

## БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 613.288:547.295]-074:543.42.062

Калинин А.В.<sup>1</sup>, Крашенинников В.Н.<sup>1</sup>, Титов В.Н.<sup>2</sup>

### СПЕКТРОМЕТРИЯ ИЗОМЕРОВ ТРИГЛИЦЕРИДОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ЖИРОМАСЛЯНЫХ ПРОДУКТАХ: СЛИВОЧНОМ И ПАЛЬМОВОМ МАСЛАХ

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт спектроскопии» РАН, 142190, Москва, Троицк;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ, 121552, Москва

*Известны различия физико-химических свойств и физиологической роли в организме позиционных изомерных форм триглицеридов жирных кислот (ЖК), потребляемых с пищей. Для дифференциации и анализа их содержания возможно применение спектроскопии комбинационного рассеяния света. Оба эти обстоятельства следует учитывать и использовать в решении практических задач диетологии, например в определении фальсификации и замены сливочного масла и спредов пальмовым маслом, а также при контроле соотношений ЖК, потребляемых пациентами с кардиологической и онкологической патологией.*

*Цель работы – определение возможности анализа позиционных изомеров ЖК, характерных для сливочного и пальмового масел, с помощью портативных и оперативных спектрометров поглощения в ближнем инфракрасном (БИК) диапазоне. С применением метода проекций на латентные структуры получены калибровки спектрометров для определения содержания 7 регламентированных ЖК и долей молочного жира и пальмового масла в жиромасляных смесях по спектрам рамановского и БИК-спектрометров. Подтверждена возможность идентификации позиционных изомеров животных и растительных триглицеридов по рамановским спектрам. Кроме того, установлено, что эффективность определения долей указанных выше жиров и масел (достоверность, точность и селективность определения) как по рамановским спектрам, так и по спектрам оптической плотности БИК-диапазона заметно выше показателей определения долей масел и жиров по содержанию семи ЖК. По нашему мнению, этот факт отражает чувствительность БИК-спектров поглощения не только к длине углеродной цепи и степени ненасыщенности (числу двойных связей C=C) ЖК, но и к позиционным изомерным формам триглицеридов. Полученные данные использованы для формулировки технических требований и условий применения портативного БИК-спектрометра для массового анализа жиромасляных продуктов.*

**Ключевые слова:** триглицериды жирных кислот; позиционные изомерные формы; ближняя ИК-спектроскопия; регрессия по проекциям на латентные структуры.

**Для цитирования:** Калинин А.В., Крашенинников В.Н., Титов В.Н.. Спектрометрия изомеров триглицеридов жирных кислот в жиромасляных продуктах: сливочном и пальмовом маслах. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (5): 260-267. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-260-267>

Kalinin A.V.<sup>1</sup>, Krasheninnikov V.N.<sup>1</sup>, Titov V.N.<sup>2</sup>

THE SPECTROMETRY OF ISOMERS OF TRIGLYCERIDES OF FATTY ACIDS IN FATTY BUTTERY PRODUCTS: BUTTER AND PALM OIL

<sup>1</sup>The Federal State Budget Institution of Science "The Institute of Spectroscopy" of the Russian Academy of Sciences, 142190, Moscow, Russia

<sup>2</sup>The Federal State Budget Institution "The National Medical Research Center of Cardiology" of Minzdrav of Russia, 121552, Moscow, Russia

*In organism, differences in physical chemical properties and physiological role of positional isomeric forms of triglycerides of fatty acids consumed with food are well known. The Raman spectroscopy to analyze there is possible to be applied. Both of these circumstances are to be considered and applied in resolving practical issues of dietetics, i.g., in detection of falsification and replacement of butter and spreads with palm oil, as well as in monitoring ratio of fatty consumed by patients with cardiologic and oncologic pathology. The purpose of study is to determine possibilities of analyzing positional fatty acids isomers specific for butter and palm oil using portable and operational spectrometers of absorption in near infrared range. The technique of projections on latent structures was applied to obtain calibrations of spectrometers to detect content of 7 regulated fatty acids and percentage of milk fat and palm oil in fat-oil mixtures according specters of Raman and near infrared range spectrometers. The possibility of identifying positional isomers of animal and vegetable triglycerides according Raman spectra was confirmed. Besides, it is established that efficiency of determining (reliability, accuracy and selectivity) the proportions of the above oils using both Raman spectra and near-infrared optical density spectra was much higher than when calculating the percentage of the same oils using the content of 7 fatty acids. This fact reflects sensitivity of near infrared range absorption spectra both to length of the carbon chain and degree of unsaturation (number of double bonds C=C) of fatty acids and positional isomeric forms of triglycerides. The obtained data are used in formulating technical requirements and conditions for application of portable near infrared range spectrometer for mass analysis of fat-oil products.*

**Key words:** triglycerides of fatty acids; positional isomeric forms; near infrared spectrometry; regression on projections to latent structures.

**Для корреспонденции:** Калинин Андрей Валентинович, канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. ФГБУН «Институт спектроскопии» РАН; e-mail: [kalinin@isan.troitsk.ru](mailto:kalinin@isan.troitsk.ru)

**For citation:** Kalinin A.V., Krashennnikov V.N., Titov V.N. *The spectrometry of isomers of triglycerides of fatty acids in fatty buttery products: butter and palm oil. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(5): 260-267. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-260-267>*

**For correspondence:** Kalinin A.V., candidate of physical mathematical sciences, senior researcher of the Federal State Budget Institution of Science "The Institute of Spectroscopy", e-mail: [kalinin@isan.troitsk.ru](mailto:kalinin@isan.troitsk.ru)

**Conflict of interests.** *The authors declare absence of conflict of interests.*

**Acknowledgment.** *The study was implemented with financial support of the Russian Foundation of Fundamental Studies in the Project № 16-02-00277.*

Received 23.10.2018  
Accepted 17.01.2018

**Введение.** Все природные жиры и масла состоят примерно на 98,5% из триглицеридов (ТГ) – эфиров разных жирных кислот (ЖК) с трёхатомным спиртом глицерином. ЖК отличаются числом атомов углерода в цепи и степенью ненасыщенности – числом двойных связей (ДС) и их положением между атомами углерода (C=C). Кроме того, ТГ ЖК отличаются позиционной изомерией – местом связи ЖК с атомами С глицерина: первичной эфирной связью в позиции sn-1 и sn-3 и вторичной эфирной связью в sn-2 (рис. 1).

Известно [1–3], что позиционные изомеры ТГ ЖК в пище клетки организма усваивают посредством специфических ферментов и активирующих их гормональных медиаторов, причём ЖК усваиваются наиболее полно преимущественно из позиции sn-2. В зависимости от того, какая ЖК этерифицирована в sn-2 с вторичной спиртовой группой глицерина, мы разделяем ТГ на пальмитиновые, олеиновые, стеариновые, линолевые и т. д.

Человек потребляет с пищей масла, которые получают при отжиме фруктов (оливковое), семян злаков (кукурузное), масличных культур (подсолнечное, льняное), бобовых растений (соевое, арахисовое), горчичных культур (рапсовое масло, *canolla oil*). Все растительные масла жидкие; в составе ТГ в sn-2 преобладают ненасыщенные ЖК, главным образом олеиновая мононенасыщенная ω-9, цис С18:1. В твёрдых жирах животного происхождения, например в сливочном жире из молока коров, в sn-2 доминирует С16:0 пальмитиновая насыщенная ЖК [4]. В свином жире сальника в sn-2 ТГ преобладает С14:0 миристиновая насыщенная ЖК (НЖК). Их также можно охарактеризовать по составу позиционных изомеров ТГ; в них этерифицированы главным образом миристиновая, пальмитиновая НЖК с температурой плавления +63°C и стеариновая ЖК с точкой плавления +73°C, в форме вплоть до афизиологичных позиционных изомеров ТГ, таких как пальмитоил-пальмитоил-пальмитат (ППП), трипальмитат, стеарил-стеарил-стеарат-глицерол, тристеарат.

Эти ТГ имеют высокую точку плавления и низкую скорость всех реакций метаболизма, в том числе и липолиза – освобождения ЖК из состава ТГ в форме свободных жирных кислот (СЖК) в межклеточную среду [5]. Пальмитиновые, стеариновые и миристиновые ТГ (миристоил-миристоил-пальмитолеат) придают жирам твёрдую консистенцию; твёрдыми являются говяжий, бараний жир, жир морских животных, например китовый. Жидкую фракцию липидов содержит гусиный жир; обусловлено это высокой мерой ненасыщенности ЖК (числом ДС в линолевых и линоленовых ТГ).

Несмотря на то что в ТГ пальмового масла этерифицировано около 50% пальмитиновой НЖК, в sn-2 с глицерином этерифицирована только олеиновая МЖК (моноеновая с одной ДС); на этом основании пальмовое

масло именуют «тропическим олеиновым маслом», по сути, это растительное оливковое масло. Ни оливковое, ни пальмовое масло не содержат пальмитиновых позиционных изомеров ТГ, таких как олеил-пальмитоил-олеат (ОПО), пальмитоил-пальмитоил-олеат (ППО) и олеил-пальмитоил-пальмитат (ОПП); все ТГ в пальмовом масле – олеиновые. Если в оливковом масле доминируют олеиновые ТГ, такие как олеил-олеил-олеат (ООО), и мало олеил-олеил-пальмитата (ООП), то в пальмовом масле в каждом из олеиновых ТГ этерифицирована одна пальмитиновая НЖК в sn-1 или sn-3. В пальмовом масле доминируют олеиновые позиционные изомеры ТГ, такие как пальмитоил-олеил-олеат (ПОО), ООП и пальмитоил-олеил-пальмитат (ПОП). В пальмовом масле вся пальмитиновая НЖК этерифицирована с первичными спиртовыми группами глицерина в sn-1 или sn-3; в sn-2 же со вторичной спиртовой группой всегда этерифицирована только олеиновая МЖК [6]. При гидролизе пальмового масла в тонкой кишке панкреатическая липаза освобождает пальмитиновую НЖК из sn-1- и sn-3- позиций ТГ в форме СЖК.

При высоком содержании пальмитиновой НЖК (≈ 40%) в растительном, олеиновом, пальмовом масле добавление его в пищу повышает содержание холестерина (ХС) в плазме крови, но повышение содержания ХС в липопротеидах низкой плотности (ХС-ЛПНП) у добровольцев в 4 раза менее выражено (лишь на 27%) по сравнению со сливочным жиром [7]. Важно понять причину столь незначительного повышения содержания ХС-ЛПНП в крови при добавлении в пищу пальмитиновой НЖК в составе олеиновых ТГ пальмового масла, в котором её больше, чем в пальмитиновых ТГ сливочного жира. На основании столь невыраженного повышения содержания ХС-ЛПНП нет оснований рассматри-

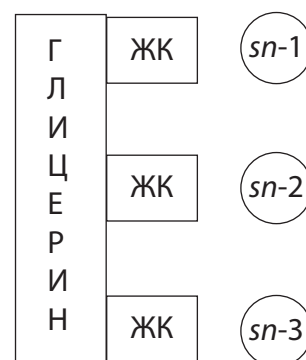


Рис. 1. Структура ТГ – эфиров трехатомного спирта глицерина и трёх ЖК: sn-1 и sn-3 – позиции этерификации ЖК с двумя первичными спиртовыми группами и sn-2 – со вторичной спиртовой группой.

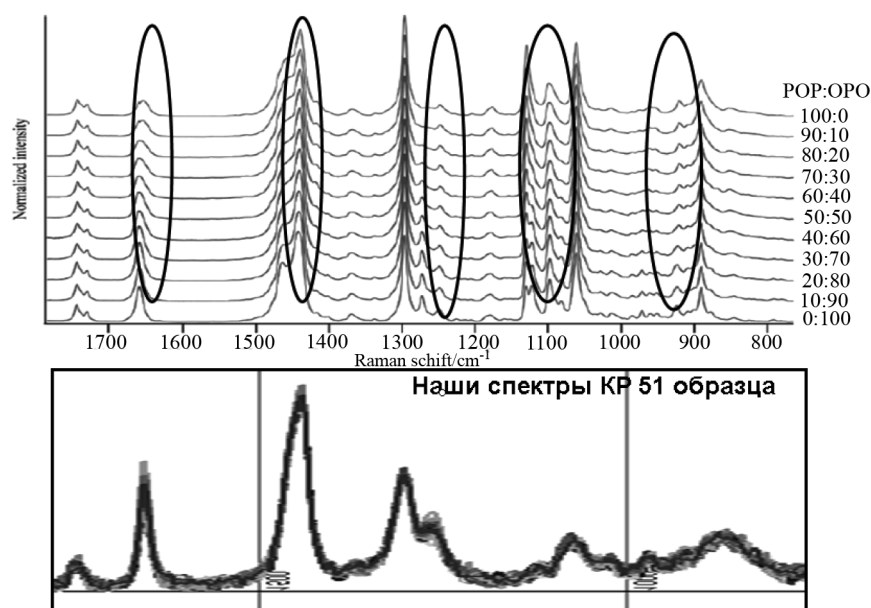


Рис. 2. Изменение спектра КР (в овалах) при вариации соотношения изомеров растительного (POP) и животного (OPO) типа в бинарной смеси из работы [12] – сверху, и измеренные нами спектры КР партии смесей молочного жира и растительных масел – внизу.

вать потребление с пищей пальмового масла как фактор риска патологии сердечно-сосудистой системы, атеросклероза и атероматоза ни на основании клинических наблюдений [8], ни по результатам экспериментальных данных [9].

Столь выраженное различие содержания в плазме крови ХС-ЛПНП при добавлении в пищу равных количеств сливочного жира и пальмового масла зависит, мы полагаем, от двух факторов: а) физико-химического различия позиционных изомеров ТГ в растительном пальмовом масле и в животном жире молока; б) особенностей стерической (позиционной) специфичности фермента – панкреатической липазы и её кофакторов – жёлчных кислот, активных эндогенных детергентов.

Физико-химическими особенностями пальмового масла является то, что все ТГ в нём олеиновые и в sn-2 этерифицирована только олеиновая МЖК. Вся же пальмитиновая НЖК этерифицирована в sn-1 и sn-3. Физико-химическими особенностями «конечных» ТГ молока (жира молока), которые являются пальмитиновыми, обусловлено, что они не предназначены для метаболизма *in vivo* у матери. Вся пальмитиновая НЖК в ТГ молока находится в sn-2, а большее количество олеиновой МЖК, немного ненасыщенных и полиеновых ЖК этерифицированы в sn-1 и sn-3 [4].

Панкреатическая липаза, гидролизуя экзогенные ТГ пищи, проявляет выраженную позиционную специфичность. Она гидролизует эфирную связь в первую очередь в sn-1, далее в sn-3 и не может гидролизовать спиртовую связь в sn-2. При гидролизе ТГ пальмового масла в тонкой кишке вся пальмитиновая НЖК освобождается из ТГ в форме СЖК, а всю олеиновую МЖК энтероциты поглощают в форме 2-глицеромоноолеата. Гидролизованная из sn-1 и sn-3 ТГ молока олеиновая МЖК, небольшие количества ненасыщенных ЖК с двумя-тремя ДС (ННЖК) и полиеновых ЖК с четырьмя-шестью ДС (ПНЖК) в физико-химические реакции с содержащим

тонкой кишки в отличие от пальмитиновой НЖК не вступают [5]. Энтероциты из гетерогенных мицелл поглощают пальмитиновую НЖК молока в форме 2-глицеромоноолеата; они ретерифицируют НЖК в одноимённые ТГ и включают в состав хиломикронов (ХМ). ХМ с пальмитиновыми ТГ молока в потоке лимфы и крови достигают печени. Далее гепатоциты после оптимизации ими экзогенных ЖК структурируют пальмитиновые ТГ в одноимённые липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП); в них экзогенную пальмитиновую НЖК поглощают клетки, в первую очередь зависимые от инсулина, путём апоЕ/В-100 эндцитоза [6]. Таким образом, как много пальмитиновой НЖК ни содержат жирное коровье молоко, жирные молочные продукты (сметана и сыры), сливочный жир, так же много их, согласно физико-химическим и биологическим закономерностям, поглощают клетки.

В отличие от ТГ молока [7], при гидролизе ТГ пальмового масла [8] всю пальмитиновую НЖК (половина всего количества ЖК) из sn-1 и sn-3 панкреатическая липаза освобождает в форме СЖК. Будучи более гидрофобной и химически активной, имея высокую точку плавления – 63°C, пальмитиновая НЖК вступает в физико-химические реакции с компонентами содержимого тонкого кишечника. В результате энтероциты всасывают существенно меньше пальмитиновой НЖК, чем её содержат ТГ пальмового масла. И если всю пальмитиновую НЖК из ТГ коровьего молока *in vivo* поглощают клетки, то большую часть пальмитиновой НЖК из пальмового масла в форме СЖК энтероциты всосать не могут; значительная часть НЖК теряется с кишечным содержимым [9]. Таким образом, поскольку пальмовое масло обладает позиционной изомерией растительных масел: олеиновая ЖК С18:1 находится в позиции sn-2, поэтому его насыщенные ЖК из позиций sn-1 и sn-3 практически не усваиваются у человека.

Следует отметить, что пальмовое масло в пище, как правило, содержит транс-жиры, возникающие при его промышленной переработке. Поэтому европейские регламенты не допускают его использования в продуктах питания.

В ряде работ [10–12] оценена возможность идентификации и количественного определения позиционных изомерных форм ТГ по спектрам комбинационного рассеяния (КР) лазерного света с помощью регрессии по проекциям на латентные структуры (ПЛС). В работе М. Motoyama [12] детально оценены вариации спектров КР смесей двух эталонных позиционных изомеров триглицеридов мажорных олеиновой и пальмитиновой ЖК, установлены их спектральные отличия в смесях различной концентрации, проиллюстрированные на рис. 2. Показано, что можно различать природные жиры путём сравнения их изоморфных форм с помощью спектроскопии КР, однако природные жиры и масла исследованы не были.

Поскольку нами ранее смеси растительных масел и сливочного жира изучены методом спектроскопии

Диапазоны вариаций долей ЖК и масел (аналитов) в 2 партиях калибровочных и тестовых образцов (в %)

№	Количество	Аналит							
		C4:0	C14:0	C16:0	C18:1	C18:0	МЖ	ПМ	ОлМ
1	35 + 15	0,5–4,2	6,0–14,0	14,0–33,0	21,0–42,0	2,5–8,5	20–80	10–60	–
2	35 + 16	0,5–3,0	5,0–11,0	14,0–25,0	24,0–48,0	2,3–3,8	20–70	20–40	0,5–20,0

Примечание. ОлМ – оливковое масло.

трии в ближнем инфракрасном (БИК) диапазоне [13], представляется актуальным исследовать корреляции БИК-спектров с позиционными изомерными формами масел на основе сравнения моделей по БИК-спектрам и спектрам КР и ответить на вопрос, можно ли с помощью спектрофотометра БИК-диапазона идентифицировать животные жиры и растительные масла с учётом позиционной изомерии ТГ ЖК.

Цель работы – оценить возможности анализа позиционных изомеров ЖК, характерных для сливочного жира и пальмового масла, с помощью спектрометров КР и поглощения в ближнем ИК-диапазоне света. Решить данную задачу предполагалось путём применения метода проекций на латентные структуры [14], чтобы получить калибровку спектрометров для определения как содержания 7 регламентированных ЖК, так и долей молочного жира и пальмового масла в жиромасляных смесях. Вторая цель состояла в изучении пригодности спектрометрии КР для дифференциации животных жиров и растительных масел по позиционным изомерам ТГ. Кроме того, задачей было сравнение эффективности калибровки (достоверности, точности и селективности определения) спектрофотометра БИК-диапазона по долям поименованных выше жиров и масел по сравнению с эффективностью определения долей по содержанию индивидуальных жирных кислот, а также формулировки технических требований и условий применения портативного спектрометра для массового анализа качества жиромасляных продуктов.

*Материал и методы. Формирование партий калибровочных и тестирующих образцов.* Спектрометрический анализ дисперсных смесей включает трудоёмкую калибровку спектрометра по большому числу стандартных образцов с вариацией концентраций нескольких (не только определяемых, но и интерферирующих, «мешающих» компонент). Ранее мы описали и проверили «экономный» способ ПЛС-калибровки [15, 16], который даёт хорошие параметры определения содержания 3 компонент с помощью БИК-спектрометра при специальном выборе распределений концентраций компонент в партии из 35 стандартных калибровочных образцов. В названной работе приготовление партий стандартных калибровочных и тестовых жиромасляных смесей основано на включении в калибровку лишь пограничных, приосевых и центральных образцов (по концентрациям компонент). Количество из 35 калибровочных и 15–18 тестовых образцов, по данным наших работ [15, 16], пригодно по метрологическим параметрам и трудоёмкости для определения содержания 3 компонент.

Аналогичный подход осуществлён в настоящей работе при построении и тестировании ПЛС-моделей по 50 образцам партии № 1 для определения содержания насыщенных ЖК C4:0, C14:0 и C16:0 в смесях молочного жира (МЖ) и пальмового масла (ПМ), а также по 51 образцу партии № 2 для определения содержания ЖК

C18:0, C18:1 и C18:2 в смесях МЖ, ПМ и небольших добавок оливкового масла с целью имитации состава ЖК сливочного масла. Параметры образцов представлены в табл. 1. Для создания заданных вариаций долей трёх ЖК в партиях образцов, кроме исходных материалов – молочного жира, пальмового и оливкового масел, был использован также разбавитель n-октан («Fluka Analytical», Германия). Партии стандартных образцов получали смешиванием рассчитанных по «экономному» способу навесок исходных материалов, предварительно измеренных по содержанию ЖК с помощью газового хроматографа Кристаллюкс-4000М (ООО «Интехром», РФ), в соответствии с ГОСТ Р 51483-99 «Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме», с предварительной калибровкой его по смеси стандартных метиловых эфиров жирных кислот (F.A.M.E., Mix C4–C24, Supelco, № 18919). Затем содержание семи ЖК, названных выше, в двух партиях калибровочных и тестовых образцов было проверено измерением на том же хроматографе. Хранили образцы при комнатной температуре в «мягких» условиях во избежание переэтерификации [17] и использовали для спектрометрии в течение двух недель. Перед измерением в БИК-спектрометрах образцы нагревали до 59°C в термостате.

Доля лауриновой ЖК C12:0 определялась по высокой корреляции (0,98) с масляной ЖК C4:0 [18].

Пробоподготовка образцов смесей исходных материалов выполнена без применения растворителей в соответствии с приёмами, которые описаны ранее, а именно [16, 19]:

- продукт нагревали до 60°C и центрифугировали при 4000 об/с в течение 6–18 мин;
- нижнюю водную фракцию сливали через отверстие в пробирке;
- верхнюю часть (иногда с протеинсодержащей пеной) отфильтровывали в термостате при 59°C.

*Спектральные методы, приборы и условия измерения.* БИК-спектры поглощения обеих партий стандартных образцов, содержащие молочный жир, измерили трехкратно (для проверки воспроизводимости) в 10-мм кювете с помощью созданного в Институте спектроскопии РАН дифракционного БИК-спектрометра [20] в диапазоне длин волн 1,10–1,65 мкм с разрешением 10 нм, при времени накопления 40 с и температуре образца 59 ± 1°C, выбранной, с одной стороны, для полного расплавления, а с другой – для исключения переэтерификации определяемых ЖК. Исследуемый образец разогревали до 59°C, отстаивали 3 мин, проверяли его прозрачность, измеряли его спектр в БИК-спектрометре и оцифрованный спектр использовали для калибровки или анализа.

По спектрам пропускания образцов и пустой кюветы рассчитаны спектры оптической плотности:  $D_i = \log(I/I_0)$ , где  $I$  – сигнал детектора, пропорциональный спектральной плотности потока, падающего на образец излучения,  $I_0$  – сигнал детектора, пропорциональный спектральной плотности потока излучения, прошедшего сквозь  $i$ -й образец. Оцифрованные спектры затем подвергнуты предобработке: вычитанию общей базовой линии, сгла-

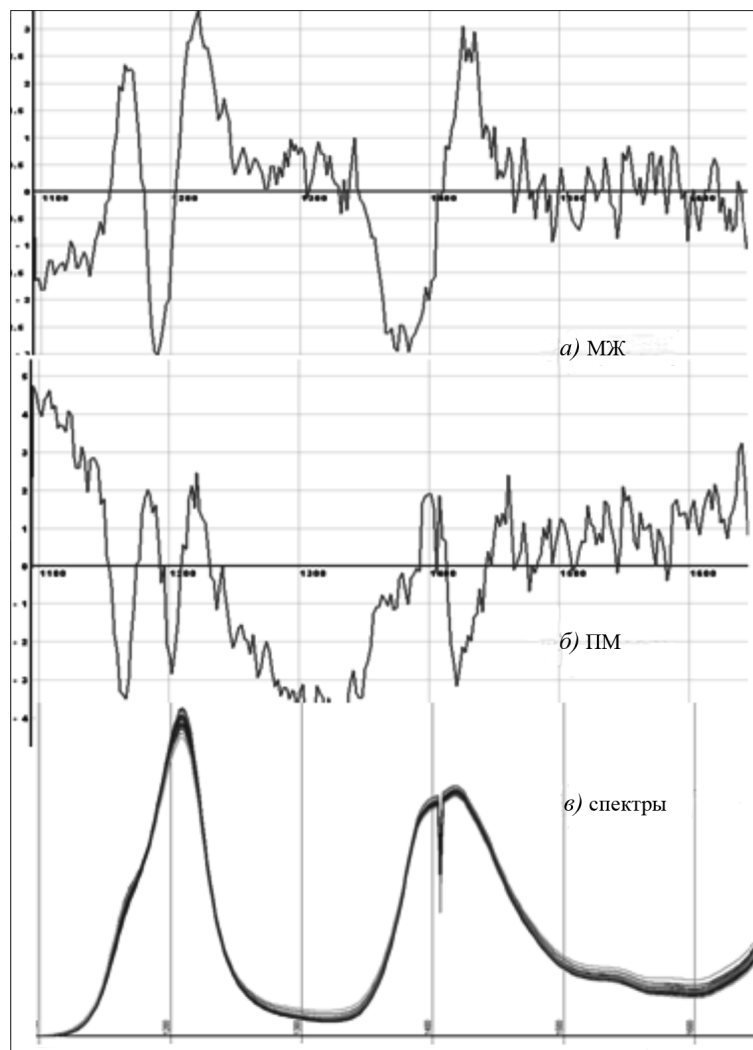


Рис. 3. Спектры: а, б – регрессионных коэффициентов для определения МЖ и ПМ, соответственно; в – оптической плотности 51 образца жировых смесей.

живанию по Голею–Савицкому и дифференцированию один или два раза.

КР-спектры образцов 2-й партии также троекратно измерены с помощью спектрометра Thermo Scientific Nicolet NXR FT с возбуждением КР-излучения лазера с длиной волны 1,06 мкм при максимальной мощности 2 Вт, температуре образца  $59 \pm 1^\circ\text{C}$  и затем усреднены. Время накопления КР-спектра 2,5 мин.

Новацией работы является то, что портативный БИК-спектрометр использует множественную регрессию в соответствии с алгоритмом NIPALS [14], реализованным нами в программе ISCAP [20], для улучшения разрешения (рис. 3).

**Построение и тестирование ПЛС-калибровок.** Решение задачи многомерной линейной калибровки (регрессии) по матричному уравнению  $Y = XB + E^*$  для многокомпонентного анализа на основе спектров состоит в:

1. В изыскании партий калибровочных образцов, стандартизированных по долям ЖК или долям жиров и масел – матрица  $Y$ .

2. Выборе технических условий спектрального метода, измерении и обработке спектров партии образцов – матрица  $X$ .

3. Создании калибровочной модели – матрицы калибровочных коэффициентов  $B$  по матрицам спектров  $X$  и показателей  $Y$  и её оптимизация, включающая:

- построение разнообразных ПЛС-моделей;
- тестирование (оценка параметров матрицы ошибок  $E$ , выбор моделей).

4. Определении показателей  $\hat{y}$  в неизвестных образцах по измеренному спектру  $x$ .

Матрица  $B$  из уравнения  $Y = XB$  находится методом наименьших квадратов: минимизируя сумму квадратов отклонений полученных на стандартах значений  $(Y - XB)^t(Y - XB)$ , находим оценки коэффициентов матрицы  $B$ :  $B = (X^t X)^{-1} X^t Y$ .

Главная математическая проблема – обращение матрицы  $X^t X$ . Очевидно, что если число стандартных образцов меньше, чем число переменных в  $X$ , то обратной матрицы не существует.

Более того, даже при достаточно большом числе образцов обратной матрицы может и не быть из-за значительного, вплоть до линейной зависимости, подобия (коллинеарности) спектров.

Инструмент против коллинеарности – сжатие данных методом главных компонент (МГК).

В МГК (Principle Component Analysis) образуют новые переменные  $t_a = p_a^1 x^1 + p_a^2 x^2 + \dots$  ( $a = 1, \dots, A$ ), называемые главными компонентами (ГК), так что:

$$X = TP^t + E$$

ГК, или счета (scores), составляют матрицу  $T$ , вместе с матрицей нагрузок (loadings)  $P$  они воспроизводят матрицу  $X$  достаточно точно, а в остатках  $E$  остаётся только ошибка. При этом:

переменные  $T$  – ортогональны;

их значительно меньше, чем в матрице  $X$ , то есть подобие спектров преодолено и  $T$  можно использовать вместо  $X$  для построения регрессии.

В методе ПЛС-регрессии:

- сжатию подвергают обе матрицы,  $X$  и  $Y$ ;

– факторы ГК рассчитывают по очереди – алгоритмом NIPALS [14];

– получают 2 набора счетов (scores)  $T$ ,  $U$  и нагрузок (loadings)  $P$ ,  $Q$  плюс матрица  $W$  взвешенных нагрузок (loading-weights);

– итерационно улучшают модель, чтобы максимизировать  $\text{cov}(T, U)$ ;

– выполняют предсказание:

$$\hat{Y} = X_{\text{new}} B$$

$$B = W^t(P^t W)^{-1} Q^t$$

Построенные модели (матрицы  $B$ ) тестируют партией стандартов, не использованных для калибровки, и выбирают модели с наилучшими показателями достоверности – коэффициента множественной корреляции  $r^2$ , сложности  $p$  – числа ГК и погрешности – случайной составляющей стандартного отклонения SEP для предсказания каждого аналита в образцах тестируемой партии.

*Алгоритмы определения доли и ошибки МЖ в смеси с растительными маслами.*

1. По содержаниям ЖК, регламентированным в ГОСТ 32261-2013:

а) идентифицируют МЖ по доле масляной ЖК С4:0. Если МЖ имеется (доля МЖ более 0,5%), то:

\* Матричные величины выделены жирным шрифтом.

1 мар 2017 16:45:18

Протокол №235 индентификации молочного жира

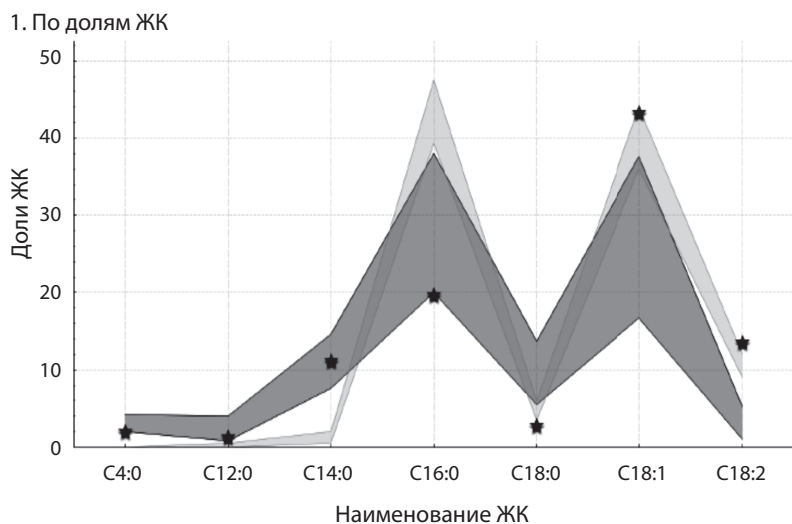


Рис. 4. Эталонные значения долей 7 ЖК в МЖ – в тёмно-серой зоне, те же значения для ПМ (по Codex Alimentarius, 2009, Brussell) – в светло-серой зоне; звёздочки – значения ЖК образца № 85.

б) идентифицируют ПМ по измеренным долям ЖК C12:0, C14:0, C16:0, C18:0 и C18:1, сравнивая их с эталонными (из Codex Alimentarius, Codex Standard for Named Vegetable Oils (CODEX-STAN 210 – 1999) по Протоколу на рис. 4. Если ПМ имеется (доли ЖК занимают промежуточное положение между эталонными для МЖ и ПМ), то:

в) рассчитывают долю МЖ ( $D_{\text{МЖ}}$ ) и вероятную стандартную ошибку (СО) по долям ЖК, используя уравнения:  $D_{\text{МЖ}} = \frac{1}{7} \sum D_{\text{МЖ}i}$  и  $CO = 0,14 \sqrt{\sum d_i^2}$ , где  $d_i$  – возможные вариации доли МЖ в образце по каждой из 7 ЖК. Для этого находят пересечения линии измеренного значения содержания i-й ЖК в образце, во-первых, для определения  $D_{\text{МЖ}}$ , с линией средней эталонной доли МЖ в смеси с ПМ и, во-вторых, для определения СО, с линиями максимальных и минимальных эталонных значений i-й ЖК при различных соотношениях МЖ и ПМ. При этом следует учитывать, что доля i-й ЖК в образце состоит из вкладов ПМ и МЖ, доля и вариация которых регламентирована ГОСТ Р 53776-2010 «Масло пальмовое рафинированное дезодорированное для пищевой промышленности. Технические условия» и ГОСТ 32261-2013 «Масло сливочное. Технические условия».

2. С помощью калибровки по долям МЖ и ПМ.

Поскольку калибровочные и тестирующие образцы были изготовлены из навесок МЖ, ПМ и оливкового масла, то возможно построение и тестирование моделей для прямого определения долей этих жиров и масел с помощью программы ISCAP.

**Результаты.** По БИК-спектрам и значениям массовых долей ЖК 4:0, 14:0, 16:0, 18:0, 18:1 и 18:2, долей МЖ и ПМ на 35 стандартах обеих партий (избранные модели представлены

в табл. 2), а по КР-спектрам 35 образцов второй партии (модели по долям МЖ и ПМ представлены в табл. 3) с помощью программы ISCAP построены ПЛС регрессии. Всего построено около 200 калибровочных моделей, которые отличались диапазонами, способами предобработки спектров, составом образцов в калибровочной партии, составом аналитов. Затем модели протестированы 15–16-ю стандартами каждой партии, рассчитаны ошибки определения МЖ (по коэффициентам множественной корреляции, СО и селективности) и выполнено взаимное тестирование моделей образцами другой партии (изготовленной из других исходных материалов). Параметры ПЛС-моделей на БИК-спектрах оптической плотности по результатам тестирования: Raw – необработанные спектры; Rb – удалена общая базовая линия; GSDer – спектры сглажены по Голею–Савицкому и продифференцированы; 2GSDer – спектры дважды сглажены по Голею–Савицкому и продифференцированы; обозначения параметров эффективности приведены ниже в пояснениях к табл. 4.

Затем для партии из 15 случайно выбранных стандартных образцов выполнено сравнение значений доли МЖ моделями на БИК- и КР-спектрах по долям ЖК расчётным методом, описанным в разделе «Материалы и методы», и моделями по долям МЖ и ПМ. Следует отметить, что доля ПМ по данным табл. 3 определяется существенно хуже, чем доля МЖ, что, вероятно, связано с большей вариацией жирнокислотного состава ПМ из различных источников поставки.

В табл. 4 для примера представлены результаты расчёта доли МЖ в образце смеси № 85 по семи значениям долей ЖК,  $\sum D_{\text{МЖ}i}/7$ .

В образце № 85, например, были определены доли МЖ с помощью калибровки по долям масел (по модели GSDer по БИК-спектрам:  $n = 4$  – число латентных переменных ГК;  $r^2_p = 0,97$  – коэффициент множественной корреляции;  $SEC = 0,8\%$  – случайная компонента среднеквадратичной ошибки). Для образца № 85 получено значение доли МЖ:  $D_{\text{МЖ}} = (0,45 \pm 0,005)\%$ , что хорошо согласуется со значением доли, полученным по долям 7 ЖК (см. табл. 4), но более достоверно и точно.

**Выводы и рекомендации.** Показатели моделей на спек-

Таблица 2

Построение и тестирование ПЛС-калибровок

Анализ. вещество	Обработка спектров											
	Raw			Rb			GSDer			2GSDer		
Аналит	n	$r^2_p$	SEP	n	$r^2_p$	SEP	n	$r^2_p$	SEP	n	$r^2_p$	SEP
C4:0	7	0,82	2	7	0,83	1,7	6	0,91	1,3	6	0,91	1,3
C12:0	7	0,82	2	7	0,83	1,7	6	0,91	1,3	6	0,91	1,3
C14:0	6	0,84	1,8	5	0,84	1,8	5	0,91	1,4	5	0,91	1,4
C16:0	5	0,85	1,6	5	0,87	1,4	5	0,92	0,9	5	0,91	0,9
C18:0	6	0,83	1,6	6	0,83	1,5	5	0,94	1	5	0,91	1
C18:1	5	0,86	1,4	5	0,86	1,4	4	0,95	0,9	5	0,91	0,9
C18:2	7	0,81	1,2	7	0,84	1,4	5	0,91	1	5	0,91	1
МЖ	6	0,89	1,5	4	0,89	1,1	4	0,97	0,8	5	0,91	0,8
ПМ	7	0,86	1,6	6	0,86	1,3	5	0,92	0,9	5	0,91	0,9

Таблица 3

**Параметры ПЛС-моделей на КР-спектрах по результатам тестирования: способы обработки спектров: Raw – необработанные, Rb – удаление общей базовой линии, SmDer – сглаживание полиномами и дифференцирование, 2SmDer – двукратное сглаживание полиномами и дифференцирование**

Обработка спектров	МЖ			ПМ			ОлМ + ПМ		
	n	r <sup>2</sup> <sub>p</sub>	SEP	n	r <sup>2</sup> <sub>p</sub>	SEP	n	r <sup>2</sup> <sub>p</sub>	SEP
Raw	4	0,94	1,1	6	0,81	1,5	4	0,93	1
Rb	3	0,92	1	4	0,81	1,2	6	0,94	0,8
SmDer	3	0,97	0,9	4	0,82	1	6	0,95	0,8
2 SmDer	3	0,87	0,9	3	0,81	1	6	0,91	0,9

трах КР по долям МЖ–ПМ: r<sup>2</sup><sub>p</sub> = 0,93; SEC = 2,5%масс существенно лучше, чем для моделей по долям 7 ЖК: r<sup>2</sup><sub>p</sub> = 0,69; SEC = 9,5 %масс.

Показатели моделей на БИК-спектрах поглощения по долям МЖ–ПМ: r<sup>2</sup><sub>p</sub> = 0,91; SEC = 1 %масс – также заметно, хотя и в меньшей степени, лучше, чем для моделей по долям 7 ЖК: r<sup>2</sup><sub>p</sub> = 0,79; SEC = 5,4 %масс.

Установлена селективность (независимость) определения олеиновой С18:1 ЖК от вариации доли ближайшего аналога – стеариновой С18:0 ЖК на уровне 86% при использовании только длины углеродной цепи и числа двойных связей C = C (по данным отнесения спектров к колебаниям), а при использовании модели по долям МЖ и ПМ, то есть при учёте изомерного различия ТГ – более 96%.

Аналогия свойств моделей на спектрах КР- и БИК-поглощения, при известной чувствительности моделей на спектрах КР к позиционным изомерам, подтверждает наличие корреляции спектров БИК-поглощения с последними. Этот вывод подтверждается также повышением селективности определения олеиновой С18:1 ЖК при учёте различия изомерных форм ПМ и МЖ.

Согласно филогенетической теории общей патологии [21], среди 7 биологических функций *in vivo* афизиологичному влиянию факторов внешней среды в большей мере подвержена биологическая функция трофологии – функция питания. Нарушение биологической функции трофологии является важным фактором в патогенезе метаболических пандемий: метаболической артериальной гипертензии, атеросклероза с атероматозом, метаболического синдрома – патологии независимых от инсулина висцеральных жировых клеток, резистентности к инсулину, ожирении – патологии инсулинозависимых подкожных адипоцитов и неалкогольной жировой болезни печени.

С позиций общей биологии, взрослым, особенно пожи-

Таблица 4

**Пример определения доли МЖ по 7 ЖК для образца № 85: Zi – доля (% массе) ЖК; ДiсэМ – средняя эталонная доля ЖК в МЖ; ДiсэП – средняя эталонная доля ЖК в ПМ, δсэ = ДiсэМ – ДiсэП; δ = Zi - ДiсэМ; Дмжi = | Zi - ДiсэМ | /δсэ.**

ЖК	Zi	ДiсэМ	ДiсэП	δсэ	δ	Дмжi
C4:0	1,8	3	0	3	1,2	0,4
C12:0	1,1	2,2	0,2	2	1,1	0,55
C14:0	10	11	1,2	9,8	1	0,1
C16:0	19	29	42	13	10	0,77
C18:0	8,5	10	5	5	1,5	0,3
C18:1	39	27	39	12	12	1,0
C18:2	1,4	4	10	6	2,6	0,43
S Дмжi/7						0,460 ± 0,025

лым, людям рекомендуется отказаться от потребления сливочного жира и уменьшить в пище содержание продуктов, богатых пальмитиновой НЖК: говядины, сметаны, жирных сыров. Это реальный шаг в профилактике метаболических пандемий (атеросклероз и атероматоз, метаболический синдром, резистентность к инсулину, ожирение). Ещё велика популяция людей, которые при оптимальном количестве пищи длительно сохраняют *in vivo* повышенное количество экзогенной пальмитиновой НЖК в плазме крови в форме незатерифицированной (свободной) ЖК. Это всегда является основой для формирования синдрома инсулинорезистентности,

гиперинсулинемии и условий для потенциального развития сахарного диабета. Описанный же в настоящей и предшествующей работе [22] портативный БИК-спектрометр может быть использован для интенсификации массового оперативного контроля содержания растительных масел и животных жиров в пище пациентов.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность канд. тех. наук Е.А. Юровой, зав. лабораторией технического контроля ВНИМИ РАН за организацию хроматографирования партий образцов. Особую благодарность авторы выражают д-ру физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. Центра лазерных исследований РАН А.П. Свиридову за организацию измерения КР- спектров партий образцов.

**Финансирование.** Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований по проекту № 16-02-00277.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-16; 19-20 см. REFERENCES)

1. Титов В.Н. Клиническая биохимия жирных кислот, липидов и липопротеинов. М. – Тверь: ООО «Издательство «Триада»; 2008.
17. Орлова Т.И., Уколов А.И., Савельева Е.И., Радилов А.С. Определение свободных и этерифицированных жирных кислот в плазме крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием. *Аналитика и контроль*. 2015; 19(2): 183-8.
18. Рудаков О.Б., Пономарев А.Н., Полянский К.К., Лобарь Ф.В. *Жиры, химический состав и экспертиза качества*. М.: Дели Принт; 2005.
21. Титов В.Н. Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез метаболических пандемий. *Сахарный диабет*. М.: ИНФРА-М; 2014..
22. Калинин А.В., Крашенинников В.Н., Свиридов А.П., Титов В.Н. Определение содержания диагностически значимых жирных кислот и индивидуальных триглицеридов в биологических средах на основе инфракрасной спектроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(11): 13 - 20.

REFERENCES

1. Titov V.N. *Clinical biochemistry of fatty acids, lipids and lipoproteins. [Klinicheskaya biokhimiya zhirnykh kislot, lipidov i lipoproteinov]*. Moscow - Tver': OOO «Izdatel'stvo «Triada»; 2008. (in Russian)
2. Lasa A., Schweiger M., Kotzbeck P., Churruga I., Simón E., Zechner R., Portillo M.P. Resveratrol regulates lipolysis via adipose triglyceride lipase. *J. Nutr. Biochem.* 2012; 23(4): 379 - 84.
3. Yao M., Lien E.L., Capeding M.R., Fitzgerald M., Ramanujam K., Yuhar R. Effects of term infant formulas containing high sn-2 palmitate with and without oligofructose on stool composition, stool characteristics, and bifidogenicity. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2014; 59(4): 440 - 8.

4. Lopez C., Cauty C., Guyomarc'h F. Organization of lipids in milks, infant milk formulas and various dairy products: role of technological processes and potential impacts. *Dairy. Sci. Technol.* 2015; 95(6): 863 - 93.
5. Giammanco A., Cefalu A.B., Noto D., Averna M.R. The pathophysiology of intestinal lipoprotein production. *Front. Physiol.* 2015; 6: 61–70.
6. Sun Y., Neelakantan N., Wu Y., Lote-Oke R., Pan A., van Dam R.M. Palm oil consumption increases LDL cholesterol compared with vegetable oils low in saturated fat in a meta-analysis of clinical trials. *J. Nutr.* 2015; 145(7): 1549 - 58.
7. Bourlieu C., Michalski M.C. Structure-function relationship of the milk fat globule. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2015; 18(2): 118 - 27.
8. Oda O.J., Ofori S., Maduka O. Palm oil and the heart: a review. *World J Cardiol.* 2015; 7(3): 144 - 9.
9. Nowacki J., Lee H.C., Lien R., Cheng S.W., Li S.T., Yao M. et al. Stool fatty acid soaps, stool consistency and gastrointestinal tolerance in term infants fed infant formulas containing high sn-2 palmitate with or without oligofructose: a double-blind, randomized clinical trial. *Nutr J.* 2014; 13: 105 – 11.
10. Bresson S., El Marssi M., Khelifa K. Conformational influences of the polymorphic forms on the C=O and C–H stretching modes of five saturated monoacid triglycerides studied by Raman spectroscopy at various temperatures. *Vibrat. Spectroscopy.* 2006; 40: 263–9.
11. Da Silva E., Bresson S., Rousseau D. Characterization of the three major polymorphic forms and liquid state of tristearin by raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids.* 2009; 113 –9.
12. Motoyama M., Structure and phase characterization of triacylglycerols by raman spectroscopy *Bull NARO. Inst. Livest. Grassl. Sci.* 2012; (12): 19-68.
13. Kalinin A.V., Krashennnikov V.N., Detection of fatty product falsifications using a portable near Infrared spectrometer. EPJ. Web. Conferences. 2017; 132, 02009 DOI:10.1051/epjconf/201713202009.
14. Wold S., Sjostrom M., Eriksson PLS regression: a basic tool of chemometrics, *Chem. Intelligent. Lab. Syst.* 2001; 58(7): 109 – 30.
15. Kalinin A., Krashennnikov V., Sadovskiy S., Yurova E. Determining the composition of proteins in milk using a portable near infrared spectrometer. *J. Near. Infrared. Spectrosc.* 2013; 21(5): 409 - 16.
16. Kalinin A., Tarabukin I., Yurova E. Determination of the milk fat in fat-oil mixture using portable NIR spectrometer. In Proceedings of 16th International Conference on Near Infrared Spectroscopy, la Grande-Motte, France. publ. by France Institut National de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture, part 3: 38 – 45, 2013.
17. Orlova T.I., Ukolov A.I., Savel'eva E.I., Radulov A.S. Determination of free and esterified fatty acids in blood plasma by gas chromatography with mass-selective detection. *Analitika i kontrol'.* 2015; 19(2): 183-8. (in Russian)
18. Rudakov O.B., Ponomarev A.N., Polyanskiy K.K., Lobar' F.V. *Fats, chemical composition and quality examination. [Zhiry, khimicheskij sostav i ekspertiza kachestva].* Moscow: Deli Print; 2005. (in Russian)
19. Cabassi G, Povolo M, Pelizzola V., Monti L., Genorini E. Contarini G. Development of a near infrared method for the quantification of the main classes of fatty acids obtained from raw milk by solvent-free extraction. *J. Near Infrared Spectrosc.* 2013; 21(5): 395-403.
20. Kalinin A., Krashennnikov V., Sadovskiy S., Denisovich E., Yurova E., Calibration models for multi-component quantitative analyses of dairy with the use of two different types of portable near infrared spectrometer. *J. Near. Infrared. Spectr.* 2008; 16(3): 343 – 8.
21. Titov V.N. *Phylogenetic theory of general pathology. The pathogenesis of metabolic pandemics. Diabetes. [Filogenicheskaya teoriya obschey patologii. Patogenez metabolicheskikh pandemij. Saharniy diabet].* Moscow:INFRA-M.; 2014. (in Russian)
22. Kalinin A.V., Krashennnikov V.N., Sviridov A.P., Titov V.N. Determination of the content of diagnostically significant fatty acids and individual triglycerides in biological media based on infrared spectrometry. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2015; 60(11): 13 - 20. (In Russian)

Поступила 23.10.17

Принята к печати 17.01.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.018:577.175.3/5.083-057.36

Кубасов Р.В.<sup>1</sup>, Барачевский Ю.Е.<sup>1</sup>, Иванов А.М.<sup>2</sup>, Кубасова Е.Д.<sup>1</sup>

## ГОРМОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ ГИПОФИЗ – НАДПОЧЕЧНИКИ У КОМБАТАНТОВ ПРИ КОМАНДИРОВКЕ В «ГОРЯЧИЕ ТОЧКИ»

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 163061, Архангельск;

<sup>2</sup>ФГБВО ВОУ «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны России, 194044, Санкт-Петербург

Свои профессиональные обязанности сотрудники Министерства внутренних дел России (МВД), как правило, выполняют в экстремальных, а нередко и в чрезвычайных ситуациях. Гипофизарно-надпочечниковая система регуляции вносит основной вклад в обеспечение формирования механизмов компенсации на эти воздействия. Цель работы – изучить изменения содержания адренокортикотропного гормона, кортизола, адреналина и норадреналина у сотрудников МВД, командированных на территории с локальным вооружённым конфликтом (Северный Кавказ) для поддержания правопорядка. Результаты исследования показали, что в течение первых двух месяцев командировки происходит значительное повышение уровня изучаемых гормонов. Это адекватная реакция организма на изменившиеся условия среды обитания. Эти изменения соответствуют основным положениям теории общего адаптационного синдрома. Однако дальнейшее же наблюдение, в динамике командировки, показало наличие признаков дисбаланса секреции гормонов в системе гипофиз – надпочечники. Обнаружено длительно сохраняющееся, до конца командировки, высокое содержание как адренокортикотропного гормона, так и кортизола. В то же время содержание гормонов «быстрого ответа» на экстремальные факторы окружающей среды (адреналин, норадреналин) оказалось таким же высоким, как и в начале командировки. Такие явления приводят к нарушению регуляции межгормональных взаимоотношений, что соответственно является фактором снижения жизненной стрессоустойчивости организма. Предложены основные направления организационно-медицинского характера в рамках мероприятий по обеспечению устойчивости организма к условиям экстремальных воздействий чрезвычайных ситуаций и снижению риска развития патологических состояний.

Ключевые слова: сотрудники правопорядка; экстремальные условия; эндокринная система.

Для корреспонденции: Кубасов Роман Викторович, канд. биол. наук, доц. каф. мобилизационной подготовки здравоохранения и медицины катастроф; e-mail: [romanas2001@gmail.com](mailto:romanas2001@gmail.com)