Для цитирования: Аналитика и контроль. 2025. Т. 29, № 4. С. 322-333
УДК 543.054:543.641:543.544.3 DOI: 10.15826/analitika.2025.29.4.004

Определение алифатических карбоновых кислот в растениях методом газовой хроматографии с предварительным прямым метилированием

И.В. Груздев, *Н.Э. Вебер, О.В. Скроцкая

ФГБУН «Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук»,
Российская Федерация, 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28

**Адрес для переписки: Вебер Никита Эдуардович, E-mail: veber.n@ib.komisc.ru*

Поступила в редакцию 08 октября 2025 г., после доработки – 15 ноября 2025 г.

Алифатические (жирные) кислоты и тесно связанные с ними липиды различного строения – наиболее обширная группа органических соединений растений, которые могут выступать в роли маркеров физиологического состояния и степени воздействия факторов внешней среды на растение. Для определения алифатических карбоновых кислот (C_{12}-C_{24}) в растительных материалах предложен подход, предполагающий совмещение стадий их экстракции и дериватизации в среде метанола (*one-step extraction/methylation method*) с последующим определением полученных эфиров методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным (ГХ-ПИД) или масс-спектрометрическим (ГХ-МС) детектором. Проведена оптимизация извлечения кислот из растительных образцов и их метилирования по следующим параметрам: соотношение массы экстрагента и массы образца при экстрагировании, концентрация катионов водорода (катализатор), продолжительность экстрагирования и температура реакционной смеси. Показано, что при выбранных оптимальных условиях степень извлечения жирных кислот и липидов из растительного образца достигает 97-99 %. Разработана методика определения жирных кислот (C_{12}-C_{24}) в растительных материалах. Интервал определяемых содержаний 0.005-0.5 мг/г, относительная погрешность 15-20 %, масса навески – 0.2-0.25 г, общая продолжительность анализа – 2.5 ч. В лекарственных растениях – иссопе лекарственном (лат. *Hyssopus officinalis*) и пустырнике сердечном (лат. *Leonurus cardiaca*) оценен качественный и количественный состав жирных кислот. В исследуемых лекарственных растениях идентифицировано десять карбоновых кислот – семь насыщенных (додекановая, тетрадекановая, гексадекановая, октадекановая, эйкозановая, докозановая, тетракозановая) и три ненасыщенных (октадеценовая, октадекадиеновая, октадекатриеновая). В наибольших количествах в растениях семейства *Lamiaceae* содержатся гексадекановая и линоленовая кислоты.

Ключевые слова: лекарственные растения, алифатические карбоновые кислоты, экстракция, химическая модификация, газовая хроматография

For citation: Analitika i kontrol' [Analytics and Control], 2025, vol. 29, no. 4, pp. 322-333
DOI: 10.15826/analitika.2025.29.4.004

Determination of aliphatic carboxylic acids in plants by gas chromatography with preliminary direct methylation

I.V. Gruzdev, *N.E. Veber, O.V. Skrotskaya

Institute of Biology of Komi Science Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences , 28 Kommunisticheskaya Str., Syktyvkar, 167982, Komi Republic, Russian Federation

**Corresponding author: Nikita E. Veber, e-mail: veber.n@ib.komisc.ru*

Submitted 08 October 2025, received in revised form 15 November 2025

Aliphatic (fatty) acids and closely related lipids of various structures constitute the most extensive group of organic compounds in plants, which can act as markers of the physiological state and the degree of reaction of environmental factors on plants. To determine aliphatic carboxylic acids (C_{12}-C_{24}) in plant materials we proposed an approach that combines the stages of the acids' extraction and derivatization in methanol (one-step

extraction/methylation method) followed by determination of the resulting esters by gas chromatography with a flame ionization (GC-FID) or a mass spectrometry (GC-MS) detector. Optimization of acid extraction from plant samples and their methylation was carried out using the following parameters: the mass ratio of the extractant and the sample during extraction, the concentration of hydrogen cations (catalyst), the duration of extraction, and the temperature of the reaction mixture. It was shown that the degree of extraction of fatty acids and lipids from a plant sample under the selected optimal conditions reaches 97–99 %. A method for determination of fatty acids (C_{12}–C_{24}) in plant materials was developed. The range of determinable contents is 0.005–0.5 mg/g, the relative error is 15–20 %, the sample weight is 0.2–0.25 g, the total analysis duration is 2.5 hours. The qualitative and quantitative composition of fatty acids in medicinal plants – hyssop (lat. *Hyssopus officinalis*) and motherwort (lat. *Leonurus cardiaca*) – was assessed. Ten carboxylic acids were identified in the medicinal plants studied, i.e. seven saturated (dodecanoic, tetradecanoic, hexadecanoic, octadecanoic, eicosanoic, docosanoic, and tetracosanoic) and three unsaturated (octadecenoic, octadecadienoic, and octadecatrienoic). Hexadecanoic and linolenic acids are found in the highest quantities in plants of the *Lamiaceae* family.

Keywords: medicinal plants, aliphatic carboxylic acids, extraction, chemical modification, gas chromatography

ВВЕДЕНИЕ

Алифатические (жирные) кислоты и тесно связанные с ними липиды различного строения – наиболее обширная группа органических соединений растений. Жирные кислоты в растениях синтезируются преимущественно в хлоропластах по ферментативным реакциям, начинающихся с ацетил-коэнзима А [1]. Образовавшиеся кислоты вовлекаются далее в биосинтез липидов мембран, входя в состав триацилглицеринов, фосфолипидов и других более сложных структур [2]. Часть жирных кислот участвует в синтезе биологически активных веществ, таких как жасмонаты и оксилипины [3], а также сохраняется растением в качестве энергетического резерва [4].

Под воздействием различных факторов, таких как температура, избыток или дефицит воды, освещённость, повышенное содержание неорганических и органических соединений в почве, жирнокислотный профиль растений может существенно изменяться [5–7]. Таким образом, жирные кислоты могут выступать в роли маркерных соединений физиологического состояния и степени воздействия факторов внешней среды на растение. Кроме того, большую ценность представляет информация о содержании в растениях ω-кислот (олеиновая, линолевая, линоленовая и др.), которые в организме человека не синтезируются и могут поступать только с пищей как животного, так и растительного происхождения [8].

Традиционные методы определения как свободных жирных кислот, так и входящих в состав липидов растений обычно включают несколько последовательных стадий: экстракцию, химическую модификацию и количественный анализ методом газовой хроматографии [9–12].

Наиболее распространенный способ извлечения жирных кислот и липидов из растений – жидкостная экстракция органическими растворителями [12, 13]. Для учета различной полярности экстрагируемых компонентов применяют бинарные смеси растворителей, такие как гексан/ацетон, хлороформ/метанол, дихлорметан/метанол и этилацетат/этанол в объемном соотношении 2:1 или 1:1 [14–17]. Для сокращения продолжительности пробоподготовки массообмен между образцом и экстрагентом ускоряют при помощи ультразвуковой [18–21] или микроволновой [22, 23] энергии.

Хорошие результаты при экстракции жирных кислот и липидов из растений дает метод Сокслета, предполагающий многократную обработку образца горячим растворителем [24–26]. Однако применение этого метода требует более длительного времени экстракции, большее количество экстрагента и может сопровождаться деградацией термолабильных соединений [27]. Наиболее востребованный растворитель в методе Сокслета – гексан, характеризующийся высокой летучестью, низкой вязкостью и широкой доступностью [24]. В качестве альтернативных экстрагентов также используют бинарные смеси с растворителями разной полярности, такие как гексан/этанол, хлороформ/этанол, бензол/этанол и дихлорметан/метанол при близких объемных соотношениях [26].

Независимо от применяемого метода экстракции, на следующей стадии выделенные липиды и жирные кислоты подвергают переэтерификации (этерификации) и полученные эфиры определяют методом газовой хроматографии [28–30]. Получение эфирных производных до газохроматографического определения – обязательная процедура, цель которой повысить летучесть и снизить термолабильность определяемых соединений.

К недостаткам традиционного подхода к определению жирных кислот в растительных материалах относится многостадийность и длительность пробоподготовки, связанная с разделением стадий экстрагирования и дериватизации выделенных соединений, большой расход реагентов и растворителей, а также необходимость применения специального оборудования (перемешивающие устройства, аппараты Сокслета, УЗИ-ванны, микроволновые печи и др.).

В связи с этим не теряет актуальность разработка методических подходов, позволяющих быстро получать надежные результаты о качественном и количественном содержании жирных кислот в различных растительных материалах. В качестве такого подхода рассматривается метод прямого

метилирования (one-step extraction/methylation method), предполагающий совмещение стадий экстракции и дериватизации жирных кислот. Прямое метилирование достаточно успешно применяют при определении липидов и жирных кислот в различных биологических материалах [31–34] и пищевых продуктах [35–39]. Метанол выступает здесь одновременно как экстрагент и модифицирующий агент, образуя метиловые эфиры при взаимодействии с жирными кислотами (этерификация) и липидами (переэтерификация). Полученные метиловые эфиры после разделения методом газовой хроматографии определяют с пламенно-ионизационным [31–37] или масс-спектрометрическим [39, 40] детектором.

В данном исследовании нами рассматривается возможность применения метода прямого метилирования для определения жирных кислот в растительных материалах. Подходы, основанные на совмещении стадий экстракции и дериватизации, применяли и ранее для определения жирных кислот в семенах [41, 42] и различных тканях растений [43–46]. Однако многие методические аспекты применения метода прямого метилирования остаются не исследованными – отсутствует информация о полноте излечения липидов и жирных кислот из растительных материалов, необходимости перемешивания в процессе экстракции/дериватизации, влиянии воды на процесс образования аналитических форм и др.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Стандартные вещества и реактивы. Для приготовления стандартных растворов карбоновых кислот применяли препараты фирмы «Fluka» с содержанием основного компонента не менее 99.5 %: додекановой (C12:0), тетрадекановой (C14:0), гексадекановой (C16:0), октадекановой (C18:0), октадеценовой (C18:1), октадекадиеновой (C18:2), октадекатриеновой (C18:3), эйкозановой (C20:0), докозановой (C22:0) и тетракозановой (C24:0) кислот. В качестве вспомогательных реактивов использованы: кислота соляная концентрированная, «х.ч.» (ООО «СигмаТэк»); кислота серная концентрированная, «о.с.ч.» (ООО «СигмаТэк»); гексадекан (ГСО 11731-2021, ВНИИМ).

Растворители. Метиловый спирт, «х.ч.»; гексан, «о.с.ч.» (ООО «НПО Реактивы ОСЧ»); толуол, «ч.д.а.» (АО «ЭКОС-1»); дистиллированная вода, очищенная при помощи системы очистки PURELAB UltraScientific фирмы ELGA (электропроводность 0.05-0.06 мкСм/см, органический углерод 3-10 ppb).

Оборудование. Хромато-масс-спектрометрический анализ (ГХ-МС) выполняли на газовом хроматографе «МАЭСТРО ГХ» (Интерлаб, Россия) с масс-селективным детектором «МАЭСТРО-α» в режиме электронного удара (EI, энергия электронов 70 эВ, диапазон сканирования масс 50-650 а.е.м.). Интерпретацию масс-спектров проводили при помощи программного обеспечения «МАЭСТРО Аналитик», AMDIS 2.73 (NIST) и библиотеки масс-спектров NIST05 MS Library (220 тыс. соединений).

Разделение компонентов выполняли на кварцевой капиллярной колонке HP-FFAP (Agilent, США) 30 м × 0.32 мм × 0.25 мкм, программирование температуры колонки: 110 °C – 5 °C/мин – 250 °C, газ-носитель – гелий (о.с.ч.), давление газа-носителя на входе колонки – 100 кПа, деление потока – 1:30, температура испарителя 300 ºС, интерфейса 250 ºС, камеры ионизации – 230 °C.

Количественное определение индивидуальных кислот проводили на газовом хроматографе «TRACE 1310» (Thermo, США) с пламенно-ионизационным детектором при следующих условиях: кварцевая капиллярная колонка TR-FAME (Thermo, США)

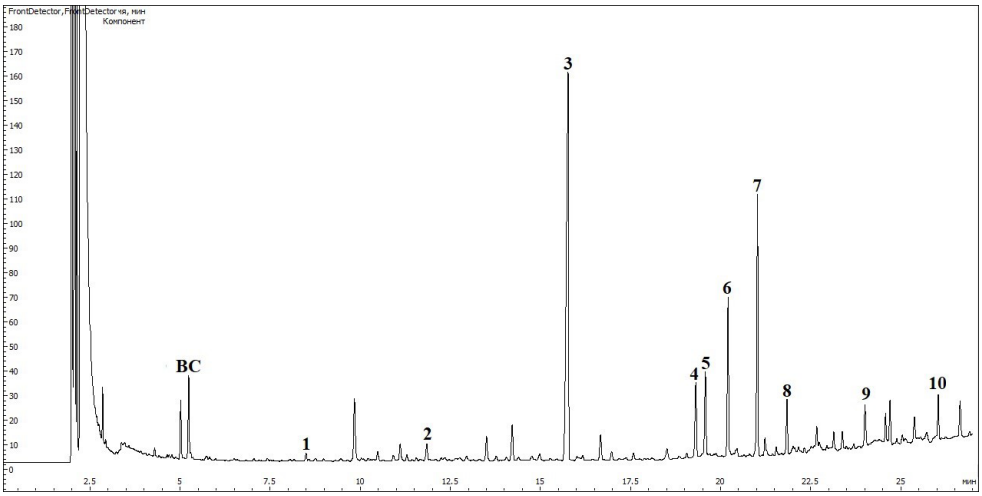


Рис. 1. Хроматограмма, иллюстрирующая определение жирных кислот в растениях (метиловые эфиры кислот): C12:0 (**1**), C14:0 (**2**), C16:0 (**3**), C18:0 (**4**), C18:1 (**5**), C18:2 (**6**), C18:3 (**7**), C20:0 (**8**), C22:0 (**9**), C24:0 (**10**), **BC** – внутренний стандарт; душица обыкновенная (лат. ***Origanum vulgare***), условия хроматографического разделения указаны в тексте

Fig. 1. Chromatogram illustrating the determination of fatty acids in plants (methyl esters of acids): C12:0 (**1**), C14:0 (**2**), C16:0 (**3**), C18:0 (**4**), C18:1 (**5**), C18:2 (**6**), C18:3 (**7**), C20:0 (**8**), C22:0 (**9**), C24:0 (**10**), **BC** – internal standard; oregano (lat. ***Origanum vulgare***), the conditions of chromatographic separation are described in the text

60 м × 0.25 мм × 0.25 мкм; газ-носитель – азот (о.с.ч.), давление газа-носителя на входе колонки – 90 кПа, программирование температуры колонки: 125 °С – 3 °С/мин – 248 °С, скорость потока водорода – 20 см³/мин, скорость потока воздуха – 200 см³/мин, деление потока – 1:30. Температура детектора 250 °С, испарителя 300 °С.

Хроматограмма экстракта, содержащего эфирные производные определяемых соединений, полученная при указанных условиях, приведена на рис. 1.

Подготовка проб. В качестве объекта исследования выбраны лекарственные растения семейства Яснотковые и плоды рябины обыкновенной из коллекции Ботанического сада Института биологии Коми НЦ УрО РАН.

Растительный материал, высушенный при комнатной температуре, измельчали при помощи лабораторной мельницы IKA A11 (25000 об/мин) и просеивали через сито (d = 0.25 мм).

В стеклянную виалу (15 см³) с анализируемым образцом (0.2-0.25 г) вносили 5 см³ метанола и 0.35 см³ соляной кислоты (38 %). Виалу герметично закрывали винтовой крышкой и выдерживали в термостате в течение 1.5 ч при температуре 90 °С. После охлаждения до комнатной температуры к экстракту добавляли 5 см³ дистиллированной воды, 0.5 см³ толуола, содержащего внутренний стандарт (гексадекан, 0.1 мг/см³) и экстрагировали в течение 5 мин. Экстракт из водно-органической суспензии выделяли центрифугированием (SIGMA 2-16P, Германия) при скорости 5000 об/мин в течение 10 мин. Выделенный экстракт анализировали методом капиллярной газовой хроматографии.

Идентификацию кислот проводили с использованием смеси BAME Mix (Supelco, США), содержащей 26 метиловых эфиров жирных кислот. Наличие идентифицированных кислот в анализируемых образцах подтверждали методом хромато-масс-спектрометрии.

Для определения количественного содержания жирных кислот в растительных материалах применяли метод внутреннего стандарта (внутренний стандарт: гексадекан). Массовую концентрацию кислот в полученных экстрактах ρ (мг/см³) рассчитывали на основе уравнений (табл. 1), полученных при градуировке хроматографа [47]:

$$\rho = a\frac{S}{S_{st}} + b,$$

где S/S_{st} – соотношение площадей хроматографических пиков, соответствующих аналиту и внутреннему стандарту (гексадекан), a, b – коэффициенты.

При проведении оптимизации извлечения кислот из растительных образцов и их метилирования (рис. 3 и 6) рассчитывали суммарную концентрацию метиловых эфиров в экстрактах для следующих кислот C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C22:0 и C24:0.

Массовую долю ω (мг/г) кислоты в растительном образце рассчитывали по формуле:

$$\omega = \rho\frac{V_э}{m_o}$$

где ρ – массовая концентрация кислоты в экстракте, мг/см³; $V_э$ – объем экстрагента (метанол), см³; m_o – масса растительного образца, г.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методика прямого метилирования кислот. Для определения содержания жирных кислот в растительных материалах разработана методика, включающая, кроме прямого метилирования, стадии жидкостной экстракции метиловых эфиров жирных кислот и отделения полученного экстракта центрифугированием (рис. 2). На последнем этапе определение метиловых эфиров жирных кислот проводится методами газовой хроматографии или хромато-масс-спектрометрии.

Преимущества объединения стадий экстракции и дериватизации жирных кислот при определении их в растениях состоят в следующем:

Таблица 1

Аналитические характеристики градуировочных зависимостей для определения жирных кислот (P = 0.95, n = 6)

Table 1

Analytical characteristics of calibration curves for determination of fatty acids (P = 0.95, n = 6)

Кислота	Диапазон концентраций, мкг/см³	Уравнение регрессии	R^2
Додекановая	0.1-5.0	$\rho = (10.64 \pm 0.04)\cdot10^{-3}\cdot(S/S_{st})$	0,9999
Тетрадекановая	0.1-5.0	$\rho = (10.98 \pm 0.05)\cdot10^{-3}\cdot(S/S_{st})$	0,9997
Гексадекановая	0.1-5.0	$\rho = (9.53 \pm 0.06)\cdot10^{-3}\cdot(S/S_{st})$	0,9996
Октадекановая	0.1-5.0	$\rho = (10.57 \pm 0.08)\cdot10^{-3}\cdot(S/S_{st})$	0.9998
Октадеценовая	0.08-3.0	$\rho = (12.99 \pm 0.11)\cdot10^{-3}\cdot(S/S_{st})$	0.9997
Октадекадиеновая	0.08-3.0	$\rho = (11.64 \pm 0.08)\cdot10^{-3}\cdot(S/S_{st})$	0.9997
Октадекатриеновая	0.25-8.5	$\rho = (12.30 \pm 0.13)\cdot10^{-3}\cdot(S/S_{st})$	0.9998
Эйкозановая	0.1-5.0	$\rho = (13.02 \pm 0.15)\cdot10^{-3}\cdot(S/S_{st})$	0.9998
Докозановая	0.1-5.0	$\rho = (14.5 \pm 0.3)\cdot10^{-3}\cdot(S/S_{st})$	0.9995
Тетракозановая	0.1-5.0	$\rho = (16.49 \pm 0.17)\cdot10^{-3}\cdot(S/S_{st})$	0.9998



Рис. 2. Аналитический цикл определения жирных кислот в растительных материалах с применением прямого метилирования

Fig. 2. Analytical cycle for the determination of fatty acids in plant materials using direct methylation

– метилирование, сопровождающее экстракцию, препятствует установлению равновесных концентраций кислот в экстракте, что повышает как скорость, так и степень их извлечения из растительного образца;
– нагревание, необходимое для проведения этерификации кислот также ускоряет и их десорбцию из образца;
– исключается стадия замены растворителя, которая часто сопровождается полным испарением экстрагента и, как следствие, нарушением компонентного состава полученного экстракта;
– одновременно со свободными кислотами определяются и связанные (липидные) кислоты, в результате их переэтерификации из липидов в соответствующие метиловые эфиры;
– существенно снижается расход растворителей, продолжительность и трудоемкость пробоподготовки, а также масса образца растения, необходимая для проведения анализа.

Оптимизация условий прямого метилирования кислот. Экстракция – важнейший этап аналитического цикла определения органических соединений в растениях, цель которой состоит в достижении максимально полного извлечения целевых аналитов из образца [10, 12, 13]. Поскольку прямое метилирование жирных кислот предполагает использование метанола, выбор экстрагента не требуется и основными факторами, влияющими как на степень извлечения кислот из растений, так и на полноту конверсии в их соответствующие метиловые эфиров, следует считать:
– соотношение массы экстрагента и образца при экстракции;
– концентрацию катионов водорода в экстрагенте;
– температуру и продолжительность метилирования/экстракции.

При экстрагировании органических соединений из твердых матриц важно установить оптимальное соотношение масс экстрагирующего раствора ($m_э$) и отбираемого для анализа образца ($m_о$). Для установления такого соотношения при прямом метилировании была исследована зависимость содержания метиловых эфиров жирных кислот в экстракте от соотношения $m_э/m_о$ (рис. 3). Концентрация эфиров жирных кислот в экстрактах, полученных из разных растительных образцов, возрастает до соотношения $m_э/m_о$ ~ 15-20, после чего она практически не изменяется, и применение б**о**льших соотношений будет приводить к перерасходу экстрагента (метанол). Следует отметить, что из плодов целевые компоненты извлекаются легче, чем из травянистых растений – для рябины максимальное извлечение жирных кислот достигается уже при соотношении $m_э/m_о$ равном 10 (рис.3).

При совмещении стадий экстракции и дериватизации в экстрагент (метанол) необходимо вводить неорганическую кислоту, поскольку катионы водорода катализируют как метилирование жирных кислот, так и переэтерификацию липидов [28–30]. Действительно, в присутствии HCl содержание метиловых эфиров кислот в экстракте возрастает и проходит через максимум в интервале c(HCl) = 0.8-1.5 моль/дм^3 (рис. 4). При б**о**льших концентрациях HCl в экстракте выход метиловых эфиров кислот незначительно снижается (рис. 4).

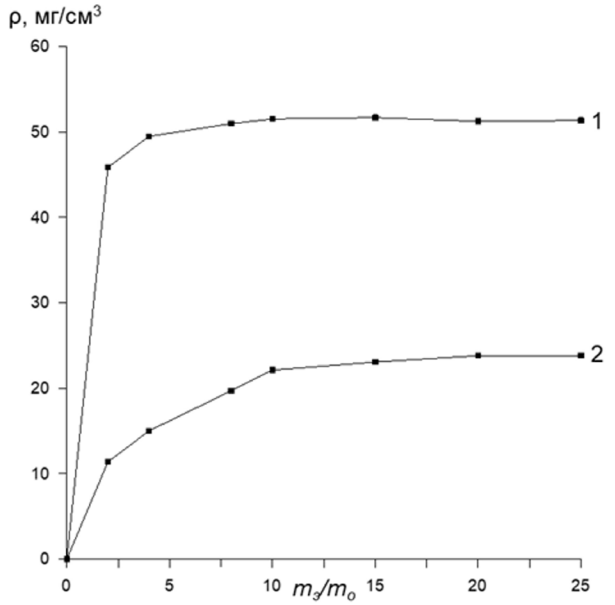


Рис. 3. Зависимость суммарной концентрации метиловых эфиров жирных кислот в экстракте от соотношения масс экстрагент/образец ($m_э/m_о$): **1** – плоды рябины обыкновенной (лат. *Sorbus aucuparia*), **2** – иссоп лекарственный (лат. *Hyssopus officinalis*); продолжительность метилирования: 90 мин (90 ºС), c(HCl) = 0.8 моль/дм^3

Fig. 3. Dependence of the total concentration of methyl esters of fatty acids in the extract on the extractant/sample mass ratio ($m_э/m_о$): **1** – rowan berries (lat. *Sorbus aucuparia*), **2** – hyssop (lat. *Hyssopus officinalis*); methylation duration: 90 min (90 ºC), c(HCl) = 0.8 mol/dm^3

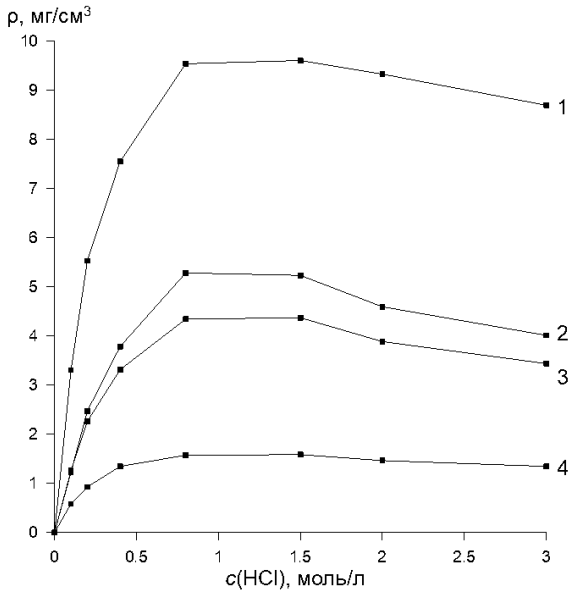


Рис. 4. Зависимость содержания метиловых эфиров жирных кислот в экстракте от концентрации соляной кислоты: **1** – C16:0, **2** – C18:3, **3** – C18:2, **4** – C18:0; пустырник сердечный (лат. ***Leonurus cardiaca***), продолжительность метилирования: 90 мин (90 °C), $m_э/m_o$ = 20

Fig. 4. Dependence of the content of methyl esters of fatty acids in the extract on the concentration of hydrochloric acid: **1** – C16:0, **2** – C18:3, **3** – C18:2, **4** – C18:0; motherwort (lat. ***Leonurus cardiaca***), methylation duration: 90 min (90 °C), $m_э/m_o$ = 20

При использовании концентрированной соляной кислоты (38 %) в реакционную смесь также вводится и вода, присутствие которой будет снижать растворимость как извлекаемых неполярных липидов, так и образующихся продуктов реакции (эфиров).

Нами показано, что снижение выхода эфирных производных по реакции переэтерификации липидов наблюдается только при массовой доле воды в реакционной смеси более 5 %, по реакции этерификации кислот – более 20 % (рис. 5). Большую индифферентность реакции этерификации к присутствию воды в системе можно объяснить, по-видимому, меньшей гидрофобностью жирных кислот по сравнению с липидами.

Расчеты показывают, что при оптимальной концентрации соляной кислоты (0.8 моль/дм^3), массовая доля воды в реакционной смеси при проведении метилирования не превышает 4 %. Таким образом, вода, которая попадает в систему при введении катализатора (HCl), не оказывает влияния на образование эфиров ни по одной из протекающих в реакционной смеси реакций.

Еще один важный фактор, определяющий эффективность прямого метилирования жирных кислот – длительность контакта экстрагента с растительным образцом. Общая продолжительность этой стадии определяется, в основном, скоростью смачивания образца, при достижении которого увеличивается как активная площадь, так и доступность десорбции липидов и кислот. В свою очередь, концентрация аналитов в экстракте и температура экстрагента, будут определять скорость метилирования, которое протекает параллельно экстракции.

Нами показано, что при проведении прямого метилирования концентрация эфиров жирных кислот достигает определенного максимума и дальше не возрастают, что косвенно указывает на достижение количественного выхода этих производных (рис. 6). Оптимальная температура метилирования жирных кислот составляет 90 °C – для достижения максимальной концентрации их эфирных производных в экстракте требуется 90 мин (рис. 6). При меньшей температуре экстрагента (80 °C) указанный максимум не достигается даже при проведении метилирования в течение 140 мин. При большей температуре (100 °C) концентрация эфиров также не достигает максимального значения (рис. 6). Более того, вследствие термодеструкции, концентрация эфиров начинают снижаться уже при нагревания смеси в течение 60 мин.

Таким образом, наиболее эффективная дериватизация и экстрагирование жирных кислот из растительных материалов при прямом метилировании достигается при соблюдении следующих условий:

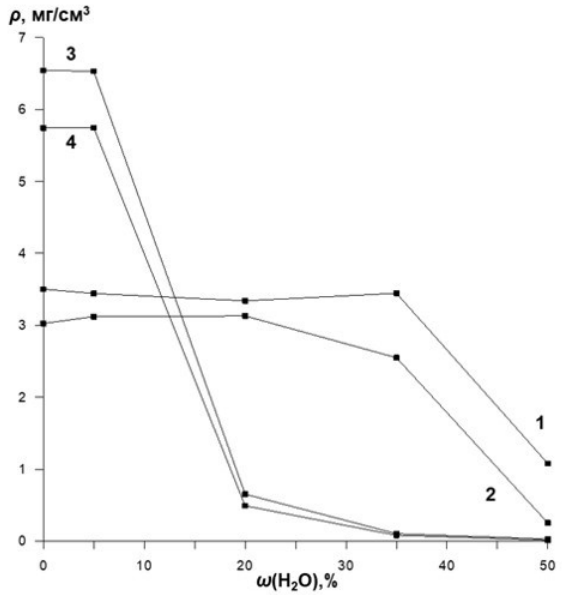


Рис. 5. Зависимость концентрации метиловых эфиров карбоновых кислот от массовой доли воды в реакционной смеси: **1** – C14:0, **2** – C20:0, **3** – C18:2, **4** – C18:1 (кислоты C18:1 и C18:2 характеризуют жирнокислотный профиль липидов масла льна); продолжительность метилирования: 90 мин (90 °C), ***c***(HCl) = 0.8 моль/дм^3

Fig. 5. Dependence of the concentration of methyl esters of carboxylic acids on the mass fraction of water in the reaction mixture: **1** – C14:0, **2** – C20:0, **3** – C18:2, **4** – C18:1 (C18:1 and C18:2 acids characterize the fatty acid profile of linseed oil lipids); methylation duration: 90 min (90 °C), ***c***(HCl) = 0.8 mol/dm^3

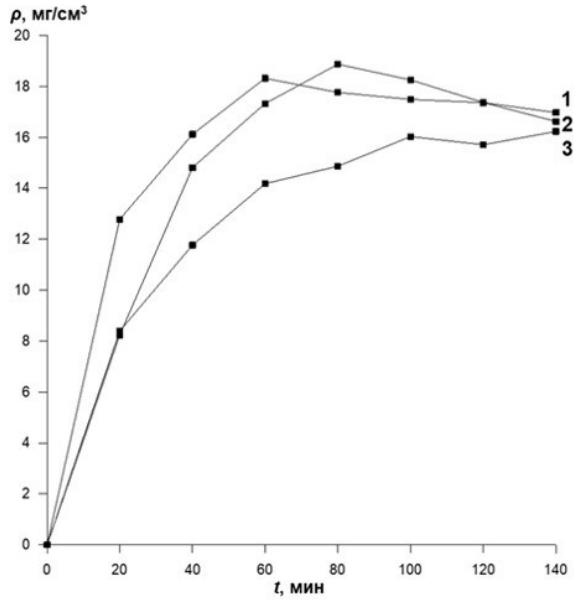


Рис. 6. Зависимость суммарной концентрации метиловых эфиров жирных кислот в экстракте от продолжительности взаимодействия с растительным образцом при разной температуре экстрагента (метанол): **1** – 100 °С, **2** – 90 °С, **3** – 80 °С; душица обыкновенная (лат. ***Origanum vulgare***), продолжительность метилирования: 90 мин (90 °С), $m_э/m_о$ = 20, ***c***(HCl) = 0.8 моль/дм³

Fig. 6. Dependence of the total concentration of methyl esters of fatty acids in the extract on the duration of interaction with the plant sample at different temperatures of the extractant (methanol): **1** – 100 °С, **2** – 90 °С, **3** – 80 °С; oregano (lat. ***Origanum vulgare***), methylation duration: 90 min (90 °С), $m_э/m_о$ = 20, ***c***(HCl) = 0.8 mol/dm³

– концентрация соляной кислоты (38 %) в экстрагенте: 0.8 моль/дм³;
– массовое соотношение экстрагент/образец: не менее 15;
– продолжительность: 90 мин при температуре 90 °С.

При установленных оптимальных условиях прямого метилирования жирных кислот была проведена оценка их степени извлечения из растительных материалов. Повторная процедура экстракции из одного и того же образца показывает, что экстракт содержит 2-5 % кислот от количества, извлеченного при первой экстракции (рис. 7). С учетом того, что после первой экстракции эфиры кислот из образца полностью удалить невозможно, степень извлечения жирных кислот, по нашей оценке, составляет не менее 97-99 %.

Как уже указывалось выше, основное преимущество проведения прямого метилирования состоит в том, что одновременно с экстрагированием происходит химическая модификация аналитов, вызывающая постоянное смещение равновесия экстракции в сторону обогащения экстракта. Этот эффект настолько велик, что проведение метилирования не требует дополнительного воздействия на образец способами, которые обычно применяют для интенсификации процесса экстрагирования из твердых матриц (перемешивание, УЗИ и др.). Так, на степень извлечения жирных кислот и липидов из растительного образца не влияет проведение периодического перемешивания образца – количественное извлечение аналитов достигается и в статическом варианте проведения метилирования (рис. 5).

Следует также отметить, что методика прямого метилирования характеризуется достаточно высокой селективностью по отношению к жирным кислотам (рис. 1). В конечный экстракт переходят преимущественно алифатические и ароматические соединения с карбоксильными группами, поскольку при метилировании они образуют неполярные эфиры, которые при последующем концентрировании хорошо экстрагируются толуолом. Соединения с гидроксильными группами (фенолы, спирты и др.) при этих условиях не метилируются и в экстракт из водно-спиртового раствора практически не переходят.

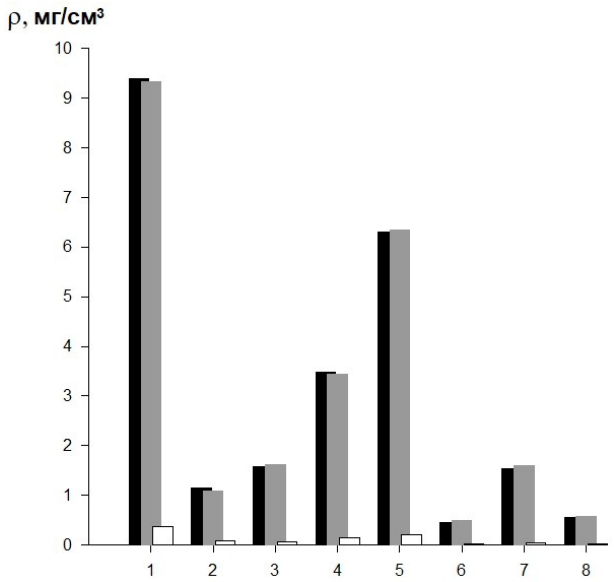


Рис. 7. Содержание эфиров жирных кислот в экстракте после первой экстракции при проведении метилирования без перемешивания (***черный***), с перемешиванием (***серый***) и повторной экстракции (***белый***) из одного и того же образца растительного материала: **1** – C16:0, **2** – C18:0, **3** – C18:1, **4** – C18:2, **5** – C18:3, **6** – C20:0, **7** – C22:0, **8** – C24:0; душица обыкновенная (лат. ***Origanum vulgare***), продолжительность метилирования: 90 мин (90 °С), $m_э/m_о$ = 20, ***c***(HCl) = 0.8 моль/дм³

Fig. 7. Content of esters of fatty acids in the extract after the first extraction during methylation without stirring (***black***), with stirring (***gray***) and repeated extraction (***white***) from the same sample of plant material: **1** – C16:0, **2** – C18:0, **3** – C18:1, **4** – C18:2, **5** – C18:3, **6** – C20:0, **7** – C22:0, **8** – C24:0; oregano (lat. ***Origanum vulgare***), methylation duration: 90 min (90 °С), $m_э/m_о$ = 20, ***c***(HCl) = 0.8 mol/dm³

Определение жирных кислот в растениях. На основе проведенных исследований был разработан способ определения жирных кислот в растительных материалах (рис. 2) с применением внутреннего стандарта. В табл. 2 приведены результаты определения содержания жирных кислот в лекарственных растениях – иссопе лекарственном (лат. *Hyssopus officinalis*) и пустырнике сердечном (лат. *Leonurus cardiaca*), полученные методом газовой хроматографии, правильность получаемых результатов подтверждали методом «введено-найдено».

В исследуемых лекарственных растениях идентифицировано 10 карбоновых кислот – семь насыщенных (C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0) и три ненасыщенных (C18:1, C18:2, C18:3). Все ненасыщенные кислоты – олеиновая, линолевая, линоленовая, относятся к незаменимым. В наибольших количествах в растениях семейства *Lamiaceae* содержатся гексадекановая и линоленовая кислоты. Среднее содержание этих кислот составляет 1-2 мг/г высушенного сырья.

Таблица 2

Результаты определения жирных кислот в лекарственных растениях методом «введено-найдено» (n = 4, P = 0.95)

Table 2

Results of determination of fatty acids in medicinal plants by the “introduced-found” method (n = 4, P = 0.95)

Кислота, ω, мкг/г	s_r	Добавка, мкг/г	
		введено	найдено
Иссоп лекарственный (лат. *Hyssopus officinalis*)			
додекановая, 5.6 ± 0.4	0.03	100.0	107 ± 9
тетрадекановая, 39.8 ± 2.4	0.02		91 ± 13
гексадекановая, 1890 ± 110	0.02		87 ± 14
октадекановая, 202 ± 21	0.04		114 ± 9
октадеценовая, 475 ± 21	0.02		92 ± 11
октадекадиеновая, 810 ± 40	0.02		94 ± 12
октадекатриеновая, 1680 ± 120	0.03		121 ± 18
эйкозановая, 213 ± 23	0.04		115 ± 9
докозановая, 144 ± 24	0.07		111 ± 14
тетракозановая, 56 ± 4	0.03		95 ± 11
Душица обыкновенная (лат. *Origanum vulgare*)			
додекановая, 8.6 ± 1.6	0.08	200.0	211 ± 23
тетрадекановая, 66.3 ± 2.9	0.02		206 ± 19
гексадекановая, 2310 ± 250	0.04		183 ± 25
октадекановая, 340 ± 40	0.04		216 ± 26
октадеценовая, 430 ± 60	0.05		207 ± 17
октадекадиеновая, 690 ± 110	0.06		177 ± 19
октадекатриеновая, 1170 ± 160	0.06		227 ± 23
эйкозановая, 272 ± 14	0.02		217 ± 18
докозановая, 137 ± 9	0.03		230 ± 40
тетракозановая, 228 ± 12	0.02		191 ± 21

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для определения алифатических кислот (C_{12}-C_{24}) в растительных материалах предложен подход, предполагающий совмещение стадий их экстракции и дериватизации в среде метанола (*one-step extraction/methylation method*) с последующим определением полученных эфиров методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным (ГХ-ПИД) или масс-спектрометрическим (ГХ-МС) детектором. Проведена оптимизация извлечения кислот из растительных образцов и их метилирования по следующим параметрам: соотношение масса образца/масса экстрагента, концентрация катионов водорода (катализатор), продолжительность экстрагирования и температура реакционной смеси. Показано, что при выбранных оптимальных условиях достигается достаточно полное извлечение жирных кислот из растительного образца (97-99 %). На основе проведенных исследований разработана методика определения жирных кислот (C_{12}-C_{24}) в растительных материалах. Интервал определяемых содержаний 0.005-0.5 мг/г, относительная погрешность 15-20 %, масса навески – 0.2-0.25 г, общая продолжительность анализа – 2.5 ч. В лекарственных растениях – иссопе лекарственном (лат. *Hyssopus officinalis*) и пустырнике сердечном (лат. *Leonurus cardiaca*) оценен качественный и количественный состав жирных кислот.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено на базе ЦКП «Хроматография» Института биологии Коми НЦ УрО РАН и УНУ «Научная коллекция живых растений Ботанического сада Института биологии Коми НЦ УрО РАН» (№ 507428) в рамках государственного задания по теме «Оценка влияния климатических условий Севера на процессы репродукции ресурсных растений» (125021302139-3).

ACKNOWLEDGMENTS

The study was carried out using the equipment of the center of collective usage “Chromatography” of the Institute of Biology of Komi Science Center of the Ural Branch of the RAS and the Scientific Collection of Living Plants of the Botanical Garden of the Institute of Biology of the Komi Science Center of the Ural Branch of the RAS (USI No. 507428) within the framework of the state assignment on the topic of “Assessment of the influence of climatic conditions of the North on the processes of reproduction of resource plants” (125021302139-3).

ЛИТЕРАТУРА

1. Harwood J.L. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids // Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab. 1996. V. 1301, № 1-2. P. 7-56.
2. Boucher Y. Lipids: Biosynthesis, Function, and Evolution // Archaea: (ed.) R. Cavicchioli. Washington, ASM Press. 2007. P. 341-353.
3. Wasternack C., Feussner I. The Oxylipin Pathways: Biochemistry and Function // Annu. Rev. Plant Biol. 2018. V. 69, № 1. P. 363-386.
4. De Carvalho C., Caramujo M. The Various Roles of Fatty Acids // Molecules. 2018. V. 23, № 10. Article 2583.
5. Biosynthesis and Functions of Very-Long-Chain Fatty Acids in the Responses of Plants to Abiotic and Biotic Stresses / M. Batsale [et al.] // Cells. 2021. V. 10, № 6. Article 1284.
6. Zhukov A.V., Shumskaya M. Very-long-chain fatty acids in plant response to stress // Funct. Plant Biol. 2020. V. 47, № 8. P. 695-703.
7. He M., Ding N.-Z. Plant Unsaturated Fatty Acids: Multiple Roles in Stress Response // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. Article 562785.
8. Saini R.K., Keum Y.-S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review // Life Sci. 2018. V. 203. P. 255-267.
9. Ruiz-Rodriguez A., Reglero G., Ibañez E. Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids // J. Pharm. Biomed. Anal. 2010. V. 51, № 2. P. 305-326.
10. Comparison of critical methods developed for fatty acid analysis: A review / Z. Wu [et al.] // J. Sep. Sci. 2017. V. 40, № 1. P. 288-298.
11. Brands M., Gutbrod P., Dörmann P. Lipid Analysis by Gas Chromatography and Gas Chromatography–Mass Spectrometry // Plant Lipids: edited by. Bartels D., Dörmann P. New York, Springer US. 2021. V. 2295. P. 43-57.
12. Current Perspectives on the Extraction, Isolation, and Identification of Fats and Fatty Acids Using Conventional and Green Methods / Y. Lima-Pereira [et a.] // Separations. 2025. V. 12, № 6. P. 160.
13. Advances in Lipid Extraction Methods. A Review / R.K. Saini [et al.] // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22, № 24. Article 13643.
14. A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research / Y. Li [et al.] // Microb Cell Fact. 2014. V. 13, № 1. Article 14.
15. Green argan oil extraction from roasted and unroasted seeds by using various polarity solvents allowed by the EU legislation / M.J. González-Fernández [et al.] // J. Cleaner Prod. 2020. V. 276. Article 123081.
16. Lipid nutritional value of legumes: Evaluation of different extraction methods and determination of fatty acid composition / G. Caprioli [et al.] // Food Chem. 2016. V. 192. P. 965-971.
17. Extraction of lipids from spent coffee grounds with non-polar renewable solvents as alternative / A.S. Loyao [et al.] // Industrial Crops and Products. 2018. V. 119. P. 152-161.
18. Senrayan J., Venkatachalam S. Optimization of ultrasound-assisted solvent extraction (UASE) based on oil yield, antioxidant activity and evaluation of fatty acid composition and thermal stability of Coriandrum sativum L. seed oil // Food Sci Biotechnol. 2019. V. 28, № 2. P. 377-386.
19. Obtaining oil from macauba kernels by ultrasound-assisted extraction using ethyl acetate as the solvent / A.C.S.D. Rosa [et al.] // Braz. J. Food Technol. 2019. V. 22. Article e2018195.
20. Optimization of ultrasound-assisted extraction of Nigella sativa seed oil for enhancement of yield and antioxidant activity / I.H. Dar [et al.] // Discov Appl Sci. 2024. V. 6, № 3. Article 104.
21. Evaluation of four derivatization methods for the analysis of fatty acids from green leafy vegetables by gas chromatography / A. Topolewska [et al.] // J. Chromatogr. B. 2015. V. 990. P. 150-157.
22. Optimization of green microwave-assisted extraction of essential oil from lemon (Citrus limon) leaves: Bioactive,

antioxidant and antimicrobial potential / S. Yeasmin [et al.] // Current Research in Green and Sustainable Chem. 2024. V. 8. Article 100413.
23. Microwave-Assisted Extraction of Curcuma longa L. Oil: Optimization, Chemical Structure and Composition, Antioxidant Activity and Comparison with Conventional Soxhlet Extraction / R. Fernández-Marín [et al.] // Molecules. 2021. V. 26, № 6. Article 1516.
24. Luque De Castro M.D., Priego-Capote F. Soxhlet extraction: Past and present panacea // J. Chromatogr. A. 2010. V. 1217, № 16. P. 2383-2389.
25. Fatty acids and sterols composition, and antioxidant activity of oils extracted from plant seeds / M. Kozłowska [et al.] // Food Chem. 2016. V. 213. P. 450-456.
26. Ramluckan K., Moodley K.G., Bux F. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method // Fuel. 2014. V. 116. P. 103-108.
27. A comparative study of various oil extraction techniques from plants / J.M. Danlami [et al.] // Rev. Chem. Eng. 2014. V. 30, № 6. P. 605-626.
28. Christie W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis // Adv. Lipid Methodol. 1993. V. 2. P. 69-111.
29. Liu K.-S. Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Gas-Chromatographic Analysis of Lipids in Biological Materials // J. Am. Oil Chem. Soc. 1994. V. 71. P. 1179-1187.
30. Ichihara K., Fukubayashi Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography // J. Lipid Res. 2010. V. 51, № 3. P. 635-640.
31. Improved Extraction of Saturated Fatty Acids but not Omega-3 Fatty Acids from Sheep Red Blood Cells Using a One-Step Extraction Procedure / E.H. Clayton [et al.] // Lipids. 2012. V. 47, № 7. P. 719-727.
32. Comparison of Six Methylation Methods for Fatty Acid Determination in Yak Bone Using Gas Chromatography / W. Jia [et al.] // Food Anal. Methods. 2017. V. 10, № 11. P. 3496-3507.
33. Validation of a one-step extraction/methylation method for determination of fatty acids and cholesterol in marine tissues / Meier S. [et al.] // J. Chromatogr. A. 2006. V. 1104, № 1-2. P. 291–298.
34. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs / J.V. O'Fallon [et al.] // J. Anim. Sci. 2007. V. 85, № 6. P. 1511-1521.
35. Comprehensive Evaluation of Parameters Affecting One-Step Method for Quantitative Analysis of Fatty Acids in Meat / M.P. Agnew [et al.] // Metabolites. 2019. V. 9, № 9. Article 189.
36. Development of a simple method for the quantitative determination of fatty acids in milk with special emphasis on long-chain fatty acids / B. Martínez [et al.] // CyTA J. Food. 2012. V. 10, № 1. P. 27-35.
37. Improvements in the methodology for fatty acids analysis in meat products: One-stage transmethylation and fast-GC method / T. Perez-Palacios [et al.] // Food Chem. 2022. V. 371. Article 130995.
38. Liu Z., Moate P., Rochfort S. A simplified protocol for fatty acid profiling of milk fat without lipid extraction // Int. Dairy J. 2019. V. 90. P. 68-71.
39. Development of one-step sample preparation methods for fatty acid profiling of milk fat / Z. Liu [et al.] // Food Chem. 2020. V. 315. Article 126281.
40. Rapid analysis of fatty acid profiles in raw nuts and seeds by microwave–ultrasonic synergistic in situ extraction-derivatisation and gas chromatography-mass spectrometry / R.-L. Liu [et al.] // Food Chem. 2013. Vl. 141, № 4. P. 4269-4277.
41. Improved method for fatty acid analysis in herbage based on direct transesterification followed by solid-phase extraction / S.P. Alves [et al.] // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1209, № 1-2. P. 212-219.
42. Garces R., Mancha M. One-Step Lipid Extraction and Fatty Acid Methyl Esters Preparation from Fresh Plant Tissues // Anal. Biochem. 1993. V. 211, № 1. P. 139-143.
43. Harmanescu M. Comparative researches on two direct transmethylation without prior extraction methods for fatty acids analysis in vegetal matrix with low fat content // Chem. Cent. J. 2012. V. 6, № 1. Article 8.
44. Ruiz-López N., Martínez-Force E., Garcés R. Sequential one-step extraction and analysis of triacylglycerols and fatty acids in plant tissues // Anal. Biochem. 2003. V. 317, № 2. P. 247-254.
45. A high-throughput method for profiling fatty acids in plant seeds based on one-step acid-catalyzed methylation followed by gas chromatography-mass spectrometry / S. Xiao [et al.] // Biotechnol. Biotechnol. Equip. 2021. V. 35, № 1. P. 1076-1085.
46. Microwave-assisted one-step extraction-derivatization for rapid analysis of fatty acids profile in herbal medicine by gas chromatography-mass spectrometry / R.-L. Liu [et al.] // Analyst. 2012. V. 137, № 21. Article 5135.
47. Новак Й. Количественный анализ методом газовой хроматографии. М.: Мир, 1978. 179 с.

REFERENCES

1. Harwood J.L. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.*, 1996, vol. 1301, no. 1-2, pp. 7-56. doi:10.1016/0005-2760(95)00242-1.
2. Boucher Y. *Lipids: Biosynthesis, Function, and Evolution. Archaea: (ed.) R. Cavicchioli.* Washington*, ASM Press*, 2007, pp. 341-353.
3. Wasternack C., Feussner I. The Oxylipin Pathways: Biochemistry and Function. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2018, vol. 69, no. 1, pp. 363-386. doi:10.1146/annurev-arplant-042817-040440
4. De Carvalho C., Caramujo M. The Various Roles of Fatty Acids. *Molecules*, 2018, vol. 23, no. 10, article 2583. doi:10.3390/molecules23102583.
5. Batsale M., Bahammou D., Fouillen L., Mongrand S., Joubès J., Domergue F. Biosynthesis and Functions of Very-Long-Chain Fatty Acids in the Responses of Plants to Abiotic and Biotic Stresses. *Cells*, 2021, vol. 10, no. 6, article 1284. doi:10.3390/cells10061284.
6. Zhukov A.V., Shumskaya M. Very-long-chain fatty acids in plant response to stress. *Funct. Plant Biol.*, 2020, vol. 47, no. 8, pp. 695-703. doi:10.1071/fp19100.
7. He M., Ding N.-Z. Plant Unsaturated Fatty Acids: Multiple Roles in Stress Response, *Front. Plant Sci*, 2020, vol. 11, article 562785. doi:10.3389/fpls.2020.562785.
8. Saini R.K., Keum Y.-S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sci.*, 2018, vol. 203, pp. 255-267. doi:10.1016/j.lfs.2018.04.049.
9. Ruiz-Rodriguez A., Reglero G., Ibañez E. Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010, vol. 51, no. 2, pp. 305-326. doi:10.1016/j.jpba.2009.05.012.
10. Wu Z., Zhang Q., Li N., Pu Y., Wang B., Zhang T. Comparison of critical methods developed for fatty acid analysis: A review. *J. Sep. Sci.*, 2017, vol. 40, no. 1, pp. 288-298. doi:10.1002/jssc.201600707.
11. Brands M., Gutbrod P., Dörmann P. *Lipid Analysis by Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Plant Lipids: edited by. Bartels D., Dörmann P.*, New York,

Springer US, 2021, vol. 2295. pp. 43-57. doi:10.1007/978-1-0716-1362-7_4.
12. Lima-Pereira Y., Oliveira de Souza E.M., Silva dos Reis D., Barcellos-Silva I.G.C., Miki K.S.L., Veiga-Júnior V.F., Teixeira-Costa B.E. Current Perspectives on the Extraction, Isolation, and Identification of Fats and Fatty Acids Using Conventional and Green Methods. *Separations*, 2025, vol. 12, no. 6, article 160. doi:10.3390/separations12060160.
13. Saini R.K., Prasad P., Shang X., Keum Y.-S. Advances in Lipid Extraction Methods. A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, no. 24, article 13643. doi:10.3390/ijms222413643.
14. Li Y., Naghdi F.G., Garg S., Adarme-Vega T.C., Thurecht K.J., Ghafor W.A., Tannock S., Schenk P.M. A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. *Microb Cell Fact*, 2014, vol. 13, no. 1, article 14. doi:10.1186/1475-2859-13-14.
15. González-Fernández M.J., Manzano-Agugliaro F., Zapata-Sierra A., Belarbi E.H., Guil-Guerrero J.L. Green argan oil extraction from roasted and unroasted seeds by using various polarity solvents allowed by the EU legislation. *J. Cleaner Prod.*, 2020, vol. 276, article 123081.
16. Caprioli G., Giusti F., Ballini R., Sagratini G., Vila-Donat P., Vittori S., Fiorini D. Lipid nutritional value of legumes: Evaluation of different extraction methods and determination of fatty acid composition. *Food Chem.*, 2016, vol. 192, pp. 965-971. doi:10.1016/j.foodchem.2015.07.102. doi:10.1016/j.jclepro.2020.123081.
17. Loyao A.S., Villasica S. L., Dela Peña P. L., Woo Go A. Extraction of lipids from spent coffee grounds with non-polar renewable solvents as alternative. *Industrial Crops and Products*, 2018, vol. 119, pp. 152-161. doi:10.1016/j.indcrop.2018.04.017.
18. Senrayan J., Venkatachalam S. Optimization of ultrasound-assisted solvent extraction (UASE) based on oil yield, antioxidant activity and evaluation of fatty acid composition and thermal stability of Coriandrum sativum L. seed oil. *Food Sci Biotechnol.*, 2019, vol. 28, no. 2, pp. 377-386. doi:10.1007/s10068-018-0467-1.
19. Rosa A.C.S.D, Stevanato N., Iwassa I., Garcia V.A.D.S., Silva C.D. Obtaining oil from macauba kernels by ultrasound-assisted extraction using ethyl acetate as the solvent. *Braz. J. Food Technol.*, 2019, vol. 22, article e2018195. doi:10.1590/1981-6723.19518.
20. Dar I.H., Junaid P.M., Ahmad S., Shams R., Dash K.K., Shaikh A.M., Béla K. Optimization of ultrasound-assisted extraction of Nigella sativa seed oil for enhancement of yield and antioxidant activity. *Discov. Appl. Sci.*, 2024, vol. 6, no. 3, article 104. doi:10.1007/s42452-024-05714-7.
21. Topolewska A., Czarnowska K., Halinski Ł.P., Stepnowski P. Evaluation of four derivatization methods for the analysis of fatty acids from green leafy vegetables by gas chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 2015, vol. 990, pp. 150-157. doi:10.1016/j.jchromb.2015.03.020.
22. Yeasmin S., Uddin J., Dey S.S., Barmon J., Ema N.T., Rana G.M.M., Rahman M., Begum M., Ferdousi L., Ahmed S., Khan S., Khatun H., Muzahid A.A. Optimization of green microwave-assisted extraction of essential oil from lemon (Citrus limon) leaves: Bioactive, antioxidant and antimicrobial potential. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 2024, vol. 8. article 100413. doi:10.1016/j.crgsc.2024.100413.
23. Fernández-Marín R., Fernandes S.C.M., Andrés M.A., Labidi J. Microwave-Assisted Extraction of Curcuma longa L. Oil: Optimization, Chemical Structure and Composition, Antioxidant Activity and Comparison with Conventional Soxhlet Extraction. *Molecules*, 2021, vol. 26, no. 6, article 1516. doi:10.3390/molecules26061516.
24. Luque De Castro M.D., Priego-Capote F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *J. Chromatogr. A*, 2010, vol. 1217, no. 16, pp. 2383-2389. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.027.
25. Kozłowska M., Gruczyńska E., Ścibisz I., Rudzińska M. Fatty acids and sterols composition, and antioxidant activity of oils extracted from plant seeds. *Food Chem.*, 2016, vol. 213, pp. 450-456. doi:10.1016/j.foodchem.2016.06.102.
26. Ramluckan K., Moodley K.G., Bux F. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. *Fuel*, 2014, vol. 116, pp. 103-108. doi:10.1016/j.fuel.2013.07.118.
27. Danlami J.M., Arsad A., Zaini M.A.A., Sulaiman H. A comparative study of various oil extraction techniques from plants. *Rev. Chem. Eng.*, 2014, vol. 30, no. 6, pp. 605-626. doi:10.1515/revce-2013-0038.
28. Christie W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. *Adv. Lipid Methodol.*, 1993, vol. 2. pp. 69-111.
29. Liu K.-S. Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Gas-Chromatographic Analysis of Lipids in Biological Materials. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1994, vol. 71, pp. 1179-1187.
30. Ichihara K., Fukubayashi Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J. Lipid Res.*, 2010, vol. 51, no. 3, pp. 635-640. doi:10.1194/jlr.d001065.
31. Clayton E.H., Gulliver C.E., Piltz J.W., Taylor R.D., Blake R.J., Meyer R.G. Improved Extraction of Saturated Fatty Acids but not Omega-3 Fatty Acids from Sheep Red Blood Cells Using a One-Step Extraction Procedure. *Lipids*, 2012, vol. 47, no. 7, pp. 719-727. doi:10.1007/s11745-012-3674-1.
32. Jia W., Liu W., Mi S., Zhang C., Li X., Wu T., Yu Q. Comparison of Six Methylation Methods for Fatty Acid Determination in Yak Bone Using Gas Chromatography. *Food Anal. Methods*, 2017, vol. 10, no. 11, pp. 3496-3507. doi:10.3724/SP.J.1123.2016.07009.
33. Meier S., Mjøs S.A., Joensen H., Grahl-Nielsen O. Validation of a one-step extraction/methylation method for determination of fatty acids and cholesterol in marine tissues. *J. Chromatogr. A*, 2006, vol. 1104, no. 1-2, pp. 291-298. doi:10.1016/j.chroma.2005.11.045.
34. O'Fallon J.V., Busboom J.R., Nelson M.L., Gaskins C.T. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *J. Anim. Sci.*, 2007, vol. 85, no. 6, pp. 1511-1521. doi:10.2527/jas.2006-491.
35. Agnew M.P., Craigie C.R., Weralupitiya G., Reis M.M., Johnson P.L., Reis M.G. Comprehensive Evaluation of Parameters Affecting One-Step Method for Quantitative Analysis of Fatty Acids in Meat. *Metabolites*, 2019, vol. 9, no. 9, pp. 189. doi:10.3390/metabo9090189.
36. Martínez B., Miranda J.M., Franco C.M., Cepeda A., Rodríguez J.L. Development of a simple method for the quantitative determination of fatty acids in milk with special emphasis on long-chain fatty acids. *CyTA J. Food*, 2012, vol. 10, no. 1, pp. 27-35. doi:10.1080/19476337.2010.538860.
37. Perez-Palacios T., Solomando J.C., Ruiz-Carrascal J., Antequera T. Improvements in the methodology for fatty acids analysis in meat products: One-stage transmethylation and fast-GC method. *Food Chem.*, 2022, vol. 371, article 130995. doi:10.1016/j.foodchem.2021.130995.
38. Liu Z., Moate P., Rochfort S. A simplified protocol for fatty acid profiling of milk fat without lipid extraction. *Int. Dairy J.*, 2019, vol. 90, pp. 68-71. doi:10.1016/j.idairyj.2018.11.005.
39. Liu Z., Wang J., Li C., Rochfort S. Development of one-step sample preparation methods for fatty acid profiling of milk fat. *Food Chem.*, 2020, vol. 315, article 126281. doi:10.1016/j.foodchem.2020.126281.
40. Liu R.-L., Song S.-H., Wu M., He T., Zhang Z.-Q. Rapid analysis of fatty acid profiles in raw nuts and seeds by microwave–

ultrasonic synergistic in situ extraction–derivatisation and gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chem.*, 2013, vol. 141, no. 4, pp. 4269-4277. doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.011.
41. Alves S.P., Cabrita A.R.J., Fonseca A.J.M., Bessa R.J.B. Improved method for fatty acid analysis in herbage based on direct transesterification followed by solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A*, 2008, vol. 1209, no. 1-2, pp. 212-219. doi:10.1016/j.chroma.2008.08.114.
42. Garces R., Mancha M. One-Step Lipid Extraction and Fatty Acid Methyl Esters Preparation from Fresh Plant Tissues. *Anal. Biochem.*, 1993, vol. 211, no. 1, pp. 139-143. doi:10.1006/abio.1993.1244.
43. Harmanescu M. Comparative researches on two direct transmethylation without prior extraction methods for fatty acids analysis in vegetal matrix with low fat content. *Chem. Cent. J.*, 2012, vol. 6, no. 1, article 8. doi:10.1186/1752-153x-6-8.
44. Ruiz-López N., Martínez-Force E., Garcés R. Sequential one-step extraction and analysis of triacylglycerols and fatty acids in plant tissues. *Anal. Biochem.*, 2003, vol. 317, no. 2, pp. 247-254. doi:10.1016/s0003-2697(03)00139-8.
45. Xiao S., Li H.-O., Xu M., Huang K., Zhoufei L., Langtao X. A high-throughput method for profiling fatty acids in plant seeds based on one-step acid-catalyzed methylation followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 2021, vol. 35, no. 1, pp. 1076-1085. doi:10.1080/13102818.2021.1954552.
46. Liu R.-L., Zhang J., Mou Z.-L., Hao S.-L., Zhang Z.-Q. Microwave-assisted one-step extraction-derivatization for rapid analysis of fatty acids profile in herbal medicine by gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst*, 2012, vol. 137, no 21, article 5135. doi:10.1039/c2an36178g.
47. Novak I. *Kolichestvennyi analiz metodom gazovoi khromatografii* [*Quantitative analysis by gas chromatography*]. Moscow, Mir publ., 1978. 179 p. (in Russian).