

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.153.015-074

Калинин А.В.¹, Крашенинников В.Н.¹, Свиридов А.П.², Титов В.Н.³

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ТРИГЛИЦЕРИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ НА ОСНОВЕ ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ

¹ФГБУН Институт спектроскопии РАН; РФ, 142190, Москва, Троицк; ²ФГБУН Институт лазерных и информационных технологий РАН, РФ, 142190, Троицк; ³ФГБУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава, РФ, 121552, Москва

Содержание клинически важных жирных кислот (ЖК) и индивидуальных триглицеридов в пище и биологических средах традиционно определяют способами газовой и жидкостной хроматографии в разных методических модификациях; по причине сложности эти методы малодоступны для лабораторий клинической биохимии. Цель исследования – разработать приемы и аппаратуру для оперативного количественного определения концентрации ЖК, в первую очередь пальмитиновой насыщенной и олеиновой мононенасыщенной, а также суммы полиеновых (эйкозапентаеновая+докозагексаеновая) ЖК в биологических средах (рыбий жир, ткани, плазма крови) с применением спектрометров ближнего инфракрасного диапазона различных типов: с Фурье-преобразованием, дифракционных и комбинационного рассеяния. На основе метода калибровки (регрессии) по проекциям на латентные структуры при использовании стандартных образцов смесей масел и жиров получены доказательства достоверного и воспроизводимого количественного определения ЖК. Выполнена оценка возможности раздельного определения содержания пальмитиновых и олеиновых триглицеридов в средах с присутствием воды, обоснован выбор технических условий и способа применения некоторых типов ИК-спектрометров и методов их калибровки.

Ключевые слова: жирные кислоты; триглицериды; спектрометрия ближнего инфракрасного диапазона; регрессия по проекциям на латентные структуры; погрешность и селективность количественного определения.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60(11): 13–20.

Kalinin A.V.¹, Krasheninikov V.N.¹, Sviridov A.P.², Titov V.N.³

THE DETECTION OF CONTENT OF DIAGNOSTICALLY SIGNIFICANT FATTY ACIDS AND INDIVIDUAL TRIGLYCERIDES IN BIOLOGICAL MEDIUMS BASED ON INFRARED SPECTROMETRY

¹The institute of spectroscopy of the Russian academy of sciences, 142190 Troitsk, Moscow, Russia; ²The institute of laser and informational technologies of the Russian academy of sciences, 142190 Troitsk, Russia; ³The Russian Cardiology R&D production complex of Minzdrav of Russia, 121552 Moscow, Russia

The content of clinically important fatty acids and individual triglycerides in food and biological mediums are traditionally detected by gas and fluid chromatography in various methodical modifications. The techniques are hard-to-get in laboratories of clinical biochemistry. The study was carried out to develop procedures and equipment for operative quantitative detection of concentration of fatty acids, primarily palmitic saturated fatty acid and oleic mono unsaturated fatty acid. Also detection was applied to sums of polyenoic (eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid) fatty acids in biological mediums (cod-liver oil, tissues, blood plasma) using spectrometers of short-range infrared band of different types: with Fourier transform, diffraction and combined scattering. The evidences of reliable and reproducible quantitative detection of fatty acids were received on the basis of technique of calibration (regression) by projection on latent structures using standard samples of mixtures of oils and fats. The evaluation is implemented concerning possibility of separate detection of content of palmitic and oleic triglycerides in mediums with presence of water. The choice of technical conditions and mode of application of certain types of infrared spectrometers and techniques of their calibration is substantiated.

Key words: fatty acids; triglycerides; spectrometry; short-range infrared band; regression by projection on latent structures; error and selectivity of qualitative detection

Citation: *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 2015; 60 (11): 13–20. (in Russ.)*

Введение. В животном мире именно жирные кислоты (ЖК) являются теми веществами, которые: а) задействованы в формировании функционально специфических структур животных клеток; б) участвуют в синтезе биологически активных медиаторов – эйкозаноидов, которые регулируют *in vivo* биологические функции и биологические реакции; в) являются субстратами для окисления в митохондриях с целью обеспечения клеток энергией, выработки макроэргического АТФ. Согласно филогенетической теории общей патологии, нарушение метаболизма ЖК является основой патогенеза

столь распространенных в популяциях сердечно-сосудистых заболеваний, включая «метаболические пандемии»; ими являются атеросклероз, ожирение, метаболический синдром и синдром инсулинорезистентности (ИР). Несмотря на столь важное диагностическое значение и биологическую роль ЖК в каждой из клеток *in vivo*, оперативно определять ЖК в диагностическом процессе в лабораториях клинической биохимии мы не можем. Содержание ЖК косвенно оцениваем на основании количественного определения спиртов (трехатомного гидрофильного спирта глицерина и одноатомного, гидрофобного, циклического спирта холестерина – ХС). Оба спирта этерифицируют ЖК в состав неполярных липидов – триглицеридов (ТГ) и эфиров холестерина (ЭХС).

Основными методами количественного определения индивидуальных ЖК в клинической биохимии являются га-

Для корреспонденции: Калинин Андрей Валентинович, kalinin@isan.troitsk.ru

For correspondence: Kalinin A.V., kalinin@isan.troitsk.ru

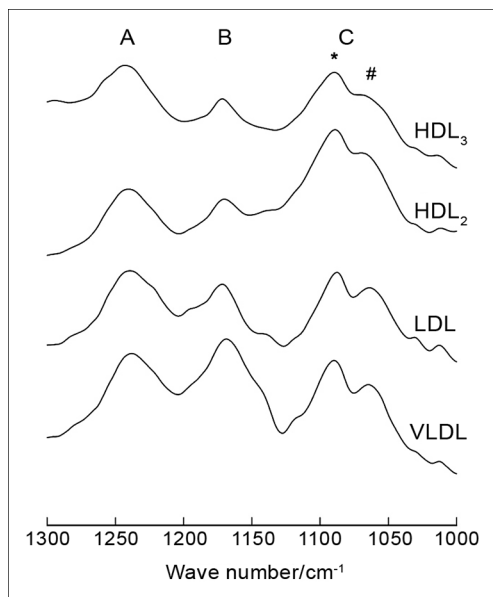


Рис. 1. ИК-спектры Фурье поглощения (в отн. ед.) разных классов ЛП плазмы крови для волновых чисел 1000–1300 см⁻¹ (длины волны 7,7–10 мкм).

зоявая и жидкостная хроматография; с методической точки зрения они малодоступны для клинической биохимии. Необходимость оперативно определять клинически значимые показатели – содержание пальмитиновой насыщенной С16:0 (НЖК), олеиновой С18:1 мононенасыщенной (МЖК) и ω-3 С20:5 эйкозапентаеновой полиненасыщенной ЖК (ПНЖК) в биологических жидкостях и тканях, побудила клинических биохимиков использовать методы инфракрасной (ИК) спектроскопии.

Применение ИК-спектроскопии позволило количественно определить содержание в плазме крови ЛПВП₂, ЛПВП₃, ЛПНП и ЛПОНП, охарактеризовать состав липидов в липопротеидах (ЛП), содержание полярных и неполярных липидов (рис. 1) [1]. Определены размеры ЛП, которые составляют соответственно 8, 10–20, 26 и 30–80 нм. Содержание в ЛП неполярных ТГ + моно-ЭХС + поли-ЭХС в сумме равно соответственно 10 ± 33, 19 ± 30, 336 ± 1600 и 11529 ± 3618 мг/дл. Эти гидрофобные липиды в ЛП ассоциированы с разными по степени гидрофобности доменами аминокислотных остатков с α-спиральной и β-складчатой структурой в составе апоА-I и апоВ-100. Одновременно полярные фосфолипиды (ФЛ) и незтерифицированный спирт ХС формируют полярный монослой на поверхности массы неполярных ТГ, которые физико-химически связала своими доменами одна молекула апобелка. Несмотря на выраженные различия ЛП, все они сформированы по единому биологическому принципу, все ЛП – это структура: бислой – белок – липид. В гидрофильной среде плазмы крови при стремлении принять наименьшую поверхность бислой деформируется, образуя псевдосферические структуры. Детальный анализ Фурье-ИК спектров в разных интервалах длин волн дает возможность составить представление о конформации апоА-I в составе ЛПВП и стерического варианта апоВ-100 в структуре ЛПНП и ЛПОНП. В настоящее время для этого в медицинской биохимии используют весьма трудоемкие и затратные электронную микроскопию и ядерную магнитную резонансную спектроскопию.

Содержание незтерифицированного ХС в монослое ЛПОНП на поверхности ТГ – субстрата липолиза снижают фармпрепараты – ксенобиотики, статины; они уменьшают разобщение субстрат↔фермент, увеличивая физико-химическую ассоциацию ТГ↔постгепариновая липопроте-

инлипаза; этим статины активируют липолиз, проявляя гиполлипидемическое действие. Продукты гидролиза неполярных ТГ в форме полярных диглицеридов, моноглицеридов и незтерифицированных ЖК можно определять, используя комбинационное рассеяние (КР) света (эффект Рамана) (рис. 2). Этот подход может послужить основой изучения модельной системы действия бактериальной липазы для оценки индивидуальных ТГ как субстратов липолиза и кинетики биохимических превращений липидов и ЖК при реакциях *in vivo*. Подобные данные составляют основу диагностики наследственных и приобретенных гиперлипидемий и профилактики «метаболических пандемий», «болезней цивилизации».

Применение метода спектроскопии КР света при использовании ИК-спектрометров позволяет дифференцировать и количественно определить содержание в смеси нейтральных гидрофобных липидов индивидуальных ЖК и индивидуальных ТГ [2]. Треть всех ТГ в говяжьем жире и свином сале (подкожных адипоцитах) представлена как пальмитоил-олеил-олеат-глицерол, олеил-пальмитоил-олеат + пальмитоил-линолеил-стеарат. В говядине вдвое больше насыщенных ТГ, таких как пальмитоил-пальмитоил-пальмитат и стеарил-стеарил-стеарат (ССС) при примерно равном количестве ТГ, таких как пальмитоил-олеил-пальмитат и олеил-олеил-олеат (ООО) + стеарил-линолеил-стеарат. Спектроскопия КР позволяет определить и низкие концентрации таких ТГ, как стеарил-олеил-арахидонат и арахидонил-олеил-олеат.

При анализе «твердого» говяжьего и свиного сала выявлена разная структура упаковки их в «липидных каплях» ТГ; упаковка молекул неполярных ТГ различается в жировых клетках (адипоцитах) разных видов животных. Различие это в клетках в форме «липидных капель» можно выявить при использовании ИК-спектроскопии как в физиологических условиях [3], так и в патологически измененных тканях [4]. Спектроскопия КР может быть проведена и при микроскопии клеток и субклеточных образований. Важно показать, что в зависимости от числа двойных связей (ДС) в ЖК в составе ТГ упаковка неполярных липидов является различной [5]. Это во многом определяет: а) кинетические параметры гидролиза ТГ в жировых клетках в условиях биологической реакции стресса при действии гормонозависимой липазы; б) скорость выхода в кровотоки освобожденных при липолизе ЖК в форме незтерифицированных ЖК в ассоциации с липидпереносящим белком альбумином и в) параметры окисления ЖК в митохондриях с наработкой макроэргического АТФ.

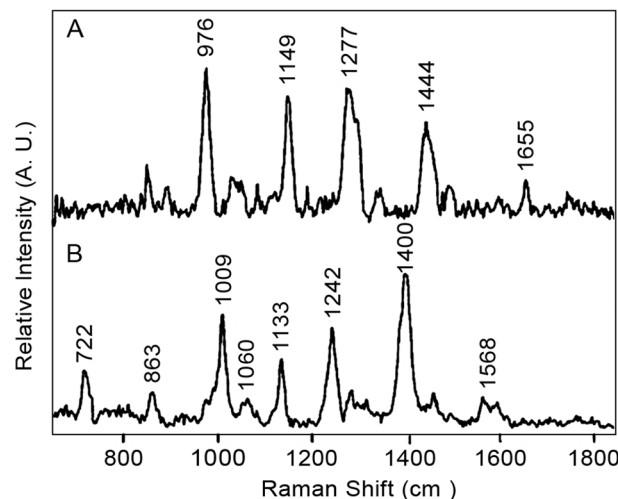


Рис. 2. Спектры КР ТГ олеил-олеил-олеат глицерола (вверху) и продукта его гидролиза при действии липазы из бактерии вида *P. Acnes*.

Упаковка неполярных ТГ в «липидных каплях» цитоплазмы в филогенетически ранних висцеральных жировых клетках саленика и поздних в филогенезе подкожных адипоцитах зависит от: а) длины цепи ЖК, числа атомов углерода; б) числа ДС в ЖК [6] и в) расположения ДС по длине ацильной цепи [7]. Для физиологического действия ЖК *in vivo* важно определить кинетические параметры гидролиза в клетках индивидуальных ТГ и константу скорости окисления митохондриями разных ЖК [8]. Ранее мы отмечали, что содержание спиртов ХС и глицерина в плазме крови зависит от числа ДС в составе ЖК и ТГ [9]. Диета, перегруженная НЖК (более 15% от всего количества ЖК), главным образом пальмитиновой, является причиной формирования эндоплазматического стресса и началом эндогенной биологической реакции воспаления с нарушением функции монослоя эндотелия в артериолах эластического типа [10]. Метод спектроскопии КР с использованием микроскопического лазерного пинцета [11] позволяет наблюдать динамику взаимодействия ЛПОНП с плазматической мембраной монослоя эндотелия в сосудах.

К сожалению, все вышеупомянутые методы исследования физико-химических параметров ЖК, полярных, нейтральных липидов и ЛП еще не стали практикой даже специализированных лабораторий клинической биохимии. Но будущее обещает новый уровень диагностики и, следовательно, понимание результатов с позиций филогенетической теории общей патологии. Среди всех упомянутых выше методических подходов в медицине скорого будущего наше внимание привлекли данные об идентификации трех больших полиморфных форм таких ТГ, как ССС. Из всех ЖК, содержание которых в липидах *in vivo* является высоким, стеариновая С18:0 НЖК является наиболее длинноцепочечной, гидрофобной с температурой плавления 70°C. Увеличение содержания ее в плазме крови в липидах или в форме мицелл, в тканях происходит только в афизиологических условиях.

Функционально разные клетки депонируют индивидуальные ТГ в цитоплазме клеток, в частности таких ТГ, как ССС, в трех полиморфных вариантах, различающихся положением ацильных цепей ТГ: гексагональная (α -форма), орторомбическая (β_1 -форма) и триклиновидная форма (β_2 -форма), которые были дискриминированы посредством КР спектроскопии [12]. Основными факторами организации неполярной фазы из ТГ в цитозоле клеток являются точка плавления этерифицированных ЖК и температура плавления самих ТГ. В формировании полиморфных форм ТГ, возможно, задействованы также и нарушения биологической функции трофологии (питания), биологической реакции экзотрофии, возможно и нарушение процессов метаболизма *in vivo*. Мы полагаем, что изменение экспрессии стеарил-КоА-десатуразы и нарушение превращения *in vivo* стеариновой НЖК в олеиновую МЖК с увеличением содержания ее в плазме крови может иметь патогенетическое значение в таком осложнении гипертриглицеридемии, как формирование эруптивных ксантом на коже.

Определение содержания как отдельных ЖК, так и их групп (транс-дис-, НЖК, ненасыщенных ЖК (ННЖК) в пищевых продуктах и животных тканях было выполнено в работах [13 – 15] с помощью Фурье-спектроскопии в ИК-области спектра при анализе ряда полос фундаментального поглощения основных колебаний молекулярных связей С–Н, С–С, С–О, а также их обертонов и комбинаций в ближней инфракрасной (БИК) области с применением метода многомерной калибровки (регрессии), в частности метода «по проекциям на латентные структуры» (ПЛС), который был разработан ранее [16]. Сравнительная эффективность специфического определения ЖК по разным полосам поглощения, их обертонов и комбинаций в названных работах не определена, что затрудняет выбор оптимальных технических условий для создания портативного БИК-спектрометра, например, на основе линейки InGaAs фотоприемников.

Цель настоящего этапа работы – оценить достоверность, погрешность и специфичность определения содержания

ЖК: масляной (С4:0), миристиновой (С14:0), пальмитиновой НЖК, олеиновой МЖК и суммы ω -3 20:5 эйкозапентаеновой + С22:6 докозагексаеновой ПНЖК, а также диагностически значимой С18:0 стеариновой НЖК и С18:2 линолевой ННЖК, в смесях растительных масел, молочного и рыбьего жиров по спектрам в широком БИК-диапазоне при использовании Фурье-спектрометров; сравнить параметры определения названных ЖК по различным полосам (обертонам и комбинациям) поглощения, а также с параметрами определения по спектрам отечественного БИК-спектрометра – прототипа портативного анализатора качества жиров, масел, биологических сред. Кроме того, целью была оценка параметров определения тех же ЖК по спектрам КР света, поскольку последний метод привлекателен в плане диагностики ТГ в плазме крови из-за нечувствительности его к водной среде. Методом регрессии ПЛС были изучены достоверность, погрешность и селективность определения с помощью различных ИК-спектрометров и методов калибровки, оценено влияние на определение индивидуальных ЖК в стандартных образцах вариаций иных мажорных компонентов смесей – стеариновой НЖК и линолевой ННЖК.

Материалы и методы. 1. Приготовление партий стандартизованных калибровочных и тестовых образцов и исследованных продуктов. Спектрометрический анализ дисперсных смесей включает трудоемкую калибровку спектрометра по большому числу стандартных образцов с вариацией концентраций нескольких (не только определяемых), но и интерферирующих, «мешающих» компонентов. Ранее [17] мы описали и проверили экономный способ калибровки ПЛС, который дает хорошие параметры определения содержания компонентов на сконструированном нами спектрометре при специальном выборе распределений концентраций трех компонентов в партии из 35 стандартных калибровочных образцов и проверкой тестовой партией. Аналогичный подход использован и в настоящей работе при определении смесей молочного жира, пальмового и подсолнечного масел с целью определения доли молочного жира по содержанию в них С4:0, С14:0 и С16:0 ЖК [18], а также смесей пальмового, оливкового масел и рыбьего жира для определения содержания С16:0, С18:1 и С20:5+С22:6 в жирах и маслах. Запекание мойвы и кижуча выполнено в духовом шкафу при температуре 180°C в течение 8–9 мин. Рыбий жир из сырых и испеченных и измельченных тканей мойвы (*Mallotus villosus*), кижуча (*Oncorhynchus kisutch*) и слабосоленой сельди (*Clupea*) получили прессованием при температуре 60°C в течение 4 ч. Экстрагирование жиров и масел из исходных материалов, а также очистка выдавленного рыбьего жира выполнены без применения растворителей в соответствии с теми приемами, которые описаны ранее [14]: а) продукт нагревали до 60°C и центрифугировали при 4000 об/с в пробирке; б) нижнюю водную фракцию сливали через отверстие в пробирке; в) верхнюю часть (иногда с протеинсодержащей пеной) отфильтровывали в термостате. Исходные материалы, в которых предварительно измерили содержание ЖК методом газовой хроматографии в соответствии с ISO 5508:1990(E), хроматограф модели «Кристаллюк-4000М» (производитель ООО Интехром, РФ), смешивали в необходимой пропорции при 60°C. Далее содержание ЖК в трех партиях калибровочных и тестовых образцов стандартизовали, измеряя на том же хроматографе. Перед измерением в ИК-спектрометрах образцы нагревали до 60°C в термостате. Параметры приготовленных партий стандартных образцов представлены в табл. 1. Кроме того, для оценки влияния на определение названных ЖК-вариаций иных мажорных ЖК во второй партии образцов оценены корреляции между вариациями спектров и массовых долей стеариновой НЖК и линолевой ННЖК; их параметры приведены в табл. 1.

2. Регистрация спектров. Спектры поглощения первой партии образцов, которые содержали жиры молока, измерены с помощью дифракционного спектрометра в диапазоне длин волн 1100–1650 нм (далее InGaAs-спектрометр; рис. 3).

Таблица 1

Концентрация индивидуальных ЖК в партии калибровочных и тестовых образцов

№ партии	Количество образцов (калибровка + тестирование)	ЖК	Диапазон вариации, %	Средние значения
1	38 + 35	C4:0	0,5–4,0	3,0
		C14:0	6,0–14,0	10,0
		C16:0	14,0–33,0	24,0
2	39 + 25	C16:0	14,0–25,0	20,0
		C18:1	24,0–48,0	40,0
		C20:5 + C22:6	4,5–24,0	14,0
		C18:0	2,3–3,8	3,0
		C18:2	4,4–7,2	6,0
3	35 + 13	C16:0	20,0–30,0	25,0
		C18:1	32,0–50,0	42,0
		C20:5 + C22:6	2,5–9,0	6,0

Спектры поглощения второй партии образцов, для которых характерна более значительная вариация концентраций ННЖК, измерены с помощью БИК-Фурье-спектрометра модели МРА (фирма Bruker, Германия) в диапазоне длин волн 800–2300 нм (рис. 4) при времени накопления 4 мин (64 скана). Измерение образцов третьей партии проведено с помощью БИК-Фурье-спектрометра модели Tango (фирма Bruker, Германия) в диапазоне длин волн 1000–2300 нм при том же времени накопления. Образцы второй и третьей партий в те же дни измерены тоекратно (для проверки воспроизводимости) с помощью спектрометра InGaAs в диапазоне 1100–1650 нм при времени измерения одного образца около 40 с.

Для проверки возможности диагностирования названных выше ЖК в водной среде (плазме крови) третья партия образцов была использована для построения и тестирования калибровочной модели на спектрах КР с помощью спектрометра ThermoScientific Nicolet NXR FT с возбуждением излучения лазером на длине волны 1,06 мкм при мощности 2 Вт и детектором InGaAs. Время накопления спектра составило 2,5 мин, термостагирование – то же.

3. *Построение и тестирование калибровочных моделей.* По спектрам и значениям массовых долей ЖК в калибровочных образцах при использовании программы ПЛС регрессии ISCAP, которая описана ранее [19], построены калибровочные

модели; далее мы протестировали их по партиям тестовых стандартных образцов, которые не использовали для калибровки. В моделях по спектрам Фурье-спектрометров использовали четыре спектральных поддиагона, на рис. 4 они обозначены линиями, которые параллельны шкале длин волн. Эффективность ПЛС моделей оценена в соответствии с [16] по величине коэффициента множественной корреляции r^2cv (достоверности) и среднеквадратичному отклонению – σ от арбитражных хроматографических данных. Кроме корреляции спектров образцов с содержанием важных в диагностике C16:0, C18:1 и C20:5+C22:6 ЖК, оценены параметры ПЛС регрессии спектров с содержанием двух мажорных ЖК в стандартных образцах – стеариновой C18:0 и линолевой C18:2, которые близки по структуре C18:1 МЖК и, возможно, «мешают» определению последней. Для исключения возможной интерференции и влияния на специфичность определения использованы результаты отнесения обертонов и комбинаций в БИК-спектрах образцов к типам колебаний С–Н- и С–С-связей, определяющих длину цепи и количество ДС ЖК соответственно, по данным работы [20]. Метод определения компонента считается специфичным, если его сигнал достоверно выше сигнала других компонентов [21].

Таким сигналом является один из параметров ПЛС моделей – вектор регрессионных коэффициентов (рис. 5), позволяющий:

а) выбрать участки спектров, которые содержат значимые для определения каждого из ЖК регрессионные коэффициенты,

б) использовать в моделях те из них, которые не перекрываются с участками, значимыми для определения других ЖК, а также произвести сопоставление (отнесение) полос поглощения с молекулярными колебаниями функциональных групп.

Степень независимости определения аналитов от мешающего действия матрицы мы оценили на основе двух подходов: а) оценка показателей ПЛС регрессии для структурных аналогов аналита и б) проверка отсутствия отклика в стандартных образцах с содержанием аналита ниже нижнего предела определения (в «пустой» (blank-) матрице) в соответствии с [22]. Выбранные по результатам тестирования калибровочные модели использованы затем для оценки качества продуктов питания и биологически активных добавок.

Результаты и обсуждение. Калибровочные модели по спектрам обоих Фурье-спектрометров для четырех спектральных диапазонов (включая полный 800–2300 нм) при тестировании дают близкую погрешность, причем модель для диапазона 1100–1880 нм имеет меньшие значения стандартной ошибки σ при перекрестной проверке даже по сравнению с моделью по спектрам полного БИК-диапазона. Влияние

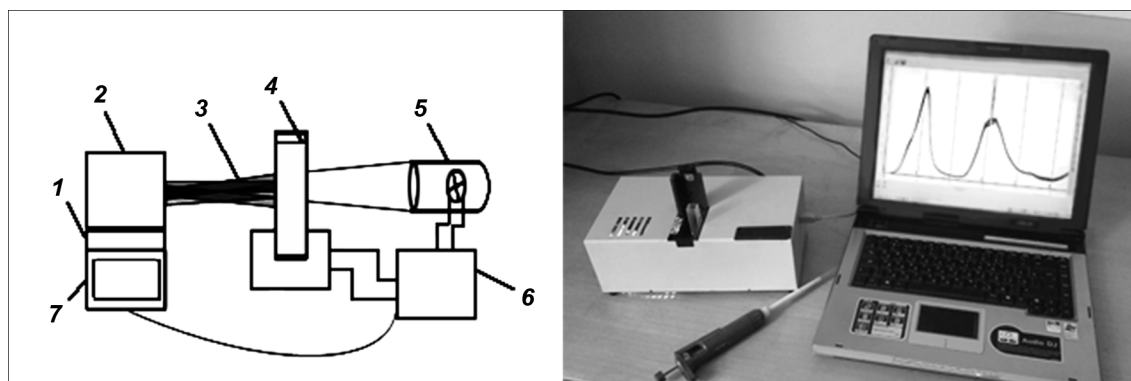


Рис. 3. Схема и общий вид спектрометра InGaAs.

1 – линейка фотодиодов InGaAs; 2 – полихроматор с дифракционной решеткой; 3 – приемный БИК-световод; 4 – термостагированная при 60°C кювета с образцом, длина оптического пути 10 мм; 5 – галогенная лампа и фильтр, отсекающий видимый свет; 6 – блок питания; 7 – ноутбук.

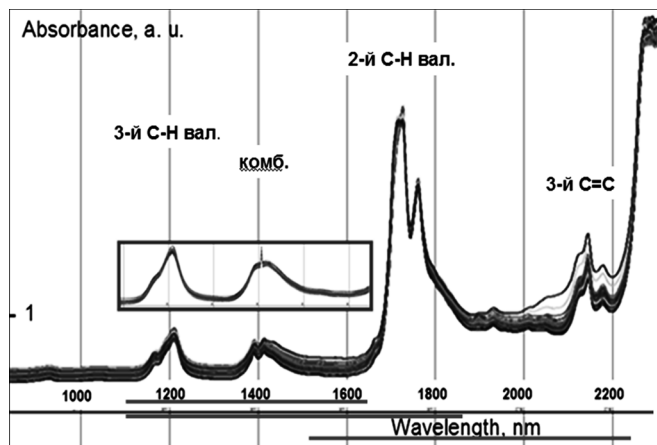


Рис. 4. Спектры оптической плотности 51 образца в кювете Ø 6 мм, полученные с помощью Фурье-спектрометра МРА, Брукер. В прямоугольнике выделены спектры образцов, накопленные спектрометром InGaAs. Линиями вблизи шкалы длин волн отмечены диапазоны линеек, которые пригодны для спектрометра InGaAs.

предобработки спектров на модели незначительно, однако удаление общей базовой линии в спектрах и дифференцирование спектров улучшают параметры определения С18:1.

Следует отметить, что во всех моделях наилучшие показатели достоверности и погрешности показали модели для определения суммы С210:5 + С22:6 ЖК (рис. 6).

Различие степени ненасыщенности ЖК (числа связей С–С) проявляется различием векторов регрессионных коэффициентов для С20:5 + С22:6 ПНЖК, С18:2 и С18:1 МЖК вблизи длины волны 1150 нм, а различие числа атомов углерода в молекуле ЖК – сдвигом пика вблизи длин волн около 1400 нм в «жесткую» область спектра при увеличении числа атомов С в цепи (рис. 7).

Модели по спектрам обоих Фурье-спектрометров для образцов, стандартизованных для определения структурных аналогов олеиновой ЖК, показали отсутствие корреляции спектров с вариацией стеариновой С18:0 ЖК и заметную корреляцию (коэффициент множественной корреляции r^2CV – от 0,61 до 0,74) для линолевой ННЖК. Установлено, что парная корреляция массовых долей олеиновой и линолевой

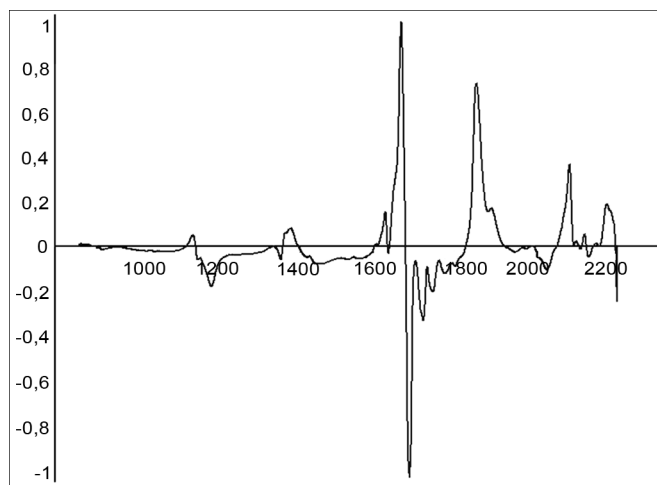


Рис. 5. Значения (векторы) регрессионных коэффициентов в зависимости от длины волны (в нм) к модели по 39 образцам смесей для определения массовой доли суммы С20:5 и С22:6 при использовании четырех латентных переменных.

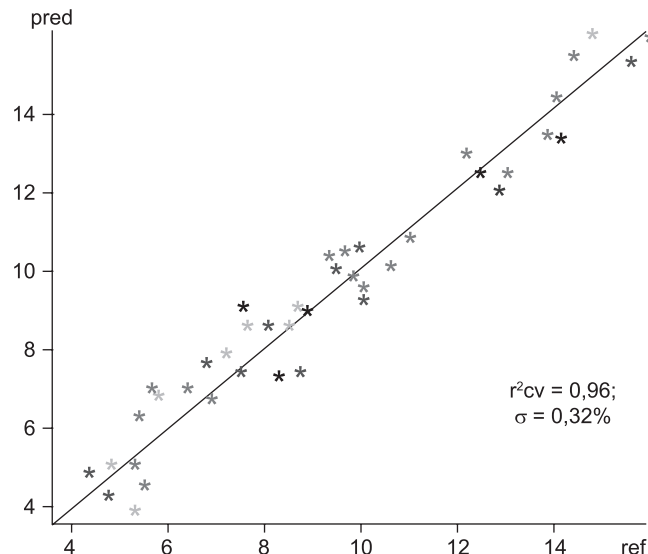


Рис. 6. График значений массовых долей суммы ЖК С20:5+С22:6 по спектрам 40 образцов, измеренных спектрометром InGaAs.

По оси ординат pred – измеренные, по оси абсцисс ref – стандартные; в рамке – параметры модели: r^2p – коэффициент корреляции, σ – стандартная ошибка определения.

ЖК в партии стандартных образцов не превышала 25%. Отсюда следует возможность «мешающего» действия последней. Оно было оценено путем сравнения результатов определения содержания С18:2 в тестовой партии из 25 образцов моделями в двух различных (хотя и соседних) спектральных поддиапазонах, отражающих различие только степени ненасыщенности этих ЖК, в соответствии с результатом работы [17]. Сравнение показало, что достоверности определения С18:1 и С18:2 посредством обеих моделей весьма высоки

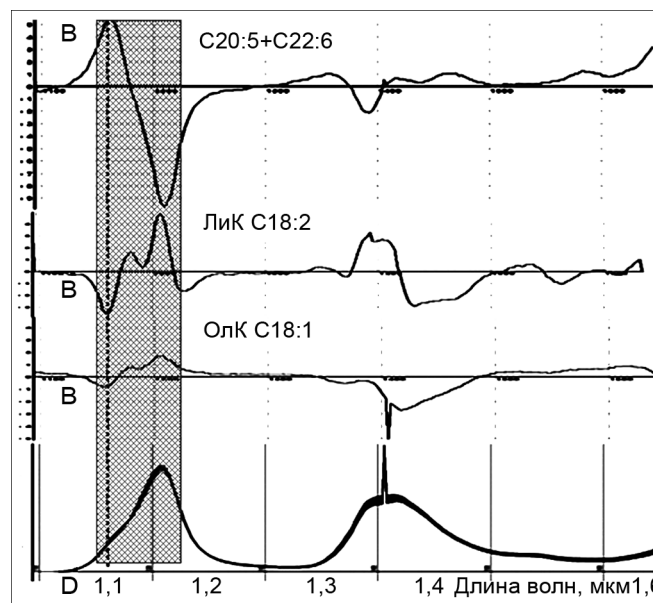


Рис. 7. Векторы регрессионных коэффициентов В моделей для определения ЖК С20:5 + С22:6 – вверху, С18:2 – в середине и С18:1 – внизу: различная степень ненасыщенности проявляется различием регрессионных коэффициентов в области серого тона при 1,1 мкм; внизу – спектры D для 44 образцов модели для сравнения (пик при 1405 нм – дефект фотоприемников).

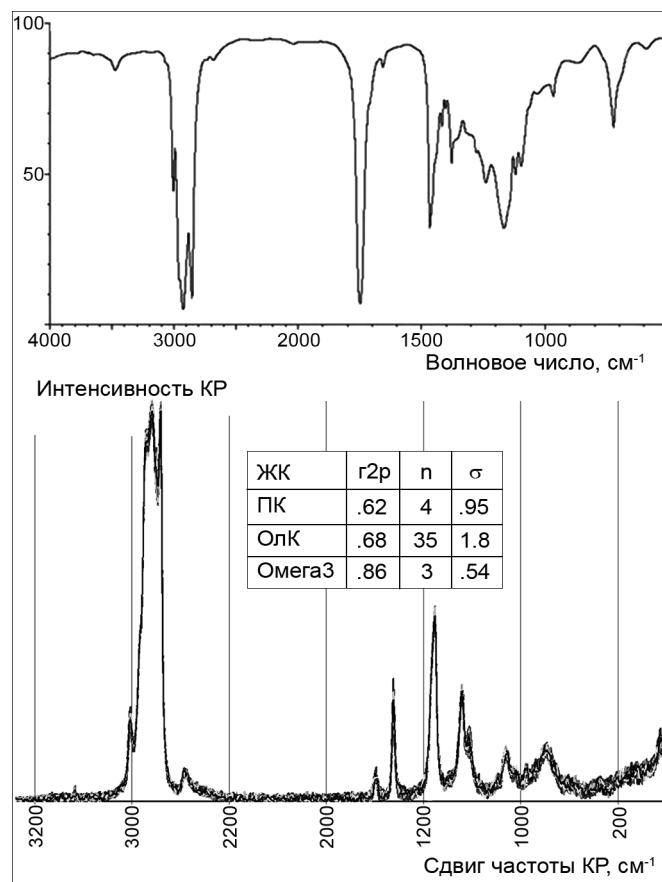


Рис. 8. Спектры фундаментального поглощения триолеата (вверху), спектры КР 48 образцов и в рамке – параметры тестирования модели на 35 образцах по 13 тестовым образцам: r^2p – коэффициент корреляции, n – число латентных переменных, σ – стандартная ошибка определения.

и близки по величине (r^2CV составляет 0,84 и 0,86 соответственно), что указывает на независимость определения. Спектры КР третьей партии образцов и параметры тестирования оптимальной модели приведены на рис. 8. Сравнение полос фундаментального поглощения, полученных в Фурье-ИК- и в КР-спектрометрах показывает отсутствие полосы связи – ОН (вблизи волновых чисел 700 и 1640 cm^{-1}) в последних. Построенные модели позволяют определять содержание С16:0, С18:1 и С20:5+С22:6 на фоне 5–8% содержания воды без помех.

Как отмечено выше, спектральный диапазон имеющегося спектрометра InGaAs не является наиболее благоприятным для определения содержания профилактически, прогностически и терапевтически значимых ЖК. Однако наилучшие по результатам тестирования калибровочные модели спектрометра InGaAs мы использовали для экспресс-определения их содержания в продуктах. Так, определение содержания НЖК, МЖК, ННЖК и ПНЖК в рыбьем жире и биологически активных добавках (табл. 2) позволило сделать заключение об эффективном содержании ω -3 ПНЖК. Определение массовой доли ω -3 ПНЖК в сырой и печеной рыбе указывает на то, что при запекании рыбы содержание ЖК уменьшается на 15–17%. Эти данные позволяют определить то количество животной пищи, которое содержит биологически необходимую для человека дозу ω -3 ПНЖК.

Определение доли молочного жира в спредах (наливной маргарин) и маслах (табл. 3) указывает на существенное количество подделок продуктов, содержащих молоко.

В связи с новыми представлениями о патогенезе атеросклероза в свете филогенетической теории общей патологии особое диагностическое значение имеет отношение С16:0/С18:1 в плазме крови и тканях. Создание портативного спектрометра для излучения диапазона длин волн 1100–1880 нм позволит эффективно контролировать нарушения биологической функции трофологии (питания), биологической реакции экзотрофии, метаболизма ЖК, липидов и ЛП. Представляется возможным использовать БИК-спектрометры не только для количественного анализа ЖК и ТГ в продуктах и биологически активных добавках с высоким содержанием линолевой и линоленовой ННЖК

Таблица 2

Содержание НЖК, МЖК, ННЖК и ПНЖК в рыбе и в биологически активных добавках

Продукт	Доля ЖК в жире				Заключение о содержании ω -3
	С16:0	С18:1	С18:2	Ω -3	
«Рыбий жир ω -3 25%»	12,4	39,9	9,9	24,4	Норма
«Доппельгерцактив ω -3 37%»	18,1	11,4	2,0	33,2	Меньше нормы
«Биафишенол ω -3 48%»	13,4	23,6	> 10,0	17,8	То же
Мойва сырая	15,9	42,0	4,2	13,1	
Мойва запеченная	14,2	41,0	4,0	11,1	Уменьшено на 15%
Кижуч сырой	17,2	47,8	> 10,0	7,2	
Кижуч запеченный	17,7	45,2	> 10,0	6,0	Уменьшено на 17%
Сельдь атлантическая	14,9	39,9	> 10,0	11,2	

Таблица 3

Доля молочного жира в спредах (наливных маргаринах) и в сливочном масле

Продукт	Доля ЖК в продукте					Заключение
	С4:0	С14:0	С16:0	С18:1	С18:2	
Спред «Кремлевское»	1,1	6,1	29,2	39,1	> 10,0	Мало молочного жира, много С18:2 – подсолнечное масло
Спред "Extra", 72%	< 5	12,2	30,3	48,0	> 10,0	Мало молочного жира, много С18 – подсолнечное масло
Масло "Из Василькова"	< 5	4,1	32,9	52,0	8,0	Нет молочного жира, много С18 – подсолнечное + кокосовое масла
Заменитель масла "Efko"	1,5	2,6	44,0	41,3	5,2	Молочного жира < 30%, много С16:0 – пальмоядровое масло

и ω -3 ЖК, но и в лаборатории клинической биохимии для анализа плазмы крови.

Портативный отечественный спектрометр InGaAs позволяет специфично определить содержание в биологических средах и биологических продуктах содержание индивидуальных НЖК, С4:0 масляной, С14:0 миристиновой, С16:0 пальмитиновой, С18:1 олеиновой. Суммарное содержание ω -3 ПНЖК достоверно определяется с помощью портативного спектрометра InGaAs в диапазоне 1100–1650 нм. В рассмотренном спектральном диапазоне Фурье-спектрометра 800–2300 нм соотношения С18:1/С16:0 определяются с оптимальной погрешностью и специфичностью в диапазоне 1100–1880 нм. Содержание С16:0 достоверно можно определить при использовании всех рассмотренных БИК-спектрометров. Использование дифференцированных спектров, как правило, увеличивает систематическую ошибку определения. Ее учет, проведенный нами по данным тестирования, позволил оценить стандартную ошибку и параметры 95% процентиля, который удобно использовать при контроле качества. Определение названных ЖК по спектрам КР показало перспективность метода для образцов с малым содержанием ЖК и в присутствии водной среды.

Внедрение в клиническую практику метода количественного определения индивидуальных ЖК и отношений олеиновая МЖК/пальмитиновая НЖК, стеариновая НЖК/пальмитиновая НЖК и олеиновая МЖК/стеариновая НЖК с использованием отечественного спектрометра InGaAs дает возможность разработать биохимически и физико-химически обоснованные, доступные методы массового контроля. Это касается эффективности проведения диетотерапии с целью профилактики атеросклероза, метаболического синдрома и синдрома ИР.

Для клинической биохимии и новых представлений о патогенезе атеросклероза с позиций филогенетической теории общей патологии [23] важно продолжить разработку на основе ИК-спектроскопии методов определения в биологических средах содержания не только индивидуальных ЖК, но и индивидуальных ТГ, таких как ООО, ССС и линолеил-линоленил-арахидонат глицерол. В клинической биохимии диагностически значимо также:

а) количественно охарактеризовать содержание полярных ди- и моноацилглицеридов, их ненасыщенность;

б) определить содержание в составе ЛП раздельно моно- и полиеновых ЭХС. В целях диагностики и профилактики гиперлипидемии разных фенотипов и типов важно определить содержание ФЛ, в первую очередь фосфоглицеридов, а также сфингофосфолипидов. Важно отработать оперативный и нетравмирующий метод количественного определения в плазме крови ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП. Поскольку во всех этих направлениях достигнуты определенные успехи, использование ИК-спектроскопии представляется весьма перспективным. Однако все это предстоит еще диагностировать и изучать.

Благодарности. Авторы глубоко благодарны Е. А. Юровой, зав. лабораторией техноконтроля Всероссийского НИИ молочной промышленности Россельхозакадемии, за предоставление стандартных образцов смесей жирных кислот, а также канд. физ.-мат. наук Н.Ю.Болдыреву за регистрацию спектров партий образцов с применением Фурье-спектрометров.

ЛИТЕРАТУРА

- Krilov D., Balarin M., Kosovi M., Gamulin O., Brnjac-Kraljevi J. FT-IR spectroscopy of lipoproteins – A comparative study. *Spectrochimica. Acta. Part A.* 2009; 701–6.
- Motoyama M. Structure and Phase Characterization of Triacylglycerols by Raman Spectroscopy. *Bull NARO. Inst. Livest. Grassl. Sci.* 2012; 12: 19–68.
- HongFei M.A., Yong Z., AnPei Y.E. Single-cell discrimination based on optical tweezers raman spectroscopy. *Chinese. Sci. Bull.* 2013; 58(21): 2594–00.
- Ting H.J., Stice J.P., Schaff U.Y. et al. Triglyceride-rich lipoproteins prime aortic endothelium for an enhanced inflammatory response to tumor necrosis factor- α . *Circ. Res.* 2007; 100: 381–90.
- Rinia H.A., Burger K., Bonn M., Muller M. Quantitative label-free imaging of lipid composition and packing of individual cellular lipid droplets using multiplex CARS microscopy. *Biophys. J.* 2008; 95: 4908–14.
- Weng Y.M., Weng R.H., Tzeng C.Y., Chen W. Structural analyses of triacylglycerols and edible oils by near-infrared Fourier-transform Raman spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 2003; 57(4): 413–8.
- Plourde M., Sergiel J.P., Chardigny J.M. et al. Absorption and metabolism of conjugated alpha-linolenic acid given as free fatty acids or triacylglycerols in rats. *Nutr. Metab.* 2006; 3: 8–14.
- Лисицын Д.М., Разумовский С.Д., Тишенин М.А., Титов В.Н. Кинетические параметры окисления озоном индивидуальных жирных кислот. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2004; 138(11): 517–9.
- Титов В.Н., Лисицын Д.М. Содержание спиртов холестерина и глицерина в плазме крови зависит от числа двойных связей жирных кислот в пуле липидов липопротеинов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2006; 142(11): 521–5.
- Sun C., Alkhoury K., Wang Y.I. et al. IRF-1 and miRNA126 modulate VCAM-1 expression in response to a high-fat meal. *Circ. Res.* 2012; 111: 1054–64.
- Chan J.W., Motton D., Rutledge J.C., Keim N.L., Huser T. Raman spectroscopic analysis of biochemical changes in individual triglyceride-rich lipoproteins in the pre- and postprandial state. *Anal. Chem.* 2005; 77(18): 5870–6.
- da Silva E., Bresson S., Rousseau D. Characterization of the three major polymorphic forms and liquid state of tristearin by Raman spectroscopy. *Chem. Physics. Lipids.* 2009; 157: 113–9.
- Mossoba M., Azizian H., Kramer J. Application of Infrared spectroscopy to the rapid determination of total saturated, trans, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids. 2012; Available at: <http://lipidlibrary.aocs.org/topics/IR-trans/index.htm>
- 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.
- Richli M., Scheeder V. Comparison of sample presentation and analysis modes for the prediction of the fatty acid composition of individual pig carcasses. In: *Proceedings of 16th International Conference on Near Infrared Spectroscopy.* la Grande-Motte, France. 2013; 6: 97–100.
- Wold S., Sjostrom M., Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chem. Intelligent. Laboratory. Systems.* 2001; 58(7): 109–30.
- 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.
- 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. 2013; 3: 38–45.
- Kalinin A., Krlvtun V., Krashennnikov V., Sadovskiy S., Denisovich H., and Yurova H. “Calibration models for multi-component quantitative analyses of dairy with the use of two different types of portable near infrared spectrometer”. *J. of Near Infrared Spectr.* 2008; 16; 343–48.
- Westad F., Schmidt A., Kermit M. Incorporating chemical band-assignment in near infrared spectroscopy regression models. *J. Near. Infrared. Spectrosc.* 2008; 16(3): 265–73.
- Клименко Л.Ю., Петюнин Г.П. Анализ подходов к определению специфичности/селективности при проведении валидации аналитических методик в судебно-токсикологическом анализе. *Украинский медицинский альманах.* 2013; 16(1): 71–4.
- Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Washington, DC: U.S. Government Printing Office. 2001.
- Титов В.Н. Высокое содержание пальмитиновой жирной кислоты в пище – основная причина повышения холестерина липопротеинов низкой плотности. *Атеросклероз и дислипидемии.* 2012; 3: 48–57.

Поступила 18.05.15

REFERENCES

- Krilov D., Balarin M., Kosovi M., Gamulin O., Brnjac-Kraljevi J. FT-IR spectroscopy of lipoproteins – A comparative study. *Spectrochimica. Acta. Part A*. 2009; 701–6.
- Motoyama M. Structure and Phase Characterization of Triacylglycerols by Raman Spectroscopy. *Bull NARO. Inst. Livest. Grassl. Sci.* 2012; 12: 19–68.
- HongFei M.A., Yong Z., AnPei Y.E. Single-cell discrimination based on optical tweezers raman spectroscopy. *Chinese. Sci. Bull.* 2013; 58(21): 2594–600.
- Ting H.J., Stice J.P., Schaff U.Y. et al. Triglyceride-rich lipoproteins prime aortic endothelium for an enhanced inflammatory response to tumor necrosis factor- α . *Circ. Res.* 2007; 100: 381–90.
- Rinia H.A., Burger K., Bonn M., Muller M. Quantitative label-free imaging of lipid composition and packing of individual cellular lipid droplets using multiplex CARS microscopy. *Biophys. J.* 2008; 95: 4908–14.
- Weng Y.M., Weng R.H., Tzeng C.Y., Chen W. Structural analyses of triacylglycerols and edible oils by near-infrared Fourier-transform Raman spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 2003; 57(4): 413–8.
- Plourde M., Sergiel J.P., Chardigny J.M. et al. Absorption and metabolism of conjugated alpha-linolenic acid given as free fatty acids or triacylglycerols in rats. *Nutr. Metab.* 2006; 3: 8–14.
- Lisizin D.M., Razumovskiy S.D., Ticshehin M.A., Titov V.N. Kinetic parameters of individual ozone oxidation of fatty acids. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsini.* 2004; 138(11): 517–9. (in Russian)
- Titov V.N., Lisizin D.M. The content of alcohols and glycerol cholesterol in blood plasma is dependent on the number of double bonds in the fatty acid pool lipoprotein lipids. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsini.* 2006; 142(11): 521–5. (in Russian)
- Sun C., Alkhoury K., Wang Y.I. et al. IRF-1 and miRNA126 modulate VCAM-1 expression in response to a high-fat meal. *Circ. Res.* 2012; 111: 1054–64.
- Chan J.W., Motton D., Rutledge J.C., Keim N.L., Huser T. Raman spectroscopic analysis of biochemical changes in individual triglyceride-rich lipoproteins in the pre- and postprandial state. *Anal. Chem.* 2005; 77(18): 5870–6.
- da Silva E., Bresson S., Rousseau D. Characterization of the three major polymorphic forms and liquid state of tristearin by Raman spectroscopy. *Chem. Physics. Lipids.* 2009; 157: 113–9.
- Mossoba M., Azizian H., Kramer J. Application of Infrared spectroscopy to the rapid determination of total saturated, *trans*, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids. 2012; Available at: <http://lipidlibrary.aocs.org/topics/IR-trans/index.htm>
- Cabassi G., Povoletto 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.
- Richli M., Scheeder V. Comparison of sample presentation and analysis modes for the prediction of the fatty acid composition of individual pig carcasses. In: *Proceedings of 16th International Conference on Near Infrared Spectroscopy.* la Grande-Motte, France. 2013; 6: 97–100.
- Wold S., Sjostrom M., Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chem. Intelligent. Laboratory. Systems.* 2001; 58(7): 109–30.
- 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.
- 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. 2013; 3: 38 – 45.
- Kalinin A., Krlvtun V., Krashennnikov V., Sadovskiy S., Denisovich H., and Yurova H. "Calibration models for multi-component quantitative analyses of dairy with the use of two different types of portable near infrared spectrometer". *J. of Near Infrared Spectr.* 2008; 16: 343–48.
- Westad F., Schmidt A., Kermit M. Incorporating chemical band-assignment in near infrared spectroscopy regression models. *J. Near. Infrared. Spectrosc.* 2008; 16(3): 265–73.
- Klimenko L.Yu., Petunin G.P. Analysis of approaches to determine the specificity / selectivity during the validation of analytical methods in forensic toxicological analysis. *Ukrainskiy medichniy al'manah.* 2013; 16(1): 71–4. (in Russian)
- Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Washington, DC: U.S. Government Printing Office. 2001.
- Titov V.N. The high content of palmitic acid in fatty food – the main reason for the increase of LDL cholesterol. *Atheroscleroz i dislipidemii.* 2012; 3: 48–57. (in Russian)

Received 18.05.15

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.34-002.1-022-06:616.151.11-053.2-07

Кригер Е.А.¹, Самодова О.В.¹, Гулакова Н.Н.², Аруев А.Б.², Крылова И.А.¹, Титова Л.В.¹

СПОСОБЫ ОЦЕНКИ ТИПА ДЕГИДРАТАЦИИ У ДЕТЕЙ, ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ПО ПОВОДУ ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИИ

¹ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 163000, г. Архангельск, Россия;²ГБУЗ АО «Архангельская детская клиническая больница им. П.Г. Выжлецова», г. Архангельск, Россия

Ежегодно в мире 800 тыс. случаев кишечных инфекций у детей заканчиваются летальным исходом вследствие дегидратации. Разные типы дегидратации требуют дифференцированного подхода к коррекции. Рутинное определение осмолярности плазмы крови при эксикозе у детей повсеместно не проводится ввиду отсутствия возможности аппаратного измерения. Необходим поиск методов, позволяющих косвенно определять типы дегидратации у детей, госпитализированных по поводу острой кишечной инфекции, для проведения рациональной терапии водно-электролитных нарушений. Обследованы 32 пациента с кишечными инфекциями, сопровождавшимися признаками эксикоза II–III степени. Определение осмолярности крови проводили аппаратным методом с использованием газоанализатора ABL 800 Flex (Radiometer, Дания) и пятью расчетными методами по результатам биохимического анализа крови. Различия в точности измерения осмолярности плазмы аппаратным и расчетными методами были сопоставлены с использованием графического метода Бланда – Алтмана. Установлено, что наиболее точной является формула: $2 \cdot [Na^+]_{sp} + [глюкоза]_{sp}$ (в ммоль/л), при использовании которой были получены результаты, сопоставимые со значениями, определенными аппаратным способом.

Ключевые слова: кишечные инфекции; типы дегидратации; осмолярность; дети.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015;60(10): 20–24.

Для корреспонденции: Кригер Екатерина Анатольевна, kate-krieger@mail.ruFor correspondence: Krieger E.A., kate-krieger@mail.ru