



УДК 661.732.8:547.395:577.161.4

## МЕТОД ПРЕПАРАТИВНОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ АВТООКИСЛЕНИЯ ЛИНОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ И ИХ ИДЕНТИФИКАЦИЯ С ПОМОЩЬЮ <sup>1</sup>H-ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

© 1995 г. В. В. Чудинова\*, М. В. Чудинов, С. В. Еремин, С. М. Алексеев

*Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова  
117571, Москва, просп. Вернадского, 86*

Поступила в редакцию 30.06.94 г.

Жидкофазным окислением линолевой кислоты в диффузной системе в темноте при 2 - 5°C получены три типа ее окисгенированных производных. Для их анализа и препаративного выделения предложен эффективный метод ВЭЖХ на нитрильной фазе, позволивший получить индивидуальные структурные изомеры каждого типа соединений. Предварительная идентификация с помощью химических, хроматографических методов и УФ-спектрофотометрии показала, что выделенные соединения представляют собой 9- и 13-*цис-транс*-изомеры гидроперокси-, гидроксид- и кетооктадекадиеновых кислот; кроме того, в минорных количествах образуются и *транс-транс*-региоизомеры гидропероксидов линолевой кислоты. Полная расшифровка <sup>1</sup>H-ЯМР-спектров полученных соединений, в том числе и спектров, снятых с гомоядерной развязкой от протонов, полностью подтвердила предварительную идентификацию. Предполагается, что образование при низких температурах автоокисления линолевой кислоты в основном *цис-транс*-изомеров окисгенированных продуктов связано в невозможностью преодоления энергетического барьера изомеризации первичного пероксирадикала жирной кислоты.

*Ключевые слова: полиненасыщенные жирные кислоты; перекисное окисление, выделение и идентификация продуктов, ВЭЖХ, <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопия.*

Перекисное окисление липидов приводит к образованию целого ряда соединений, которые играют центральную роль в различных биохимических процессах. В нормальных условиях преобладает ферментативное окисление, однако и автоокисление занимает немаловажное место, поскольку приводит к дестабилизации, изменению функциональных свойств и даже разрушению биологических мембран [1, 2]. В связи с этим исследования процессов автоокисления полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в различных условиях и идентификация продуктов оказываются весьма актуальными, поскольку позволяют судить о возможных механизмах образования соединений, дестабилизирующих биомембраны.

Кроме того, на сегодняшний день остается почти нерешенной проблема получения в препаративных количествах неэтерифицированных продуктов автоокисления ПНЖК – изомерных гидроперокси- и кетокислот. В большинстве работ анализ изомерного состава продуктов автоокисления и их препаративное выделение с помощью ВЭЖХ проводят, используя метиловые эфиры ПНЖК и восстановленную форму их гидропе-

роксидов – соответствующие гидроксипроизводные метиловых эфиров ПНЖК [3]. Это обусловлено тем, что гидропероксиды ПНЖК – соединения весьма лабильные и частично разлагаются уже в условиях анализа.

Таким образом, в задачу нашей работы входило исследование процесса автоокисления линолевой кислоты, разработка метода препаративного выделения продуктов ее окисления, а также их идентификация различными химическими, хроматографическими и спектральными методами.

В качестве метода оксигенации линолевой кислоты нами было выбрано жидкофазное автоокисление в диффузной системе (без дополнительного притока кислорода) в темноте при пониженной температуре (2 - 5°C). Линолевая кислота была предварительно очищена колоночной хроматографией на силикагеле. Контроль процесса автоокисления с помощью ТСХ (условия приведены в "Экспериментальной части") показал, что в выбранных условиях в течение первых 20 сут окисление идет медленно. Затем, после расходования приблизительно 10% линолевой кислоты, начинается быстрое накопление ее окисгенированных производных. После 30 сут окисления степень превращения исходного вещества была 68%.

\* Автор для переписки.

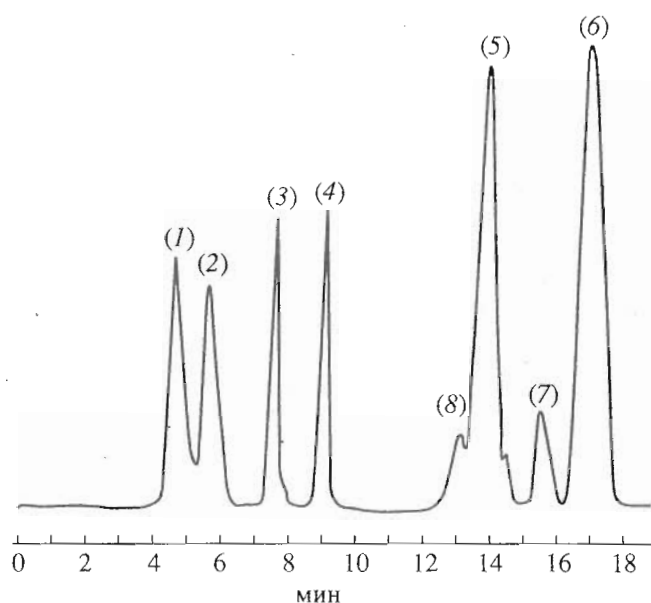


Рис. 1. ВЭЖХ смеси продуктов автоокисления линолевой кислоты (рефрактометрическая детекция).

При этом нам не удалось зафиксировать стадию образования только первичных продуктов окисления – гидропероксидов линолевой кислоты. Одновременно с ними в реакционной массе накапливались и вторичные продукты, что, по-видимому, связано с присутствием микропримесей ионов переходных металлов, содержащихся в силикагеле. Эти ионы способны катализировать расщепление гидропероксильных групп и тем самым превращение первичных продуктов окисления во вторичные [4].

После 30 сут окисления реакционную массу подвергли хроматографическому разделению на силикагеле, элюируя системой гексан–этилацетат, 95 : 5. Отсутствие в элюенте кислоты значительно повышает устойчивость окисгенированных производных линолевой кислоты на силикагеле, однако снижает селективность разделения. Основная фракция продуктов содержала, по данным ТСХ, три группы веществ. Для их анализа и препаративного разделения с помощью ВЭЖХ был подобран оптимальный сорбент (данные не показаны). Обращенно-фазовая хроматография не обеспечивает разделения изомерных продуктов автоокисления линолевой кислоты. ВЭЖХ на силикагеле обладает достаточной селективностью, но в кислых условиях наблюдается разложение анализируемых веществ. Мы остановили свой выбор на нитрильном сорбенте, поскольку он имеет существенные преимущества перед силикагелем: малое время уравнивания колонки, высокую стабильность сорбента в кислых условиях, необходимых для разделения неэтерифицированных производных ПНЖК, и устойчивость самих веществ в условиях анализа без перевода их

в эфиры или восстановления гидропероксидов. Кроме того, нитрильная фаза обладает достаточной селективностью при ВЭЖХ как в аналитическом режиме, так и в препаративных масштабах. И наконец, подобранная нами система (условия ВЭЖХ приведены в “Экспериментальной части”) позволила одновременно анализировать все три класса полученных соединений.

Для идентификации соединений (1) – (7) (рис. 1), выделенных с помощью препаративной ВЭЖХ, были использованы хроматографические, химические и спектральные методы.

Соединения (5) – (7) имели одинаковую подвижность при ТСХ и давали положительную реакцию при обнаружении раствором KI. УФ-спектры этих веществ также оказались идентичными и характеризовались максимумом поглощения при 234 нм, демонстрирующим наличие сопряженной системы двух двойных связей [5]. Таким образом, мы предположили, что вещества (5) – (7) представляют собой изомерные гидропероксиды линолевой кислоты.

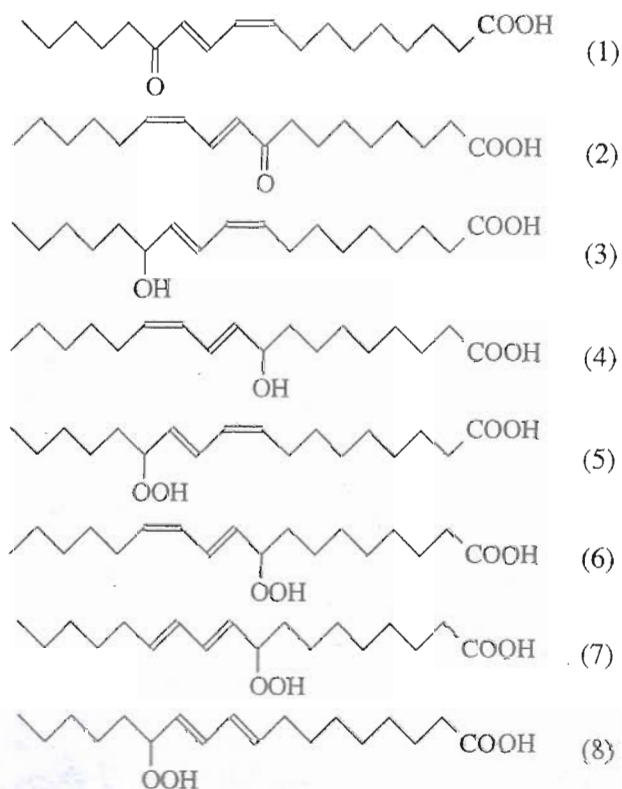
Использование в качестве стандартов ферментативно полученных гидропероксидов линолевой кислоты позволило идентифицировать соединения (5) и (6) как (9Z,11E)-13-гидроперокси-9,11- и (10E,12Z)-9-гидроперокси-10,12-октадекадиеновые кислоты соответственно.

В литературе указывается на образование при автоокислении ПНЖК как *цис-транс*-, так и *транс-транс*-изомеров гидропероксидов [3]. Поэтому соединение (7), по-видимому, представляет собой гидропероксид линолевой кислоты с *транс-транс*-конфигурацией двойных связей, однако установить положение гидропероксильной группы химическими и хроматографическими методами не удавалось.

Соединения (3) и (4) не реагировали при обработке пластинок раствором KI и имели максимум поглощения в УФ-области спектра при 234 нм (так же как вещества (5) и (6)), т.е. не содержали гидропероксильной группы и имели систему двух сопряженных двойных связей. Кроме того, восстановление боргидридом натрия соединений (5) и (6), отнесенных к изомерным гидропероксидам линолевой кислоты, дало соединения (3) и (4) соответственно (определено с помощью ВЭЖХ). Совокупность этих данных позволила сделать вывод, что вещества (3) и (4) представляют собой (9Z,11E)-13-гидрокси-9,11- и (10E,12Z)-9-гидрокси-10,12-октадекадиеновые кислоты соответственно.

Продуктами восстановления кислот (1) и (2) боргидридом натрия также оказались соединения (3) и (4) (по данным ВЭЖХ). Однако соединения (1) и (2) имели в УФ-спектре максимум поглощения при 278 нм, характерный для сопряженной системы из двух двойных связей и карбонильной группы [5]. Кроме того, при обработке пластинок ТСХ

спиртовым раствором ванилина, кислоты (1) и (2) обнаруживали бордовое окрашивание, характерное для веществ, содержащих кетогруппу [6]. Поэтому соединения (1) и (2) были идентифицированы как (9*Z*,11*E*)-13-кето-9,11- и (10*E*,12*Z*)-9-кето-10,12-октадекадиеновые кислоты соответственно.



Для непосредственного подтверждения молекулярной структуры образовавшихся продуктов автоокисления линолевой кислоты был применен метод  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии (рис. 2).

Высокая эффективность использованного метода препаративного разделения изомерных продуктов дала возможность выделить индивидуальные вещества с чистотой более 90% и получить спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР области двойных связей (рис. 3) с высоким разрешением. В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектрах область двойных связей для региоизомеров одного класса соединений оказалась идентичной, поэтому на рис. 3 приведены по одному спектру "а" для кислот (5) и (6), "б" для кислоты (7), "в" для кислот (3) и (4) и "г" для (1) и (2).

Все образовавшиеся продукты автоокисления линолевой кислоты дают четыре эквивалентных по интегральной интенсивности мультиплета в области двойных связей в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре. Исходя из литературных данных по идентификации (9*Z*,11*E*)- и (9*E*,11*E*)-октадекадиеновых кислот [7], 13-гидропероксидов линолевой и линоленовой кислот [14], основных правил анализа спектров первого порядка [8] и известных констант спин-спинового расщепления для протонов при *цис*- и *транс*-двойных связях и для протонов метиле-

новых групп (6–12, 12–18 и 7–8 Гц соответственно) [9] мы полностью расшифровали спектры продуктов автоокисления линолевой кислоты. Отношение основных сигналов приведено в табл. 1.

Необходимо отметить, что мультиплетность сигналов в области двойных связей продуктов автоокисления линолевой кислоты с *цис-транс*-конfigurацией двойных связей была ниже, чем у соответствующей (9*Z*,11*E*)-октадекадиеновой кислоты [7], что существенно облегчило анализ спектров. Такое снижение мультиплетности, по-видимому, связано с экранированием системы сопряженных двойных связей соседним электроотрицательным атомом кислорода и, как следствие, уменьшением дальних взаимодействий, приводящих к дополнительному спин-спиновому расщеплению.

Спектр соединения (7) в области двойных связей принципиально отличался от спектра (9*E*,11*E*)-октадекадиеновой кислоты, в которой система сопряженных двойных связей симметрична. Симметричная конъюгированная система *транс-транс*-двойных связей дает в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре два сигнала от попарно магнитно эквивалентных внешних и внутренних атомов водорода, причем эти сигналы представляют собой сложные мультиплеты, анализ которых возможен только с использованием подходов, разработанных для систем, характеризующихся сильным спин-спиновым взаимодействием между ядрами [7]. Однако введение гидропероксильной группы приводит к исчезновению симметрии системы двойных связей, и в спектре соединения (7) (рис. 3) наблюдается четыре эквивалентных по интенсивности мультиплета с константами спин-спинового взаимодействия 15 Гц, характерными для *транс*-двойных связей.

Таким образом, анализ спектров, приведенных на рис. 3, позволил непосредственно подтвердить, что продукты автоокисления линолевой кислоты (1) – (6) содержат *цис-транс*-сопряженную систему двойных связей, а кислота (7) – *транс-транс*-конъюгированную систему. Кроме того, из рис. 2 видно, что химический сдвиг атома водорода при углероде, несущем функциональные группы, различен для 9- и 13-замещенных изомеров. Для 9-замещенных изомеров во всех случаях сигнал атомов водорода, ближайших к функциональным группам, сдвинут в сторону сильных полей. Указанные различия позволяют определить положение функциональных групп в региоизомерах и идентифицировать соединение (7) как (10*E*,12*E*)-9-гидроперокси-10,12-октадекадиеновую кислоту.

Метод  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии с гомоядерной развязкой от протонов позволяет также непосредственно определить, с какой стороны к системе сопряженных двойных связей присоединена функциональная группа. Спектры с развязкой от

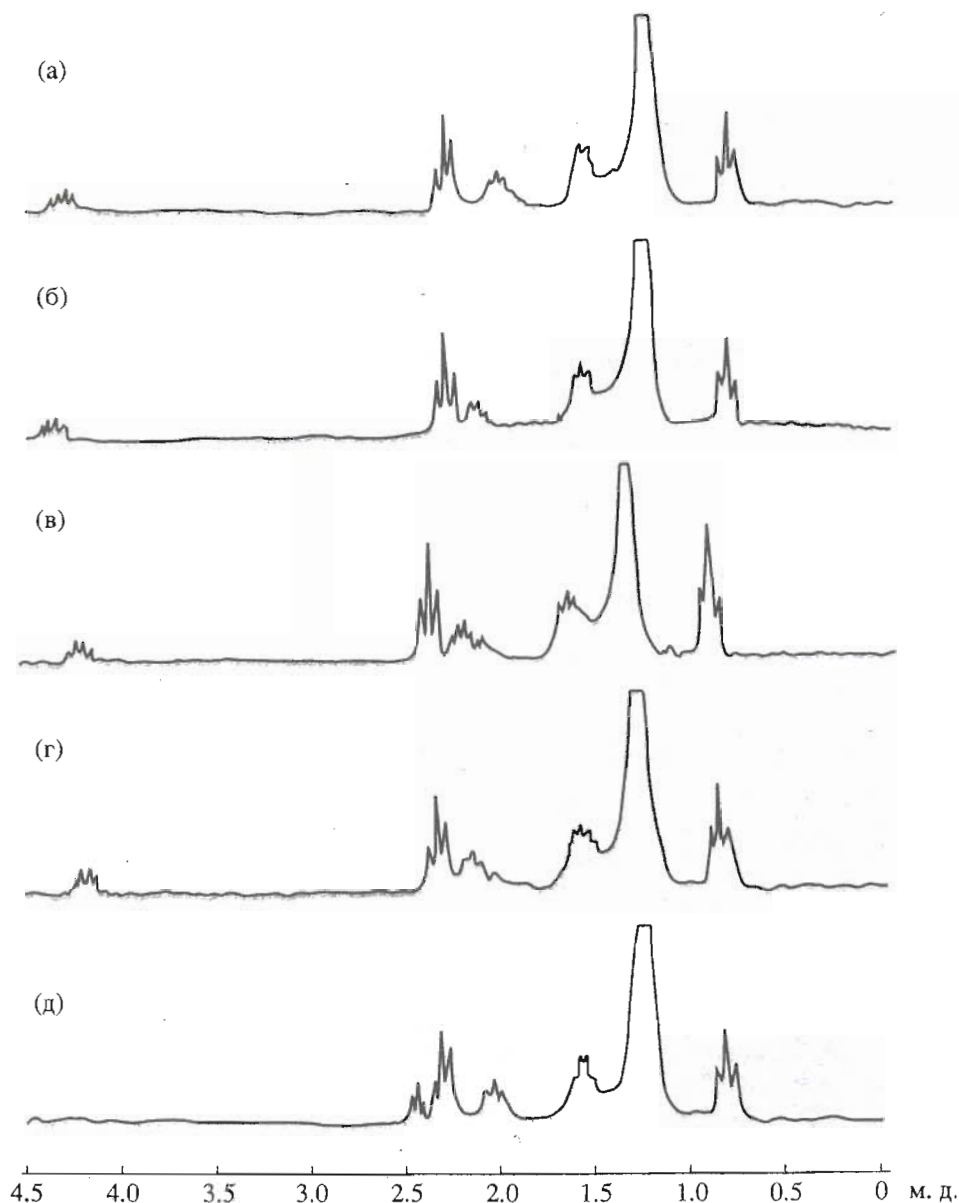


Рис. 2.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектры продуктов автоокисления линолевой кислоты в области 0 - 4,5 м. д. а - спектр соединений (6) и (7), б - (5), в - (4), г - (3), д - (1) и (2). Структурные формулы соединений (1) - (7) приведены в тексте.

атома водорода при углероде, несущем гидропероксильную или гидроксильную группу, представлены на рис. 4, а их расшифровка - в табл. 2.

У соединений (3) - (7) сигнал внешнего атома водорода *транс*-двойной связи представляет собой дублет дублетов за счет расщепления на внутреннем атоме водорода *транс*-двойной связи ( $J$  15 Гц) и на атоме водорода у третичного углерода, связанного с функциональной группой ( $J$  7 Гц) (рис. 3). Для этих соединений гомоядерная развязка от атома водорода при углероде, несущем функциональную группу, приводит к исчезновению дополнительного расщепления (дублет вместо дублета дублетов) (рис. 4). Величина

константы спин-спинового расщепления дублета (15 Гц) позволяет сделать однозначный вывод, что ближайшая к функциональной группе двойная связь во всех полученных продуктах автоокисления имеет *транс*-конфигурацию. Кроме того, структура спектра гидропероксидов линолевой кислоты с *цис-транс*-конфигурацией двойных связей (5) и (6), снятого с развязкой от атома водорода (рис. 4), аналогична структуре спектра кетосоединений (1) и (2) (рис. 3). Сигнал внешнего атома водорода *транс*-двойной связи в обоих случаях представляет собой дублет ( $J$  15 Гц), т.е. расщепление происходит только за счет взаимодействия с внутренним атомом водорода *транс*-связи,

Таблица 1. Отнесение основных сигналов в <sup>1</sup>H-ЯМР-спектрах продуктов автоокисления линолевой кислоты

Соединение	Номер протона	Химический сдвиг, δ, м. д.	Мультиплетность*	КССВ, Гц
(5) и (6)	2	5.50**	дт	$J_{1,2} 7$
(5) и (6)	5	5.60**	дд	$J_{6,5} 7; J_{4,5} 15$
(5) и (6)	3	6.00	дд	$J_{2,3} = J_{4,5} = 10$
(5) и (6)	4	6.60	дд	
(5)	6	4.35	дт	$J 7$
(6)	6	4.30	дт	$J 7$
(7)	5	5.50	дд	$J_{6,5} 7; J_{4,5} 15$
(7)	2	5.76	дт	$J_{1,2} 7; J_{3,2} 15$
(7)	3	6.20	дд	$J_{4,3} 10$
(7)	4	6.35	дд	
(7)	6	4.30	дт	$J 7$
(3) и (4)	2	5.45	дт	$J_{1,2} 7$
(3) и (4)	5	5.68	дд	$J_{6,5} 7; J_{4,5} 15$
(3) и (4)	3	5.98	дд	$J_{2,3} = J_{4,3} = 10$
(3) и (4)	4	6.50	дд	
(3)	6	4.20	дт	$J 7$
(1) и (2)	2	5.40***	м	
(1) и (2)	5	5.38***	д	$J_{4,5} 15$
(1) и (2)	3	5.97	дд	$J_{2,3} = J_{4,3} = 10$
(1) и (2)	4	6.15	дд	
(1) и (2)	6	2.55	т	$J 7$

\* м – мультиплет; д – дублет; дд – дублет дублетов; дт – дублет триплетов; т – триплет.

\*\* Мультиплет, в котором можно выделить наложенные сигналы.

\*\*\* Неразрешенный мультиплет с наложенным дублетом.

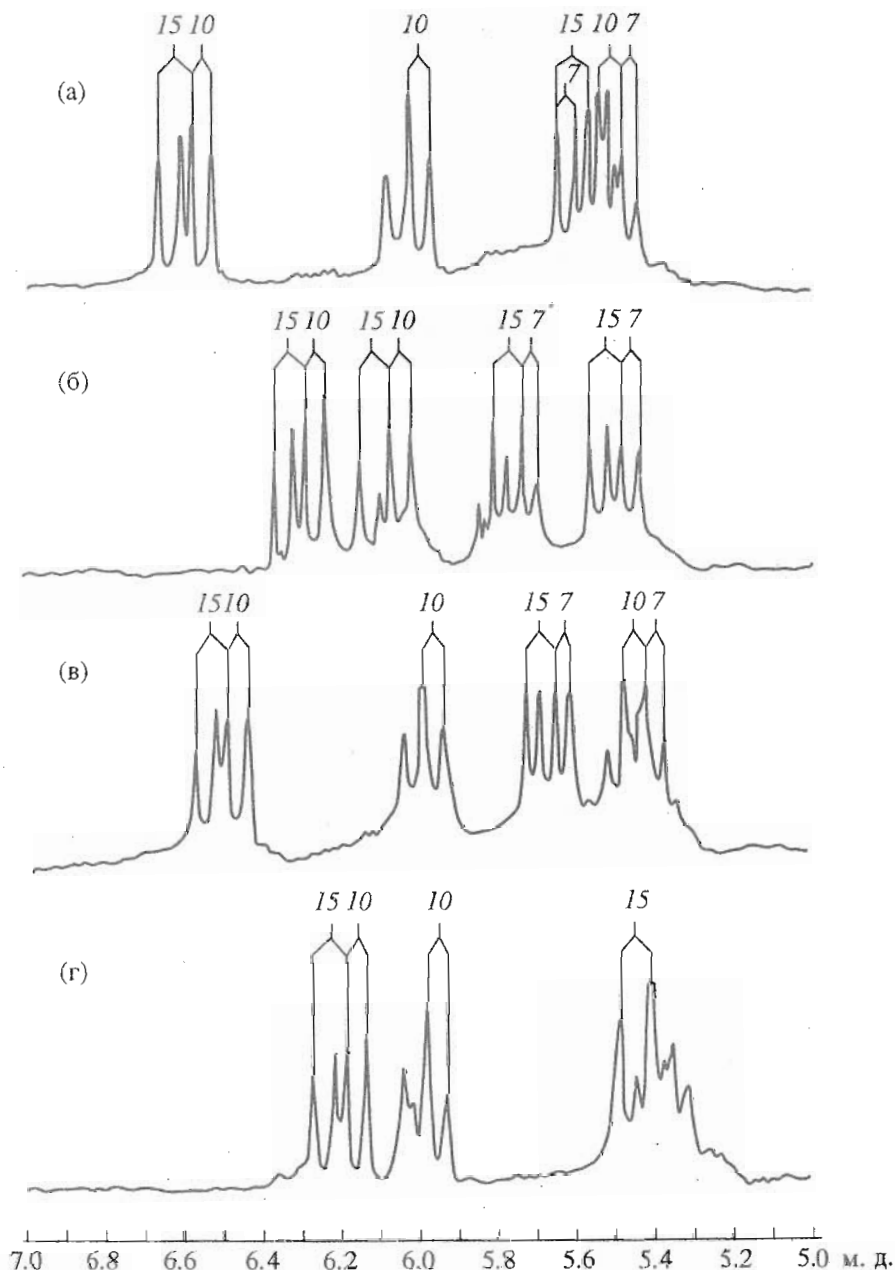


Рис. 3. Область двойных связей (5 - 7 м. д.) в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектрах продуктов автоокисления линолевой кислоты. Над пиками указаны величины констант спин-спинового взаимодействия в герцах. Спектр а относится к соединениям (5) и (6), б - к (7), в - к (3) и (4), г - к (1) и (2). Структурные формулы области двойных связей соединений (1) - (7) приведены в табл. 1.

а в  $\alpha$ -положении к двойной связи атомы водорода, способные давать дополнительное расщепление, отсутствуют. Это еще раз подтверждает правильность идентификации всех полученных соединений.

Таким образом, при определении структуры продуктов было получено полное соответствие между данными хроматографического, химического и спектрального анализов, т. е. установлено, что при автоокислении линолевой кислоты в диффузной системе в темноте при температуре 2 - 5°C образуются в основном (10*E*,12*Z*)-9-гидро-

перокси-10,12- (6), (9*Z*,11*E*)-13-гидроперокси-9,11- (5), (9*Z*,11*E*)-9-гидрокси-9,11- (4), (9*Z*,11*E*)-13-гидрокси-9,11- (3), (10*E*,12*Z*)-9-кето-10,12- (2) и (9*Z*,11*E*)-13-кето-9,11- (1) октадекадиеновые кислоты. Кроме того, зафиксировано образование минорных количеств (10*E*,12*E*)-9-гидроперокси-10,12-октадекадиеновой кислоты (7). По-видимому, образуется и соответствующий (9*E*,11*E*)-13-гидроперокси-9,11-изомер (пик  $\delta$  на рис. 1), но его не удалось выделить в количестве, достаточном для идентификации.

Таблица 2. Отнесение основных сигналов в <sup>1</sup>H-ЯМР-спектрах продуктов автоокисления линолевой кислоты, снятых с развязкой от атома водорода при атоме углерода, несущем функциональную группу

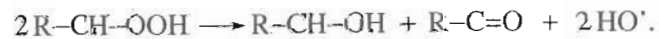
Соединение	Номер протона	Химический сдвиг, δ, м. д.	Мультиплетность*	КССВ, Гц
(5) и (6)	2	5.50**	м	—
(5) и (6)	5	5.60**	д	$J_{4,5}$ 15
(5) и (6)	3	6.00	дд	$J_{2,3} = J_{4,3} = 10$
(5) и (6)	4	6.60	дд	
(7)	5	5.50	д	$J_{4,5}$ 15
(7)	2	5.76	дт	$J_{1,2}$ 7; $J_{3,2}$ 15
(7)	3	6.20	дд	$J_{4,3}$ 10
(7)	4	6.35	дд	
(3) и (4)	2	5.35	дт	$J_{1,2} = J_{3,2} = 10$
(3) и (4)	5	5.68	д	$J_{4,5}$ 15
(3) и (4)	3	5.98	дд	$J_{4,3}$ 10
(3) и (4)	4	6.50	дд	

\* Сокращение для обозначения мультиплетности см. табл. 1.  
 \*\* Мультиплет с наложенным дублетом.

Обращает на себя внимание то, что в выбранных условиях автоокисления линолевой кислоты образуются в основном *цис-транс*-оксигенированные соединения, количественное соотношение соответствующих *Z, E*- (6) и *E, E*- (7) 9-гидропероксидов было 5 : 1, а количества образовавшегося (*9E,11E*)-13-гидропероксиизомера (8) оказалось недостаточно для препаративного выделения. В то же время в литературе указывается на образование как *цис-транс*-, так и *транс-транс*-продуктов оксигенирования [3]. Однако образование *транс-транс*-соединений предполагает изомеризацию первичного *цис-транс*-пероксирадикала [10], что, по-видимому, в нашем случае не происходит. Это можно объяснить условиями автоокисления. Ве-

роятно, низкие температуры не дают возможности преодолеть энергетический барьер изомеризации.

Основными продуктами автоокисления линолевой кислоты в выбранных условиях были гидроперокси- (5 - 7), гидрокси- (3, 4) и кето- (1, 2) кислоты, образовавшиеся в соотношении 3 : 1 : 1 (по данным ВЭЖХ). Первичные продукты свободнорадикального оксигенирования – гидропероксиды линолевой кислоты, – по-видимому, претерпевают каталитическое расщепление в присутствии содержащихся в системе ионов металлов [4].



Кроме того, гомолитическое расщепление гидропероксидов с образованием гидроксильного

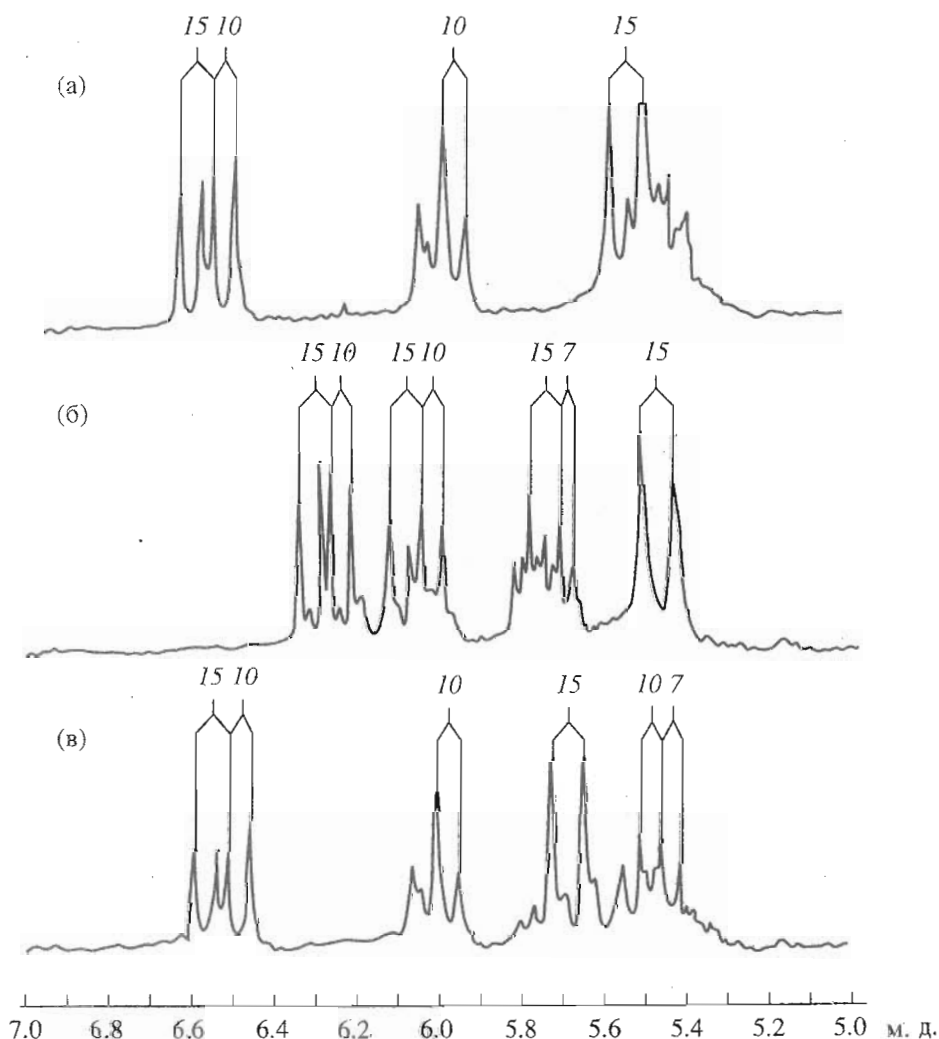


Рис. 4.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектры продуктов автоокисления линолевой кислоты, снятых с развязкой от протонов при атоме углерода, несущем функциональную группу (табл. 2) (область двойных связей – 5–7 м. д.). а – спектр соединений (5) и (6), б – (7), в – (3) и (4). Над пиками указаны величины констант спин-спинового взаимодействия в герцах.

радикала, обладающего высокой активностью, может объяснить особенности динамики процесса автоокисления линолевой кислоты при достаточно низких температурах.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали линолеовую кислоту, полученную из подсолнечного масла, с содержанием основного вещества 99% (по данным ГЖХ), очищенную колоночной хроматографией на силикагеле L40/100 мкм в системе гексан–этилацетат, 95 : 5.

Автоокисление линолевой кислоты проводили в объеме 5 мл без дополнительного доступа кислорода в темноте при 2–5°C в течение 30 сут. Непрореагировавшую линолеовую кислоту отделяли от продуктов ее автоокисления колоночной хроматографией на силикагеле L40/100 мкм в си-

стеме гексан–этилацетат, 95 : 5, а основную фракцию окисгенированных производных элюировали системой гексан–этилацетат, 90 : 10.

ТСХ проводили на силуфоле в системе гексан–эфир–уксусная кислота, 8 : 7 : 0.1, обнаружитель – 1% спиртовой раствор ванилина, содержащий 3% серной кислоты [6]. Гидропероксиды линолевой кислоты обнаруживали также водным раствором KI.

ВЭЖХ осуществляли на жидкостном хроматографе Клапек, снабженном рефрактометрическим и УФ-детекторами. Обращенно-фазовую хроматографию проводили на колонке Ecoposil C18 (2.5 × 250 мм, 5 мкм) в системе ацетонитрил–вода, 85 : 15, хроматографию на прямой фазе – на колонке Силасорб 300 (2.5 × 250 мм, 5 мкм), элюент – гексан–этилацетат–трифторуксусная кислота, 70 : 30 : 0.3. Для ВЭЖХ на нитрильном сорбенте использовали колонку Nucleosil CN (8 × 250 мм,



5 мкм) и систему гексан-изопропанол-трифторуксусная кислота, 98 : 2 : 0,1. Скорость элюирования во всех случаях была 3 мл/мин. Для анализа на колонку наносили 1 - 2 мг смеси продуктов автоокисления или индивидуального вещества. Препаративное выделение изомерных гидроперокси-, гидроксид- и кетопроизводных линолевой кислоты осуществляли в тех же условиях, нанося на колонку 20 - 30 мг смеси продуктов автоокисления.

(9Z,11E)-13-гидроперокси-9,11- и (10E,12Z)-9-гидроперокси-10,12-октадекадиеновые кислоты, использованные в качестве стандартов, получали из линолевой кислоты ферментативным окислением липоксигеназами сои и картофеля по методам, описанным в работах [11] и [12] соответственно.

Гидроперокси- и кетопроизводные линолевой кислоты восстанавливали до соответствующих гидроксисоединений по методу [13].

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Beckman DU-8B в диапазоне 200 - 300 нм в метаноле.

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектры были записаны на приборе Bruker MSL-200 на рабочей частоте 200 МГц в дейтерохлороформе. Гомоядерную развязку осуществляли на частоте, соответствующей химическому сдвигу атома водорода при третичном атоме углерода, несущем функциональную группу.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Basage H.S.* // Biochem. and Cell Biol. 1990. V. 68. № 7 - 8. P. 989 - 998.
2. *Hallivell B., Gutteridge J.M.C.* // Arch. Biochem. and Biophys. 1990. V. 280. № 1. P. 1 - 8.
3. *Chan H.W.-S., Levett G.* // Lipids. 1977. V. 12. № 1. P. 99 - 104.
4. *Kowalska E., Naglik T.* // Acta biochim. pol. 1990. V. 37. № 1. P. 88 - 85.
5. *Frankel E.N.* // J. Amer. Oil Chem. Soc. 1984. V. 61. № 12. P. 1908 - 1917.
6. *Лурье А.А.* Хроматографические материалы (справочник). М.: Мир., 1978. С. 377.
7. *Аникин А.В., Чупин В.В., Чудинов М.В., Серебренникова Г.А., Евстигнеева Р.П.* // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. № 2. С. 254 - 261.
8. *Эмсли Дж., Финей Дж., Сатклиф Л.* Спектроскопия ЯМР высокого разрешения. Т. 1. М.: Мир, 1968.
9. *Гордон А., Форд Р.* Спутник химика. М.: Мир, 1978. С. 302.
10. *Porter N.A., Wujec D.G.* // J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. № 12. P. 2626 - 2629.
11. *Graff G., Anderson L.A., Jaques L.W.* // Analyt. Biochem. 1990. V. 188. № 1. P. 38 - 47.
12. *Sekiya J., Aoshima H., Lajiwara T., Togo T., Hatanaka A.* // Agric. and Biol. Chem. 1977. V. 41. № 5. P. 817 - 832.
13. *Чудинова В.В., Захарова Е.И., Алексеев С.М., Евстигнеева Р.П.* // Биоорганическая химия. 1992. Т. 19. № 4. С. 505 - 510.
14. *Gardner H.W., Weisleden D.* // Lipids. 1972. V. 7. № 3. P. 191 - 193.

## Preparative Separation and <sup>1</sup>H NMR Identification of Products of Linoleic Acid Autooxidation

V. V. Chudinova\*, M. V. Chudinov, S. V. Eremin, and S. M. Alekseev

*Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia*

**Abstract** - Bulk phase oxidation of linoleic acid in a diffuse system in the dark at 2 - 5°C was found to produce three types of oxygenated derivatives. An effective method of HPLC on the nitrile phase was developed for the analysis and preparative isolation of products, which made it possible to prepare individual structural isomers of each type. After preliminary identification by chemical, chromatographic, and UV spectroscopic methods, the isolated compounds were identified as 9- and 13-isomers of hydroperoxy-, hydroxy-, and keto-octadecadienoic acids with Z-E-conjugated double bond systems. The formation of minor E-E-regioisomers of linoleic acid hydroperoxides was also observed. The assignment of signals in the <sup>1</sup>H NMR spectra of the compounds isolated, including homonuclear proton-decoupled spectra, validated the proposed structures. It is suggested that the preferable formation of Z-E-isomers of oxygenated products in the process of linoleic acid autooxidation under low temperature is connected with impossibility of overcoming the energy barrier of primary peroxyl radical isomerization.

**Key words:** polyunsaturated fatty acids, peroxidation, isolation and identification of products, high-performance liquid chromatography (HPLC), <sup>1</sup>H NMR spectroscopy.

\* To whom correspondence should be addressed.