-толуолсульфокислота. Взаимодействием статистической смеси 1,3-диглицеридов пальмитиновой и стеариновой кислот с хлорангидридом олеиновой кислоты получили смесь триглицеридов, сходную с маслом какао¹². На схеме 2 приведены реакции синтеза 1,3-диглицеридов полиненасыщенных кислот (I—III) и 1(3)-моноглицеридов (IV—VII). Для синтеза трудно кристаллизующихся 1,3-диглицеридов полиненасыщенных кислот (III) применяют ацилирование 1(3)-монотритилового эфира глицерина (I, X=H) с последующим дегидрированием, сопровождающимся количественной миграцией 2-ацила в крайнее положение. Несимметричные двухкислотные триглицериды (AAB) получают ацилированием хлорангидридом кислоты А 1(3)-моноглицеридов кислоты В (VII, R=B), синтезированных по Фишеру с применением 1,2(2,3)-изопропилиденовой защиты и ее последующим снятием кислотным гидролизом^{29, 38}.

Схема 2



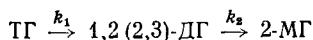
Наконец, для синтеза трехкислотного триглицерида (ABC) сначала получают 1(3)-моноглицерид кислоты А (VII, R=A) по механизму IV→VII, затем прекращают его в 3(1)-монотритиловый эфир (I, X=COA), который этерификацией хлорангидридом кислоты С в положении 2 и последующей ацильной миграцией по механизму I→III переводят в 1,3-диглицерид кислоты А и С (III, R=A или С); последний замещают в положении 2 хлорангидридом кислоты В. Если С — ненасыщенная кислота, то тритильную защиту в II снимают гидрогенолизом без миграции ацила, а возникший 1,2(2,3)-диглицерид на последнем этапе синтеза ацилируют хлорангидридом другой ненасыщенной кислоты с образованием трехкислотного триглицерида типа SU₂^{4, 35}.

III. СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ТРИГЛИЦЕРИДОВ МЕТОДОМ ЛИПАЗНОГО ГИДРОЛИЗА

1. *Реакция липазного гидролиза триглицеридов.* Еще в 1945 г. обнаружили, что липазный гидролиз жиров в кишечнике прекращается задолго до расщепления всех сложноэфирных связей^{1, 35, 39–45}. Последующие опыты с синтетическими триглицеридами известного строения показали, что в диглицеридах, содержащихся в продуктах неполного гидролиза, преобладают 1,2(2,3)-изомеры^{39, 44}. О преимущественном отщеплении липазой поджелудочной железы именно крайних ацилов в триглицеридах

S- и U-кислот с $m=12-18$ *in vivo* и *in vitro* свидетельствует также включение ^{14}C -свободных жирных кислот (СЖК) в присутствии липазы и жира только в 1,3-положения триглицеридов, а также образование при липазном гидролизе 2-изомеров МГ, доказанное их изомеризацией с HClO_4 и периодатным окислением^{40, 46-51}. На основе этих открытий в 1956 г. предложили метод определения состава ацилов в 1,3- и 2-положениях триглицеридов природного жира по составу СЖК и 2-моноглицеридов, возникших при его ферментативном расщеплении⁴⁸. Липазный гидролиз служит сейчас главным методом структурного анализа триглицеридов^{42, 47}.

В отличие от эстераз, гидролизующих водорастворимые субстраты, липаза (гидролиза эфиров глицерина, КФ 3.1.1.3) почти абсолютно специфична к ограниченно растворимым в воде сложным эфирам 1,3-ОН-групп глицерина^{52, 55}. Она не расщепляет, например, в масле спорыны эстолидные связи, содержащиеся в цепи рицинолеата⁵⁶. Кроме того, липаза не обладает стереоизбирательностью (см. IV, 1)³⁹. Упрощенно липазную реакцию можно разделить на 2 этапа:



Каждый из них имеет свою константу скорости: для масла *Madhuca longifolia* $k_1=0,35$, $k_2=0,36$, а для свиного жира $k_1=0,31$, $k_2=0,36$. Из уравнения реакции (e — основание натуральных логарифмов, t — время реакции):

$$[\text{ТГ}]_t = [\text{ТГ}]_0 \cdot e^{-k_1 t};$$

$$[\text{ДГ}]_t = [\text{ДГ}]_0 + [\text{ТГ}]_0 \cdot [k_1/(k_2 - k_1)] (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t});$$

$$[\text{МГ}]_t = [\text{МГ}]_0 + [\text{ТГ}]_0 \{1 - [1/(k_2 - k_1)]\} \cdot (k_2 e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t})^{52}$$

Перед гидролизом белок фермента адсорбируется на поверхности жировых мицелл, и потому скорость реакции зависит от степени эмульгирования субстрата в водном растворе, определяющей площадь этой поверхности, а также от соотношения количества фермента и жира⁵⁷. Возникшие при гидролизе СЖК и МГ десорбируются в водную фазу⁵⁵. Скорость реакции постепенно снижается, поскольку триглицериды на 1 моль глицерина отщепляют 2 моля кислот, 1,2(2,3)-ДГ — 1 моль, а 2-МГ — ни одного⁵⁸. Максимумы содержания ДГ и МГ наблюдаются после того, как гидролиз пройдет на 40 и 70% соответственно (рис. 2). После прохождения гидролиза на 25—40% в среде из-за ацильной миграции может появиться свободный глицерин (см. III, 3)^{47, 52}. Данные о свойствах, кинетике и механизме реакции панкреатической липазы приведены в ряде обзоров^{1, 41, 43, 44, 54}.

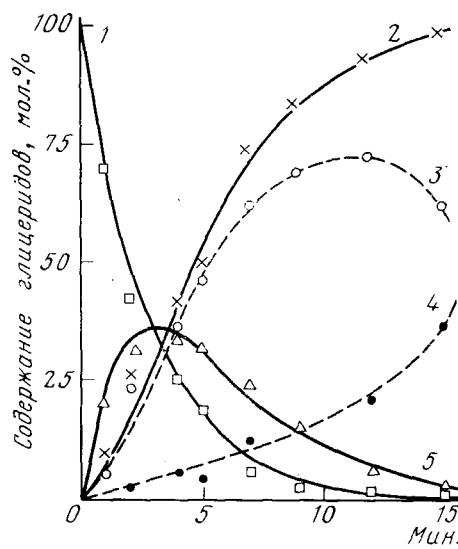


Рис. 2. Зависимость липазного гидролиза жира растения *Madhuca longifolia* от времени реакции⁵². Сплошные линии — вычисленные (см. III, 1), пунктир — найденные концентрации; 1 — триглицериды, 2 — моноглицериды+глицерин, 3 — моноглицериды, 4 — глицерин, 5 — диглицериды

2. Условия проведения липазного гидролиза приведены в обобщенном виде в табл. 2. Источником фермента обычно служат сок или препараты поджелудочной железы свиньи — панкреатин, стеапсин и др., которые могут сильно различаться по активности и позиционной специфичности^{15, 42, 56, 59}. Количество липазы подбирают так, чтобы достичь 65—70%-ного

ТАБЛИЦА 2

Условия реакции (на 1 г жира) при изучении строения триглицеридов методом липазного гидролиза (данные в скобках относятся к микромодификации метода)^{1, 10, 35, 47, 55, 58, 59—64}

Параметр среды реакции и единицы измерения	Численное значение
Состав и концентрация буферного раствора	1,2 M NH ₄ OH—NH ₄ Cl или 1 M
Количество буферного раствора	18—23 (160—1050)
Оптимум pH буферного раствора	8,0—8,5
Содержание таурохолеата Na, мг	5—20 (250—500)
Содержание хлористого кальция, мг	350—440 (2000—8000)
Содержание фермента, мг	70—400
Температура среды, °С	37—40
Длительность инкубации, мин.	10—90 (2—30)
Степень гидролиза сложногидириных связей, %	50—70
pH среды после добавления 1—6 N HCl	1—3
Газовая среда	Азот или воздух
Скорость перемешивания смеси, об./мин	120—3000

выхода при гидролизе за минимум времени, а ее специфичность проверяют по действию на синтетические триглицериды известного строения^{44, 47, 49, 58, 64}. Очистка фермента повышает его активность в 135 раз и включает обезжикивание, экстракцию водой, адсорбцию на Al(OH)₃, осаждение (NH₄)₂SO₄, диализ и хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе*. Однако очистка не увеличивает позиционную специфичность, и потому для изучения глицеридов обычно ограничиваются II стадией очистки по Денюэлю^{40, 43, 65, 66}. Важно удалить из препарата эндогенные липиды и устранить возможную активность эстераз (если исследуются глицериды кислот с $m < 12$) и неспецифической «липазы», которая составляет подчас 2—10% всей липазной активности, стимулируется таурохолатом и тормозится 2-часовым выдерживанием при pH 9 и 40°^{62, 63, 67, 68}.

Субстрат — природные или синтетические триглицериды — и другие компоненты реакции также очищают от возможной примеси МГ и ДГ^{44, 69}. Гидролиз ненасыщенных глицеридов проводят в атмосфере N₂ (табл. 2). Расщепляется только жидкий и хорошо эмульгированный субстрат^{15—39}, поэтому до прибавления липазы его смесь с эмульгатором гомогенизируют при нагревании. При температуре выше 40° растет ацильная миграция и инактивация фермента, поэтому гомогенность среды лучше создавать быстрым механическим перемешиванием^{40, 43, 47}. Обычно эмульгатором служит таурохолеат Na, который, однако, активирует постороннюю «липазу» (см. выше) и оказывает еще не совсем ясное стимулирующее действие на саму панкреатическую липазу^{41, 59}; применяют также полимеры — поливиниловый спирт, гуммиарабик и др.^{42, 61}. Однако эмульгаторы часто недостаточны для получения хороших эмульсий из твердых S₃-глицеридов (длина цепи каждого ацила $m_s > 12$); тогда их до эмульгирования смешивают с жидкими липидами-носителями, не влияющими на специфичность гидролиза насыщенных субстратов^{70, 71}. Смешивание S₃ с триолеином (1:1 или 4:1) загрязняло реакционную смесь

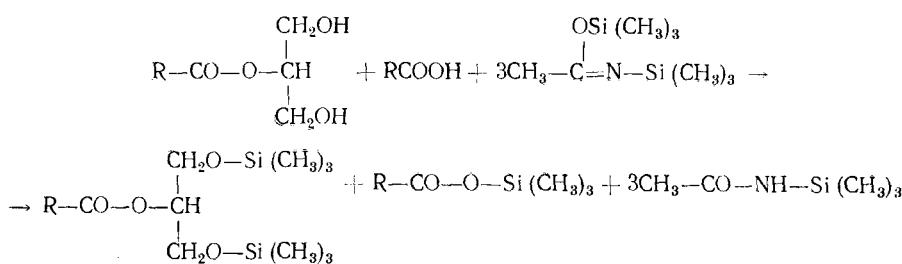
* ДЭАЭ — диэтиламиноэтил.

продуктами гидролиза последнего, поэтому сейчас его заменяют метиловыми эфирами — метилолеатом, метилпентадеканоатом и др.^{55, 63, 69}.

По мере гидролиза в макромасштабе, когда молярное соотношение жира ($0,2-2,2$) и буфера $\approx 1,5$, pH среды быстро падает ниже оптимального (табл. 2)^{10, 47, 59, 61, 63}; оптимальный pH среды во избежание инактивации липазы надо сохранять, добавляя вручную или самопищущим pH-статом NH_4OH или $0,5-1\text{ N NaOH}$, что позволяет уловить точку максимального содержания МГ в среде (рис. 2)^{42, 56, 59, 63, 72}. При микрометоде ($1-50\text{ мг жира}$) сохранение оптимума pH обычно обеспечено имеющимся буферным раствором^{47, 65}. Ионы Ca^{2+} (табл. 2) связывают СЖК, и потому гидролиз проходит до МГ; без Ca^{2+} или в присутствии связывающего Ca^{2+} фосфатного буфера возникают лишь ДГ, и в среде накапливаются СЖК, инактивирующие фермент^{43, 44, 55}. Если от добавления липазы до помутнения смеси, вызванного нерастворимыми Са-солями, прошло время t , то момент $2t$ отвечает максимальному содержанию МГ^{41, 54}. Реакцию прекращают избытком HCl и сумму липидов экстрагируют^{40, 57, 61, 73}.

По составу продуктов липазного гидролиза определяют строение природных триглицеридов. Состав образовавшихся МГ и ДГ можно установить газовой хроматографией их ацетатов; МГ удалось разделить доmonoаракина, а ДГ — до пальмитомиристина. Ацетаты 1-МГ и 1,3-ДГ элюировались медленнее, чем производные 2-МГ и 1,2-ДГ соответственно⁷⁴. Для определения 1- и 2-МГ их смесь обрабатывают метансульфонилхлоридом и раствором NaI в ацетоне; 2-МГ переходят в 1-изомеры, и полученные аллиловые эфиры жирных кислот разделяют на неполярной жидкой фазе при 240° за 60 мин.^{75, 76}. Для количественного определения продуктов гидролиза глицеридов, содержащих в цепи жирнокислотных остатков кислотолабильные группы, использовали газовую хроматографию нерасщепленных триглицеридов и триметилсилильных (ТМС) производных МГ, ДГ и СЖК, которые получали в 20%-ном растворе *бис*-(ТМС)-ацетамида в пиридине (схема 3). Простые ТМС-эфиры МГ и ДГ и сложные ТМС-эфиры жирных кислот сразу же разделяли в программированном температурном режиме. Этот метод служил для позиционного анализа глицеридов *цис*-12,13-эпоксиолеиновой, *транс*-10,12-9-оксиоктадекадиеновой и 9-*цис*, 11-*транс*, и 13-*транс*-октадекатриеновой кислот; продукты распада, даваемые другими методами силирования, здесь отсутствовали⁷⁷.

Схема 3



Продукты липазного гидролиза — нерасщепленные ТГ, ДГ, МГ, СЖК и глицерин — обычно выделяют адсорбционной хроматографией в тонком слое или на колонке^{40, 78–89}. Если адсорбент пропитан H_3BO_3 , то ДГ и МГ разделяются на симметричные 1,3- и 2- и несимметричные 1,2(2,3)- и 1(3)-изомеры соответственно^{65, 79}. Каждый класс липидов учитывают количественно и состав их кислот определяют газовой хроматографией^{60, 78, 84, 85}. Зная содержание какой-либо жирной кислоты А для исходного

жира $[A]$ и для одного из положений триглицеридов, вычисляют состав другого положения по формуле $3[A] = 2[A]_{1,3} + [A]_2$ и содержание A в положении 2 $H = 100 [A]_2/3[A]$ ^{17, 44, 80, 82, 90–92}. Для учета ацильной миграции (см. III, 3) 1(3)-МГ разрушают периодатом, а 2-МГ выделяют повторно^{64, 83, 87, 90}; строение ДГ и МГ определяют также их этерификацией хлорангидридами жирных кислот, не свойственных данному жиру, повторным липазным гидролизом полученных искусственных триглицеридов и исследованием продуктов расщепления последних^{46, 68}.

3. *Определение достоверности данных ферментативного анализа триглицеридов.* Для оценки достоверности результатов липазного гидролиза необходимо, во-первых, выяснить, одинакова ли скорость отщепления разных жирных кислот и проходит ли отщепление статистически и, во-вторых, знать, соблюдается ли позиционная специфичность гидролиза, и как на нее влияет возможная миграция ацилов^{43, 60, 68, 73, 93–101}.

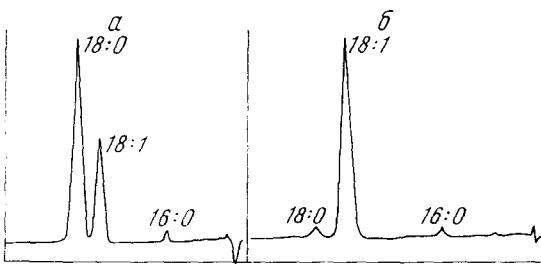


Рис. 3. Газо-жидкостные хроматограммы жирных кислот: *а* — 1,3-дистеаро-2-олеина (SOC); *б* — 2-моноглицеридов, полученных липазным гидролизом SOC⁵⁵

больших изменений в составе кислот каждого из классов липидов (см. III, 2); нерасщепленные триглицериды и объединенная фракция СЖК и 2-МГ, с одной стороны, и исходный жир, — с другой (при условии низкого содержания ДГ в смеси), — были близки по составу кислот. Таким образом, жирнокислотная специфичность реакции незначительна, а сам гидролиз 1,3-ацилов является статистическим^{1, 40, 44, 52, 57, 71, 99–107}.

Кислоты 20:5 и 22:6 (указаны $m:e$) жиров морских животных из-за пространственной близости их COOH к первой двойной связи и концевой CH₃-группе (вследствие изгиба цепи) отщепляются в 5–10 раз медленнее обычных кислот и потому накапливаются в ДГ и ТГ реакционной смеси; ацилы 22:5, лишенные этих особенностей пространственной структуры, гидролизуются нормально. Сейчас для структурного анализа «морских» жиров гидролиз липазой заменили анализом с реагентом Гриньара CH₃MgBr^{80, 95, 107}.

Наоборот, ацилы коротких кислот ($m < 12$) из-за легкости их миграции в 2-МГ и 1,2(2,3)-ДГ из 2- в 1,3-положение гидролизуются втрой быстрее обычных кислот, вызывая их накопление в МГ. Поэтому данные липазного гидролиза молочного жира, жира *Cuphea llavia*, масла *Irvingia gabonensis* и других богатых летучими кислотами жиров ненадежны. Степень миграции лауриновой кислоты (Ла), занимающей промежуточное положение между летучими и нелетучими кислотами, еще не определена^{16, 39, 53, 82, 87, 93, 94, 96, 97, 100, 102–104, 106}.

Разветвление в цепи ацилов тормозит их отщепление, а введение гидроксила не сказывается на скорости гидролиза. Дикарбоновые ацилы в триглицеридах, содержащих азелайнную кислоту (Az), гидролизовались как и обычные ацилы. Ненасыщенные ацилы свиного жира ($[S]_2 \approx 75\%$) отщеплялись преимущественно, что увеличивало насыщенность остаточных ТГ и ДГ. Состав 2-МГ ($[S]_2$) не менялся, поэтому расчет $[A]_{1,3}$ (см. III, 2) и строения глициридов по $[A]_2$ и $[A]$ более правилен, чем

При разном времени гидролиза обычных жиров с $[S]_2 < 10\%$ и числом атомов углерода m S- и U-кислот = = 12–18 не обнаружили

ТАБЛИЦА 3

Гидролиз 1,3-дипальмитил-2-(9, 10-³Н)-олеинглицерина панкреатической липазой, мол %⁶⁵

Время ре-акции, мин.	СЖК в продуктах реакции	Содержание ³ Н (%) в				Моли 1,3-ПО на 100 молей 1,2-ПО	Моли на 100 молей 2-МГ		
		ТГ	ДГ	МГ	СЖК		Всех 1-МГ	1-МО	1-МП
19	31	26	34	37	3	2	23	20	3
22	50	17	27	52	4	3	23	20	3
30	60	6	15	74	5	4	38	35	3
45	60	11	15	66	8	6	43	38	5

прежний расчет $[A]_2$ по неустойчивому составу СЖК. Данные о влиянии *цик*-, *транс*-изомерии на скорость гидролиза разноречивы^{41, 46, 47, 54, 59, 98, 105}.

Гидролиз синтетических и природных глицеридов в кишечнике и *in vitro* в микромасштабе в течение 1—2 мин. (рис. 3) отвечает уравнению реакции гидролиза (см. III, 1)^{42, 52, 57, 83}. С ростом времени реакции МГ изомеризуются: обычно в них обнаруживается 10—30% и более 1(3)-МГ, которые возникают путем миграции ациллов в водной среде при pH 8 и легко образуют глицерин (до 30—40% в конце реакции)^{39, 66, 71}. Изомеризацию можно частично снять добавлением СЖК или применением микробных липаз с кислым оптимумом pH (см. III, 4)^{41, 49, 108}. Миграция ациллов термодинамически направлена в сторону 1,3-положения, и скорость ее ниже скорости отщепления. Поэтому 2-МГ свободны от ациллов, содержащихся в 1,3-положениях исходных триглицеридов, и состав их кислот соответствует составу 2-положения этих триглицеридов^{46, 47, 82}.

Позиционная специфичность липазы практически абсолютна^{44, 55, 105}. Так, при гидролизе продуктов ацилирования 1(3)- и 2-МГ (см. III, 2) исходная кислота отщеплялась на 98 и 2—10% соответственно, а при гидролизе производных 1,2(2,3)- и 1,3-ДГ состав полученных продуктов в пределах 5% отвечал теоретическому. Аналогичные данные, получили в опытах с 2-олеил-1,3-бензилиденглицерином и 2-олеил-1,3-дигексадецил-глицерином, где миграция олеата была исключена, а посторонняя «липаза» (см. III, 2) тормозилась^{62, 68}.

Для количественной оценки миграции и специфичности гидролиза 1,3-дипальмитил-2-(9,10-³Н)-олеил-*sn*-глицерин (ПО³П) расщепляли при постоянном pH 8 (табл. 3, рис. 4). Состав кислот продуктов реакции отклонялся от теоретического только за счет изомеризации 1,2(2,3)-ДГ и особенно 2-МГ, усиливающейся в ходе инкубации; содержание 1-МГ и свободного олеата в продуктах гидролиза не превышало 3—5%. Радиоактивность ТГ, ДГ и МГ (в 10^3 имп/мин/мкмоль), полученных из ПО³П

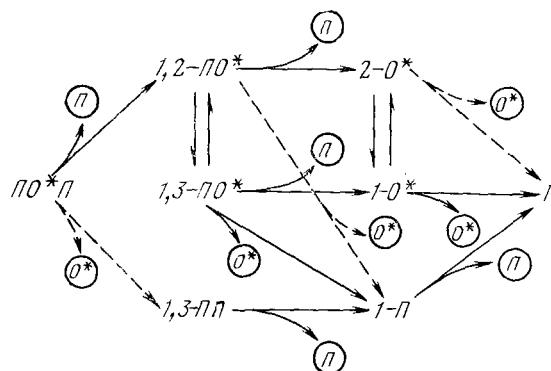


Рис. 4. Возможные превращения PO^3P при липазном гидролизе⁶⁵. Сплошная линия — нормальный гидролиз 1,3-ациллов; пунктир — ненормальный гидролиз 2-ациллов; \leftrightarrow — спонтанная ацильная миграция

гидролизом липазой плесени *Rhizopus arrhizus*, равна 60; 59,9 и 55,5 соответственно, что указывает на слабую миграцию ОТ из 2-положения⁶⁵.

Вначале липазу применяли для гидролиза или синтетических индивидуальных триглицеридов, или нативных жиров со сложным составом глицеридов^{40, 42, 44, 50}. Полученные данные выражали в виде состава кислот в 2- и 1,3-положениях, а также применяли для расчета величины Н (см. III, 2), других параметров позиционного распределения отдельных кислот и состава глицеридов жира по соответствующим уравнениям^{64, 68, 93, 105}. При Н ≈ 33% налицо чисто статистическое распределение данного ацила^{71, 82, 106}. Оно, однако, встречается редко⁶³: строение большинства животных и растительных жиров сильно отклоняется от статистического^{43, 45, 83}. Различия в составе между 1,3- и 2-положениями породили гипотезу о двух ферментах синтеза глицеридов, разных по жирнокислотной и позиционной специфичности^{35, 49, 73}. Сейчас показано, что сочетание микрометода липазного гидролиза с предварительным хроматографированием жиров наилучший метод структурного анализа глицеридов^{1, 41, 47, 54, 72, 87}.

Недостатки липазного гидролиза — не всегда хорошая воспроизводимость действия разных препаратов липазы, содержащих те или иные примеси, миграция ацилов, реэтерификация СЖК под влиянием трансферазной активности липазы при долгой инкубации без Ca^{2+} и отсутствие стереоспецифичности гидролиза^{1, 39–42, 47, 54, 67, 109–111}.

4. *Применение других липаз для анализа триглицеридов.* Кроме панкреатической липазы свиньи, в анализе жиров используют соответствующие ферменты других млекопитающих, а также липазы трески, ската и омура, имеющие ту же позиционную специфичность^{39, 43, 79, 112–114}. Липазы молока и гриба *Pseudomonas fragi* также специфичны к 1,3-положениям. Оптимальным для их действия является рН 5,6, поэтому миграция ацилов выражена здесь слабее, чем для панкреатических липаз^{1, 44, 100, 115}. Липаза семян *Vernonia anthelminthica* атакует 2-положение, давая 1,3-ДГ. Фермент гриба *Geotrichum candidum* специфичен, хотя и не абсолютно, к *цис*-9-ненасыщенным кислотам, особенно к олеиновой, независимо от их положения (см. IV, 8). Фермент почти не отщепляет элаидиновую кислоту, что доказывает стереоизбирательность образования фермент-субстратного комплекса^{101, 112, 116}. Неспецифические липазы клещевины и *Streptococcus aureus* в анализе глицеридов не применяются^{54, 105}. Гипотезы об участии липаз растений в синтезе триглицеридов теперь оставлены⁴¹.

5. *Структурный анализ триглицеридов методом масс-спектрометрии.* К неферментативным методам структурного анализа триглицеридов относятся масс-спектрометрия (рис. 5), а также определение полиморфизма, ЯМР- и ИК-спектроскопия (см. V).

В масс-спектре синтетического 1-миристил-2-стеарил-3-пальмитил-*sn*-глицерина (МСП), полученном на приборе MS-9 при 170–200°, обнаружены следующие пики: 1) пик молекулярного иона (M^+), m/e 804; 2) пики m/e 523, 551, 579, образующиеся при отрыве от M^+ RCOO-группы ($R = -C, П$ и M); 3) пики ионов тех же ацилов с m/e 267, 239 и 211; 4) пики ионов, образующихся в результате отрыва от M^+ фрагмента CH_2OCOR (m/e 509, 537 и 565 соответственно). Как показывает рис. 5, интенсивность пика иона $M^+ - \text{CH}_2\text{OCOC}_{17}\text{H}_{35}$ (m/e 509), содержащего остаток стеарата, который расположен в 2-положении исходного триглицерида, была втрое меньше интенсивности пиков ионов с m/e 537 и 565. Следовательно, по относительной интенсивности пиков $M^+ - \text{CH}_2\text{OCOR}$ можно установить положение ацильного остатка в молекуле триглицерида. Так, синтетические 2-OCC и 1-OCC дали разные масс-спектры. Для соедине-

ний с молекулярным весом ниже 1058 распад под электронным ударом не сопровождается термическим распадом. Масс-спектрометрический метод по скорости и чувствительности анализа выше липазного гидролиза, но применим пока лишь к очищенным индивидуальным триглицеридам^{41, 117}.

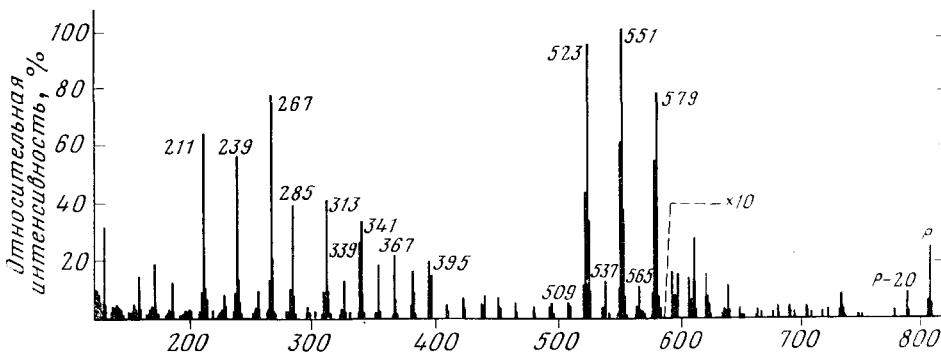
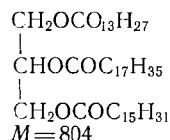


Рис. 5. Массовый спектр 1-миристо-2-стеаро-3-пальмитина¹¹⁷



В числе природных глициридов методом масс-спектрометрии был исследован оптически активный трехкислотный триглицерид из полярной фракции китайского масла *Sapium sebiferum*, дающий при метанолизе эфиры линолевой, линоленовой и 2,4-декадиеновой (10:2) кислот. Молекулярный вес этого глицирида, определенный методом масс-спектрометрии, равен 920, а не 778, как можно было бы ожидать из его жирнокислотного состава. Разность, составляющая 142 единицы, свидетельствует о том, что в этом соединении содержится также остаток C₈-оксикислоты. Поскольку в спектре отсутствовал пик M⁺—CH₂OCOR (R=10:2) можно было предположить, что кислота 10:2 не соединена непосредственно с глицирином. Эти данные послужили материалом для установления строения оптически активного триглицерида, которое подробнее описано ниже (см. IV, 4).

IV. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АБСОЛЮТНОЙ КОНФИГУРАЦИИ ТРИГЛИЦЕРИДОВ

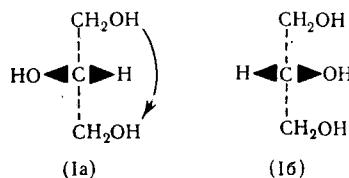
1. Современное состояние проблемы абсолютной конфигурации жиров. Известно, что большинство асимметрических природных соединений — аминокислоты, углеводы, терпены, алкалоиды и др.— обычно представляют собой энантиомеры^{35, 113}. Структурный анализ триглицеридов часто ограничивается проведением липазного гидролиза¹¹⁹, а стереоизомерия триглицеридов в отличие от их состава изучена еще мало из-за трудности выделения в индивидуальном виде, недостаточной разработанности синтеза их стереоизомеров, а также потому, что в стереоизомерах триглицеридов современные методы обычно не обнаруживают оптическую активность¹¹⁸.

Оптическую активность можно ожидать у асимметрических триглицеридов вида ABC (A=B и A≠B)⁴¹, обнаруженных сейчас во всех при-

родных жирах¹²⁰. Рацемическая смесь равных количеств энантиомеров таких глицеридов не обладает оптической активностью. Если же один антипод полностью или частично отсутствует в смеси, то экспериментальное обнаружение асимметричного С-2 атома остатка глицерина в принципе возможно¹²¹. Вопрос об эквивалентности или неэквивалентности состава ацилов в положениях 1 и 3 смесей оптически активных глицеридов важен для полной характеристики жира и для оценки достоверности теорий строения триглицеридов, поскольку многие из этих теорий основаны на гипотезе о статистическом распределении ацилов в 1,3-положениях. Этот вопрос может решаться и независимо от какой-либо теории строения^{118, 121–123}.

2. *Номенклатура стереоизомеров производных глицерина.* Обычно молекулу глицерина, лишенную оптической активности, считают симметричной. Как же различить между собой его атомы углерода 1 и 3, которые дифференцируются в реакциях обмена липидов? Фишеровская проекционная формула глицерина (Ia) на схеме 4 (темные треугольники —

Схема 4



связи, направленные к читателю, пунктир — связи от читателя) показывает, что при рассечении атома С-2 плоскостью по линии OH—H возникающие половины не идентичны, так как их нельзя наложить друг на друга. Таким образом, С-2 атом глицерина, является *мезо*-атомом, а сам глицерин имеет *мезо*-строение и, следовательно, лишен вращательной симметрии. Действительно, вращая (Ia) на 180° вокруг оси, перпендикулярной к плоскости листа, мы получаем формулу глицерина (Iб), которую нельзя наложить на (Ia). *Мезо*-строение и отсутствие вращательной симметрии позволяют считать, что в ходе обменных реакций с асимметрическими реагентами (все биологические реакции относятся именно к таким реакциям) судьба каждой карбинольной группы CH₂OH различна и что их можно различить между собой. Так, биосинтетическое замещение активного водорода в одной из этих групп фосфатом, алкилом, ацилом и т. д. дает глицерофосфат, батиловый спирт, 1-МГ и т. д., обнаруживающие оптическую активность. Поэтому стереономенклатура атомов С глицерина важна для изучения строения и биосинтеза жиров¹²⁴.

До последнего времени для обозначения абсолютной конфигурации оптически активных производных глицерина пользовались системой Бера и Фишера. В этой системе принадлежность данного производного к *D*-или *L*-ряду определяется тем, в какой из двух стереоизомеров глицеральдегида (*D*- или *L*-) его можно превратить при помощи наименьшего числа реакций. В частности, для несимметричных моно- и диглицеридов одной из стадий такого превращения служит окисление свободной первичной карбинольной группы до альдегидной группы без изменения положения заместителей. Неацилированная, замещенная фосфатом, содержащая радиоактивную метку и т. д., карбинольная группа всегда обозначается греческой буквой α , а вторичная HCOR₂-группа — буквой β . Для структурных и биохимических целей эта система представляет ряд неудобств, поскольку остается неясным, означает ли α 1- или 3- положение. Номенклатура Бера и Фишера была видоизменена в так называемой

«общепринятой *D/L* системе» (conventional *D/L* system). В этой системе также используются приставки *D* и *L*. Однако, в отличие от предыдущей, положение заместителей обозначается цифрами 1, 2 и 3, причем № 1 означает ацилированную карбонильную группу. Данная система также не лишена недостатков. Например, продукт фосфорилирования *L*-1,2-диацилглицерина (фосфатидную кислоту) по этой номенклатуре можно назвать или *L*-1,2-диацилглицеро-3-фосфатом, или *D*-2,3-диацилглицеро-1-фосфатом. Поэтому сейчас эта система заменяется другими^{124–126}.

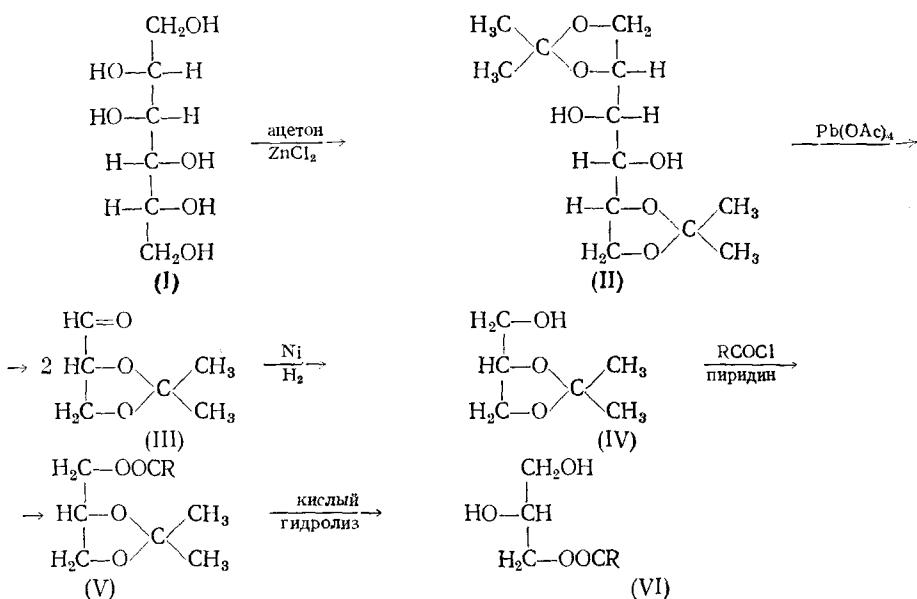
Более совершенная (*R*)/(*S*) система основана на последовательности расположения радикалов того или иного ранга вокруг центра асимметрии¹¹⁸. Ранг данной группы зависит от ее места в условной иерархии: $\text{OH} > \text{COOH} > \text{кетон} > \text{альдегид} > \text{карбинол} > \text{CH}_3 > \text{H}$ и т. д.¹²⁶. В глицеринах более длинные ацилы имеют приоритет перед более короткими, ненасыщенные перед насыщенными, разветвленные — перед нормальными, *цис*- перед *транс*- и т. д. Группа CH_2OH , замещенная ацилом низшего ранга, имеет № 1. В триглицериде последовательность начинается с группы высшего ранга — OR при С-2, содержащей кислород, и кончается радикалом наименьшего ранга — атомом H при С-2. Если радикалы в порядке убывания их ранга расположены в плоскости над атомом С-2, рассматриваемым со стороны, противоположной заместителю наименьшего ранга (атому H), по часовой стрелке, то триглицерид принадлежит к правой, или (*R*), а если против — то к левой, или (*S*) конфигурации. Так, оптические антиподы α -лауродипальмитина (см. IV, 3) по (*R*)/(*S*) номенклатуре обозначаются как (*S*)-1-лауродипальмитин (I) и (*R*)-1-лауродипальмитин (II)¹¹⁸. Достоинства (*R*)/(*S*)-системы — универсальность и отсутствие какой-либо двусмыслиности обозначения. Однако реакции производных глицерина чаще всего затрагивают только 1- и 3-сложнозифирные связи. Это приводит к тому, что обозначение конфигурации префиксами (*R*) и (*S*) часто меняется. Так, продукт фосфорилирования (*S*)-1,2-диацилглицерина обозначается как (*R*)-фосфатидная кислота. В настоящее время (*R*)/(*S*)-система в номенклатуре липидов применяется мало¹²⁴.

Хиршман предложил для производных глицерина систему стереоспецифической нумерации с фиксированным положением заместителей (*sn*-система), которая пользуется сейчас наибольшим распространением для обозначения стереоспецифичности триглицеридов^{124, 126}. Было установлено, что атомы углерода в проекционной формуле глицерина (Ia), в которой заместитель высшего ранга (гидроксил мезо-атома углерода) всегда обращен влево, а атом водорода — вправо, нумеруются так же, как атомы углерода в *L*-глицериновом альдегиде, т. е. сверху вниз (см. I). Таким образом, каждая первичная карбонильная группа глицерина получает в *sn*-системе определенный номер, и ей не может присваиваться то № 1, то № 3. Триглицерид обозначается здесь как 1,2,3-триацил-*sn*-глицерин, а *D*- и *L*- α, β -диглицериды по Беру и Фишеру — как 1,2-диацил- и 2,3-диацил-*L*-глицерин соответственно. Если имеется равновесная смесь обоих антиподов, то в *sn*-системе она обозначается приставкой *rac*-, например, *rac*-1-олеодипальмитоглицерин, а если конфигурация неизвестна — то приставкой *X*-, например, *X*-1-пальмитодиолеоглицерин. В настоящее время *sn*-система рекомендована к широкому применению Комиссией по биохимической номенклатуре Международного союза по теоретической и прикладной химии для обозначения абсолютной конфигурации липидов^{124, 126}.

3. Стереоспецифический химический синтез триглицеридов разработан вследствие трудности выделения их стереоизомеров из природных жиров для сравнения синтетических антиподов с природными^{4, 120}. Ран-

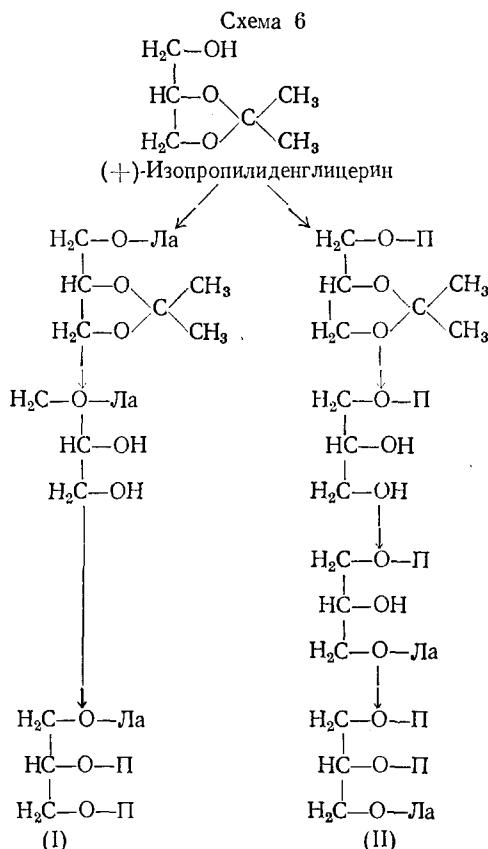
ние синтезы основывались на разделении рацематов промежуточных продуктов при помощи *D*-винной кислоты, сахарной кислоты или стрихнина на антиподы, которые превращали в глицериды без рацемизации⁴. Сейчас синтез начинают с оптически активного природного соединения *D*- или *L*-манинта. По методу Фишера и Бера для синтеза *L*-МГ (схема 5), 1,2,5,6-диизопропилиден-*D*-манинит (II), полученный из *D*-манинта (I) обработкой ацетоном в присутствии $ZnCl_2$, окислительным расщеплением тетраацетатом Pb по 3,4-ОН-группам превращают в 2 молекулы изопропилиден-*D*-глицеринового альдегида (III), восстановливают III до *D*(+)-изопропилиденглицерина (IV), этерифицируют IV в 1- положении хлорангидридом кислоты и, удалив остаток ацетона в V гидролизом, получают 3-ацил-*L*-глицерин (VI). Аналогично из *L*-манинта синтезируют

Схема 5



1-ацил-*L*-глицерин⁴. Стереосизомерные МГ превращают в триглицериды (см. II, 3). На схеме 6 показан синтез 1-лауроил-2,3-дипальмитоил-*L*-глицерина [(-) (S)-1-лауродипальмитина, I] и 1,2-дипальмитоил-3-лауроил-*L*-глицерина [(+)(R)-1-лауродипальмитина, II]; физическими методами доказали, что продукты синтеза — действительно оптические антиподы¹¹⁸. При стереоспецифическом синтезе 1,2-дипальмитоил-3-сорбина свободную OH-группу в IV защищали бензилом и снимали защиту гидрогенолизом; полученный триглицерид сравнивали с природным из масла *S. sebiferum*. Для измерения оптического вращения в условиях, исключающих миграцию ацилов, 12-, и 2,3-ДГ, полученные липазным гидролизом асимметрических триглицеридов, ацилировали хлорангидридом сорбиновой кислоты или превращали в ТМС-производные^{120, 123}. Кроме синтетических антиподов МГ, для синтеза триглицеридов применяют 1,2-диацил-*L*-глицерины, полученные из яичного лецитина действием фосфолипазы С^{125, 127}.

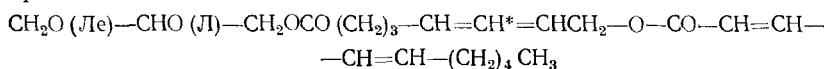
4. Физические методы определения абсолютной конфигурации триглицеридов включают прежде всего поляриметрию, поскольку многие производные глицерина — глицерофосфат, батиловый спирт, МГ, ДГ, тритилдиглицериды — обнаруживают заметное оптическое вращение^{4, 35, 118, 123}. Из триглицеридов вращение найдено лишь у тех, которые содержат I



или 2 остатка ароматических кислот или летучих жирных кислот; *L*-формы этих глицеридов являются левс-, а *D*-формы — правовращающими. Совпадение конфигурации и знака вращения здесь, вероятно, случайное: соответствующие 1,3-ДГ не обнаруживают такого совпадения¹¹⁸. Высшие жирные ацилы, мало различающиеся по длине и структуре цепи, вызывают в энантиомерных триглицеридах столь малую оптическую активность, что ее нельзя обнаружить поляриметрией даже в УФ-свете. Ацилирование оптически активного *D*(+)-1,2-диолеина ($[\alpha]_D^{20} = +1,73^\circ$) в 3- положении сразу снимает оптическую активность^{4, 34, 35, 118, 120, 121, 123}. Дисперсия оптического вращения при 300—600 мк у синтетического 1,2-ди- пальмито-3-лаурина в 25 раз ниже, чем у 1-монопальмитина и обратна по знаку вращения¹¹⁸. Таким образом, отсутствие вращения у несимметричного триглицерида еще не говорит о его рацемическом составе. Энантиомерные триглицериды, непосредственно не обнаруживающие оптического вращения даже в УФ-свете, называются «криптоактивными»^{4, 34, 35, 118}.

Сильное вращение дельфиньего жира и масел растений *S. sebiferum* и *Sebastiania lingustrina* (сем. *Euphorbiaceae*) связано с наличием центра асимметрии не в остатке глицерина, а в ацилах^{118, 120, 128}. Полярная фракция масла *S. sebiferum* представляет собой оптически активный триглицерид ($[\alpha]_D^{20} = -21,9^\circ$); путем его обработки алюмогидридом лития и затем уксусным ангидридом с образованием триацетина и ацетатов жирных спиртов было показано, что этот глицерид содержит равное количество линолеата и линолената и, кроме того, 31,5% 2,4-декадиеновой кислоты. Оптическая активность глицерида исчезала после гидрирования, а этиловый эфир декадиеновой кислоты был неактивен. В первой работе,

посвященной этому вопросу, предположили, что оптическая активность вызвана присутствием декадиеновой кислоты в 1- или 3-положениях глицерида, вблизи от потенциального центра асимметрии — С-2 атома глицерина¹²⁸. Однако величина $[\alpha]_{548}^{20}$ синтетического аналога — 1,2-дипальмитата 3-(2,4-гексадиеноата) *sn*-глицерина составила всего —3,60°. Позднее исследование глицерида *S. sebiferum* методами ИК- и ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии позволило установить его действительное строение¹²⁹:



Доказано, что остаток декадиеновой кислоты присоединен не к остатку глицерина, а к ацилу оптически активной C_8 -оксиалленовой кислоты. Таким образом, центр асимметрии (C^*) триглицерида содержится не в остатке глицерина, а в алифатической цепи C_8 -кислоты^{128, 129}.

Из природных триглицеридов измеряемая оптическая активность, вызванная асимметрией остатка глицерина, найдена лишь в *L*-1,2-диацил-3-ацетинах — главных компонентах масел семян *Euonymus verrucosus*, *Impatiens edgeworthii* и других растений из сем. *Celastraceae*, *Rosaceae*, *Balsaminaceae*, *Lardizabalaceae* и *Ranunculaceae*. После гидрогенизации в масле нашли *L*-1,2-пальмитостеаро-3-ацетин и *L*-1,2-дистеаро-3-ацетин; $[\alpha]_{350}^{250}$ их смеси =1,9°, а главная полоса ИК-спектра находится при 8,1 $\mu\text{к}$, что свидетельствует о присутствии ацетатной группы. Оптическая активность стереоизомерных глицеридов не исчезает при гидрировании, хранении в течение 6—7 лет при обычных условиях и нагревании до 170° при исключении ацильной миграции и окисления. Однако оптическая активность терялась после рандомизации, что доказывает расположение центра асимметрии в остатке глицерина этих триглицеридов^{130—132}.

Определение антиподов и рацематов и установление конфигурации криптоактивных триглицеридов физическими методами требует выделения и тщательной очистки индивидуальных глицеридов; кроме того, последние должны испытываться в виде кристаллов. Изучение пьезоэлектрической возбудимости трех синтетических триглицеридов между электродами при частоте переменного тока показало, что пьезоэлектрический эффект свойствен лишь антиподам, а в рацемате отсутствует. Различия рацемата и антиподов по точке плавления слишком малы для идентификации последних, поэтому надо снимать фазовые диаграммы смесей триглицерида неизвестной конфигурации с каждым из соответствующих антиподов^{34, 118}.

Более удобно определение стереоизомерии триглицеридов рентгеноструктурным анализом. Стереоизомеры дают одинаковую картину дифракции, отличающуюся от картины, даваемой рацематом. Поэтому для определения конфигурации 2-ОПС масла какао сравнивали рентгенограммы синтетического рацемата и природного глицерида; совпадение картин доказывает, что природный 2-ОПС является рацематом. Если бы совпадения не было, необходимо было бы получить рентгенограмму смеси природного глицерида с одним из синтетических стереоизомеров; если картина не меняется, то глицерид какао идентичен последнему, в противном случае природный глицерид идентичен другому стереоизомеру¹¹⁸.

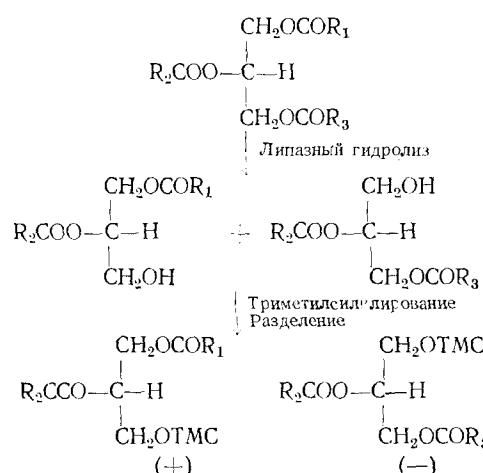
5. *Качественное обнаружение оптической активности триглицеридов химическими методами*, например ее обнаружение в растительных SUU-триглицеридах* требует их превращения путем липазного гидролиза в смесь 1,2- и 2,3-ДГ; полученные ацетилированием последних ацетаты ди-

* SUU — 1,3-динасыщенно-2-ненасыщенные триглицериды.

глицеридов можно окислением по двойным связям раствором KMnO_4 — KIO_4 перевести в смесь AcAzS - и AcAz_2 -триглицеридов. Наличие вращения в этой смеси будет говорить о неэквивалентности состава кислот в положениях 1 и 3 исходных SUU -глицеридов⁴¹.

Синтетический 1,2-дипальмитоил-3-сорбоил-*L*-глицерин обнаружил заметное вращение ($[\alpha]_{D48}^{20} = +3,7^\circ$). Поэтому предположили, что поляриметрией соответствующих производных 1,2- и 2,3-диглицеридов — продуктов липазного гидролиза жира — можно установить наличие в жире стереоизомеров^{41, 120}. Для поляриметрии применяли ТМС-эфиры ДГ, поскольку по углу вращения $[\alpha]$ они превышали как эфиры сорбиновой кислоты, так и сами диглицериды; кроме того, в них исключалась миграция ацилов. Стандартом был ТМС-эфир *L*-1,2-дипальмитоилглицерина, $[\alpha] = +4,7^\circ$. SSO- и OOS-глицериды ряда природных жиров расщепляли липазой и измеряли угол вращения $[\alpha]$ стереоизомеров ТМС-*sn*-1,2- и 2,3-ДГ разного кислотного состава, полученных тонкослойной хроматографией комплексов с ионами Ag^+ (схема 7). Все изученные триглицери-

Схема 7



ды были активны, причем вращение антиподов противоположно по знаку угла вращения; однако по $[\alpha]$ все фракции были ниже синтетического стандарта (схема 8). Так можно предварительно установить абсолютную

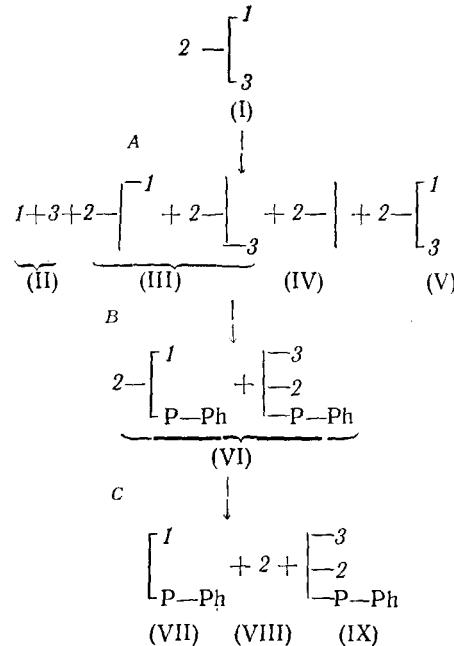
Схема 8

Жир	Триглицериды	Значения $[\alpha]$ ТМС-производных диглицеридов		Абсолютная конфигурация	
		1,2-	2,3-	по <i>sn</i> -системе	по Ингольду
Свиной жир	SSO	SS-TMC (+1,6°)	OS-TMC (-1,3°)	$\text{S}-\begin{array}{c} \text{---S} \\ \\ \text{---O} \end{array}$	(<i>R</i>)
Пальмовое масло	OOS	OO-TMC (+2,5°)	SO-TMC (-2,3°)	$\text{O}-\begin{array}{c} \text{---O} \\ \\ \text{---S} \end{array}$	(<i>S</i>)
Жир <i>Myristica</i> <i>labarica</i>	OOS	OO-TMC (+0,5°)	SO-TMC (-3,9°)	$\text{O}-\begin{array}{c} \text{---O} \\ \\ \text{---S} \end{array}$	(<i>S</i>)
Масло какао	OOS	OO-TMC (+1,0°)	SO-TMC (-3,2°)	$\text{O}-\begin{array}{c} \text{---O} \\ \\ \text{---S} \end{array}$	(<i>S</i>)

конфигурацию глицерида или преобладающего в нем стереоизомера¹²³.

6. Количествоное определение стереоизомерии природной смеси триглицеридов с применением фосфолипазы A по Брокерхофу¹²⁴ основано на позиционной и стерео-специфичности липолитических ферментов (схема 9).

Схема 9



ма 9; 1, 2, 3 — ацилы жирных кислот). Липазный гидролиз (A) триглицерида (I) дает СЖК (II), рацемическую смесь sn-1,2- и sn-2,3-ДГ (III), МГ (IV) и нерасщепленный триглицерид (V); III фосфорилируют (B) фенилдихлорфосфатом и получают смесь L- и D-фосфатидилфенолов (VI), а VI гидролизуют в 2- положении (C) стереоспецифической фосфолипазой A (КФ 3.1.1.4), получая L-лизофосфатидилфенол (VII), СЖК (VIII) и незатронутый гидролизом 1-фосфат 2,3-диацил-L-глицерина (IX, D-фосфатидилфенол по номенклатуре Фишера). По составу кислот в исходных, промежуточных и конечных продуктах реакции можно независимо вычислить состав ацилов в 1,2- и 3- положении триглицеридов.

При наличии миграции ацилов и жирнокислотной специфичности гидролиза состав кислот 1,3- положений ДГ не будет идентичен таковому исходного жира⁴¹. Гидролиз D-, L- и DL-дипальмитоолеина липазой показал, что ацилы 1 и 3 отщепляются одновременно и с равной скоростью, а полученные ДГ оптически не активны. Величина $[\Pi]/[\text{O}]$ в СЖК и ДГ реакционной смеси (1 : 1 и 3 : 1 соответственно) отвечает теоретической¹²³. При гидролизе в макромасштабе стеарат отщеплялся медленнее других ацилов⁶⁸, для обеспечения статистического гидролиза в среду (см. III, 2) добавляли гексан, который ослабляет силы Ван-дер-Ваальса, селективно удерживающие более длинные и менее изогнутые ацилы над поверхностью жировой мицеллы^{9, 125}. Отщепление полиненасыщенных кислот с $t=20-22$ отставало даже с гексаном, приводя к их накоплению в ДГ. Поэтому «морские» жиры, а также свиной жир и масло кукурузы деацетилировали реагентом Гриньера (0,06—0,12 M CH_3MgBr в эфире); при этом симметричные МГ и ДГ значительно изменяли состав из-за мигра-

ции ациллов, но 1,2(2,3)-ДГ отвечали по составу исходному жиру и могли быть использованы для стереоспецифического анализа^{9, 41, 107, 134–136}. Состав кислот 1,2(2,3)-ДГ, полученных гидролизом в макромасштабе^{125, 137}, сильно отличался от вычисленного теоретически повышенным содержанием насыщенных ациллов. Лучшее соответствие дал микрометод гидролиза^{47, 134}. Возможно, что статистический гидролиз обеспечивается снижением уровня Ca^{2+} и повышением содержания фермента в реакционной смеси⁴¹.

По Брокерхофу полученные гидролизом диглицериды (выход 20–30%) разделяли на 1,2(2,3)- и 1,3-ДГ хроматографией на силикагеле, пропитанном H_3BO_3 ; 1,2(2,3)-ДГ в присутствии фенилдихлорфосфата, эфира и пиридина при 0° превращали в фосфатидилфенолы, триэтиламмониевые соли которых гидролизовали фосфолипазой А в эфире, рН 7,5, в присутствии CaCl_2 . Продукты реакции разделяли хроматографией на адсорбенте, пропитанном H_3BO_3 , и состав кислот каждой фракции определяли газо-хроматографически^{9, 125, 135, 136}. Достоверность состава 1-2- и 3-положения обеспечивается лишь при совпадении данных следующих анализов: **I=V**, **III=VI** и **IV=VIII** (схема 9), указывающем, что гидролиз липазой и фосфолипазой прошел статистически и без изомеризации. Непосредственно определяют состав 1-положения (VII) и 2-положения (IV и VIII); содержание кислоты в 3-положении вычисляют двояко: оно равно $3 \times \text{I} - \text{IV} - \text{VII}$, или же $2 \times \text{IX} - \text{IV}$. При расчете допустимо абсолютное расхождение в 4% при $[\text{A}] \geq 40\%$, не более 3% при $[\text{A}] = 10–35\%$ и не более 2% при $[\text{A}] < 10\%$; обычно ошибка расчета не превышает $\pm 2\%$ и лишь для трудногидролизуемых насыщенных жиров возрастает до 8%^{9, 10, 119, 125, 136}. Если же результаты хорошо воспроизводятся, то ограничиваются анализом фракций (I, IV, VII) и (IX)⁹. Метод Брокерхофа проверен на синтетических и полусинтетических ТГ¹²⁵.

Для прямого анализа состава 3-положения полученные деацетилированием жира с помощью реагента Гриньара 1,3-ДГ превращали в *L*-2-фосфатидилфенолы и расщепляли последние в положении 1 фосфолипазой А; возникающие лизо-производные по составу кислот отвечают 3-положению исходного жира¹³⁵.

7. *Определение абсолютной конфигурации индивидуальных триглицеридов.* У всех изученных жиров 1-положение имеет иной состав, чем 3-положение. Это косвенно доказывает наличие стереизомеров триглицеридов, но не говорит об их природе¹²⁸. Однако даже идентичность состава 1 и 3-положений смеси триглицеридов не обязательно доказывает, что все глицериды жира — рацематы. Так, для эквимолярной смеси (*R*)ПОС, (*S*)ППС, (*R*)ПОС, (*S*)ППС, (*S*)ПОС и (*R*)ППС соотношение П и С в положении 1 и 3 равно 1, хотя эта смесь содержит 1/3 рацемата 2-ОПС, 1/3 рацемата 2-ППС, 1/6 антипода (*R*)ПОС и 1/6 антипода (*S*)ППС. Поэтому об абсолютной конфигурации можно судить лишь по анализу индивидуальных глицеридов или их простых смесей, в которых (например, в (*S*)ПОС+СОС) определенный ацил (в данном случае — пальмитат) имеется лишь в одном из крайних положений одного из глицеридов¹¹⁸.

Сейчас проблема анализа конфигурации смесей и отдельных видов двухкислотных (A_2B) триглицеридов, по крайней мере в принципе, разрешена: обеспечено разделение мегамеров с одинаковыми *m* и *e*, но с разным числом S-ациллов (например, ССЛ и СОО); соотношение стереоизомеров в A_2B легко найти по содержанию кислоты В в положениях 1, 2 и 3 смеси ААВ+АВА+ВАА. Сложнее установить конфигурацию трехкислотных глицеридов, т. е. соотношение 6 возможных стереоизомеров: АВС, АСВ, ВАС, ВСА, САВ и СВА. По составу кислот в 1, 2- и 3-положениях

можно найти соотношения произвольных пар изомеров, например пар по содержанию кислоты А¹²²:

(I)	AA	BC	BC	(II)	AB	AC	BC
	BC	AA	CB		BA	CA	CB
	CB	CB	AA		PP	PP	PP
					x	y	z

Для определения количества каждого стереоизомера в смеси (I) нужен еще один параметр расчета, который можно получить разделением промежуточных продуктов анализа по составу кислот: глицерид (ABC) гидролизуют липазой, выделяют 1,2(2,3)-ДГ; 1,2-ДГ превращают в фосфатидные кислоты стереоспецифической диглицеридкиназой и находят состав кислот каждого положения методом Брокерхоя с тем отличием, что фосфатидные кислоты предварительно разделяют на пары стереоизомеров по составу кислот (II). Соотношение пар x, y и z равно соотношению кислот С, В и А соответственно в положении 3. Соотношение изомеров внутри пары определяют гидролизом фосфолипазой А¹³⁸.

8. Использование других ферментов (кроме фосфолипазы А) для анализа стереоизомерии триглицеридов. Если (ABC) глицерид содержит олеат, то дополнительный параметр для расчета стереоизомеров можно получить при помощи липазы *G. candidum* (см. III, 4) одновременно с анализом по Брокерхоя; 1,2(2,3)-ДГ, полученные отщеплением олеата из 1(3)-положений, превращают в фосфатидилфенолы и определяют соотношение стереоизомеров в их паре при помощи гидролиза фосфолипазой А¹³⁹.

Для анализа стереоизомерии пригодны и другие стереоспецифические ферменты обмена липидов. Рацемическую смесь фосфатидилфенолов можно разделить гидролизом фосфолипазой С, специфичной к L-изомеру⁹. Для анализа триглицеридов печени крысы применили диглицеридкиназу *Escherichia coli*, превращающую 1,2-ДГ, полученные липазным гидролизом, в фосфатидные кислоты (ФК) в 25 раз быстрее, чем 2,3-ДГ^{137, 140, 141}; содержание каждой кислоты в положениях 1,2 и 3 вычисляли по формулам:

$$[A]_1 = (2[A]_{\text{ФК}} - [A]_{\text{МГ}}) : 3;$$

$$[A]_2 = ([A]_{\text{МГ}}) : 3;$$

$$[A]_3 = [A]_{\text{ТГ}} - (2[A]_{\text{ФК}}) : 3,$$

где [A]_{ТГ}, [A]_{МГ} и [A]_{ФК} — содержание кислоты А в исходных триглицеридах и в полученных из них 2-моноглицеридах и фосфатидных кислотах. Равенство правой и левой частей в этих уравнениях достигается лишь в том случае, если жирнокислотный состав полученных при липазном гидролизе 1,2(2,3)-ДГ отвечает рассчитанному (см. IV, 6), и подстановка [A]_{1,2(2,3)} вместо [A]_{1,2} в уравнения дает одинаковый состав кислот в 1- и 3-положениях; обнаруживаемые различия указывают на минимальную ошибку метода. Часто эти различия значительны, что свидетельствует о жирнокислотной селективности липазного гидролиза; поэтому в каждом опыте необходимо обеспечить совпадение найденного состава кислот с теоретическим¹³⁴.

V. ПОЛИМОРФИЗМ ТРИГЛИЦЕРИДОВ

1. Структура кристаллической решетки и фазовые переходы триглицеридов. Явление полиморфизма, открытое Митчерлихом еще в 1821 г., состоит в том, что данное соединение имеет несколько кристаллических

модификаций одного состава и строения, называемых полиморфными формами. Эти формы заметно отличаются по структуре и параметрам кристаллической решетки, температуре плавления, плотности и другим свойствам, но в отличие от изомеров положения дают идентичную жидкую или газообразную фазу. В неорганическом мире примером полиморфных форм могут быть кристаллические модификации углерода — графит и алмаз. Полиморфизм свойствен и органическим веществам, особенно соединениям жирного ряда с длинной цепью, и в их числе природным глицеридам. До 1930-х г. тройные точки плавления триглицерида, открытые более 100 лет назад, объяснялись наличием в нем ряда изомеров положения; только Т. Малкин доказал, что аномалии плавления вызваны различиями в кристаллической решетке. При медленном нагревании застывшего расплава (α -полиморфной формы) простого S_3 -глицерида он плавится, а затем снова затвердевает с выделением тепла, образуя устойчивую β - или промежуточную β' -форму; последняя возникает при выдерживании расплава при температуре на 1—2° выше точки плавления α -формы. Эти превращения, которые могут и не сопровождаться плавлением, идут в направлении от менее устойчивых форм, образование которых требует минимального изменения свободной энергии решетки, к более термодинамически стабильным полиморфным формам, бедным свободной энергией. Триглицериды разного состава и строения дают сходные по свойствам главные α -, β - и β' -формы, так как решающую роль в полиморфизме играют ацильные цепи. Однако в огромном разнообразии природных жиров находят все новые, добавочные полиморфные формы, и потому классификация и номенклатура последних еще не установлены. Направление и продукты полиморфных превращений зависят от чистоты препарата, наличия и природы затравки для кристаллизации, растворителя, давления, температуры, скорости ее изменения и т. д. Таким образом, о кристаллических, термических, рентгеноструктурных и других свойствах триглицерида в данных условиях среди можно судить лишь после установления полиморфной формы, в которой находится сейчас это соединение. Полиморфизму триглицеридов посвящен ряд обзоров^{4, 142—154}.

По данным рентгеноструктурного анализа, алифатические цепи являются зигзагообразными структурами с прямолинейными осями, где угол между С—С-связями равен 109°28', а приращение (a) длины ацильного остатка при увеличении последнего на CH_2 -группу равно 1,28 Å⁴. При недостаточно низкой температуре близкий подход цепей друг к другу затруднен, и триглицериды остаются жидкими, без упорядоченной структуры. Растущее сближение ацилов при охлаждении порождает притяжение силами Ван-дер-Ваальса между атомами углерода соседних цепей, т. е. кристаллизацию триглицеридов^{146, 147}.

В кристаллах однородных алифатических молекул, концы которых различаются по полярности, цепи расположены в основном параллельно в виде своеобразного «частокола» и за счет водородных связей полярных групп обычно образуют двойной кристаллический слой, наглядную модель которого можно представить себе в виде двух связок очень большого числа спичек, где головка обозначает CH_3 -радикал, а свободный конец — полярную группу; одна из связок поставлена головками на некоторую плоскость, а другая — свободными концами — на первую связку. Таким образом, двойные слои молекул ограничены неполярными «метильными» плоскостями, расстояние между которыми (L) в Å называется длинным интервалом («long spacing»). Найденный по рентгеноструктурным данным L позволяет определить число цепей, составляющих длинный интервал⁴.

Если двойные слои длиной $2m$ расположены под углом 90° к плоскостям CH_3 -групп, то $L=2m$; в кристаллах смешанных глицеридов встречаются слои с L , кратным 3 или 4 m . Однако чаще всего $m < L < 2m$, и между осями цепей и плоскостями имеется угол наклона $\beta_x < 90^\circ$. Различие в величине β_x между разными кристаллическими формами — одна из главных причин полиморфизма триглицеридов; уменьшение угла β_x усиливает контакт между их более полярными сложноэфирными группами и, следовательно, повышает устойчивость полиморфных форм^{143, 146, 149}. Для триглицеридов с разным составом кислот L данной формы различен. Гипотеза, что снижение L вызвано не наклоном цепей, а их вторичными изгибами меандровой формы¹⁴⁹, экспериментально еще не доказана.

Параллельные друг другу цепи триглицеридов образуют элементарную кристаллическую ячейку — вертикальную или наклонную призму, ширина которой, называемая коротким интервалом S («short spacing»), определяется способом упаковки цепей в кристаллической решетке; последний является другой главной причиной полиморфизма глицеридов. В отличие от L значение S для данной формы практически постоянно и не зависит от m ^{143, 147, 154}.

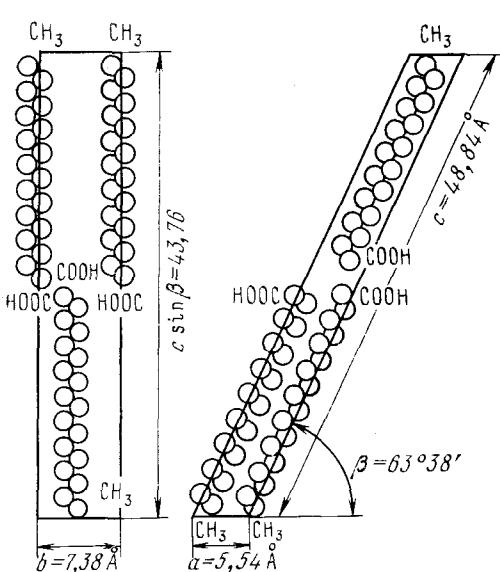


Рис. 6. Элементарная ячейка кристалла β -полиморфной формы стеариновой кислоты⁴. *a*, *b* — короткие межплоскостные расстояния; *c* $\sin \beta_x$ — длинное межплоскостное расстояние

Рис. 6 представляет модель, состоящую из 2 пар цепей ячейки стеариновой кислоты⁴. Сложнее построена содержащая 2 молекулы ячейка триглицерида: поскольку ось одного из ациллов составляет угол в 180° с осями остальных 2 ациллов (рис. 6), каждая цепь в решетке совпадает по положению с длиной осью четырехгранной призмы, образованной 4 другими цепями (рис. 7)¹⁴⁹.

На рис. 8 приведены возможные конфигурации молекул в кристаллах триглицеридов. Сначала считали, что преобладает конфигурация вилки, затем предположили, что более плотную упаковку дает конфигурация кресла. Сейчас рентгеноструктурный анализ единственного кристалла β -формы трилаурина (рис. 9) показал, что наиболее экономичную упаковку с наименьшей свободной энергией, не противоречащую принципам симметрии, дает конфигурация стержня^{143, 144}. Видно, что кристалл состоит из $2m$ -слоев стержнеобразных молекул в триклинической упаковке; 2 ацила находятся на одной прямой, а третий (еще неизвестно какой — средний или один из крайних) расположен рядом, параллельно им. Значения угла β_x , найденные на рентгенограмме ($62^\circ 7'$) и вычисленные по L ($61^\circ 35'$), хорошо совпадали между собой. Форма стержня обеспечивает также образование $3m$ - и $4m$ -слоев в кристалле (рис. 8)^{143, 149}. Форма молекул в других главных модификациях α и β' еще не выяснена¹⁵¹.

В гетерогенных системах фазовые переходы могут быть энантиотропными, т. е. осуществляться обратимо в обоих направлениях без расплыв-

ления при изменении температуры системы, или монотропными, которые необратимы, идет с потерей свободной энергии в сторону большей устойчивости и для обратного получения нестабильной формы из стабильной требуют промежуточного расплавления. Фазовые превращения триглицеридов относятся в основном к монотропным¹⁴³.

Для получения четких полиморфных переходов и форм с определенными свойствами нужны чистые препараты триглицеридов, не содержащие гомологов близкого состава или строения. Так, в чистых образцах Лаз и C_3 , судя по спектрам ЯМР низкого разрешения, жидкой фазы ниже температуры плавления не было, а в загрязненных кристаллах β -форм ОПП, ПОП, ПОО и СОС эта фаза появлялась задолго до плавления^{152, 161}.

Обычно в переохлажденных расплавах сразу ниже точки плавления β -формы наблюдается перелом кривых зависимости $\lg \eta$ от T^{-1} (η — вязкость), отражающий усиление агрегации глицеридов в виде параллельной укладки. С другой стороны, сразу же после расплавления кристаллическая структура триглицерида частично еще сохраняется: при быстром охлаждении этот расплав немедленно кристаллизуется; после разрушения частично упорядоченной структуры жидкой фазы 30 мин. — выдерживанием при температуре, на 20° выше точки плавления, кристаллы образуются медленно^{153, 160, 164}. При кристаллизации P_3 из растворителя свойства возникающих кристаллов β -формы зависят от природы последнего¹⁵⁷.

Условия получения главных полиморфных форм простых S_3 указаны в табл. 4^{143, 146}. Там же приведены некоторые методы исследования полиморфизма ТГ. Ранние методы — определение точек плавления в капилляре и дифференциальный термический анализ, состоящий в непрерывной регистрации выделения тепла при затвердевании или поглощения при

плавлении по кривым разности температур между окружающей средой и пробой триглицерида при его охлаждении или нагревании соответственно 4, 5, 33, 155–163. Дилатометрия регистрирует увеличение удельного объема V_s (в $мл/г$) триглицерида в одной из точек фазового перехода — точке плавления, а также равное по величине, но противоположное по направлению изменение — сжатие в точке затвердевания; оба эти процессы регистрируются

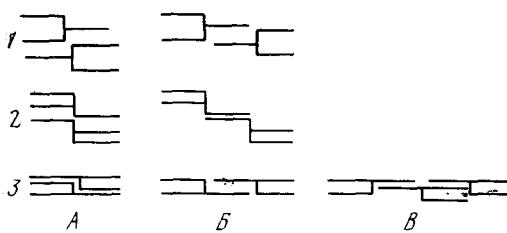
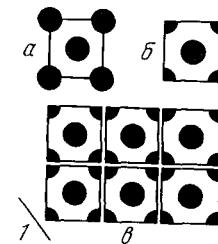


Рис. 8. Возможные конфигурации триглицеридов в кристаллах: 1 — конфигурация вилки; 2 — конфигурация кресла; 3 — конфигурация стержня. Длинный интервал, кратный $A = 2m$; $B = 3m$; $B' = 4m$

как функция температуры^{148, 156, 158}. При нагревании α - и β -форм триглицерина в микродилатометре со скоростью $6,4^\circ/\text{мин.}$ (рис. 10) обнаружили, что различия между исходным и конечным V_s при плавлении β -формы вызваны образованием при застывании расплава промежуточной β' -формы. В расплавах трилаурина и тристеарина застывание сразу приводило к возникновению метастабильной α -формы, устойчивость которой возрастала с увеличением m ; нагревание последней вызывало появление β -формы¹⁵⁷.



Обусловленные температурой полиморфные превращения можно обнаружить периодическим определением числа и величины L и S , свойственных той или иной форме данного глицерида, а также по рентгенограммам кристаллического порошка или крупного единичного кристалла (рис. 9) ^{154, 159, 164, 165}.

Изменения в упаковке цепей при переходе от неустойчивой полиморфной формы к устойчивой можно определить ИК-спектроскопией (рис. 11) по характерным скелетным колебаниям при $2-15 \text{ мк}$ ($5000-600 \text{ см}^{-1}$) ^{147, 149, 155, 159, 162}. Наконец, спектроскопия ЯМР низкого разрешения оценивает вращательную подвижность ацилов триглицеридов в кристаллической решетке, улавливает $\alpha \rightarrow \beta$ термический переход C_3 и определяет малые количества жидкой фазы в кристаллах триглицеридов с точностью $\pm 2\%$. Этот метод эффективнее дилатометрии, дающей лишь относительное содержание твердой фазы ^{161, 164}.

2. Полиморфные формы тринасыщенных триглицеридов и их некоторые свойства приведены в табл. 4 ^{143, 146}; более полные данные на этот счет имеются в монографии Маркли ⁴.

Единой номенклатуры форм еще нет (табл. 4). Ранняя номенклатура Малкина, различающая для данного глицерина 4 формы — стекловидную, α -, β' - и β - в порядке роста точки плавления, несовершена, так как у разных форм с разной структурой кристаллов эти точки близки или даже совпадают ^{5, 145, 149}. Согласно Луттону, лишенная кристаллической структуры стекловидная форма в действительности не существует, а имеются лишь 3

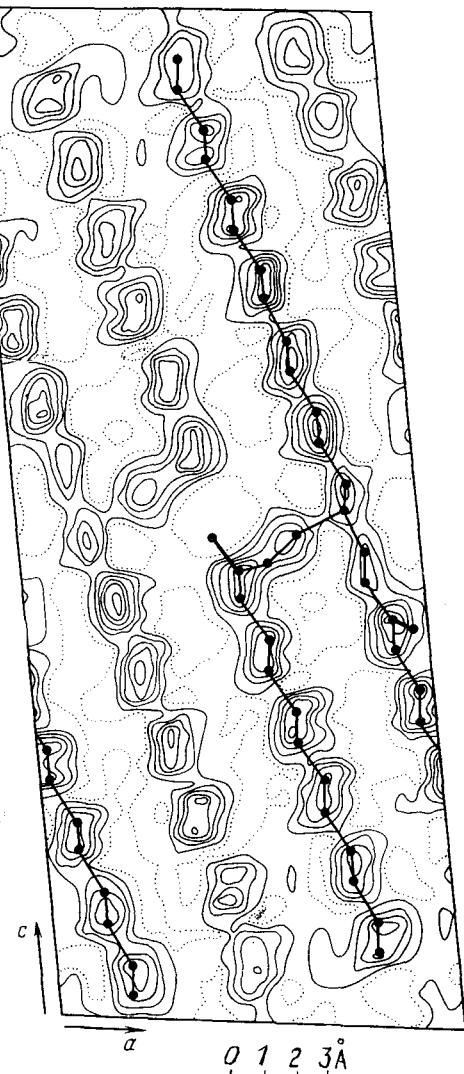


Рис. 9. Рентгенограмма β_L -полиморфной формы трилаурина ¹⁴³

главных формы α , β' и β , характеризуемые интервалом S (табл. 4) ^{147, 154, 165, 166}. Во избежание путаницы принадлежность данной формы к той или иной номенклатуре обозначают индексом автора (α_m , α_L , β'_L и т. д.), а число цепей в L — цифрой после индекса (β_L-2 , β_L-3 и т. д.) ^{144, 146, 151, 159}.

Число и свойства отдельных полиморфных форм триглицеридов определили также ИК-спектроскопией. Свойства ИК-спектров расплавов или растворов простых S_3 -глицеридов приведены в табл. 5 ^{33, 142, 155, 159}. Для

твердых глицеридов характерны интенсивность и число полос колебаний V группы, причем найдены 3 типа ИК-спектров по набору этих полос, соответствующие главным формам по Луттону (табл. 4).

В возникающей из расплава α_L -форме (табл. 4) цепи отстоят друг от друга на 5 Å и свободно вращаются вокруг своей вертикальной оси. Многочисленные полосы α_L -формы при 1250 см^{-1} доказывают, что она яв-

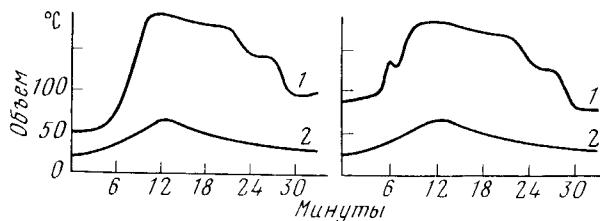


Рис. 10. Дилатометрические (1) и температурные (2) кривые стабильной β - (слева) и метастабильной α - (справа) полиморфных форм трипальмитина¹⁵⁶

ляется кристаллической, а не стекловидной, как считал Малкин. У глицеридов от Лаз и выше, имеющих устойчивую α_L -форму, число этих полос равно $m/2$, что позволяет определить длину ациллов в глицеридах по ИК-спектру¹⁴³.

Свойства β_L -формы (табл. 4) указывают на обычную орторомбическую упаковку двух типов наклонных цепей, плоскости которых ориенти-

ТАБЛИЦА 4

Свойства главных полиморфных форм простых насыщенных триглицеридов*

Обозначение данной формы по номенклатуре:	Стекловидная	α_M	β_M
Малкина			
Луттона	α_L^{**}	β_L^{***}	β_L^{**}
Ганстоуна	V	U	T
Угол β_x , град.	90	68	64
Наличие чередования точек плавления «четных» и «нечетных» гомологов, °С	Нет (54,5)	Нет (65,0)	Есть (71,5)
Длина короткого интервала, Å	4,15	3,8 и 4,2	4,6
Величина c , Å для расчета длинного интервала по уравнению Ганстоуна при четных m			
1. При L , кратной 2 m^{***}	4,9	4,3	3,7
2. При L , кратной 3 m	—	—	8,4
Упаковка цепей	Гексагональная	Орторомбическая	Триклиниальная
Главные полосы поглощения V группы (табл. 5), см^{-1}	720	727 и 719 (дублет)	717

* В скобках приведены соответствующие данные для тристеарина.

** Главный способ получения: α_L — застывание расплава при температуре ниже 0°, β_L — застывание расплава при температуре на 1—2° выше точки плавления α_L -формы; β_L — кристаллизация из полярных растворителей или медленное нагревание кристаллов α_L -формы выше ее температуры плавления.

*** В уравнении Ганстоуна $m_A = 0$.

рованы под прямыми углами друг к другу. Наблюдалось образование β_L' -формы C_3 при кристаллизации из парафинового масла^{143, 152}.

Наконец, β_L -форма (табл. 4) соответствует триклинической упаковке, где все плоскости зигзагообразных жирных цепей параллельны друг другу, а сами цепи более устойчивы и упакованы плотнее, чем у α_L -формы; амплитуда вращательных колебаний цепей вокруг вертикальной оси для C_3 не превышает 17°¹⁴³.

Номенклатуры Малкина и Луттона не позволяют сравнить триглицериды по свойствам их полиморфных форм с другими алифатическими соединениями. В номенклатуре Ганстоуна¹⁴⁶ полиморфные формы насыщенных соединений с длинной цепью разделяются по величине угла β_x на 5 групп, причем триглицериды входят в 3 первые группы V , U и T (табл. 4). Величину L в кристаллах одно-, двух- и трехкислотных S_3 -триглицеридов вида ABC (ацил В всегда в 2-положении), являющуюся линейной функцией длины цепи m , можно вычислить по уравнению $L = 1,28 \cdot \sin \beta_x (m_A + m_B + m_C) + c$, где m_A , m_B и m_C — число атомов углерода в ацилах A, B и C, а c — константное приращение L (в Å), отражающее длину

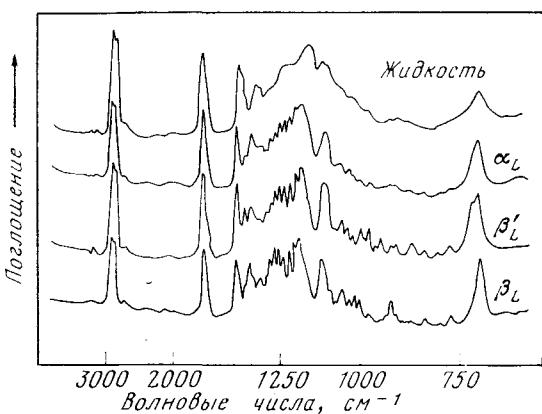


Рис. 11. Инфракрасные спектры полиморфных форм тристеарина¹⁴³

остатка глицерина и зоны контакта сложноэфирных групп; величины c для 2 m - и 3 m -слоев простых и смешанных триглицеридов с разной длиной ацилов A, B и C приведены в табл. 4. Для двойного (2 m) слоя m_A в уравнении Ганстоуна считают равным 0. Вычисленные и найденные рентгеноструктурным методом величины L хорошо совпадали между собой¹⁴⁶.

ТАБЛИЦА 5

Главные полосы поглощения в инфракрасном спектре простых тринасыщенных триглицеридов

Группы колебаний Полосы поглоще- ния, см^{-1}	I 3030—2967	II 1751—1733	III 1464—1453, 1383—1361	IV 1179—1166	V 1261—1250 и 730—717
Вызывающие коле- бания группы	C—H	C=O в COOR	CH ₂	C—O	CH ₂
Вид колебаний	Валентные	Валентные	Ножничные деформаци- онные	Валентные	Маятниковые деформацион- ные

Номенклатура Ганстоуна впервые показала, что каждая полиморфная форма характеризуется определенным углом наклона, однако она непригодна для расчета ненасыщенных глицеридов и не учитывает добавочные полиморфные формы простых S_3 -глицеридов, совпадающие с основными по величине β_x ¹⁵¹.

К добавочным формам относится sub- α_L -форма; она возникает без плавления из α_L -формы C_3 при —50°, обратимо превращается в α_L -фор-

му и по всем свойствам, кроме угла $\beta_x = 90^\circ$, совпадает с β_L' -формой. Иногда при кристаллизации из растворителя или при нагреве α_L -формы возникает ряд устойчивых β_L -форм, идентичных по картине дифракции, но различных по β_x . В отличие от «четных» триглицериды «нечетных» кислот устойчивы не в β_L , а в β_L' -форме^{142, 143, 152, 159}.

Возникновение добавочных форм пытались описать номенклатуры Хора и Ларсона. По Хору имеется 4 формы — α , β' , промежуточная и β в порядке повышения точки плавления. Названная промежуточной модификация, возникающая при нагреве α -формы, позднее оказалась смесью равных частей орторомбической и триклинической форм^{146, 148}. По

ТАБЛИЦА 6

Полиморфные формы некоторых двух- и трехкислотных насыщенных триглицеридов

ТГ	Δm	Главные формы			Добавочные формы	По ИК-спектру сходен с	Примечание
		α_L -2	β_L' -2	β_L -2			
ПСС	+2	+	+	+	β_L -3	ССС	
СПП	+2	+	+	+	То же	ППП	
СПС	-2	+	—	+		ССС	
ПМП	-2	+	—	+		ППП	
ПСП	+2	+	+	—		ППП	
МПМ	+2	+	+	—		МММ	
СМС	-4	+	+	+	β_L' -4	ССС	
СЛАЛА	-6	+	+	—	β_L -3, β_L' -3		

^a β_L' -и β_L -формы одинаково устойчивы; ^b β_L -форма наиболее устойчива; ^c β_L' -форма наиболее устойчива, β_L -форма трудноуловима; ^г β_L -и β_L' -формы близки по величине L

Ларсону: 1) формы с одним $S=4,15 \text{ \AA}$ обозначаются α , 2) формы с 2 $S=4,2$ и $3,8 \text{ \AA}$ и дублетом при 720 cm^{-1} обозначаются β' , а все формы, не отвечающие критериям 1 и 2, обозначаются β ; если у данного глицерида несколько β -форм, то они обозначаются β_1 , β_2 и т. д. в порядке снижения точки плавления. У β -форм, по Ларсону, все плоскости зигзагообразных цепей параллельны, у β' -форм — взаимоперпендикулярны, а у α -форм в размещении плоскостей нет определенной закономерности¹⁵¹.

Несмотря на свои недостатки, наиболее приемлемой до сих пор остается номенклатура Луттона, включающая 3 главные формы простых S_3 -глицеридов: неустойчивую α_L , промежуточную β_L' и устойчивую β_L . Эти главные формы надо рассматривать как совокупности близких по свойствам, но не идентичных кристаллических модификаций. Для более полной классификации нужны новые исследования¹⁴³.

Полиморфизм двух- и трехкислотных S_3 -глицеридов (табл. 6) весьма индивидуален и зависит от Δm — разности длин ациллов в 1,3- и 2-положениях, от симметрии строения и от наличия ацила низшей жирной кислоты в 2-положении. В гомологических рядах триглицеридов с определенным значением $+\Delta m$ или $-\Delta m$ набор полиморфных форм аналогичен, а симметричные и несимметричные триглицериды одного состава одинаковы по величине L 2 m - и 3 m -слоев, хорошо совпадающей с вычисленной по Ганстоуну (табл. 4). У разных триглицеридов наиболее устойчивы β_L , β_L' или α_L -формы; так, у глицеридов бегеновой кислоты устойчивы не β_L , а β_L' -формы. Трудноуловимые формы образуются лишь в присут-

ствии кристаллов янтарной кислоты. Смешанные глицериды, содержащие 2 ацила какой-либо кислоты, почти идентичны простым глицеридам той же кислоты по числу полос ИК-спектра α_L -формы в области 1250 см^{-1} ^{142, 143, 159, 166, 167}. С увеличением абсолютной величины Δt сложность полиморфизма растет (табл. 6). У смешанных глицеридов, включающих ацилы летучих кислот, большую роль в полиморфизме играет С=О-группа последних, приводящая к уникальным полиморфным формам^{4, 146, 154}.

3. *Полиморфные формы триглицеридов других типов.* Менее изученные простые U_3 -триглицериды по набору и свойствам полиморфных форм в общем сходны друг с другом и с соответствующими S_3 -глицеридами; иногда имеются добавочные формы, например, β_L -3 у *цис*-ненасыщенных триглицеридов. Для последних характерны полосы ножничных колебаний атомов Н в *цис*-связи при 690 и 1660 см^{-1} . Триолеин сходен с тристеарином по главным полосам поглощения в ИК-спектре полиморфных форм при $723 (\alpha_L)$, 729 и $722 (\beta_L')$ и $722 (\beta_L) \text{ см}^{-1}$. При замене *цис*-связи *транс*-связью у всех форм появляется полоса при 963 см^{-1} , а сходство по полиморфизму с S_3 -глицеридами той же длины еще более возрастает. Число полос U_3 при 1250 см^{-1} равно $m/2$, как и для S_3 (см. V, 2)^{142, 144}. Таким образом, в простых триглицеридах ненасыщенность мало влияет на полиморфизм⁴.

Большой набор полиморфных форм имеют триглицериды типа SUS, составляющие $\sim 80\%$ экономически важного масла бобов какао. Полиморфизм этого масла хорошо изучен, так как он был главным методом определения структуры глицеридов до появления липазного гидролиза^{168–171}. Кристаллические фракции масла совпадают со смесью синтетических ПОС, СОС и ПОП, а выделенный из масла ПОС — с синтетическим ПОС по температуре плавления, кривым нагревания, дилатометрии, картинам дифракции и ИК-спектрам их отдельных полиморфных форм до и после гидрогенизации (табл. 7)^{33, 142}. Смесь ПОС и СОС дает 3 по-

ТАБЛИЦА 7

Свойства полиморфных форм триглицеридов масла какао, 2-ОПС и 2-ОСС

Форма	sub- α_L -3	α_L -2	β_L' -2	β_L -3 (V)	β_L -3 (VI)
Температура плавления, $^{\circ}\text{C}$	17	23	27	33	36
Величина S , \AA	3,8 и 4,2	4,2	3,8 и 4,2	4,6	4,6

лиморфные формы и отличается от каждого из компонентов по скорости превращения неустойчивых форм, а смесь СОС и ССО (1:3) может давать новую кристаллическую форму, которой нет у исходных компонентов^{150, 162, 165}. Сравнение полиморфизма СОС и ССО показало, что параллельности с соответствующими насыщенными изомерами (табл. 6) нет¹⁶⁸. В гомологических рядах ППО по полиморфизму аналогичен ССО, а ПОП аналогичен СОС; у несимметричных SU_2 -глицеридов СОО и ПОО, также как у ССО и ППО, устойчива β_L -3-форма¹⁷⁰. По данным ЯМР спектроскопии, цепи олеата в ССО упакованы менее плотно и врашаются вокруг оси свободнее, чем насыщенные ацилы^{4, 5, 143, 144}.

Кроме ССО, наиболее изучены по полиморфизму SSU -глицериды* свиного жира⁸⁹. Его главный компонент по свойствам полиморфных форм совпадает с ОПС^{33, 150}. Крупнозернистые кристаллы β_L -3-формы этого триглицерида возникают при хранении свиного жира при 27° и ухудшают внешний вид продукта¹⁷²; это явление устраняют переэтери-

* SSU — 1,2(2,3-динасыщенно-3(1)-ненасыщенные триглицериды.

ификацией (см. II, 1) ¹⁶³. В отличие от ОПС, ССО и ПОО, симметричные глициериды свиного жира ОСО и ОПО дают формы α_L , β_L -2 и β_L -3, последняя из которых устойчива ¹⁷⁰.

У нативного, гидрированного и переэтерифицированного говяжьего и бараньего жира и у S_3 этих жиров устойчива β_L -форма ^{5, 163}, а у гидрогенизированного хлопкового масла, где преобладает ПСП (табл. 6) — β_L -форма, получаемая кристаллизацией из гексана в присутствии янтарной кислоты ¹⁷². Переход к устойчивому полиморфному составу ускоряется смешиванием жиров, богатых SSU, с жирами, содержащими много SUS ^{150, 168}, а также выдерживанием при постоянной температуре ¹⁵⁴. Так, некоторые растительные масла при зимнем хранении приобретают зернистую текстуру, вызванную прямым переходом α_L -формы S_3 -глициеридов в β_L -форму ^{4, 173}.

Изучение полиморфизма природных жиров достигло успехов и, в частности, показало, что их строение не является статистическим. Новые исследования должны дать более полную картину полиморфных форм триглицеридов, особенно ненасыщенных: последние составляют большую часть мирового производства жиров, но по своему полиморфизму изучены еще слабо ¹⁴⁶. Определение совокупности свойств всех кристаллических модификаций соответствующих синтетических и природных триглицеридов важно для идентификации последних по составу и строению ⁵. Полиморфные свойства жира важны и для его технологической оценки ¹⁶⁴ по консистенции, пластичности, зернистости и другим свойствам ^{142, 143}.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. H. Coleman, *Adv. Lipid Res.*, **1**, 1 (1963).
2. L. Going, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **44**, 414A (1967).
3. H. P. Kaufmann, F. Grandel, B. Grothues, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **60**, 919 (1958).
4. K. S. Markley (ed.), *Fatty Acids*, N. Y., Interscience, 1961.
5. M. R. Mills, *Paint Technol.*, **23**, 129 (1959).
6. F. A. Norris, K. F. Mattil, *Oil and Soap*, **23**, 289 (1946).
7. J. Baltes, *Nahrung*, **4**, 1 (1960).
8. M. L. Blank, B. Verdino, O. S. Privett, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 87 (1965).
9. H. Brockerhoff, *Arch. Biochem. Biophys.*, **110**, 586, (1965).
10. H. Brockerhoff, M. Yurkowski, *J. Lipid. Res.*, **7**, 62 (1966).
11. M. M. Chakrabarty, D. Bhattacharyya, A. Gupta, *J. Chromatog.*, **22**, 84 (1966).
12. H. J. Dutton, C. R. Scholfield, T. L. Mounts, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **38**, 96 (1961).
13. A. Kuksis, M. McCarthy, *J. Beveridge*, Там же, **41**, 201 (1964).
14. E. S. Lutton, M. F. Mallory, *J. Burgers*, Там же, **39**, 233 (1962).
15. L. K. Arnold, A. D. Milloy, Там же, **40**, 296 (1963).
16. A. Boudreau, J. M. de Mal, *Canad. J. Biochem.*, **43**, 1799 (1965).
17. G. Clement, J. Belleville, C. Lorette, J. Raulin, *Bull. soc. chim. biol.*, **45**, 1433 (1963).
18. H. P. Kaufmann, H. Wessels, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **68**, 249 (1966).
19. G. B. Martinenghi Oléagineux, **19**, 333 (1964).
20. V. Mazuelos, *Grasas y aceites*, **15**, 12 (1964).
21. C. R. Scholfield, H. J. Dutton, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **35**, 495 (1958).
22. B. de Vries, *J. Chromatog.*, **14**, 525 (1964).
23. C. G. Youngs, H. R. Sallans, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **35**, 388 (1958).
24. R. A. Brett, *Nature*, **197**, 484 (1963).
25. A. K. Biswas, D. Ganguly, Там же, **188**, 57 (1960).
26. J. D. Brandner, R. L. Birkheimer, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **37**, 396 (1960).
27. J. D. Brandner, R. L. Birkheimer, Там же, **41**, 367 (1964).
28. A. Crossley, I. P. Freeman, B. J. F. Hudson, J. H. Pierce, *J. Chem. Soc.*, **1959**, 760.
29. F. H. Mattson, R. A. Volpenhein, *J. Lipid. Res.*, **3**, 281 (1962).
30. D. Buchnea, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **64**, 887 (1962).
31. D. J. Hanahan, *Lipide chemistry*, N. Y., Wiley, 1960.

32. P. E. Verkade, *Rec. trav. chim.*, **85**, 426 (1966).
33. D. Chapman, A. Crossley, A. C. Davies, *J. Chem. Soc.*, **1957**, 1502.
34. L. Hartman, *Chem. Revs.*, **58**, 845 (1958).
35. T. P. Hilditch, P. N. Williams, *The Chemical Constitution of Natural Fats*, N. Y., Wiley, 1964.
36. D. Lefort, R. Perron, A. Pourchez, C. Madelmont, J. Petit, *J. Chromatogr.*, **22**, 266 (1966).
37. H. E. Longenecker, *Chem. Revs.*, **29**, 201 (1941).
38. T. Malkin, T. H. Bevan, *Progr. Chem. Fats. Lipids*, **4**, 64 (1957).
39. G. Clement, J. Clement, J. Bezard, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **8**, 238 (1962).
40. M. H. Coleman, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **38**, 685 (1961).
41. M. H. Coleman, *Там же*, **42**, 1040 (1965).
42. M. H. Coleman, W. C. Fullon, в кн. *Enzymes of Lipid Metabolism*, P. Desnuelle (ed.), L., Pergamon Press, 1961, стр. 127.
43. P. Desnuelle, *Adv. Enzymol.*, **23**, 129 (1961).
44. P. Desnuelle, P. Savary, *J. Lipid Res.*, **4**, 369 (1963).
45. H. J. Dutton, C. R. Scholfield, *Progr. Chem. Fats. Lipids*, **6**, 313 (1963).
46. B. Entressangles, P. Savary, P. Desnuelle, *Biochim. biophys. acta*, **84**, 140 (1964).
47. F. E. Luddy, R. A. Barford, S. F. Herb, P. Magidman, R. W. Riemschneider, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **41**, 693 (1964).
48. F. H. Mattson, L. Beck, *J. Biol. Chem.*, **219**, 735 (1956).
49. P. Savary, P. Desnuelle, *тм.⁴²*, стр. 138.
50. P. Savary, J. Flanz, P. Desnuelle, *Biochim. biophys. acta*, **24**, 414 (1957).
51. P. Savary, J. Flanz, P. Desnuelle, *Rev. franc. corps gras*, **5**, 493 (1958).
52. M. H. Coleman, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **40**, 568 (1963).
53. E. L. Jack, C. P. Freeman, L. M. Smith, *J. Dairy Sci.*, **46**, 284 (1963).
54. G. Lakshminarayana, *J. Sci. Ind. Res.*, **23**, 506 (1964).
55. J. Moore, D. Williams, *Biochim. biophys. acta*, **98**, 137 (1965).
56. L. J. Morris, S. W. Hall, *Lipids*, **1**, 188 (1966).
57. P. Savary, M. J. Constantin, P. Desnuelle, *Biochim. biophys. acta*, **48**, 562 (1961).
58. H. J. Ast, R. J. Vander Wal, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **38**, 67 (1961).
59. A. Dolev, H. S. Olcott, *Там же*, **42**, 11046 (1965).
60. F. D. Gunstone, R. J. Hamilton, M. I. Qureshi, *J. Chem. Soc.*, **1965**, 319.
61. G. Jurriens, B. de Vries, L. Schouten, *J. Lipid Res.*, **5**, 366 (1964).
62. F. H. Mattson, R. A. Volpenhein, *Там же*, **9**, 79 (1968).
63. C. G. Stinson, J. M. de Man, J. P. Bowland, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **44**, 253 (1967).
64. C. G. Youngs, *Там же*, **38**, 62 (1961).
65. B. Entressangles, H. Sari, P. Desnuelle, *Biochim. biophys. acta*, **125**, 597 (1966).
66. J. Clement, P. Boucrot, C. Lorette, J. Raulin, *Bull. soc. chim. biol.*, **45**, 1031 (1963).
67. G. V. Marinetti, *Biochim. biophys. acta*, **46**, 468 (1961).
68. F. H. Mattson, R. A. Volpenhein, *J. Lipid Res.*, **2**, 58 (1961).
69. R. A. Barford, F. E. Luddy, P. Magidman, *Lipids*, **1**, 287 (1966).
70. R. D. Harlow, C. Litchfield, H. C. Fu, R. Reiser, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 747 (1965).
71. O. Hirayama, *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 193 (1964).
72. M. McCarty, A. Kuksis, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **41**, 527 (1964).
73. E. Vioque, M. Maza, M. Calderon, *Grasas y aceites*, **15**, 173 (1964).
74. V. R. Huebner, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **36**, 262 (1959).
75. A. G. McInnes, N. H. Tattrie, M. Kates, *Там же*, **37**, 7 (1960).
76. H. P. Burchfield, E. E. Storrs, *Biochemical Applications of Gas Chromatography*, N. Y., Academic Press, 1962, стр. 488.
77. W. Tallent, R. Kleiman, *J. Lipid Res.*, **9**, 146 (1968).
78. K. T. Achaya, B. M. Craig, C. G. Youngs, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **41**, 783 (1964).
79. H. Brockerhoff, *J. Fish. Res. Board Canada*, **23**, 1835 (1966).
80. H. Brockerhoff, R. J. Hoyle, *Arch. Biochem. Biophys.*, **102**, 452 (1963).
81. G. K. Chacko, E. G. Perkins, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 1121 (1965).
82. J. Clement, J. Bezard, E. Courcel, *Biochim. biophys. acta*, **106**, 25 (1965).
83. P. Desnuelle, P. Savary, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **61**, 871 (1959).
84. F. D. Gunstone, F. B. Padley, *Chem. Phys. Lipids*, **1**, 110 (1967).
85. F. D. Gunstone, A. J. Sealy, *J. Chem. Soc.*, **1964**, 4407.
86. H. P. Kaufmann, H. Wessels, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **66**, 81 (1964).
87. C. Litchfield, M. Farquhar, R. Reiser, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **41**, 588 (1964).

88. E. G. Perkins, Там же, **41**, 285 (1964).
89. R. Reiser, H. G. R. Reddy, Там же, **36**, 97 (1959).
90. R. J. Vander Wal, Там же, **40**, 242 (1963).
91. R. J. Vander Wal, *Adv. Lipid Res.*, **2**, 1 (1964).
92. D. Wolf, L. Dugan, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **41**, 139 (1964).
93. J. Bezzard, J. Clement, *C. r.*, **259**, 3118 (1964).
94. M. L. Blank, O. S. Privett, *J. Dairy Sci.*, **47**, 481 (1964).
95. N. Bottino, G. A. Vandenburg, R. Reiser, *Lipids*, **2**, 489 (1967).
96. A. Boudreau, J. M. de Man, *Biochim. biophys. acta*, **98**, 47 (1965).
97. G. Garton, *J. Lipid Res.*, **4**, 237 (1963).
98. G. Garton, W. Duncan, *Biochim. biophys. acta*, **98**, 436 (1965).
99. F. D. Gunstone, R. J. Hamilton, F. B. Padley, M. I. Qureshi, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 965 (1965).
100. R. G. Jensen, J. Sampugna, G. W. Gander, *J. Dairy Sci.*, **44**, 1983 (1961).
101. R. G. Jensen, J. Sampugna, J. Quinn, D. L. Carpenter, T. A. Marks, J. A. Alford, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 1029 (1965).
102. A. Kuksis, W. C. Breckenridge, Там же, **42**, 978 (1965).
103. A. Kuksis, M. McCarthy, J. Beveridge, Там же, **40**, 530 (1963).
104. S. Kumar, T. I. Pynadath, K. Lalika, *Biochim. biophys. acta*, **42**, 373 (1960).
105. J. A. Lovorn, в кн. *Comprehensive Biochemistry*, M. Florkin (ed.), Amsterdam, Elsevier, **6**, 52 (1965).
106. L. M. Smith, C. P. Freeman, E. L. Jack, *J. Dairy Sci.*, **48**, 531 (1965).
107. M. Yurkis, H. Brockerhoff, *Biochim. biophys. acta*, **125**, 55 (1966).
108. P. Desnuelle, M. Burnet, *Bull. soc. chim. France*, **1956**, 268.
109. A. R. S. Kartha, *J. Sci. Ind. Res.*, **18A**, 304 (1959).
110. A. R. S. Kartha, Там же, **21A**, 577 (1962).
111. A. R. S. Kartha, *Indian J. Chem.*, **2**, 199 (1964).
112. J. A. Alford, J. L. Smith, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 1038 (1965).
113. H. Brockerhoff, R. J. Hoyle, *Biochim. biophys. acta*, **98**, 435 (1965).
114. H. Brockerhoff, J. Stewart, W. Tacreiter, *Canad. J. Biochem.*, **45**, 421 (1967).
115. G. W. Gander, R. G. Jensen, *J. Dairy Sci.*, **43**, 1762 (1960).
116. F. D. Gunstone, *Chem. a. Ind.*, **1965**, 762.
117. M. Barber, T. D. Merren, N. Kelly, *Tetrahedron Letters*, **1964**, 1063.
118. W. Schlenk, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 945 (1965).
119. H. Brockerhoff, R. J. Hoyle, N. Wolmark, *Biochim. biophys. acta*, **110**, 67 (1966).
120. L. J. Morris, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **18**, 495 (1965).
121. C. Litchfield, R. Reiser, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **40**, 749 (1963).
122. H. Brockerhoff, *Lipids*, **1**, 162 (1966).
123. L. J. Morris, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 340 (1965).
124. E. H. Ahrens, *J. Lipid Res.*, **8**, 523 (1967).
125. H. Brockerhoff, Там же, **6**, 10 (1965).
126. H. Hirschmann, *J. Biol. Chem.*, **235**, 2762 (1960).
127. N. H. Tattrie, *J. Lipid Res.*, **1**, 60 (1959).
128. R. Maier, R. T. Holman, *Biochemistry*, **3**, 270 (1964).
129. H. W. Sprecher, R. Maier, M. Barber, R. T. Holman, Там же, **4**, 1856 (1965).
130. M. Bagby, C. Smith, *Biochim. biophys. acta*, **137**, 475 (1967).
131. R. Kleiman, R. W. Miller, F. R. Earle, I. A. Wolff, *Lipids*, **1**, 286 (1966).
132. R. Kleiman, R. W. Miller, F. R. Earle, I. A. Wolff, Там же, **2**, 473 (1967).
133. N. H. Tattrie, R. A. Bailey, M. Kates, *Arch. Biochem. Biophys.*, **78**, 319 (1958).
134. R. E. Anderson, N. R. Bottino, R. Reiser, *Lipids*, **2**, 440 (1967).
135. H. Brockerhoff, *J. Lipid Res.*, **8**, 167 (1967).
136. H. Brockerhoff, R. J. Hoyle, P. C. Huang, *Canad. J. Biochem.*, **44**, 1519 (1966).
137. W. E. M. Lands, R. A. Pieringer, P. M. Slakey, A. Zschocke, *Lipids*, **1**, 444 (1966).
138. W. E. M. Lands, P. M. Slakey, Там же, **1**, 295 (1966).
139. R. G. Jensen, J. Sampugna, J. Quinn, Там же, **1**, 294 (1966).
140. P. M. Slakey, W. E. M. Lands, Там же, **3**, 30 (1968).
141. P. M. Slakey, W. E. M. Lands, R. A. Pieringer, *Federation Proc.*, **25**, 521 (1966).
142. D. Chapman, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **37**, 73 (1960).
143. D. Chapman, *Chem. Revs.*, **62**, 433 (1962).
144. D. Chapman, *The Structure of Lipids by Spectroscopic and X-ray Techniques*, L. Methuen, 1965.
145. H. J. Deuel, *The Lipids. Their Chemistry and Biochemistry*, N. Y., Interscience, 1951.
146. F. D. Gunstone, *Chem. a. Ind.*, **1964**, 84.

147. F. D. Gunstone, *An Introduction to the Chemistry and Biochemistry of Fatty Acids and Their Glycerides*, L., Chapman and Hall, 1967.
148. C. W. Hoerr, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **37**, 539 (1960).
149. L. Ivanovszky, *Seifen, Öle, Fette, Wachse*, **92**, 535 (1966).
150. W. Landmann, N. V. Lovegren, R. O. Feuge, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **38**, 681 (1961).
151. K. Larsson, *Acta chem. scand.*, **20**, 2255 (1966).
152. H. Nakajima, *J. Phys. Soc. Japan*, **16**, 1778 (1961).
153. L. W. Phipps, *Nature*, **193**, 541 (1962).
154. E. Sambuc, *Rev. franc. corps gras*, **11**, 319 (1964).
155. Л. Б. Арутюнова, Г. Б. Равич, *ДАН*, **148**, 89 (1963).
156. Г. Б. Равич, Б. Н. Егоров, Б. Г. Крылов, *Изв. АН СССР, ОХН*, 1963, 481.
157. N. Albon, A. Packer, *Nature*, **207**, 1088 (1965).
158. W. Q. Braun, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **32**, 633 (1955).
159. D. Chapman, *J. Chem. Soc.*, **1957**, 2715.
160. D. Chapman, R. C. Richards, R. W. Yorke, *Nature*, **183**, 44 (1959).
161. J. Clifford, *Там же*, **195**, 568 (1962).
162. W. Landmann, R. O. Feuge, N. V. Lovegren, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **37**, 638 (1960).
163. O. T. Quimby, R. L. Wille, E. S. Lutton, *Там же*, **30**, 186 (1953).
164. J. Taylor, W. Pohle, R. Gregory, *Там же*, **41**, 177 (1964).
165. R. Wille, E. S. Lutton, *Там же*, **43**, 491 (1966).
166. E. S. Lutton, F. R. Hugenberg, *J. Chem. Eng. Data*, **5**, 489 (1960).
167. D. Chapman, *J. Chem. Soc.*, **1963**, 131.
168. N. V. Lovegren, R. O. Feuge, W. Landmann, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **41**, XVI (1964).
169. E. S. Lutton, *Там же*, **34**, 521 (1957).
170. E. S. Lutton, *Там же*, **43**, 509 (1966).
171. M. L. Meara, *J. Chem. Soc.*, **1949**, 2154.
172. K. Terada, M. J. Sano, *J. Japan. Oil Chem. Soc.*, **11**, 400 (1962).

Институт физиологии растений
АН СССР, Москва