

21. Nielsen T.S., Jessen N., Jørgensen J.O., Møller N., Lund S. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J. Mol. Endocrinol.* 2014; 52(3): R199 - 222.
22. Titov V.N. *Metabolic syndrome - overeating physiological food. Visceral fat cells, and non-esterified free fatty acids. [Metabolicheskiy sindrom - pereedanie fiziologichnoy pishi. Viskeral'nye ghirovye kletki, neeterifizirovannye i svobodnye ghirovye kisloty]*. Moscow: INFRA-M; 2017. (in Russian)
23. Kuz'menko D.I., Udinzhev S.N., Kliment'eva T., Serebrov V.Yu. Oxidative stress of adipose tissue as the primary link in the pathogenesis of insulin resistance. *Biomeditsinskaya khimiya.* 2016; 62(1): 14 - 21. (in Russian)
24. Prozorovskiy V.N., Lokhov P.G., Maslov D.L., Ipatova O.M. Structural and functional features of insulin and the mechanism of its action. *Biomeditsinskaya khimiya.* 2003; 49(1) 46 - 62. (in Russian)
25. Ksenofontova O.I. Introduction of mutations in the insulin molecule: "positive" and "negative" mutations. *Biomeditsinskaya khimiya.* 2014; 60(4): 430 - 7. (in Russian)
26. Phosat C., Panprathip P., Chumpathat N., Prangthip P., Chantratita N. Elevated C-reactive protein, interleukin 6, tumor necrosis factor alpha and glycemic load associated with type 2 diabetes mellitus in rural Thais: a cross-sectional study. *BMC Endocr. Disord.* 2017; 17(1): 44 - 9.
27. Protzek A.O., Rezende L.F., Costa-Júnior J.M., Ferreira S.M., Cappelli A.P., de Paula F.M. Hyperinsulinemia caused by dexamethasone treatment is associated with reduced insulin clearance and lower hepatic activity of insulin-degrading enzyme. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2016; 155(Pt A): 1 - 8.
28. Wen L., Duffy A. Factors Influencing the gut microbiota, inflammation, and type 2 diabetes. *J. Nutr.* 2017; 147(7): 1468S - 75S.
29. de Groot P.F., Frissen M.N., de Clercq N.C., Nieuwdorp M. Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: history, present and future. *Gut. Microbes.* 2017; 8(3): 253 - 67.
30. Kahn S.E., Cooper M.E., Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet.* 2014; 383(9922): 1068 - 83.
31. Kuzuya T., Nakagawa S., Satoh J., Kanazawa Y., Iwamoto Y., Kobayashi M., Nanjo K., Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes. Res. Clin. Pract.* 2002; 55(1): 65 - 85.
32. Cometty of Japan Diabetes Society. Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *J. Diabet. Invest.* 2010; 1(5): 212 - 28.
33. Li Y., Hryby A., Bernstein A.M., Ley S.H., Wang D.D., Chiuve S.E. Saturated fats compared with unsaturated fats and sources of carbohydrates in relation to risk of coronary heart disease: a prospective cohort study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2015; 66(14): 1538 - 48.
34. Rask-Madsen C., Kahn C.R. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012; 32(9): 2052 - 9.
35. Domanski M.J., Fuster V., Diaz-Mitoma F., Grundy S., Lloyd-Jones D., Mamdani M. Next Steps in Primary Prevention of Coronary Heart Disease: Rationale for and Design of the ECAD Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2015; 66(16): 1828 - 36.
36. Balijepalli C., Druyts E., Siliman G., Joffres M., Thorlund K., Mills E.J. Hypoglycemia: a review of definitions used in clinical trials evaluating antihyperglycemic drugs for diabetes. *Clin. Epidemiol.* 2017; 9: 291 - 6.
37. Shin J.A., Lee J.H., Lim S.Y., Ha H.S., Kwon H.S., Park Y.M. Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness. *J. Diabetes. Investig.* 2013; 4(4): 334 - 43.
38. Odegaard J.I., Ricardo-Gonzales R.R., Goforth M.H., Morel C.R., Subramanian V., Mukundan L., Red Eagle A. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature.* 2007; 447(7148): 1116 - 20.
39. Odin V.I. Clinical rhetoric in high school. *Клиническая медицина.* 2016; 94(6): 474 - 9. (in Russian)
40. Yoshinaga K., Obi J., Nagai T., Iioka H., Yoshida A., Beppu F., Gotoh N. Quantification of triacylglycerol molecular species in edible fats and oils by gas chromatography-flame Ionization detector using correction factors. *J. Oleo. Sci.* 2017; 66(3): 259 - 68.
41. May C.Y., Nesaretnam K. Research advancements in palm oil nutrition. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2014; 116(10): 1301 - 15.

Поступила 25.08.17

Принята к печати 30.08.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.31:547.2951-074:543.544

Ариповский А.В.¹, Колесник П.О.², Кулагина Т. П.³, Титов В. Н.⁴

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ: ПРЕИМУЩЕСТВА БЕЗЭКСТРАКЦИОННОГО МЕТОДА С ПРЯМОЙ ПЕРЕЭТЕРИФИКАЦИЕЙ ЛИПИДОВ ВЫСУШЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБ

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Госсанэпиднадзора РФ, 142279, г. Оболенск Московской области, Россия;

²Ужгородский Национальный Университет, 88000, г. Ужгород Закарпатской области, Украина;

³ФГУН «Институт биофизики клетки» РАН. 142290, г. Пущино Московской области, Россия;

⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии», 121552, Москва, Россия

Проведено сравнение методов подготовки проб жидких и твердых биологических материалов для последующего газохроматографического определения содержания жирных кислот. Классический метод (с предварительной экстракцией липидов из биологической матрицы методами Фолча или Хара—Рэдина) не обеспечивает каких-либо оптимальных преимуществ в сравнении с безэкстракционным методом, т. е. прямой дериватизацией высушенной биологической пробы в ходе её последовательной обработки растворами метоксида натрия и трёхфтористого бора в метаноле. Последний универсальный метод гарантирует не меньшую, а достоверно большую степень извлечения определяемых веществ, принципиально упрощает и ускоряет процедуру подготовки проб. Вариант метода сухой капли (на пористых дисках из целлюлозной или, предпочтительно, фторопластовой фильтрующей бумаги) оказывается удобным и для лабораторного анализа жидких биологических проб, позволяя исключить не только операцию их жидко-жидкостной экстракции, но и стадию вакуумной сушки. В отличие от методов Фолча и Хара—Рэдина, безэкстракционный метод не требует обязательной «гомогенизации» биологического материала, т. е. его измельчения до частиц микронного размера. Применение безэкстракционной дериватизации – даже при работе с крупными частицами биологического материала размером 0,2–1,0 мм – обеспечивает заметно большую степень извлечения определяемых веществ (по сравнению с таковой при экстракции микронных гомогенизатов в различных вариантах классического метода Фолча).

Для корреспонденции: Ариповский Александр Викторович, канд. хим. наук., вед. науч. сотр.; e-mail: aripovsky@rambler.ru

Ключевые слова: газовая хроматография; жирные кислоты; метод Фолча; «метод сухой капли»; безэкстракционная дериватизация.

Для цитирования: Ариповский А.В., Колесник П.О., Кулагина Т.П., Титов В.Н. Подготовка проб для газохроматографического определения жирных кислот: преимущества безэкстракционного метода с прямой перэтерификацией липидов высушенных биологических проб. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (3): 141-147. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-141-147>

A. V. Aripovsky¹, P. O. Kolesnik², T. P. Kulagina³, V. N. Titov⁴

PREPARATION OF SAMPLES FOR GAS-CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF FATTY ACIDS: DIRECT TRANSESTERIFICATION OF LIPIDS OF A DRY BIOLOGICAL SAMPLE IS PREFERRED IN COMPARISON WITH THE METHODS EMPLOYING PRELIMINARY LIPID EXTRACTION.

¹State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk town, Moscow region, Russian Federation, 142279;

²Uzhgorod National University, Uzhgorod, Transcarpathia, Ukraine, 88000;

³Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Science, Pushchino town, Russian Federation, 142290;

⁴National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russian Federation, 121552

Different methods of sample preparation and derivatization were compared from the point of view of product yield, speed and convenience of the technique used.

Fatty acid determination in absolutely dry objects (biochemical preparations, food protein isolates, lyophilized microbial biomass) may be performed easily with the use of Folch method provided that 4-component system "chloroform/ methanol/water/acetic acid" was employed. Nevertheless, we could not find any real advantages of classical Folch or Hara-Radin extraction method variants when compared to simple non-extraction technique (which consists in direct trans-esterification of dried biomaterial due to sequential sample treating with sodium methoxide and boron trifluoride methanolic solutions).

The latter method, being completely universal, provides considerable increase of fatty esters yield, sample preparation is noticeably simplified and accelerated (becoming much more economical). Its "dry blood spot" variant (using cellulose or, preferably, fluoroplast filter paper disks) seems to be extremely convenient for laboratory routine analysis of liquid biological samples, allowing to exclude not only their liquid-liquid extraction but also the stage of vacuum drying.

Unlike the methods of Folch and Hara-Radin, the non-extraction method does not necessarily require the homogenization of the biological material, that is, it's grinding to fragments of micron size. Direct derivatization method provides noticeably better parameters of fatty acids yield even for relatively large particles - 0.2-1.0 mm - of the test material (in comparison with those parameters observed upon extraction of micron size homogenizates by the Folch method in its most advanced modifications).

Key words: gas chromatography, fatty acids, Folch's method, "dry drop method", non-extractive derivatization.

For correspondence: Aripovskiy Alexandr Viktorovich, PhD. Chem. Sciences.; e-mail: aripovsky@rambler.ru

For citation: A.V. Aripovsky, P. O. Kolesnik, T. P. Kulagina, V. N. Titov. Preparation of samples for gas-chromatographic determination of fatty acids: direct transesterification of lipids of dry biological sample is preferred in comparison with the methods employing preliminary lipid extraction. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63(3): 141-147 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-141-147>

Acknowledgment. This study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interests.

Received 14.11.2017
Accepted 01.12.2017

Применение капиллярной газовой хроматографии сильно расширило возможности структурно-химического исследования липидов, позволяя быстро и надёжно разделять не только гомологичные или функционально различающиеся жирные кислоты (ЖК), но также их геометрические изомеры и изомеры положения. В последнее время количественное газохроматографическое определение индивидуальных ЖК в биологических объектах является одним из наиболее востребованных методов аналитической и клинической биохимии: оно широко используется при оценке пищевой ценности продуктов питания, для таксономического и судебно-медицинского установления природы биологических образцов, в качестве источника информативных биомедицинских критериев в диагностике заболеваний разной этиологии [1–3].

Газохроматографическое определение спектра индивидуальных ЖК в биологическом образце требует, однако, обязательной предварительной химической дериватизации компонентов пробы – превращения жирнокислотных фрагментов глицеридов, фосфолипидов, эфиров холестерина, восков в летучие и термически устойчивые алкиловые эфиры ЖК (как правило, метиловые). Методы перевода липидов в метиловые эфиры ЖК подробнейшим образом изложены во многих обзорах – например, в [4, 5].

Весьма существенным с точки зрения химика является

тот факт, что процессы перевода глицеридов в метиловые эфиры ЖК являются реакциями нуклеофильного замещения у атома углерода карбоксильной группы ЖК и чувствительны к присутствию даже следовых количеств воды в образце. Только при хроматографическом анализе жиров и масел, которые практически не содержат влаги, навеска анализируемого вещества может быть непосредственно подвергнута действию метилирующего реагента. Для большинства биологических препаратов – тканей животных и растений, биомассы одноклеточных, препаратов крови и плазмы, биологических жидкостей – характерно высокое (20–98%) содержание воды: в этих случаях получение приемлемых выходов целевого продукта в ходе химической дериватизации липидов требует эффективного удаления воды (представляющей собой нуклеофильный агент существенно более мощный, нежели метиловый спирт). Для этой цели в лабораторной практике, как правило, используется экстракция биологических образцов бинарными смесями растворителей с высоким содержанием спирта [6–8]; при этом нелипидные спирторастворимые соединения (аминокислоты, углеводы, пигменты, витамины), способные сильно осложнить хроматографирование ЖК, удаляются в ходе последующего промывания экстрактов водными растворами солей.

Считается, что наилучшие результаты извлечения липидов

дов обеспечивают классический [6] метод Фолча (*Folch*) – МФ – и его различные модификации [8, 9]. Метод предполагает гомогенизацию образца в 20-кратном объёме смеси хлороформа с метанолом, взятых в соотношении 2:1 (иногда – с добавкой 5–20% воды или разбавленной уксусной кислоты), и отделение остатков матричного материала путём фильтрования или центрифугирования. Далее экстракт промывают 0,85% водным раствором *NaCl* (20% от объёма экстракта) для удаления метанола и спирторастворимых примесей. Растворитель удаляют в вакууме, липидный же остаток подвергают химической дериватизации.

В существенно менее популярном методе Хара – Рэдина [9] (МХР) пробы гомогенизируют в смеси гептана с изопропанолом, 3:2, используя 18-кратный объём данного экстрагента; для отмывания полярных компонентов применяется 0,5 М раствор сульфата натрия (40% от объёма органического экстракта).

Иные экстрагенты (смеси на основе этанола, этилацетата, метил-трет-бутилового и диэтилового эфиров) применяют сравнительно редко и лишь в особых случаях. Можно достаточно уверенно утверждать, что у большинства аналитиков и рутинный анализ, и научно-исследовательская экспериментальная работа в области жирнокислотного анализа биологических образцов прочно ассоциируются с понятием “экстракция по Фолчу”.

В то же время многие исследователи не без оснований считают порочным сам принцип предварительного экстракционного извлечения липидов из биологического образца. Значительная трудоёмкость и материалоемкость экстракционных методов, низкие выходы экстрагируемых липидов, существенные потери полярных липидов (прежде всего кислых), гликолипидов и липопротеинов в ходе отмывания экстракта водными растворами солей – все эти недостатки могут быть устранены в ходе прямой обработки исследуемого материала дериватирующим реактивом; воду же связывают большим избытком «водоотнимающего» реагента (хлористый ацетил, 2,2-диметоксипропан, метоксид натрия [5, 10–12]) или удаляют в ходе эффективного предварительного высушивания образца [13–15].

Подобный приём, судя по утверждениям авторов, позволяет существенно упростить процедуру анализа, сводя её к вакуумной или азеотропной сушке биологической пробы и кратковременной обработке сухого остатка дериватирующим реактивом; здесь представляется уместным отметить, что приготовление всего лишь одной пробы по МФ или МХР требует использования трёх отдельных лабораторных сосудов и последовательного выполнения семи препаративных операций. Безэкстракционный метод дериватизации (БМД) устраняет как неизбежные потери полярных и высокомолекулярных липидных конъюгатов (вообще не экстрагирующихся органическими жидкостями), так и потери водорастворимых кислых липидов в ходе отмывания экстрактов соевыми растворами. Более того, авторы [10, 12, 13, 15] обычно указывают на существенное – до 25% в сравнении с МФ – увеличение выхода метиловых эфиров ЖК при использовании БМД.

Однако критическое рассмотрение результатов работ по применению различных схем БМД с целью определения жирнокислотного состава образцов заставляет усомниться в исчерпывающем характере выводов, сделанных их авторами.

Во-первых, все подобные работы выполнялись с использованием высокодисперсных объектов – препаратов одноклеточных (микроорганизмы, эритроциты) или бесклеточных (плазма крови и её фракции, липопротеины и продукты их фракционирования). Представлялось весьма вероятным, что эффективность извлечения липидов из тканей многоклеточных должна сильно зависеть от степени измельчения исследуемых твердых образцов, однако литература не даёт

никаких указаний относительно максимально допустимых размеров частиц животной или растительной ткани, дериватируемой в БМД.

Во-вторых, авторы подобных работ обычно сравнивали результаты БМД с результатами использования “канонического” варианта МФ [6], т. е. экстракции образца простейшей смесью хлороформ – метанол, что в ряде случаев может оказаться не вполне корректным. Действительно, для многих объектов (лиофилизированные белки, липопротеины, высушенные микроорганизмы) первоначальный вариант МФ явно непригоден, поскольку фосфолипиды из полярной биологической матрицы можно извлечь только тройной смесью хлороформ – метанол – вода (5–15% воды); бинарная же смесь Фолча эффективно извлечь их не может. При экстракции липидов из таких объектов целесообразно [4] использовать систему метанол – хлороформ, содержащую около 5% воды по объёму, а для уменьшения потерь кислых липидов в ходе промывания экстракта следует вводить в смесь Фолча 0,5–2,0% уксусной кислоты.

Вызывает сомнение и вывод о кардинальном улучшении выхода ЖК при переходе к БМД. Ведь классический МФ [6] (с 20-кратным избытком экстрагента по отношению к экстрагируемому материалу) вообще-то и не претендовал на количественное извлечение липидов: их выход в указанных условиях составлял 85–95% (данная величина установлена основоположником метода путём многократных последовательных экстракций гомогенизированного материала). Существенное увеличение избытка экстрагента (затруднительное при крупномасштабных препаративных извлечениях, но вполне реальное в условиях аналитического эксперимента) могло бы полностью или частично устранить этот нежелательный эффект.

Таким образом, представляло определенный интерес квалифицированное сравнение результатов жирнокислотного анализа биологических образцов различной природы (ткани растений и животных, сухая биомасса микроорганизмов, бесклеточные препараты плазмы крови, концентраты и изоляты пищевых белков) с использованием БМД, с одной стороны, и наиболее современных и совершенных вариантов экстракционных МФ и МХР – с другой.

Практически важным казалось также исследование зависимости степени извлечения липидов (при БМД образца) от глубины предварительного измельчения материала. Общеизвестно, что эффективная гомогенизация большого числа образцов животных и растительных тканей представляет собой чрезвычайно трудоёмкий и утомительный процесс, сопровождается сильным разбавлением (а часто и загрязнением) проб. Измельчение образца каким-либо иным, менее изощрённым, способом могло бы ощутимо облегчить труд аналитика.

Материал и методы. Помимо образцов коммерческих пищевых продуктов, а также препаратов эритроцитов и плазмы крови, в работе использованы изолят соевого белка DB-909 (“*Pingdingshan Tianjing plant albumen Co.*”, КНР), изолят белка подсолнечника “Протемил” (“БиоТехнологии”, РФ) и сухой яичный белок (“Роскар”, РФ). Образцы лиофилизованной биомассы бактерий, дрожжей и грибов любезно предоставлены В.А. Самойленко (канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН).

Для получения твёрдых образцов с контролируемой степенью измельчения использован набор хроматографических сит из бронзовой проволоки с ячейками размером 0,2, 0,5, 0,7, 1,0, 1,4 и 2,0 мм. Образец, грубо измельчённый в ступке или на тёрке (с отверстиями диаметром 2,0–3,0 мм), последовательно просеивали или протирали сквозь указанный сита: собирали фракции с соответствующим максимальным размером частиц («менее 2,0 мм», «менее 1,4 мм», ..., «менее 0,2 мм»).

Использованные в работе растворители производства

Экспериментальные величины суммарного содержания ЖК С14 – С24, определённые методом ГЖХ с использованием разных способов подготовки пробы

Объект Исследования	Среднее значение содержания суммы ЖК, мкг/г (найденно по методу Фолча, $n = 5$)	Относительное содержание суммы ЖК С14–С24 в пробе (за 100 единиц принято среднее значение, полученное по методу Фолча)		
		Метод Фолча ($n = 5$)	Метод Хара-Рэдина ($n = 5$)	Безэкстракционный метод ($n = 5$)
Субклеточные препараты				
Жидкий желток куриного яйца	317 000 А**	100 ± 6* А**	95 ± 8* В**	98 ± 5* Е**
Сухой белок куриного яйца	700 Б	100 ± 10 Б	89 ± 9 Г	97 ± 9 Е
Плазма крови человека жидкая	2210 А	100 ± 3 А	99 ± 1 В	99 ± 2 Е
Плазма крови, метод «сухой капли»	2160 Ж, Б	100 ± 5 Ж, Б	96 ± 6 Ж, Г	100 ± 2 Ж, Е
Изолят соевого белка DB-909	16900 Б	100 ± 5 Б	21 ± 2 В	104 ± 3 Е
	6400 А	38 ± 2 А		
Изолят белка подсолнечного шрота «Протемил»	19100 Б	100 ± 3 Б	54 ± 4 Г	105 ± 3 Д
	13300 А	70 ± 2 А	32 ± 3 В	109 ± 3 Е
Молоко сухое обезжиренное	5900 Б	100 ± 5 Б	95 ± 6 Г	99 ± 5 Е
Молоко жидкое 3,2%	22300 А	100 ± 3 А	97 ± 2 В	100 ± 2 Е
Препараты одноклеточных				
Биомасса дрожжей <i>Saccaromyces cerevisiae</i> (лиофилизат)	33200 Б	100 ± 4 Б	64 ± 3 Г	116 ± 5 Е
	10600 А	32 ± 2 А	30 ± 2 В	
Биомасса бактерий <i>Pseudomonas aureofaciens</i> (лиофилизат)	31700 Б	100 ± 2 Б	64 ± 6 Г	103 ± 2 Е
				104 ± 2 Д
Биомасса бактерий <i>Bacillus subtilis</i> (лиофилизат)	12500 Б	100 ± 6 Б	74 ± 11 Г	118 ± 7 Д
				117 ± 4 Е
Биомасса гриба <i>Trichoderma harzianum</i> (лиофилизат)	45500 Б	100 ± 2 Б	74 ± 3 Г	108 ± 3 Д
				108 ± 3 Е
Жидкий препарат эритроцитов	320 А	100 ± 6 А	73 ± 8 В	103 ± 6 Д
Жидкий препарат эритроцитов, «метод сухой капли»	300 Ж, Б	100 ± 5 Ж, Б	–	104 ± 7 Е
				111 ± 6 Ж, Е
Препараты тканей многоклеточных				
Спинальная мышца трески	3810 А	100 ± 6 А	103 ± 8 В	112 ± 7 Е
Грудная мышца бройлера	9410 А	100 ± 7 А	92 ± 7 В	131 ± 6 Е
Печень говядья	20770 А	100 ± 9 А	83 ± 10 В	114 ± 5 Е
Рисовое зерно	5670 Б	100 ± 3 Б	81 ± 3 Г	117 ± 4 Е
Перец черный	6390 А	100 ± 5 А	94 ± 8 В	109 ± 4 Е
Бобы чечевицы	16550 А	100 ± 3 А	86 ± 5 В	105 ± 2 Е
Корень имбиря	970 А	100 ± 3 А	81 ± 3 В	117 ± 4 Е
Кофе «Арабика», бобы	128 000 А	100 ± 2 А	101 ± 2 В	100 ± 2 Е
Корица молотая	37400 Б	100 ± 4 Б	100 ± 5 Г	107 ± 3 Е
Мякоть тыквы	560 А	100 ± 16 А	80 ± 3 В	99 ± 6 Е
Соцветия цветной капусты	1460 А	100 ± 3 А	84 ± 7 В	98 ± 4 Е
Шампиньон, мякоть шляпки	3400 А	100 ± 9 А	82 ± 7 В	99 ± 7 Е

Примечание. * – среднее значение и его доверительный интервал для надежности $p \geq 0,95$; ** – вариант метода подготовки пробы (см. раздел *Методы предварительной подготовки проб*).

фирмы «МЕРК» (ФРГ) – н-гептан, толуол, метанол, изопропанол – перед применением перегоняли. Для химической дериватизации применяли метоксид натрия и 15%-ный метанольный раствор трёхфтористого бора того же производителя (квалификация «для синтеза»). В качестве внутренних стандартных образцов использовали тримаргароилглицерин и маргариновую кислоту («Сигма», США, около 99% основного вещества).

Инертные пористые диски высокой влагоёмкости для определения состава ЖК в липидах плазмы по «методу сухой капли» готовили [16] из фторопластовой фильтровальной бумаги МФФК-Г («Технофильтр», РФ).

Хроматографическое определение индивидуальных средне- и длинноцепочечных ЖК в форме метиловых эфиров выполнено с использованием аналитического газового хроматографа фирмы «Вариан», США, модель 3900, и квар-

цевой капиллярной колонки «Супелковакс-10» («Супелко», Швейцария) размером 15 м x 0,25 мм x 0,25 мкм. Стандартная аналитическая процедура включала программирование температуры колонки от 100 до 245°C (задержка 0,5 мин) со скоростью 10°C/мин (разделение требует 14–17 мин) и пламенно-ионизационное детектирование пиков разделённых веществ. Регистрация хроматографических пиков проведена с помощью компьютерной программы «Мультихром-1,5х» («Амперсенд», РФ), количественное определение содержания ЖК в пробах выполнено методом внутреннего стандартного образца, статистическая обработка – с использованием программы Microsoft Excel.

Методы предварительной подготовки проб. А. Классический вариант метода экстракции по Фолчу (МФ). Навеску 20–60 мг исследуемого материала и раствор 40–250 мкг тримаргароилглицерина в 50 мкл толуола помещали в патрон

стеклянного пестикового гомогенизатора, прибавляли 5,0 мл смеси хлороформа с метанолом (взятых в соотношении 2:1) и гомогенизировали до состояния однородной слабо опалесцирующей жидкости. Соотношение объемов экстрагента и экстрагируемой пробы в данном случае близко к 100 (в классическом варианте МФ – 20). Гомогенизат центрифугировали, осторожно декантировали прозрачный супернатант в мерную пробирку и промывали при интенсивном встряхивании изотоническим раствором хлорида натрия (20% от объема экстракта). Эмульсию вновь центрифугировали, часть хлороформного слоя пипеткой переносили в пробирку для дериватизации (с завинчивающейся крышкой и самоуплотняющейся тефлон-силиконовой прокладкой); упаривали экстракты досуха в вакууме ротационной сушилки (вакуумной центрифуги) модели «Савант».

Б. Модифицированный вариант метода экстракции по Фолчу. Процедура отличается от описанной в варианте А тем, что гомогенизацию биологического образца проводили в 5,0 мл хлороформ-метанольной смеси, содержащей 5 объемных процентов 8%-ного водного раствора уксусной кислоты. В качестве внутреннего стандартного образца могут быть использованы как тримаргароилглицерин, так и свободная маргариновая кислота.

В. Классический вариант МХР. Процедура отличается от изложенной в варианте А тем, что гомогенизация проводилась в смеси н-гептана и изопропанола (3:2). Для промывания экстракта использовали раствор сульфата натрия (1 г безводной соли в 15 мл воды), взятый в объеме 40% от объема экстракта.

Г. Модифицированный вариант МХР. Процедура отличается от изложенной в варианте В тем, что гомогенизацию проводят в спирт-гептановой смеси, содержащей 5 объемных процентов 8%-ного водного раствора уксусной кислоты. В качестве внутреннего стандартного образца при этом можно использовать как свободную маргариновую ЖК, так и тримаргароилглицерин.

Д. Безэкстракционный метод с гомогенизацией биоматериала. Навеску исследуемого материала – 20–60 мг биологической жидкости или ткани многоклеточных, 5–20 мг порошкообразного безводного биологического материала – гомогенизировали с 50 мкл толуольного раствора 40–250 мкг маргариновой кислоты (или тримаргароилглицерина) и 3 мл 0,5% раствора уксусной кислоты в смеси хлороформа с метанолом (взятых в соотношении 5:1). Гомогенизат количественно переносили в пробирку для дериватизации, удаляли растворители в вакууме ротационной сушилки «Савант».

Е. БМД без гомогенизации биоматериала. Навеску исследуемого материала – 20–60 мг биологической жидкости или одной из фракций измельченной ткани многоклеточных ($\leq 2,0$ мм, $\leq 1,4$ мм, ... $\leq 0,2$ мм), 5–20 мг порошкообразной биомассы одноклеточных или иного безводного биологического материала – отбирали в пробирку для дериватизации, добавляли раствор 40–250 мкг маргаринового кислоты или тримаргароилглицерина в 50 мкл толуола и сушили смесь в вакууме в течение 15–20 мин. Сухой остаток подвергали непосредственной химической дериватизации.

Ж. «Метод сухой капли» в применении к произвольным жидким образцам [16]. «Диск» (т. е. круглый или прямоугольный фрагмент фторопластовой бумаги МФФК-Г массой 15–20 мг, отмытый в аппарате Сокслета смесью хлороформа с 20% метанола) помещали на поверхность чистой тефлонной пластинки, автоматической пипеткой наносили 50–100 мкл жидкости (например, плазмы крови) и сушили при комнатной температуре в течение 1 ч. Раствор внутреннего стандарта (40–100 мкг тримаргарина в 50 мкл толуола) добавляли в реакционный сосуд перед дериватизацией пробы.

В качестве «диска» в принципе может быть использован и фрагмент целлюлозной – фильтровальной или хроматографической – бумаги той же массы, однако в этом случае нагрузка «диска» жидкой пробой должна быть уменьшена до 10–20 мкл вследствие относительно низкой влагоемкости целлюлозной бумаги (по этому параметру, как и по параметрам химической инертности, целлюлозная бумага всех сортов значительно уступает рекомендуемому фторопластовому материалу).

Химическая дериватизация образцов. Для получения метиловых эфиров ЖК использована слегка модифицированная методика двустадийной дериватизации [12, 15]. Объект исследования (сухой экстракт липидов пробы, высушенная в вакууме навеска биомассы, диск из фторопластовой бумаги с сухой пробой биологической жидкости) обрабатывали смесью 200 мкл сухого толуола с 250 мкл 0,6 N метанольного раствора метоксида натрия при 68–70°C в течение 20 мин, после чего к пробе прибавляли 350 мкл 15%-ного раствора трёхфтористого бора в метаноле и вновь нагревали 20 мин при той же температуре. Охлаждали пробу, добавляли 1,0 мл н-гептана и 600 мкл воды, встряхиванием экстрагировали метиловые эфиры ЖК в органический слой. В большинстве случаев эффективное спонтанное расслоение водно-спиртовой и углеводородной фаз происходило уже через 30–60 с.

В некоторых случаях, при высоком содержании белка в пробе, разделение компонентов эмульсий требовало крат-

Таблица 2

Влияние степени измельчения биологического образца на эффективность извлечения ЖК при безэкстракционном методе дериватизации

Объект исследования	Суммарное содержание ЖК С14–С24, БМД гомогенизата (частицы 1,5–3,5 мкм), мкг/г Метод Д*, n = 5	Относительное суммарное содержание ЖК С14–С24 как функция размера частиц исследуемого материала при БМД: за 100 единиц приняты значение, найденное по методу Фолча (метод Б, см. табл.1)						
		Гомогенизат (фракция 1,5–3,5 мкм) Метод Д*, n = 5	Фракция $\leq 0,2$ мм Метод Е*, n = 5	Фракция $\leq 0,5$ мм Метод Е*, n = 5	Фракция $\leq 0,7$ мм Метод Е*, n = 5	Фракция $\leq 1,0$ мм Метод Е*, n = 5	Фракция $\leq 1,4$ мм Метод Е*, n = 5	Фракция $\leq 2,0$ мм Метод Е*, n = 5
Спинальная мышца трески	4 260**	112 ± 7**	108 ± 3**	108 ± 4**	104 ± 4**	103 ± 5**	102 ± 5**	92 ± 6**
Грудная мышца бройлера	12 290	131 ± 6	111 ± 6	116 ± 4	111 ± 4	103 ± 6	96 ± 7	91 ± 6
Печень бычьей	23 600	114 ± 5	114 ± 8	108 ± 4	116 ± 7	102 ± 6	104 ± 5	97 ± 5
Перец черный	6 980	109 ± 4	111 ± 5	109 ± 5	114 ± 5	103 ± 5	89 ± 4	67 ± 5
Бобы чечевицы	17 310	105 ± 2	103 ± 1	104 ± 3	99 ± 2	100 ± 2	98 ± 3	98 ± 2
Соцветия цветной капусты	1 430	98 ± 4	96 ± 5	101 ± 4	98 ± 4	103 ± 6	75 ± 7	68 ± 6
Мякоть шляпки шампиньона	300	99 ± 7	100 ± 7	106 ± 7	108 ± 6	94 ± 9	90 ± 7	85 ± 4

Примечание. * – вариант метода подготовки пробы (см. Методы предварительной подготовки пробы); ** – среднее значение и его доверительный интервал для надежности $p \geq 0,95$.

ковременного (30–60 с) центрифугирования пробы в низ-кооборотной (300–600 об/мин) центрифуге ротационной су-шилки «Савант» (иногда – с добавлением 50 мкл этилового спирта к верхней фазе).

Чрезвычайно эффективный альтернативный метод раз-рушения эмульсии состоит в её фильтровании сквозь слой гранулированного безводного сульфата натрия (200–300 мг гранулированной соли помещают на небольшом ватном там-поне в полипропиленовый наконечник для автоматической пипетки и предварительно промывают небольшими порция-ми чистого гептана).

Результаты и обсуждение. Данные об эффективности из-влечения ЖК из образцов различных биологических материа-лов с использованием МФ, МХР и БМД приведены в табл. 1.

Легко видеть, что в некоторых случаях использование модифицированных (Б, Г) вариантов экстракционных ме-тодов позволяет резко увеличить выход метиловых эфиров в сравнении с классическими вариантами МФ и МХР (А, В). Действительно, применение большого избытка кислого четырёхкомпонентного экстрагента Фолча (хлороформ – ме-танол – вода – уксусная кислота, метод Б) даёт возможность эффективно извлекать липиды и из совершенно сухих объ-ектов – изолятов растительных белков и биомассы высушен-ных микроорганизмов, – для которых классический вариант МФ (А) оказывается неприменимым.

Одновременно не вызывает сомнения и то, что БМД (в варианте Д) отличается универсальностью, простотой и ско-ростью исполнения, обеспечивая по меньшей мере не худ-шие – а иногда и значительно лучшие – показатели эффек-тивности извлечения ЖК в виде их эфиров.

Практически интересной представляется возможность существенного упрощения определений ЖК в биологиче-ских жидкостях за счёт использования бумаги МФФК-Г – отечественного фторопластового фильтрующего материала высокой влагоёмкости (до 85% воды от массы влажного об-разца) – в качестве носителя в “методе сухой капли” (вариант Ж). Этот материал, весьма удобный для длительного кон-сервирования образцов крови и плазмы в условиях полевых работ [16], может быть с успехом использован и как носитель пробы в рутинном жирнокислотном анализе произвольных жидких проб: в этом случае подготовка хроматографируемой пробы уже не требует ни специального оборудования, ни ва-куумной техники, ни серьезных трудозатрат.

В ходе изучения зависимости между эффективностью извлечения липидов и размерами частиц исследуемого мате-риала возникает понятный интерес к вопросу о действи-тельной глубине разрушения биологических структур в процессе измельчения тканей различными способами. Так, с использованием оптического микроскопа *Leica DM-1000* мы оценили размер частиц окрашенных растительных мате-риалов (корица, бобы кофе, черный перец) после их квали-фицированного перетирания в пестиковом гомогенизаторе с хорошо пришлифованными стеклянными рабочими поверх-ностями. Основная масса полученных микрочастиц характе-ризовалась диаметрами 1,5–3,5 мкм; существенно меньшей была доля более мелких частиц, а крупные (более 5 мкм) встречались весьма редко.

Таким образом, измельчение биологического материа-ла в стандартном “микробиологическом” пестиковом го-могенизаторе действительно обеспечивает диспергирова-ние до фрагментов субклеточного размера. Приходится констатировать, что разрушение довольно крупных клеток эритроцитов, дрожжей и микроскопических грибов в ходе гомогенизации соответствующих препаратов никак не сказывается на выходе метиловых эфиров в варианте БМД (см. данные крайнего правого столбца таблицы 1 о сравнительной эффективности методов Д и Е): наличие неповрежденной клеточной мембраны очевидным обра-

зом не препятствует эффективному извлечению липидов из клетки в ходе БМД.

Результаты, приведенные в табл. 2, позволяют с опреде-лённым оптимизмом оценить перспективы использования БМД в ходе серийного жирнокислотного анализа твердых биологических образцов. Хотя выход метиловых эфиров ЖК в БМД ощутимо снижается с увеличением размеров частиц исследуемого препарата, но даже при весьма грубом измель-чении подобного материала (для частиц с размером до 1,0 мм) данный метод позволяет добиться лучших результатов, нежели наиболее совершенные варианты МФ.

Измельчение твердого и хрупкого биологического сырья (с целью получения частиц размера 0,1–1,0 мм) не вызы-вает затруднений и может быть выполнено его перетирани-ем в ступке или дроблением в шаровой мельнице с последу-ющим просеиванием сквозь соответствующее сито. Задача несколько усложняется при переходе к нехрупким объектам (мясо, рыба, растительные ткани с высоким содержанием влаги), поскольку их протирание сквозь сита с мелкими ячейками (0,1–0,2 мм) уже требует значительных физиче-ских усилий и не обеспечивает достаточно высокого выхода измельчённого материала; в то же время использование сит из тонкой металлической проволоки (латунь или нержавею-щая сталь) с размером ячеек от 0,4 до 0,7 мм позволяет выполнять эту операцию быстро и эффективно. Кроме того, данное затруднение несложно устранить предварительным тонким дроблением замороженного материала (или исполь-зованием портативных измельчающих устройств экстрази-онного, куттерного или волчкового типов).

В качестве дополнительного преимущества двустадий-ного метода дериватизации образца, изложенного в разделе «Химическая дериватизация образцов», следует упомянуть его нечувствительность к присутствию довольно значи-тельных количеств остаточной влаги в анализируемом материале (до 10–20% от его массы). Эта особенность ме-тода определяется, разумеется, способностью алкоголята натрия к мгновенному связыванию эквимолярного количе-ства воды: образующийся в ходе гидролиза едкий натр в спиртовом растворе является практически столь же эффек-тивным сапонифицирующим и метилирующим агентом, как и исходный метоксид натрия. Данное преимущество, отмеченное и ранее [12] в ходе исследования частично вы-сушенной биомассы водорослей, позволяет вообще опу-стить стадию вакуумной или азеотропной сушки образца в случае исследования состава ЖК зерновых, бобовых и других биоматериалов с невысокой естественной влажно-стью. Весьма мягкие режимы сушки (обезвоживание «до визуального сухого состояния»), что соответствует нескольким весовым процентам остаточной влажности образца) могут быть применены и для подготовки образцов материалов с высоким содержанием влаги – мяса, рыбы, молока, компо-нентов крови и иных биомедицинских объектов. Действи-тельно, выполненная нами экспериментальная проверка показывает, что непосредственная дериватизация липидов в «сырых» (без предварительного удаления 3–12% остаточ-ной влаги) образцах рисовой муки, измельчённого чёрного перца, кофейных зёрен предлагаемым двустадийным мето-дом приводит в точности к тем же результатам, что и в ходе обработки образцов, высушенных в вакууме масляного наса до постоянной массы.

Выводы. Подробное сравнительное исследование не по-зволило нам обнаружить у классических экстракционных ме-тодов (метод Фолча, метод Хара–Рэдина) ни одного сколько-нибудь ощутимого преимущества в сравнении с безэкстрак-ционным методом подготовки биологической пробы для последующего количественного определения ЖК методом ГЖХ. Безэкстракционный метод обеспечивает не меньшие, а во многих случаях и ощутимо более высокие степени

извлечения целевых веществ, позволяет принципиальным образом упростить, облегчить и ускорить процедуру подготовки хроматографируемой пробы, резко снизить как расход материалов, так и риск загрязнения или окисления образца. Данный подход оказывается весьма эффективным и в применении к исследованию произвольных жидких материалов биологической природы: вариант «метода сухой капли» на пористых дисках из целлюлозной или (предпочтительно) фторопластовой фильтрующей бумаги позволяет легко выполнять одновременную подготовку большого количества экспериментальных проб вообще без использования вакуумного оборудования.

Достаточно неожиданным и практически важным представляется тот факт, что безэкстракционный метод (в отличие от методов Фолча, Хара–Рэдина) не требует эффективной гомогенизации исследуемого материала, т. е. его измельчения до фрагментов микронного размера. Даже для довольно крупных (0,2–1,0 мм) частиц исследуемого биологического материала безэкстракционная дериватизация обеспечивает лучшие показатели эффективности извлечения биологических ЖК, нежели наиболее совершенные варианты метода Фолча – для гомогенизированных (то есть измельченных до частиц микронных размеров) образцов того же материала.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-14 см. REFERENCES)

15. Ариповский А.В., Колесник О.П., Веждел М.И., Титов В.Н. Метод подготовки проб для хроматографического определения жирных кислот без предварительной экстракции липидов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 1: 3 - 6.
16. Ариповский А.В., Астахова Е.А., Колесник П.О., Кулагина Т.П., Шушман И.В., Титов В.Н. Перспективный фторопластовый пористый носитель для консервирования и пересылки проб плазмы крови: применение «метода сухой капли» с целью последующего определения индивидуальных жирных кислот. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(9): 517 – 26.

REFERENCES

1. Harris W.S., von Schacky C. The Omega-3 Index: a New Risk Factor from Coronary Heart Disease. *Prev. Med.* 2004; 39(1): 212.
2. Young G., Conquer J. Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders. *Reprod. Nutr. Dev.* 2005; 45(1): 1.

3. Kabagambe E.K., Ezeamama A.E., Guwatudde D., Campos H., Fawzi W.W. Plasma n-6 fatty acid levels are associated with CD4 cell counts, hospitalization, and mortality in HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2016; 73(5): 598.
4. Cristie W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. *Advances in Lipid Methology –Two*. Dundee: Ed. W.W.Cristie, Oily Press, 1993. P. 69. <http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=40374> (16.10.2017г.)
5. AOCS Lipid Library. Literary Survey. Combined Extraction-Esterification of Fatty Acids. <http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=39377> (16.10.2017г.)
6. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A Simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226(1): 497.
7. Reis A., Rudnitskaya A., Blackburn G.J., Fauzi N.M., Pitt A.R., Spickett C.M. A Comparison of five lipid extraction systems for lipiodic studies of human LDL. *J. Lipid Res.* 2013; 54(7): 1812.
8. CYBERLIPID CENTER. Lipid Extraction General Methodologies. www.cyberlipid.org/extract/extr0002.htm# (16.10.2017г.)
9. Hara A., Radin N.S. Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* 1978; 90(1): 420.
10. Lepage G., Roy C.C. Improved recovery of fatty acids through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lipid Res.* 1984; 25(12): 1392.
11. Glaser C., Demmelmair H., Koletzko B. High-throughput analysis of total plasma fatty acid composition with direct in situ transesterification. *PLoS*. 2010; 5(8): e12045.
12. Griffiths M.J., van Hille R.P., Harrison S.T. Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae. *Lipids*. 2010; 45(11): 1053.
13. Sattler W., Puhl H., Hayn N. Determination of fatty acids in the main lipoprotein classes by capillary GC: BF₃/methanol transesterification of lyophilized samples Instead of Folch extraction gives higher yields. *Anal. Biochem.* 1991; 198(1): 181.
14. Lakshmy R., Gupta R., Prabhakaran D., Snehi U., Reddy K.S. Utility of dried blood spots for measurement of cholesterol and triglycerides in a surveillance study. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2010; 4(2): 258.
15. Ариповский А.В., Колесник О.П., Веждел М.И., Титов В.Н. Method of preparing samples for the chromatographic determination of the fatty acids without preliminary extraction of lipids. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 1: 3 - 6. (in Russian)
16. Ариповский А.В., Астахова Е.А., Колесник П.О., Кулагина Т.П., Шушман И.В., Титов В.Н. Promising media for preservation, transfer of serum samples by means of “dry drop” method for the determination of individual fatty acids. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(9): 517 – 26. (in Russian)

Поступила 14.11.17
Принята к печати 01.12.17