

DOI: 10.26896/1028-6861-2018-84-2-18-23

УДК (UDC) 543.054:543.635.32

ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ ПРИ АНАЛИЗЕ МАСЛА С РАДИКАЛАМИ ЖИРНЫХ КИСЛОТ, СОДЕРЖАЩИХ СОПРЯЖЕННЫЕ ДВОЙНЫЕ СВЯЗИ: МАСЛО МОМОРДИКИ КОХИНХИНСКОЙ

© Виктор Иванович Дейнека, Ань Нгуен Ван,
Людмила Александровна Дейнека

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород, Россия;
e-mail: deineka@bsu.edu.ru

Статья поступила 29 марта 2017 г.

Предложен способ пробоподготовки масла семян момордики кохинхинской (*Momordica cochinchinensis*), учитывающий высокую химическую лабильность соединений, содержащих сопряженные С=С-связи. Способ включает экстракцию при комнатной температуре и очистку методом твердофазной экстракции (ТФЭ). Для экстракции масла из семян можно воспользоваться *n*-гексаном. В таком случае экстракт может быть непосредственно очищен сорбцией на насадочных картриджах, заполненных силикагелем. Однако перед очисткой необходимо убедиться в отсутствии каталитической активности сорбента по отношению к лабильным сопряженным триеновым соединениям. Установлено, что при сорбции на силикагеле некоторых коммерческих марок вещества, содержащиеся в масле, могут быстро разрушиться. При использовании предложенного способа масляность семян была оценена на уровне 53 %, и после очистки было получено прозрачное масло с коэффициентом преломления 1,503, типичным для масел с высоким содержанием ненасыщенных соединений. Методом обращенно-фазовой ВЭЖХ установлено, что масло имеет тот же набор триацилглицеринов (ТАГ), что и масло момордики другого вида — момордики харанция (*M. charantia*), и содержит ди- α -элеостеарат-стеарат в качестве основного компонента ($47,9 \pm 0,5$ моль %). Каждый из триацилглицеринов имеет изомер, в котором радикал β -элеостеариновой кислоты заменяет один радикал α -элеостеариновой кислоты. Жирнокислотный состав масла, рассчитанный по составу ТАГ, следующий: $62,1 \pm 0,3$ % суммы элеостеариновых, $11,2 \pm 0,3$ % линолевой, $5,5 \pm 0,2$ % олеиновой, $1,5 \pm 0,2$ % пальмитиновой и $19,7 \pm 0,4$ % стеариновой кислот.

Ключевые слова: пробоподготовка; твердофазная экстракция; растительные масла; *Momordica cochinchinensis*; кислоты с сопряженными двойными связями; ВЭЖХ.

FEATURES OF SAMPLE PREPARATION FOR ANALYSIS OF SEED OIL WITH CONJUGATE FATTY ACIDS: *Momordica cochinchinensis* SEED OIL

© Victor I. Deineka, Nguen Van Ahn, Ludmila A. Deineka

Belgorod State National Research University, Belgorod Russia; e-mail: deineka@bsu.edu.ru

Submitted March 29, 2017.

A method of gac (*Momordica cochinchinensis*) seed oil sample preparation is proposed with allowance for high chemical lability of the compounds containing conjugated C=C-bonds. The method includes extraction at room temperature and purification by solid-phase extraction (SPE), *n*-hexane being a convenient solvent for oil extraction from seeds and the extract can be directly purified by oil sorption on the syringe (packed)cartridges filled with silica gel. However, before cleaning, it is necessary to verify the absence of catalytic activity of the sorbent towards chemically labile conjugated trienoic compounds. It has been shown that some commercial grades of silica gel can quickly disintegrate the oil. Using the developed method we obtained transparent seed oil with a refractive index of 1.503 typical for highly unsaturated oils, the oil content of seeds being 53%. Data of reversed-phase HPLC revealed the same set of triacylglycerols (TAG) characteristic of another *Momordica* species bitter melon (*M. charantia*) and contains di- α -eleostearate-stearate as a main component (47.9 ± 0.5 mol. %), each of triacylglycerol set has isomers wherein the radical of α -eleostearic acid is replaced by radical of α -eleostearic acid. Fatty acid composition of the oil, calculated from TAG composition contains: $62.1 \pm 0.3\%$ eleostearic acids, $11.2 \pm 0.3\%$ linoleic, $5.5 \pm 0.2\%$ oleic, $1.5 \pm 0.2\%$ palmitic and $19.7 \pm 0.4\%$ stearic acids.

Keywords: sample preparation; solid phase extraction; vegetable oil; *Momordica cochinchinensis*; acids with conjugated double bonds; HPLC.

Масла, образованные жирными кислотами с сопряженными двойными связями, представляют большой интерес как в фармакологии (в качестве активных ингредиентов различного назначения [1, 2]), так и в лакокрасочной промышленности (в качестве пленкообразующих веществ [3]). Но соединения с сопряженными двойными связями обладают высокой химической активностью, легко вступая в ряд превращений. Этим можно объяснить тот факт, что по данным ряда публикаций [4, 5] α -элеостеариновую кислоту (9с,11т,13т-октадекатриеновую кислоту) не обнаружили в масле косточек вишни. Ее потерю можно объяснить разрушением при получении метиловых эфиров для последующего определения продуктов метилирования методом газовой хроматографии. О масштабе такой потери можно судить по данным о том, что содержание α -элеостеариновой кислоты (ЭСК) в масле косточек вишен может превышать 15 % [6].

Как при отжиме масел, так и при его экстракционном выделении из исходного сырья получают сложную смесь веществ. Среди них могут быть и вещества, ухудшающие качество масла, и вещества, мешающие последующему определению основных компонентов. Поэтому для получения качественного масла используют различные методы его очистки.

Сорбционная очистка путем твердофазной экстракции [7] может быть простым и быстрым способом пробоподготовки образцов перед анализом методом ВЭЖХ. Если в качестве сорбента использовать силикагель, то триацилглицерины (ТАГ), содержащие три сложноэфирные группировки, могут быть отделены от менее полярных соединений, а также от более полярных — диацилглицеринов, свободных кислот [8] и фосфолипидов. Но по нашему опыту полиеновые соединения (например, каротиноиды) при сорбции на силикагелях некоторых торговых марок быстро разрушаются. Поэтому необходим предварительный контроль активности силикагеля по отношению к сорбируемому материалу.

Цель настоящей работы — разработка методов выделения и очистки масла семян *Momordica cochinchinensis* (момордики кохинхинской, — популярного во Вьетнаме растения) и определение жирнокислотного и видового состава его триацилглицеринов. Растение было выбрано по той причине, что в единственном доступном для нас обстоятельном исследовании [9] сопряженные триеновые кислоты в масле семян этого растения не были обнаружены вообще, хотя публикаций о высоком содержании ЭСК в масле семян момордики другого вида — момордики харанция (*M. charantia*) — много [10]. Поэтому в настоящей работе акцент сделан на пробоподготовке —

экстракции и очистке, которые должны быть выполнены так, чтобы не возникло нежелательных артефактов.

Семена момордики кохинхинской были доставлены из Вьетнама (окрестности Ханоя, урожай 2015 г.), семена момордики харанция получили из растений, выращенных в Белгороде.

Масла из измельченных семян экстрагировали тремя растворителями различной полярности, для оценки которой использовали предложенный Снайдером [11] параметр P' : неполярным n -гексаном ($P' = 0,1$), смесью n -гексана со среднеполярным дихлорметаном ($P' = 3,1$) в соотношении 1:1 по объему и полярным ацетоном ($P' = 5,1$).

Для предотвращения разрушения сопряженных полиеновых соединений экстракцию проводили без нагревания. К навеске размолотых в фарфоровой ступке семян массой $2,0 \pm 0,1$ г добавляли 10 мл растворителя, тщательно растирали фарфоровым пестиком, после отстаивания экстракт отделяли от осадка при помощи шприца. К остатку добавляли новую порцию растворителя, и все последовательные экстракты объединяли в одной колбе. Полноту экстракции контролировали спектрофотометрическим методом — до прозрачности последнего экстракта при 274 нм ($A < 0,02$).

Массу экстрагированного масла определяли гравиметрическим способом после отгонки растворителя из объединенного экстракта при помощи вакуумного ротационного испарителя при температуре термостата 35 °С.

Твердофазную очистку масла выполняли на насадочных картриджах ДИАПАК С (Био-ХимМак СТ, Москва). Предварительно через насадку пропускали 6 мл n -гексана, а затем — 20 мл раствора масла в n -гексане с концентрацией ~10 мг/мл. Масло десорбировали с силикагеля дихлорметаном (порциями по 1 мл); растворитель удаляли с помощью вакуумного ротационного испарителя.

Для оценки сохранности масла в сорбированном состоянии вначале из очищенного масла момордики выделили основной компонент триацилглицеринового комплекса (ди- α -элеостеарат-стеарат, α -Э₂С) в условиях полупрепаративной хроматографии. Для этого использовали хроматограф Shimadzu LC20 с хроматографической колонкой 250 × 10 мм SUPELCOSIL™ LC-18,5 мкм и спектрофотометрическим детектором ($\lambda = 270$ нм). В качестве подвижной фазы использовали смесь пропанола-2 и ацетона в объемном отношении 1:1.

Из полученного образца приготовили раствор α -Э₂С в n -гексане (3,0 мг/мл) и по 1 мл полученного раствора перенесли в вials, добавив по 0,2 г сорбента. В течение заданного времени

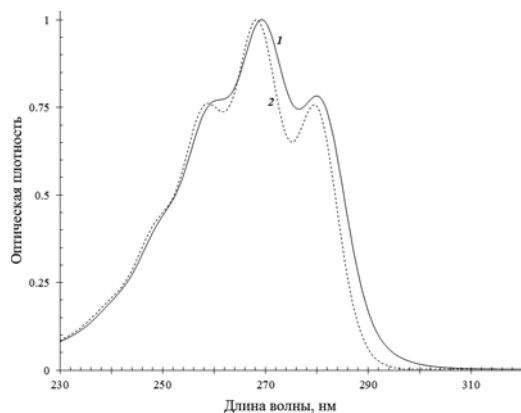


Рис. 1. Спектр экстракта масла момордики кохинхинской: 1 — спектр основных компонентов; 2 — спектр веществ, изомерных основным

смесь периодически встряхивали при комнатной температуре вне доступа прямого солнечного света, затем сорбент отделяли от раствора, сорбат экстрагировали ацетоном (растворитель удаляли с помощью вакуумного ротационного испарителя) и остаток растворяли в подвижной фазе для ВЭЖХ определения.

Для анализа масел методом обращенно-фазовой ВЭЖХ использовали хроматограф Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектором и колонкой 250 × 4 мм Kromasil 100-5C18 ($\lambda = 274$ нм). В качестве подвижной фазы применяли смесь пропанола-2 и ацетонитрила в объемном отношении 2:3 (1 мл/мин), температура термостата колонки — 25 °С.

Отличительной особенностью спектров поглощения сопряженных полиеновых соединений является их электронно-колебательная структура [12], полосы в которой соответствуют переходам электрона из основного колебательного состояния основного электронного состояния вследствие «вертикальности» (т. е. запаздывания изменения ядерной конфигурации при изменении электронного состояния) переходов на несколько различных колебательных состояний первого возбужденного электронного состояния. Именно такого типа спектры были получены нами для масла момордики кохинхинской (рис. 1).

В спектре (см. рис. 1) отчетливо видны три максимума при $\lambda = 282$, 271 и 263 (плечо) нм (в смеси ацетонитрила и пропанола-2 в объемном отношении 70:30). При этом положение самого длинноволнового максимума (282 нм) свидетельствует о присутствии веществ с тремя сопряженными C=C-связями [13]. Сравнение спектра этого масла со спектром масла момордики харанция показало их сходство, что свидетельствует в пользу присутствия в масле именно α -элеостеариновой кислоты.

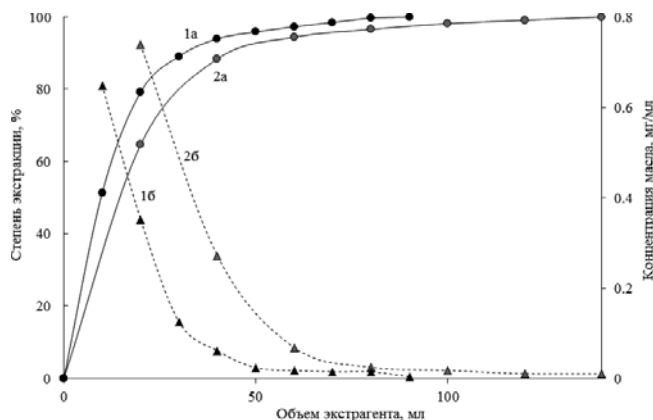


Рис. 2. Зависимость степени экстракции (а) и концентрации масла семян момордики кохинхинской (б) от объема экстрагента (*n*-гексана): 1 — при экстракции порциями по 10 мл; 2 — 20 мл

Контроль экстракции масла. Из-за высокой химической лабильности сопряженных полиеновых соединений экстракция кипящим растворителем в аппарате Сокслета исключена, поэтому в работе использовали экстракцию растворителями из измельченных семян при комнатной температуре.

Из данных, представленных на рис. 2, следует, что экстракция порциями по 10 мл *n*-гексана немного удобнее экстракции порциями по 20 мл: для извлечения 97 % масла из семян необходимо провести четыре экстракции порциями по 20 мл (суммарный объем экстрагента — 80 мл) или шесть экстракций порциями по 10 мл (60 мл). Экспериментально было установлено, что замена *n*-гексана на его смеси с метилхлоридом, пропанолом-2 или ацетоном практически не влияла на степень извлечения масла из семян. Значения масличности семян, найденные по экстракции *n*-гексаном и его смесью с метилхлоридом, оказались статистически неразличимы: $53,0 \pm 1,0$ и $52,8 \pm 0,5$ % соответственно ($n = 3$; $P = 95$ %). Коэффициент преломления полученного масла составил $1,503 \pm 0,001$ ($n = 6$; $P = 95$ %), что свидетельствует о его высокой ненасыщенности и несколько превышает этот показатель для масла семян момордики харанция [13].

Контроль каталитической активности сорбента. О необходимости очистки масла момордики от сопутствующих примесей свидетельствует тот экспериментальный факт, что в образце неочищенного экстракта, хранившемся в бытовом холодильнике в течение нескольких месяцев, степень разрушения триацилглицеринов превысила 50 %.

В целях проверки применимости силикагеля для твердофазной экстракции масла превращение индивидуально выделенного ди- α -элеостеарат-стеарата контролировали методом ВЭЖХ (рис. 3).

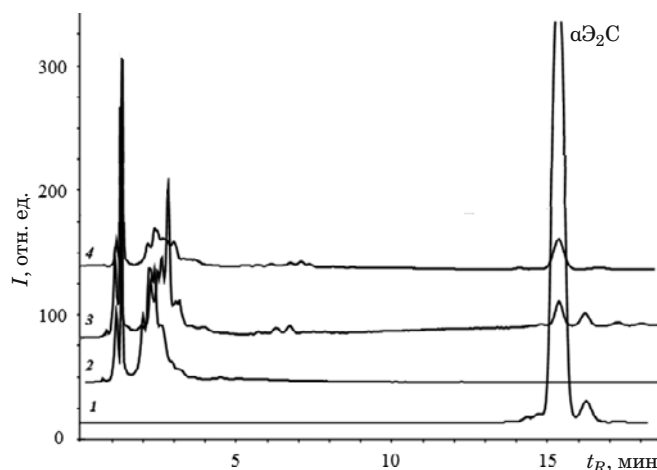


Рис. 3. Хроматограммы исходного ди- α -элеостеарат-стеарата (1) и десорбированного после ТФЭ через 2 суток с силикагелем различных марок: 2 — КСМГ; 3 — КСКГ; 4 — ДИАПАК С (БиоХимМак СТ, Москва)

По приведенным на рис. 3 хроматограммам видно, что исходный образец содержал 95,5 % $\alpha\text{-Э}_2\text{С}$ и 4,5 % изомеров (хроматограмма 1), но при контакте с силикагелем марки КСМГ в течение двух суток (хроматограмма 2) эти соединения полностью разрушились. На силикагеле марки КСКГ (хроматограмма 3) степень превращения исходных триацилглицеринов составила 88 ± 3 % (для трех параллельных наблюдений). Более того, на силикагеле, использованном для заполнения концентрирующих насадочных картриджей ДИАПАК С (БиоХимМак СТ, Москва), за это же время разрушение также примерно столь же велико (82 ± 5 %, хроматограмма 4).

Мы исследовали возможность использования указанных выше картриджей при меньшем времени контакта. При этом было установлено, что за время порядка 0,5 – 1,0 ч степень превращения $\alpha\text{-Э}_2\text{С}$ составляет 0,3 – 0,9 %. Следовательно, патроны ДИАПАК С можно использовать для твердофазной очистки масел с радикалами октадекатриеновых кислот, но время контакта образца с сорбентом не должно превышать 1 ч.

Твердофазная очистка масла на насадочных картриджах. Для твердофазной очистки раствор масла в *n*-гексане с концентрацией 10 мг/мл пропускали через насадочный картридж порциями по 1 мл, определяя концентрацию масла спектрофотометрическим (или — для суммы — гравиметрическим) методом. Полученные результаты представлены на рис. 4.

Из представленных данных следует, что практически без проскока может быть сорбировано 10 мл раствора масла в *n*-гексане. Для рекстракции масла в работе использовали дихлорметан (порциями по 1 мл), контролируя элюат спектрофотометрическим и хроматографическим методами. Оказалось, что для практически пол-

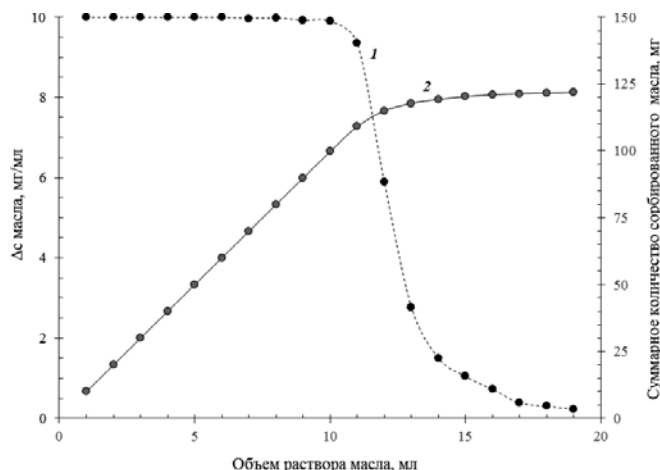


Рис. 4. Зависимость параметров сорбции от объема раствора масла на насадочном картридже ДИАПАК С: 1 — уменьшение концентрации масла в элюате; 2 — суммарное количество сорбированного масла, мг/картридж

ной десорбции масла достаточно использовать 4 мл растворителя.

Растворитель из полученного элюата удаляли с помощью вакуумного ротационного испарителя, получая прозрачное, не содержащее твердых включений масло. В то же время сложная гетерогенная смесь образовывалась при удалении растворителя из первичного экстракта.

При твердофазной очистке из 122 ± 5 мг неочищенного масла было получено 108 ± 5 мг очищенного масла, т. е. в масле содержалось около 12 % более липофильных (по сравнению с триацилглицеринами) примесей, и выход масла составил немногим более 88 %.

Отметим, что предельная сорбция картриджей по маслу момордики была оценена на уровне 120 мг/картридж.

Определение видового состава триацилглицеринов. Для определения видового состава масла использовали неводный вариант обращенно-фазовой ВЭЖХ с элюентами системы «ацетонитрил — пропанол-2». Видовой состав триацилглицеринов рассчитывали по инкрементному подходу [14], а количественные данные — по площадям пиков с поправкой на число радикалов α -элеостеариновой кислоты в соединении. Представленная на рис. 5 хроматограмма показывает, что масла двух видов момордики (кохинхинской и харанция) содержат одни и те же компоненты, но в несколько различающихся соотношениях.

Состав триацилглицеринов масла семян момордики кохинхинской: Э_3 — $6,7 \pm 0,2$; $\text{Э}_2\text{Л}$ — $9,1 \pm 0,3$; $\text{Э}_2\text{О}$ — $4,0 \pm 0,3$; $\text{Э}_2\text{П}$ — $4,6 \pm 0,5$; $\text{Э}_1\text{О}$ — $3,8 \pm 0,3$; $\text{Э}_2\text{С}$ — $47,9 \pm 0,7$ и $\text{Э}_1\text{С}$ — $11,2 \pm 0,6$ % мол. ($n = 5$; $P = 0,95$). Триацилглицерины (ТАГ) обозначали принятым для химии масел способом, указывая радикалы кислот, образовавших соединение (без диффе-

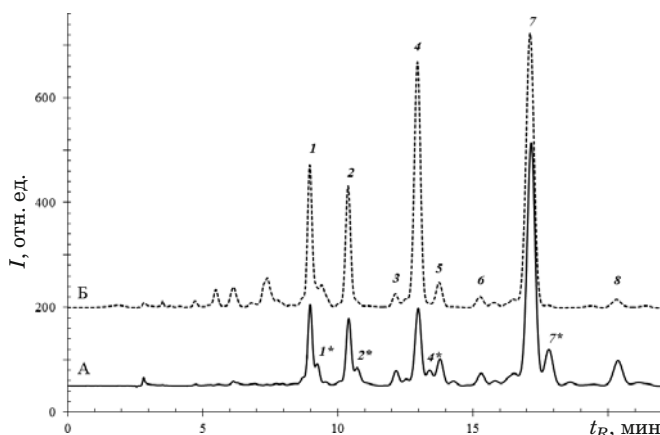


Рис. 5. Хроматограммы масел семян двух видов момордики — кохинхинской (А) и харанция (Б): 1 — α -Э₃; 2 — α -Э₂Л; 3 — α -ЭЛ₂; 4 — α -Э₂О; 5 — α -Э₂П; 6 — α -ЭЛО; 7 — α -Э₂С; 8 — α -ЭЛС (знаком «*» отмечены соединения, в которых вместо одного радикала α -элеостеариновой кислоты присутствует радикал β -элеостеариновой кислоты)

ренциации их положения в молекуле), например, Э₂Л — ТАГ, содержащий два радикала элеостеариновых ($\alpha + \beta$) кислот и один радикал линолевой; буквами О, П и С обозначены радикалы олеиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот соответственно. На хроматограмме знаком «*» отмечены некоторые пики веществ, полученных заменой одного радикала α -элеостеариновой на радикал β -элеостеариновой (9*t*, 11*t*, 13*t*-октадекатриеновой) кислоты, что проявляется в гипсохромном сдвиге максимумов абсорбции при замене *цис*-конфигурации одной из сопряженных С=С-связей на *транс*-конфигурацию (см. рис. 1).

В соответствии с расчетом по ТАГ жирнокислотный состав масла момордики кохинхинской следующий: $62,1 \pm 0,3$ % α -элеостеариновой, $11,2 \pm 0,3$ % линолевой, $5,5 \pm 0,2$ % олеиновой, $1,5 \pm 0,2$ % пальмитиновой и $19,3 \pm 0,4$ % стеариновой кислот ($n = 5$; $P = 0,95$).

Таким образом, пробоподготовка образцов растительных масел к последующему хроматографическому анализу методом твердофазной экстракции требует тщательного контроля каталитической активности силикагеля. Использование силикагеля как самого популярного сорбента в практике химических лабораторий может оказаться неприемлемым из-за разрушения лабильных органических соединений в сорбционном слое, что может привести к ошибочным выводам о составе исследуемой смеси.

ЛИТЕРАТУРА

1. Khanal R. C. Potential Health Benefits of Conjugated Linoleic Acid (CLA): A Review / Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2004. Vol. 17. N 9. P 1315 – 1328.
2. Kobo K., Belury M. B., Sugano M. Potential health benefits of conjugated trienoic acids / Lipids. 2007. Vol. 19. N 9. P. 200 – 203.

3. Biermann U., Butte W., Holtgreffe R., et al. Esters of calendula oil and tung oil as reactive diluents for alkyd resins / Eur. J. Lipid. Sci. Tech. 2010. Vol. 112. P 103 – 109.
4. Farrohi F., Mehran M. Oil characteristics of sweet and sour cherry kernels / J. Amer. Oil Chem. Soc. 1975. Vol. 52. P 520 – 521.
5. Lazos E. S. Composition and oil characteristics of apricot, peach and cherry kernel / Grasas y Aceites. 1991. Vol. 42. P 127 – 131.
6. Górnaś P., Rudzińska M., Raczyk M., et al. Composition of bioactive compounds in kernel oils recovered from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) by-products: Impact of the cultivar on potential applications / Ind. Crops Prod. 2016. Vol. 82. P 44 – 50.
7. Żwir-Ferenc A., Biziuk M. Solid Phase Extraction Technique — Trends, Opportunities and Applications / Polish J. Environ. Stud. 2006. Vol. 15. N5. P 677 – 690.
8. Ruiz-Gutiérrez V., Pérez-Camino M. C. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds / J. Chromatogr. A. 2000. Vol. 885. P 321 – 341.
9. Ishida B. K., Turner C., Chapman M. H., et al. Fatty Acid and Carotenoid Composition of Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) Fruit / J. Agric. Food Chem. 2004. Vol. 52. P 274 – 279.
10. Yoshime L. T., de Melo I. L. P., Sattler J. A. G., et al. Bitter gourd (*Momordica charantia* L.) seed oil as a naturally rich source of bioactive compounds for nutraceutical purposes / Nutrire. 2016. Vol. 41. P 12.
11. Johnson A. R., Vitha M. F. Chromatographic selectivity triangles / J. Chromatogr. A. 2011. Vol. 1218. P 556 – 586.
12. Ruger R., Niehaus T., van Lenthe E. L., et al. Vibrationally resolved UV/Vis spectroscopy with time-dependent density functional based tight binding / J. Chem. Phys. 2016. Vol. 145. 184107.
13. Hopcins C. Y., Chisholm M. J. Identification of conjugated triene fatty acids in certain seed oils. I / Canad. J. Chem. 1962. Vol. 40. P 2078 – 2082.
14. Дейнека В. И., Староверов В. М., Фофанов Г. М. и др. Инкрементный подход при определении состава триглицеридов / Хим.-фарм. журн. 2002. Т. 36. № 7. С. 44 – 47.

REFERENCES

1. Khanal R. C. Potential Health Benefits of Conjugated Linoleic Acid (CLA): A Review / Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2004. Vol. 17. N 9. P 1315 – 1328.
2. Kobo K., Belury M. B., Sugano M. Potential health benefits of conjugated trienoic acids / Lipids. 2007. Vol. 19. N 9. P. 200 – 203.
3. Biermann U., Butte W., Holtgreffe R., et al. Esters of calendula oil and tung oil as reactive diluents for alkyd resins / Eur. J. Lipid. Sci. Tech. 2010. Vol. 112. P 103 – 109.
4. Farrohi F., Mehran M. Oil characteristics of sweet and sour cherry kernels / J. Amer. Oil Chem. Soc. 1975. Vol. 52. P 520 – 521.
5. Lazos E. S. Composition and oil characteristics of apricot, peach and cherry kernel / Grasas y Aceites. 1991. Vol. 42. P 127 – 131.
6. Górnaś P., Rudzińska M., Raczyk M., et al. Composition of bioactive compounds in kernel oils recovered from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) by-products: Impact of the cultivar on potential applications / Ind. Crops Prod. 2016. Vol. 82. P 44 – 50.
7. Żwir-Ferenc A., Biziuk M. Solid Phase Extraction Technique — Trends, Opportunities and Applications / Polish J. Environ. Stud. 2006. Vol. 15. N5. P 677 – 690.
8. Ruiz-Gutiérrez V., Pérez-Camino M. C. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds / J. Chromatogr. A. 2000. Vol. 885. P 321 – 341.
9. Ishida B. K., Turner C., Chapman M. H., et al. Fatty Acid and Carotenoid Composition of Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) Fruit / J. Agric. Food Chem. 2004. Vol. 52. P 274 – 279.
10. Yoshime L. T., de Melo I. L. P., Sattler J. A. G., et al. Bitter gourd (*Momordica charantia* L.) seed oil as a naturally rich source of bioactive compounds for nutraceutical purposes / Nutrire. 2016. Vol. 41. P 12.

11. **Johnson A. R., Vitha M. F.** Chromatographic selectivity triangles / *J. Chromatogr. A*. 2011. Vol. 1218. P. 556 – 586.
12. **Ruger R., Niehaus T., van Lenthe E. L., et al.** Vibrationally resolved UV/Vis spectroscopy with time-dependent density functional based tight binding / *J. Chem. Phys.* 2016. Vol. 145. 184107.
13. **Hopkins C. Y., Chisholm M. J.** Identification of conjugated triene fatty acids in certain seed oils. I / *Canad. J. Chem.* 1962. Vol. 40. P. 2078 – 2082.
14. **Deineka V. I., Staroverov V. M., Fofanov G. M., et al.** An Increment Approach to the HPLC Analysis of Triglycerides / *Pharm. Chem. J.* 2002. Vol. 36. P. 392 – 395.