

УДК 677.019.543:543.054

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

© 2022 г. В. А. Зотов¹, *, В. В. Бессонов¹, Д. В. Рисник¹

¹Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, 109240 Россия

*e-mail: arkont-87@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.01.2021 г.

После доработки 07.07.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2021 г.

В обзоре рассмотрены основные современные методы определения жирных кислот (ЖК) в биологических объектах, а также менее распространенные, но перспективные методы. Описываются и сравниваются преимущества, недостатки и перспективы этих методов. Особое внимание уделено особенностям подготовки биологических образцов, таким как экстракция липидов и дериватизация жирных кислот. Рассматриваются методические аспекты определения жирных кислот методами газовой хроматографии (ГХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), особенности использования различных типов неподвижных фаз используемых для хроматографического разделения ЖК. Проанализированы возможности использования капиллярного электрофореза (КЭ) и спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для анализа жирных кислот, особые требования и ограничения этих методов при работе с биоматериалом.

Ключевые слова: липиды, полиненасыщенные жирные кислоты, газовая хроматография, жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез, сверхкритическая флюидная хроматография, ЯМР-спектроскопия

DOI: 10.31857/S0555109922010111

Жирные кислоты (ЖК) — ациклические одноосновные карбоновые кислоты, содержащиеся в жирах, маслах и восках биологического происхождения. В организме человека ЖК присутствуют в основном в виде продуктов этерификации, представленных триглицеридами, фосфолипидами и эфирами холестерина [1]. ЖК, как правило, содержат неразветвленную цепь из атомов углерода C₄-C₂₄, (включая углерод карбоксильной группы) и могут быть как насыщенными, так и ненасыщенными. Разветвленные жирные кислоты по сравнению с жирными кислотами с неразветвленной цепью в составе липидов растений и животных встречаются реже. В бактериях довольно часто встречаются моометил-разветвленные жирные кислоты [2].

По степени ненасыщенности ЖК подразделяют на насыщенные, в которых отсутствуют кратные связи, мононенасыщенные, содержащие одну двойную связь, и полиненасыщенные, в структуре которых содержится две и более кратные связи [3].

Ряд полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), необходимых животным и человеку, но которые не образуются в ходе биосинтеза в их организмах, относят к незаменимым. К ним

относятся 18-атомные кислоты семейств n-6 и n-3 (омега-6 и омега-3): линолевая кислота с двумя двойными связями 18:2n-6 и альфа-линоленовая кислота с тремя двойными связями 18:3n-3 [4].

Биологическая роль ЖК заключается в их участии в формировании клеточных мембран, внутриклеточных структур и органелл, а также в энергетическом обмене. Помимо этого, они участвуют в синтезе биологически активных соединений, таких как эйкозаноиды [5].

Изучение содержания ЖК и их метаболических профилей важно для лабораторно-клинической диагностики [6]. Например, изучение маркеров метаболизма ЖК применяется в диагностике рисков развития сердечно-сосудистых заболеваний и метаболического синдрома. Масштабные клинические и эпидемиологические исследования больших групп пациентов (более десяти тысяч человек) показали, что повышенное потребление омега-3 ПНЖК существенно снижает риск сердечно-сосудистых заболеваний у здоровых людей и на 35% снижает смертность среди людей, перенесших эти заболевания [7]. По современным представлениям влияние эйкозапентаеновой кислоты на сердечно-сосудистую систему связано с действием ее производных — эйкозаноидов,

которые являются ингибиторами тромбообразования, способствуют расширению просвета сосудов, участвуют в регуляции иммунного ответа [8–10]. Возможные механизмы кардиопротекторных эффектов омега-3 ПНЖК заключаются в понижении уровней триглицеридов, ослаблении аритмий, снижении кровяного давления, предотвращении агрегации кровяных телец [11, 12].

Многие исследования связывают аномалии в метаболизме ЖК с развитием некоторых видов онкологических заболеваний. Однако общие тенденции изменений липидных профилей плазмы крови у больных имеют ряд противоречий, что связано с различием в механизмах синтеза и использования липидов при различных разновидностях раковых заболеваний [13, 14].

Нарушение нормальных процессов метаболизма ЖК может являться причиной хронических нервно-мышечных заболеваний, которые могут сопровождаться тяжелыми осложнениями, в том числе со смертельным исходом, включая миопатию, прогрессирующую кардиомиопатию, рецидивирующую энцефалопатию и т.д.

В эпидемиологических исследованиях установлена прямая корреляция между недостаточной обеспеченностью омега-3 ПНЖК и развитием психических и нейродегенеративных заболеваний. Несмотря на то, что в настоящее время не найдено средств лечения одного из самых распространенных видов деменции – болезни Альцгеймера [7, 15], имеются достоверные данные, свидетельствующие о возможности снижения риска развития и даже замедления развития этого заболевания при дополнительном употреблении докозагексаеновой кислоты [16].

Чтобы раскрыть биологическую значимость ЖК в заболеваниях, необходимо дополнительное изучение роли и механизмов их метаболизма, совершенствование методик их количественного определения в биологических образцах, что позволит внести значительный вклад в практику лабораторно-клинической диагностики. Разработка и совершенствование надежных процедур определения ЖК в свободных и этерифицированных формах позволит усовершенствовать методы диагностики метаболического синдрома, наследственных и онкологических заболеваний, а также осуществить выявление отклонений у людей, находящихся в зоне риска на ранней стадии.

Изучение содержания ЖК в биологических объектах является сложной аналитической задачей из-за большого разнообразия веществ, в состав которых входят ЖК, и из-за сложного характера матрицы (посторонних компонентов образца). В настоящее время в основном используются хроматографические методы: газовая хроматография (ГХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), сверхкритическая флюидная

хроматография (СФХ), а также комбинированные методы – масс-спектрометрия в сочетании с различными способами разделения, спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия) [17–19].

Газовая хроматография. Среди инструментальных методов анализа ЖК наиболее распространенным является ГХ с тем или иным способом детектирования. Наиболее часто используется пламенно-ионизационный детектор. Его основными преимуществами являются низкие пределы обнаружения (на уровне нг/мл) и широкий линейный диапазон [20].

Исторически это был первый хроматографический метод, использованный для анализа ЖК [17]. Известно, что основные требования, предъявляемые к анализам при использовании этого метода разделения, – летучесть, термостабильность и инертность. Поскольку ЖК характеризуются термолабильностью, низкой летучестью, наличием полярных функциональных групп, а также легко поддаются полимеризации и дегидратации [1, 21, 22], что препятствует их прямому качественному и количественному определению методами ГХ [23]. Такие свойства обуславливают необходимость проведения предварительной дериватизации перед проведением анализа. Дериватизация позволяет повысить летучесть ЖК, а также улучшает эффективность их разделения и повышает чувствительность определения [24]. В литературе описано множество подходов к дериватизации ЖК. Чаще всего легколетучие производные ЖК получают путем одностадийной кислотной или щелочной переэтерификации.

Кислотно-катализируемые реакции. В случае кислотно-катализируемых реакций переэтерификации в прошлом широкое распространение получило использование растворов соляной (HCl) или серной (H₂SO₄) кислот в спиртах [25]. Обычно применяют 2–10% растворы в метаноле (CH₃OH). Однако в современной практике чаще используют различные кислоты Льюиса: например, фторид бора (BF₃) и хлорид алюминия (AlCl₃) [26, 27]. Общая схема кислотно-катализируемых реакций дериватизации липидов представлена на рис. 1а.

Применение трифторида бора для определения ЖК описано еще в 1964 г. [28]. В настоящее время есть множество данных о применении BF₃ при анализе биологических образцов, в том числе для трансметилирования липидов в плазме крови человека [29], эритроцитах и сыворотке крови [23, 30], мышечной ткани коров и овец [31, 32], печени рыб [33], бактериях [34]. BF₃ в метаноле позволяет конвертировать кислоты всех классов липидов (включая свободные ЖК) в метиловые эфиры [27]. Дериватизация проводится при 100°C. Этерификация свободных ЖК в таких условиях происходит за 2 мин, переэтерификация фосфоли-

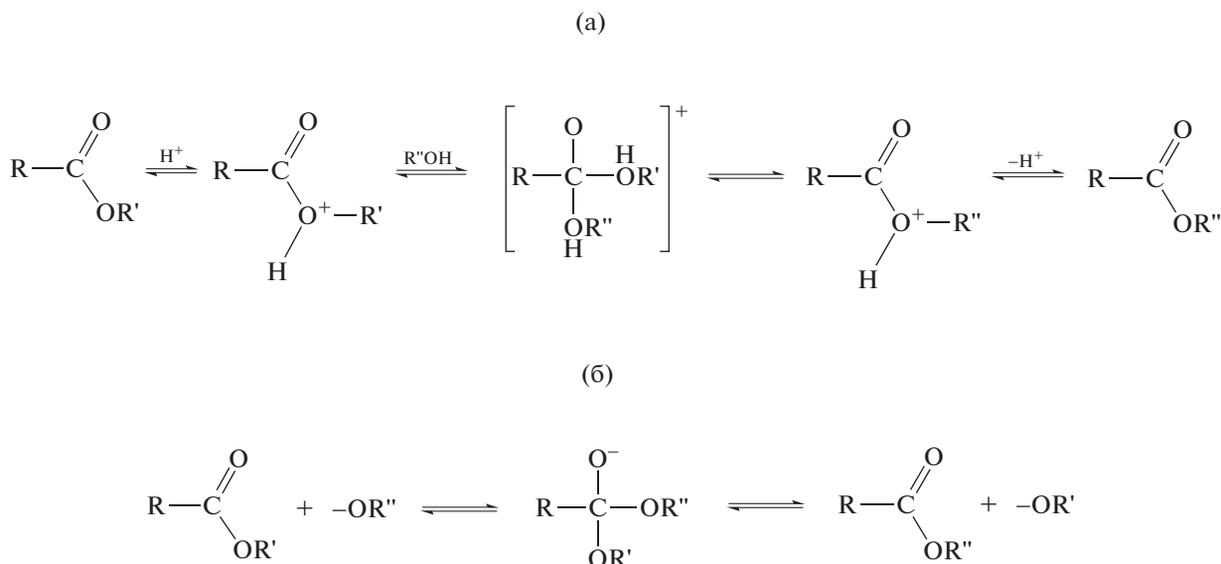


Рис. 1. Общая схема кислотно- (а) и основно-катализируемых (б) реакций дериватизации липидов [18].

пидов – за 10 мин. Более длительного времени требует переэтерификация триглицеридов и сфингомиелина – 30 и 90 мин соответственно [28]. Выход реакции этерификации, выполненной таким образом для биологических объектов, достигает 99% [28, 35]. Применение BF_3 для анализа ПНЖК плазмы крови и мембран эритроцитов описано в работе Вогнилда [36]. Экстракцию липидов проводили по методу Фолча (смесью хлороформа и метанола). Применение трифторида бора для этерификации свободных ЖК, полярных эфиров и триглицеридов возможно в комбинации с гидроксидом натрия. Метод продемонстрировал высокую эффективность при анализе общего содержания ЖК в плазме крови человека и тканях печени крысы. Эффективность этерификации превышает 85% для всех классов липидов [26]. Полученные метиловые эфиры экстрагируют с использованием *n*-гексана (или *n*-пентана) с последующей промывкой водой. Однако, такой способ является достаточно жестким. В целях предотвращения окисления ненасыщенных ЖК реакцию проводят в присутствии антиоксидантов.

В современной практике анализа ПНЖК в качестве антиоксиданта часто используется 2,6-дитретбутил-4-метилфенол (бутилгидрокситолуол или ВНТ). Одним из недостатков метода является ограничение по срокам и условиям хранения раствора фторида бора [22]. Фторид бора способен реагировать с холестерином с образованием метилового эфира, который мешает дальнейшему анализу компонентов. Необходимо отметить, что используемый в качестве антиоксиданта ВНТ, является весьма токсичным веществом и обладает ярко выраженным канцерогенным действием [37].

Хлорид алюминия (AlCl_3) также используют при определении жирнокислотного состава липидов. Этот реагент может быть использован для прямого метилирования (без предварительной экстракции жиров). По способности переэтерификации AlCl_3 сравним с фторидом бора. Преимуществом метода является меньшее содержание мешающих хроматографическому анализу продуктов. Недостаток – неспособность метилировать свободные ЖК [25].

Для прямого метилирования возможно также применение ацетилхлорида (CH_3COCl). Его добавляют в пробу без предварительной подготовки с последующей экстракцией метиловых эфиров *n*-гексаном или *n*-пентаном. Система метанол-ацетилхлорид применима для дериватизации широкого спектра липидов, при этом ацетилхлорид отличается более высокой эффективностью дериватизации по сравнению с соляной кислотой и фторидом бора [38].

Растворы соляной или серной кислот в метаноле, как и BF_3 , быстро метилируют свободные ЖК и могут быть использованы для переэтерификации всех классов липидов, содержащихся в биологическом материале, в том числе, например, в плазме крови человека [39, 40], мышцах и печени животных [41]. Реакцию обычно проводят при 60–70°C в течение часа.

Одним из общих недостатков кислотных катализаторов является способность конвертировать плазмалогены, присутствующие в биологических образцах, в диметилацетали, которые могут затруднять хроматографическое разделение метиловых эфиров ЖК [42]. Следует отметить, что диметилацетали можно отличить от жирных кислот

по масс-спектрам, поэтому их присутствие не мешает анализу при использовании масс-спектрометрического детектирования.

Основно-катализируемые реакции. Эти реакции (рис. 1б) проходят в более мягких условиях. Наиболее часто применяемыми способами дериватизации являются получение алкильных производных (метиловых, этиловых и изопропиловых) в результате взаимодействия растворов алкоголятов щелочных металлов в соответствующих спиртах. Классическим и наиболее распространенным способом в клинической практике, микробиологии и анализе пищевых продуктов является метилирование [40, 43].

Для щелочного трансметилирования наиболее часто используют растворы метилата натрия (CH_3ONa) или гидроксида калия (KOH) в метаноле. Реакция с метилатом происходит достаточно быстро даже при комнатной температуре, поэтому нет необходимости в использовании антиоксидантов [31]. Особенностью этого основно-катализируемого метода дериватизации является отсутствие модификации свободных кислот и сфинголипидов в метиловые эфиры. Тем не менее, CH_3ONa эффективно используется для трансметилирования липидов крови человека и мышечной ткани [31, 44]. Применение раствора KOH в метаноле для трансметилирования липидов претворяет реакции изомеризации двойных связей в молекулах ненасыщенных кислот и образование метокси-артефактов [45, 46]. В обоих случаях не происходит высвобождение диметилацеталей из плазмалогенов, которые могут помешать хроматографическому определению.

Реже для щелочной этерификации используют производные аммония, например гидроксид тетраметиламмония (**ТМАН**), гидроксид триметилфениламмония (**ТМРАН**) и др. [47]. Связанные ЖК переходят в соли аммония, которые подвергаются пиролизу с получением метиловых эфиров в испарителе газового хроматографа. Преимущество этого способа заключается в том, что реакция проводится при комнатной температуре, в одну стадию без предварительной экстракции [48].

Известны способы метилирования ЖК с использованием диазометана (рис. 2) и алкилхлорформатов [49]. Для метилирования ЖК может быть использован йодметан (CH_3I). Этот метод был применен для определения состава сфинголипидов [50] и свободных ЖК в мозговой ткани. Кроме получения метиловых производных липидных соединений применяют этерификацию до этил-, пропил-, изопропил-, бутил- и изобутилпроизводных [51].

Описаны методы этерификации ЖК до метиловых эфиров непосредственно в биоматериале (плазме крови, эритроцитах, тканях) без предварительной экстракции липидной фракции [30]. В

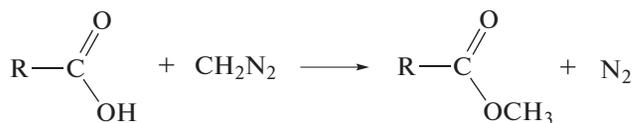


Рис. 2. Дериватизация жирных кислот диазометаном [18].

этом случае не требуются такие стадии пробоподготовки, как, например, отгонка растворителя или центрифугирование, что позволяет избежать потерь в определяемых компонентах и значительно сократить время анализа. Производные, полученные после экстракции *n*-гексаном (или *n*-пентаном) и промывки водой, подвергают хроматографическому анализу.

В некоторых исследованиях приведены методы построения метаболических профилей ЖК с последовательным применением разных дериватизирующих агентов [52].

В целом, одним из главных недостатков метилирования является относительно длительное время реакции и высокая температура, что может способствовать изменению структуры определяемых кислот.

Разделение производных ЖК обычно проводят на капиллярных колонках с неподвижной фазой разной степени полярности. Среди неполярных неподвижных фаз распространены диметилполисилоксан и фенилметилполисилоксан. Часто для анализа метиловых эфиров жирных кислот (**МЭЖК**) используются полярные капиллярные колонки с неподвижной фазой на основе полиэтиленгликоля (**ПЭГ**) [18]. Это связано с тем, что капиллярные колонки с ПЭГ эффективно разделяют эфиры с изомерией углеродного скелета и кратных связей. Наиболее серьезным ограничением для ПЭГ-фазы является низкая разрешающая способность для пространственных изомеров, которые элюируются одновременно. Таким образом, эти колонки не пригодны, если требуется разделение специфичных *цис*-, *транс*-изомеров ЖК при использовании пламенно-ионизационного детектора. Дополнительную эффективность могут обеспечить капиллярные колонки с высокополярной (например, цианополисилоксановой) неподвижной фазой. Методика определения МЭЖК с использованием капиллярной колонки с цианопропильным покрытием предложена специалистами по ГХ компании "Agilent Technologies" (США). Методика позволила провести полное разделение 37-компонентной стандартной смеси МЭЖК, а использование водорода в качестве газа носителя позволило сократить время анализа до 18 мин [53].

Информацию о химической структуре анализируемых ЖК получают с помощью масс-спек-

трометрических (МС) детекторов. Предел обнаружения МС сравним с пределом обнаружения пламенно-ионизационного детектора. В практике анализа ЖК методом ГХ-МС помимо метилирующих агентов, для дериватизации ЖК используются и другие реагенты. Такими реагентами могут быть, например, N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид (BSTFA) [54], N-метил-N-(трет-бутилдиметилсилил) трифторацетамид (MTBSTFA) [55]. При реакции с MTBSTFA получают сложные эфиры трет-бутилдиметилсилила (TBDMS), преимущества которых состоят в высокой стабильности и образовании очень интенсивных пиков характеристических ионов при фрагментации и, следовательно, легко интерпретируемых масс-спектров. С использованием этого дериватирующего агента разработан метод для одновременного определения ЖК и стероидов в биологических жидкостях. Методика была успешно применена для количественного определения 18 ЖК и некоторых стероидов включая прекурсоры холестерина в образцах слюны человека. Помимо этого методика подходит для анализа таких объектов, как моча, амниотическая жидкость, спинномозговая жидкость и может быть весьма перспективна в клинической практике [55]. Довольно мягкий способ дериватизации – реакция с бис(пентафторфенил)диметилсиланом – длится всего 15 мин. и проходит при комнатной температуре [56]. Для определения короткоцепочечных жирных кислот, являющихся маркерами многих метаболических заболеваний, предложена методика дериватизации пентафторбензилбромидом (PFBBr). При помощи этого метода определяли короткоцепочечные линейные и разветвленные жирные кислоты в фекалиях мышей. Оптимальное время реакции составило 90 мин при температуре 60°C и pH 7. Методика позволила одновременно обнаружить 8 основных короткоцепочечных ЖК с пределом обнаружения 0.244–0.977 мкмоль [57].

При определении ЖК методом ГХ-МС возможна дериватизация 3-пиридилкарбинолом с получением пиколиниловых эфиров. Спектры пиколиниловых эфиров ЖК весьма информативны, содержат интенсивные пики молекулярных ионов, позволяют достоверно определить структуру углеродной цепи кислот и положение кратных связей.

Применение этого способа дериватизации для экспрессного профилирования жирных кислот в бактериальных клетках описано в работе Куркевича с соавторами. Описанный ими метод интересен тем, что авторы использовали пиролизер в качестве термохимического микрореактора для дериватизации. Вкратце, аликвоту (5 мкл) суспензии бактериальных клеток в ацетоне помещали на термоэлемент пиролизера. Сразу после этого добавляли 1 мкл дериватирующей смеси (10% водный раствор гидроксида натрия и 5% пи-

ридилкарбинола), и растворители выпаривали в токе азота. Термоэлемент помещали в пиролизер по точке Кюри и проводили пиролитическую газовую хроматографию (метод исследования при котором образец подвергают пиролизу, а образовавшиеся летучие продукты разделяют в газовом хроматографе) с масс-спектрометрическим детектированием [58]. Температуры, при которых проводят разделение пиколиниловых эфиров, примерно на 50°C выше чем те, которые используют для разделения МЭЖК, так как они имеют более низкую летучесть. Необходимо отметить, что хроматографическое разделение этих производных характеризуется худшим разрешением по сравнению с методами разделения метиловых эфиров [59].

Высокоспецифичным масс-спектром обладают также производные ЖК 4,4-диметилноксазолина (DMOX). Способность к разделению у них сходна с метиловыми эфирами соответствующих кислот [60]. В случае применения пентафторфенилдиметилсилила для дериватизации предел обнаружения можно понизить до 0.05 нг/мл [61].

Жидкостная хроматография. Одним из альтернативных направлений в анализе липидов является ВЭЖХ [18]. Основное преимущество ВЭЖХ над ГХ заключается в большей чувствительности и более высокой селективности, что обусловлено разнообразием неподвижных фаз ВЭЖХ колонок. Недостатком ВЭЖХ для анализа липидов является длительность разделения и высокий расход органических растворителей.

Одна из сложностей анализа ЖК при использовании ВЭЖХ заключается в низком поглощении ими излучения в ближнем ультрафиолетовом (УФ) диапазоне, что затрудняет их прямое детектирование с помощью УФ детекторов или флуоресцентного детектора. В случае работы с этими наиболее распространенными в ВЭЖХ типами детекторов, перед анализом необходима дериватизация для введения сильных хромофорных УФ-поглощающих групп в молекулы ЖК. Дериватирующими агентами для этого могут служить 2-бромацетофенон [62], 9-флуоренилметилхлорформиат [63], 2-нитрофенилгидразин [64].

Описан метод определения жирных кислот в семенах масличных культур с помощью флуоресцентного детектора с предколоночной дериватизацией 9-флуоренилметилхлороформиатом. Реакция дериватизации проводилась при 60°C в течение всего 10 мин. Хроматографическое разделение 14 жирных кислот (C10–C22) было достигнуто за 30 мин. Использовались длины волн возбуждения и излучения 265 и 315 нм соответственно. Метод показал хорошую чувствительность и воспроизводимость: пределы обнаружения – 0.01–0.05 мкг/мл, относительные стандартные отклонения – менее 0.27%. Этот метод был применен для количе-

ственного определения жирных кислот в кунжутном масле [63].

Дериватизация не требуется в случае применения детекторов, отклик которых не зависит от оптических свойств образца, например, детектора по светорассеянию (Evaporative Light Scattering Detector – **ELSD**). Этот детектор совместим с широким спектром растворителей, что обеспечивает некоторую гибкость при разработке методик. **ELSD** подходит для обнаружения $C_{12}C_{22}$ кислот. Кислоты с более короткой цепью слишком летучие для их уверенного детектирования таким способом [65].

Большинство разделений проводят на обратной фазе с использованием колонок с октадецилсиликагелем (**ODS**, **C18**). Реже используются **C30** и **C8** фазы [50]. Фаза **C8** в большей степени подходит для определения более полярных липидов, например фосфолипидов и короткоцепочечных насыщенных **ЖК** [66].

Хиральные неподвижные фазы, например, 3,5-динитробензоил фенилглицин (**DNBPG**) “Merck KGaA” (Германия), используют для разделения продуктов перекисного окисления липидов [67], разделения энантимеров **ЖК** [68].

Широко распространенной группой методов в липидомике является **ВЭЖХ** в сочетании с масс-спектрометрией [69–71]. В последние десятилетия технический прогресс привел к существенному усовершенствованию **ВЭЖХ-МС**-систем, что позволило повысить чувствительность и селективность приборов. С помощью этих методов могут быть проанализированы все основные классы липидов крови человека (стерины, сложные эфиры холестерина, фосфохолины, фосфозаноламины, сфингомиелины, триацилглицерины, **ЖК**, лизофосфохолины и диацилглицерины), возросла скорость анализа, уменьшилось время на подготовку проб.

Среди методов ионизации, обычно используемых в **ВЭЖХ-МС**, наиболее популярны ионизация электрораспылением (**ESI**) и химическая ионизация при атмосферном давлении (**APCI**).

Для экстракции липидов из биологических матриц перед анализом методом **ВЭЖХ-МС** для экстракции обычно пользуются методом Фолча или Блайя–Дайера, которые считаются эталонными. Также для этой цели применяют смеси метил-трет-бутилового эфира (**МТБЭ**) и метанола, гексана и изопропанола, бутанола и метанола. Все эти методы экстракции демонстрируют различную степень эффективности извлечения для разных классов липидов. Известны методики анализа липидов с одностадийной экстракцией, например метанолом [72]. Метанол обладает высокой экстрагирующей способностью в отношении фосфолипидов и лизофосфохолинов. Помимо этого он вызывает денатурацию белков крови,

которые затем легко удалить центрифугированием, а супернатант может быть непосредственно введен в **ВЭЖХ-МС** систему без дополнительной очистки. В силу своей простоты этот метод обладает очень высокой воспроизводимостью.

В литературных источниках описаны и более универсальные способы одностадийной экстракции, например с использованием смеси метанола, хлороформа и **МТБЭ** в соотношении 1.3 : 1 : 1 [73]. Соотношение объемов образца (100 мкл плазмы крови) и экстрагирующей смеси – 1 : 20. Экстракцию проводили в 5 мл пробирке Эппендорфа. Образцы встряхивали и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин, затем повторно встряхивали и центрифугировали при 2000 оборотов в течение 10 мин. Верхний слой экстрагента подвергали хроматографированию без дополнительной очистки. Хроматографическое разделение проводили на хроматографе Agilent 1290 “Agilent Technologies” (США) на фазе **C18** (колонок Zorbax Eclipse Plus RRHD 2.1 × 150 мм, 1.8 мкм “Agilent Technologies” (США)). В качестве элюента применяли 5 мМ раствор формиата аммония в воде, в ацетонитриле и в изопропанол. Разделение было выполнено при температуре 40°C. Детектирование проводили на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре Agilent 6540 “Agilent Technologies” (США) в режиме регистрации положительных ионов (напряжение на капилляре – 4000 В) с азотом в качестве газа-осушителя (температура – 250°C, скорость потока – 8.8 л/мин). Напряжение на фрагменторе, конусе, скиммере, и октаполе – 110, 500, 65, и 750 В, соответственно. Скорость сканирования – 2 ГГц. При таких условиях удалось обеспечить наилучшее соотношение сигнал/шум для стандартных образцов основных классов липидов, которые в режиме положительной ионизации были детектированы преимущественно в виде аддуктов состава $[M + H]^+$. Еще более высокой чувствительности для **ЖК** (в виде аддуктов $[M - HCOO]$) удалось добиться в отрицательном режиме. Описанный метод экстракции обеспечивал близкую к 100% степень извлечения для девяти основных классов липидов крови человека [73].

Качественно нового уровня в нецелевой липидомике позволяет достичь сочетание **ВЭЖХ** с масс-спектрометрами высокого разрешения. В последнее время благодаря очень высокой разрешающей способности и точности для исследования липидных профилей все чаще используются масс-анализаторы ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (**ИЦР/ПФ**). Например, в работе Ху с соавторами [74] предложен метод **ВЭЖХ-ИЦР/ПФ** для определения липидов в плазме крови человека и мыши. Хроматографическое разделение проводили на фазе **C8** с пористыми частицами сорбента в градиентном режиме. В качестве элюента исполь-

зовали смеси ацетонитрил–вода (60 : 40) и изо-пропанол–ацетонитрил (90 : 10). В одном цикле ВЭЖХ-ИЦР/ПФ было обнаружено более 160 липидов, относящихся к восьми различным классам. Метод был полностью валидирован. Предел обнаружения методики – 0.08–1.28 мкг/мл плазмы, стандартное отклонение воспроизводимости – 2.7–7.9%.

В работе Корц [75] для определения 6 ПНЖК, 14 эйкозаноидов и 3 окисленных метаболитов применяли осаждение белков и онлайн твердофазную экстракцию в сочетании с тандемным МС-детектированием. Разделение компонентов пробы проводили на фазе С18. Для точной идентификации соединений были подобраны специфические MRM-переходы (MRM – мониторинг множественных реакций). Предложенный метод отличается быстрой автоматизированной пробоподготовкой. Пределы обнаружения составили 200–1000 нг/мл для ПНЖК и 10–1000 пг/мл для их метаболитов.

В практике ВЭЖХ анализа липидов описаны методы дериватизации диметиламиноэтанолом. Например, в работе Петтинелла с соавторами [76] было предложено проводить определение ЖК в тканях атеросклеротических бляшек после их удаления с внутренней стенки артерии. Для этого сначала проводили экстракцию ЖК из матрицы с помощью смеси хлороформа и метанола, а затем полученную смесь гидролизовали с помощью 40% гидроксида калия. Далее проводили дериватизацию свободных ЖК деанолом (диметиламиноэтанол или DMEA), с добавлением йодметана. Полученные триметиламиноэтиловые эфиры ЖК определяли методом ВЭЖХ/МС-МС. Пределы обнаружения составили 4–40 нг/мл.

В настоящее время анализ липидов с помощью ВЭЖХ-МС – один из наиболее эффективных подходов для исследования самых разнообразных биологических объектов, в том числе плазмы крови и других биологических жидкостей. По совокупности таких характеристик, как чувствительность, селективность и точность определения, жидкостная хромато-масс-спектрометрия является непревзойденной техникой физико-химического анализа. Альтернативой является газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГХ-МС), которая по-прежнему играет важную роль в липидомике. Однако методы липидного профилирования на основе ГХ-МС обычно требуют длительных процедур гидролиза и дериватизации, что может быть источником дополнительной погрешности при количественном определении. При этом для анализа неполярных липидов предпочтительнее использовать ГХ-МС.

Сверхкритическая флюидная хроматография. Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) – вид хроматографии, в котором подвиж-

ной фазой служит сверхкритический флюид, – вещество при температуре и давлении выше критической точки. Свойства веществ в сверхкритическом состоянии являются промежуточными между их свойствами в газовом и жидком агрегатном состоянии. Например, при плотности близкой к плотности жидкости, они обладают гораздо более высокими коэффициентами диффузии и значительно меньшей вязкостью. Отсутствует поверхностное натяжение. В то же время их растворяющая способность намного выше, чем у газов. Контролируя температуру и давление флюида, можно в широком диапазоне изменять его свойства.

Первое упоминание об использовании сверхкритического флюида в хроматографии относится к 1962 г. Метод описан немецким химиком Клеспером [77]. Тогда он получил название “газовая хроматография высокого давления”. СФХ имеет ряд преимуществ перед ГХ и ВЭЖХ. Низкая вязкость позволяет использовать более длинные (и, соответственно, более эффективные) колонки и работать с более высокими скоростями потоков; хроматографы совместимы практически с любым типом детектора, включая, например, пламенно-ионизационный, что невозможно в ВЭЖХ. Немаловажным является экологичность, так как углекислый газ, который наиболее часто используется в качестве элюента в СФХ, не токсичен в отличие от таких растворителей, как метанол и ацетонитрил, обычно используемых в жидкостной хроматографии. В отличие от ГХ возможно разделение термолабильных и нелетучих веществ.

Такое сочетание свойств позволяет анализировать ЖК без дериватизации, поскольку не требуется обеспечивать летучесть образца, как в случае с ГХ, и не нужно вводить в молекулы аналитов хромофорные группы, как при ВЭЖХ с УФ-детектированием [78]. Следует отметить, что СФХ-систему гораздо проще сочетать с масс-селективными детекторами, так как поток подвижной фазы заметно меньше, чем в ВЭЖХ. Как и в случае ВЭЖХ-МС для ионизации предпочтительно применять электроспрей и химическую ионизацию при атмосферном давлении [79]. Также в отличие от ВЭЖХ СФХ позволяет использовать более высокие скорости потока при более низком давлении, что позволяет достичь большей эффективности и, соответственно лучшего разрешения, и одновременно сократить время анализа.

Современным трендом в СФХ-анализе биологических объектов и, в частности в липидомике, является развитие многомерной хроматографии. В многомерной хроматографии проба последовательно разделяется на двух колонках разной длины и с разными неподвижными фазами [18, 80]. Впервые применение двумерной СФХ для анали-

за жиров описано Хиратой в 2004 г. [81]. В работе выполнено разделение метиловых эфиров ЖК с помощью системы СКФ × СКФ с насадочными колонками и пламенно-ионизационным детектором. Первая колонка с силикагелем (150 × 4.6 мм, размер частиц сорбента 5 мкм) работала при постоянном давлении 13 МПа при 20°C и обеспечила разделение по количеству кратных связей. Вторая колонка с октадецилсиликагелем (50 × 4.6 мм, размер частиц сорбента 5 мкм) работала при постоянном расходе (3 мл/мин) при 50°C. Удерживание на второй колонке возрастало с ростом длины углеродной цепи, однако несколько сокращалось при увеличении количества кратных связей, что, вероятно, связано с некоторым увеличением полярности аналитов. Эта система позволяла добиться очень высокого разрешения и простой идентификации минорных компонентов пробы.

Высокой степени ортогональности позволяет добиться сочетание СФХ и обращено-фазовой жидкостной хроматографии ОФ-ВЭЖХ [82]. Применение подобной системы описано для анализа триглицеридов рыбьего жира [83]. На первом измерении разделение фенациловых эфиров ЖК происходило на фазе, модифицированной серебром. Фазы с закрепленными ионами переходных металлов, в частности серебра, чрезвычайно селективны по отношению к соединениям с кратными связями. В качестве элюента использовали углекислый газ с ацетонитрилом и изопропанолом в качестве модификаторов. На втором измерении разделение происходило на фазе C18 (колонка Zorbax SB C18 50 × 4.6 мм, с размером частиц сорбента 3.5 мкм) с градиентным элюированием водой и ацетонитрилом. Комбинация СФХ × ОФ-ВЭЖХ обеспечила значительно более высокую пиковую емкость главным образом за счет высокой степени ортогональности, основанной на насыщенности и гидрофобности.

Несмотря на все преимущества, СФХ в настоящее время не получила широкого распространения. В первую очередь это связано со сложностью аппаратного исполнения СФХ систем. Поскольку жидкости обладают очень низкой сжимаемостью, их плотность почти постоянна независимо от давления. Сверхкритические флюиды, напротив, очень сжимаемы и их физические свойства существенно изменяются с изменением давления при движении через колонку. Для поддержания постоянного давления (даже при изменении расхода элюента) в системе требуются регуляторы обратного давления, которые очень сложны технически. Помимо этого для изготовления прокладок и уплотнительных колец необходимы специальные материалы, устойчивые к действию сверхкритической жидкости

Перспективы дальнейшего развития СФХ связаны с разработкой новых типов сорбентов, что позволит осуществлять разделение специфических аналитов и расширить область применения СФХ на ранее недоступные для этого метода задачи. Развитие методов динамического модифицирования может гибко регулировать свойства подвижной и стационарной фаз и обеспечить возможность одновременного анализа различных липидов с широким диапазоном полярностей. Большой потенциал в качестве комплексного и высокопроизводительного метода профилирования липидов имеет внедрение хроматографических систем с возможностью автоматической сверхкритической флюидной экстракции (СФЭ). Это позволит осуществлять извлечение аналитов из объектов исследования значительно эффективнее и быстрее, уменьшить расход реактивов и, следовательно, сократить время анализа и существенно снизить его стоимость.

Капиллярный электрофорез. Альтернативой хроматографическим методам анализа липидов является капиллярный электрофорез (КЭ). Метод основан на разделении заряженных компонентов пробы в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Разделение происходит в кварцевом капилляре, предварительно заполненном электролитом (подходящий буферный раствор). После подачи высокого напряжения (до 30 кВ) к концам капилляра компоненты смеси начинают двигаться с разной скоростью, в зависимости от их заряда и ионного радиуса и, соответственно, в разное время достигают зоны детектирования. Разделение характеризуется очень высоким разрешением, для анализа требуется небольшое количество пробы – обычно объем анализируемого раствора составляет порядка 2 нл. Детектирование аналитов при капиллярном электрофорезе может осуществляться различными способами. Наиболее распространено фотометрическое детектирование в ультрафиолетовой или видимой области и лазерная флуоресценция. Вполне допустимо сочетание систем капиллярного электрофореза с масс-спектрометрами.

Капиллярный электрофорез традиционно использовали для определения высокомолекулярных биомолекул, однако в последнее время возросла его роль в анализе низкомолекулярных органических веществ. В начале 21 века КЭ начали применять для исследования трансжиров в пищевых продуктах [84].

Для разработки эффективного метода КЭ необходимо принять во внимание несколько аспектов. Важным этапом анализа является оптимизация электрофоретических и аналитических параметров: концентрации и рН фонового электролита, типа и концентрации буферных добавок (поверхностно-активные вещества, органические раство-

рители, циклодекстрины), приложенного напряжения, температуры системы. В первую очередь нужно подобрать рН. Поскольку значения констант кислотности (рКа) ЖК составляет приблизительно 5,0, обычно используют электролиты с рН выше 7,0, чтобы перевести аналиты в анионную форму.

Классическая разновидность КЭ – капиллярный зонный электрофорез – ограниченно применима для определения ЖК из-за плохой растворимости Аналитов в воде и низкого УФ-поглощения аналитов. Водные электролиты допустимо использовать для разделения кислот с длиной цепи C_2 – C_{14} . Как и в случае ВЭЖХ, для фотометрического детектирования возможно введение в молекулы ЖК хромофорных групп, например, дериватизация ω -бромацетофеноном для получения фенациловых эфиров ЖК [85].

Для соединений, слабо поглощающих излучение в УФ-диапазоне, в практике КЭ существует возможность регистрации методом косвенного (непрямого) детектирования. В этом случае в фоновый электролит вводят небольшое количество вещества, хорошо поглощающего излучение требуемой длины волны, подвижность которого близка к подвижности разделяемых веществ. В случае определения анионов поглощающий ион также должен быть анионом, а при определении катионов – катионом. Чаще всего используют катионы ароматических аминов или гетероциклические соединения. Количество добавки должно быть мало для сохранения постоянной ионной силы ведущего электролита в процессе разделения. В зоне, где находится непоглощающий ион, уменьшается концентрация поглощающего иона, и на электрофореграмме регистрируются отрицательные пики, площади которых пропорциональны концентрациям определяемых ионов. Косвенное детектирование позволяет регистрировать все присутствующие в пробе компоненты, то есть является универсальным способом детектирования.

Наиболее распространено в практике анализа ЖК с помощью капиллярного электрофореза использование системы с неводным буферным электролитом и косвенным детектированием. Например, предложен метод разделения различных смесей насыщенных и ненасыщенных свободных ЖК с использованием аденозинмонофосфата (АМФ) в качестве хромофора. Преимущество этого реагента в том, что он имеет высокую молярную поглощающую способность, большое отношение фонового поглощения к фоновому шуму, растворим как в водных, так и в неводных средах [85].

В работе Хаддадиана с соавторами [86] разделение кислот C_{12} – C_{31} было проведено с использованием электролита, содержащего N-метилформамид и диоксан в соотношении 3:2, 40 мМ 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диола

(ТРИС), 2,5 мМ АМФ и 0,5% лаурилового эфира полиоксиэтилена (Brj 35) за 40 мин. Смесь 13 насыщенных и ненасыщенных изомеров C_{14} – C_{22} ЖК была разделена до базовой линии за 37 мин с использованием смеси N-метилформамид–диоксан–вода в соотношении 5 : 4 : 1.

Косвенное детектирование было успешно применено для анализа фосфолипидов крови [87]. В качестве электролита использован 5 мМ раствор аденозинмонофосфата. Разделение проводили при температуре 25°C и приложенном напряжении 30 кВ. Кислоты разделяли в анионной форме и в виде цвиттер-ионов. Метод очень перспективен для определения фосфолипидов в биологических образцах.

Прямое УФ-детектирование возможно, если аналиты содержат несколько двойных связей в углеродной цепи, что обеспечивает возможность поглощения излучения в интервале от 200 до 250 нм [88]. Например, была предложена методика анализа содержания омега-3 ЖК в яйцах с прямым УФ-детектированием при 200 нм [89]. В исследовании применяли 12 мМ боратный буферный раствор, рН 9,2, содержащий 12 ммоль Brj 35, 17% ацетонитрила и 33% метанола. Рабочие условия: ввод пробы – 25 мбар в секунду, напряжение 27 кВ, температура 27°C, детектирование прямое при 200 нм. Параметры капилляра – 40 см \times 50 мкм \times 375 мкм. Описанная в работе методика имела такие преимущества, как низкая себестоимость, короткое время анализа, отсутствие дериватизации в ходе подготовки проб и простота интерпретации данных.

Основные преимущества – высокая эффективность разделения, недоступная для ВЭЖХ, низкое расход образцов и реагентов, короткое время анализа, простота подготовки образцов (отсутствие дериватизации). К сожалению, КЭ обеспечивает гораздо более низкую чувствительность по сравнению с хроматографическими методами (ВЭЖХ или ГХ), а также худшую воспроизводимость. Таким образом, КЭ представляет собой интересную альтернативу для скрининга ЖК в образцах с высоким содержанием ЖК, например, в растительных маслах, продуктах питания, БАДах.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. ЯМР-спектроскопия – метод исследования вещества, использующий явление ядерного магнитного резонанса. Это один из наиболее совершенных методов качественного анализа, дающий наиболее полную информацию о молекулярном строении химических веществ и реакционной способности молекул, допускающий также количественное определение. Сигнал пропорционален разности в заселенности уровней, которая определяется статистикой Больцмана. Достоинства метода – чувствительность к структурным изменениям, неструктуривность, высокая скорость анализа, возмож-

ность анализа смесей. Особые требования к подготовке образца для проведения ЯМР-анализа сокращают сферы применения или вообще делают невозможным его применение в работе с биоматериалом.

Однако возможен анализ биологических жидкостей и тканей с очень простой подготовкой (жидкость-жидкостная экстракция). Например, в случае липидного анализа плазмы крови, жиры могут быть выделены с помощью процедуры жидкостной экстракции по методу Фолча (смесь CHCl_3 и CH_3OH) и переработаны в дейтерированном хлороформе (CDCl_3) перед анализом. Образцы могут быть проанализированы непосредственно (без экстракции) после добавления равного объема D_2O . ЯМР-анализы проводятся с использованием ЯМР 1H спектроскопии протонного магнитного резонанса (ПМР). Образец плазмы получают центрифугированием [90]. При этом ЯМР 1H является наиболее быстрым способом получения информации, поскольку в сравнении со спектроскопией на ядрах углерода (^{13}C ЯМР-спектроскопия) для получения спектра нужно гораздо меньше времени.

Существуют исследования, в которых описано применение протонного магнитного резонанса для количественного определения ненасыщенных ЖК в тканях животных [91]. Свежие образцы тканей аорты, почек и сердца замораживали с помощью жидкого азота сразу после извлечения. Замороженные ткани взвешивали и гомогенизировали. Липиды экстрагировали смесью хлороформ-метанол (2:1) из расчета 20 об./ед. веса ткани (20 мл/г) в течение 20 мин. Затем образцы фильтровали через воронку из пористого стекла. Такой же объем раствора использовали для промывки остатков ткани на фильтре. Фильтрат смешивали с 0.74%-ным раствором KCl (1/5 общего объема фильтрата) для удаления всех нелипидных примесей и оставляли для разделения на ночь. Нижний слой (хлороформный) собирали, отгоняли растворитель в роторном испарителе при 30°C. Сухие экстракты перерастворяли в CDCl_3 и использовали для анализа. Спектры ЯМР жирных кислот в экстрактах получены при 200 МГц на спектрометре Varian XL-200 с использованием ширины частотной полосы 5000 Гц, угол поворота вектора намагниченности 60°, время сбора данных 1.64 с, задержка 4 с.

Ввиду сложности матриц биологических объектов, ЯМР часто применяют в сочетании с каким-либо методом разделения, например, ВЭЖХ или ГХ. ЯМР в сочетании с ВЭЖХ незаменим при структурном анализе неизвестных соединений в биологических матрицах. Нужно отметить, что по сравнению с другими методами детектирования (такими как масс-спектрометрия), обычно применяемыми в хроматографии, ЯМР характеризу-

ется более низкой чувствительностью [92]. Низкая чувствительность всегда была основным ограничением ЯМР-спектроскопии. Теоретически ЯМР не имеет предела чувствительности, поскольку чувствительность и разрешение связаны с силой магнитного поля (отношение сигнал-шум увеличивается пропорционально 1.5 степени вектора магнитной индукции). Кроме того, качество полученного спектра вещества может быть улучшено за счет увеличения числа сканирований (времени накопления сигналов). Однако для коммерчески доступных в настоящее время спектрометров пределы обнаружения все еще находятся в диапазоне от низких микромолярных до высоких наномолярных. Помимо этого проблема анализа биологических объектов связана с тем, что чем сложнее молекула органического соединения, тем больше сигналов содержит ее протонный спектр. При этом неизбежно наложение сигналов с близкими химическими сдвигами, что затрудняет расшифровку полученных данных. Увеличение рабочей частоты спектрометра разделяет мультиплетные спектральные линии взаимодействующих протонов, что позволяет получить более информативный спектр, но в то же время удорожает используемое оборудование.

Метод ЯМР является единственно возможным вариантом прямого подтверждения строения молекулы вещества, выделенного из биологического объекта и первоначально идентифицированного методами ГЖХ или ВЭЖХ. ЯМР спектроскопия позволяет наиболее простым способом провести анализ конформаций молекул веществ и типов химических связей всех классов липидов. Другие варианты подтверждения структуры менее информативны. Например, масс-спектрометрия имеет дело с фрагментами молекул, а ИК-спектроскопия позволяет оценить общие представления о наличии в веществе определенных функциональных групп или фрагментов структур молекулы. Таким образом, не смотря на то, что ЯМР спектроскопия определяет строение не измененной молекулы, этот метод является в основном, подтверждающим.

Малая распространенность ЯМР обусловлена высокой эксплуатационной стоимостью по сравнению с масс-спектрометрами и другими распространенными аналитическими инструментами. Помимо этого, метод ЯМР требует очень высокой квалификации операторов, использования растворителей со специальным изотопным составом. Также высокие требования предъявляются к лабораториям, в которых эксплуатируются ЯМР-спектрометры (отсутствие вибраций, изоляцией от магнитных и радиочастотных помех и т.д.). Эти факторы, в дополнение к первостепенной проблеме низкой чувствительности сдерживают применение ЯМР в анализе биологических объектов.

Таблица 1. Сравнение основных методов анализа содержания жирных кислот в биологических образцах

Показатель	Вид анализа				
	ГХ	ВЭЖХ	СФХ	КЭ	ЯМР
Предел обнаружения	0.1 пг/мл–1 нг/мл	10 пг/мл–1000 нг/мл	~1 пг/мл	0.1 мкг/мл	0.1–1 мкг/мл
Чувствительность	Высокая	Высокая	Высокая	Низкая	Низкая
Селективность	Средняя	Высокая	Высокая	Удовлетворительная (в случае непрямого детектирования)	Высокая
Продолжительность анализа	Длительная	Длительная	Короткая	Короткая (~40 мин)	Короткая
Пробоподготовка	Экстракция, дериватизация	Экстракция	Экстракция	Экстракция	Экстракция, перерастворение в дейтерированном хлороформе; добавление равного объема D ₂ O
Необходимость дериватизации	+ (требуется)	+ – (требуется для оптических детекторов)	+ – (требуется для оптических детекторов)	+ – (требуется для оптических детекторов в случае прямого детектирования)	– (не требуется)
Дериватизирующие агенты	Кислоты в метаноле (фторид бора, хлорид алюминия, соляная кислота, серная кислота); ацетилхлорид; метилат натрия; гидроксид калия в метаноле; гидроксид тетраметиламмония, гидроксид триметилфениламмония; диазометан и его производные; алкилхлороформиаты; йодметан; бис-триметилсилил-трифторацетамид; N-метил-N-(трет-бутилдиметилсилил) трифторацетамид; бис-(пентафторфенил) диметилсилан; пентафторбензилбромид	Хлорангидрид нафталинкарбоновой кислоты; фталевый ангидрид; дифеновый ангидрид; 2-сульфобензойный ангидрид; диметиламиноэтанол	Кислоты в метаноле; ω-бромацетофенон	ω-бромацетофенон	–
Продолжительность дериватизации	2–90 мин	30–120 мин	2–90 мин	15 мин	–

Таблица 1. Окончание

Показатель	Вид анализа				
	ГХ	ВЭЖХ	СФХ	КЭ	ЯМР
Температура при дериватизации	25–100°C	25–100°C	60–100°C	100°C	–
Температура в процессе анализа	50–280°C	Комнатная	20–50°C	Комнатная	Комнатная
Детекция	Пламенно-ионизационный детектор, масс-селективный детектор	Ультрафиолетовый детектор; флуоресцентный детектор; детектор по светорассеянию; масс-селективный детектор	Любой вид детектора, в т.ч. пламенно-ионизационный	Фотометрический детектор в ультрафиолетовой или видимой области; лазерная флуоресценция; масс-спектрометрия; косвенная детекция	–
Объем пробы	Маленький	Маленький	Маленький	Очень маленький (~2 нл)	Большой
Расход реагентов	Низкий	Высокий	Низкий	Очень низкий	Высокий

В табл. 1 приведено сравнение рассмотренных в работе методов анализа ЖК.

Обзор литературы, посвященный применению различных методов анализа ЖК в биологических объектах, показал, что все представленные хроматографические методы пригодны для качественного и количественного определения этих соединений. Выбор конкретной методики зависит от многих факторов – типа анализируемого образца, характера матрицы и т.п.

ГХ и ВЭЖХ в сочетании с различными детекторами являются доминирующими по распространенности методами анализа ЖК. Разнообразие детекторов увеличивает гибкость и расширяет сферу применимости этих групп методов к различным типам образцов. Очень перспективен для анализа липидов метод СФХ. Интересную альтернативу хроматографии для скрининга ЖК в различных матрицах представляет собой КЭ.

Применение ЯМР для анализа липидов ограничивается высокой эксплуатационной стоимостью и очень высокими требованиями к квалификации операторов, а также сравнительно низкой чувствительностью.

Работа проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда по проекту № 19-76-30014 “Фундаментальные исследования паттернов питания человека как основа перспективных технологий производства пищевых продуктов заданного состава и свойств для реализации стратегии здорового питания и профилактики социально значимых заболеваний”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vance J.E., Vance D.E. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Amsterdam: Elsevier, 2008. 639 p.
2. Köfeler H.C. // Encyclopedia of Lipidomics / Ed. M. Wenk. Dordrecht: Springer, 2016. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7864-1_21-1
3. van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2008. V. 9. № 2. P. 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
4. Гладышев М.И. // Журн. СФУ. Биология. 2012. Т. 4. № 5. С. 352–386.
5. SanGiovanni J.P., Chew E.Y. // Prog. Retin. Eye Res. 2005. V. 24. № 1. P. 87–138. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2004.06.002>
6. Valera B., Suhas E., Counil E., Poirier P., Dewailly E. // J. Am. Coll. Nutr. 2014. V. 33. № 4. P. 288–296. <https://doi.org/10.1080/07315724.2013.874913>
7. Harris W.S., Mozaffarian D., Rimm E., Kris-Etherton P., Rudel L.L., Appel L.J., Engler M., Engler M., Sacks F. // Circulation. 2009. V. 119. № 6. P. 902–907. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.191627>
8. Синуцкая Е.Н., Кокоричева Л.В., Манык Ф.М. // Молодой ученый. 2018. № 50. С. 97–99.
9. Phang M., Lazarus S., Wood L., Garg M. // Semin. Thromb. Hemost. 2011. V. 37. № 03. P. 199–208. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1273084>
10. Plourde M., Cunnane S. // Appl. Physiol. Nutr. Metab. 2007. V. 32. № 4. P. 619–634. <https://doi.org/10.1139/H07-034>
11. Hegele R.A. // Nat. Rev. Genet. 2009. V. 10. № 2. P. 109–121. <https://doi.org/10.1038/nrg2481>

12. *Simopoulos A.P.* // Exp. Biol. Med. 2008. V. 233. № 6. P. 674–688.
<https://doi.org/10.3181/0711-MR-311>
13. *Ly W., Yang T.* // Clin. Biochem. 2012. V. 45. № 1–2. P. 127–133.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.10.011>
14. *Munir R., Usman H., Hasnain S., Smans K., Kalbacher H., Zaidi N.* // Biochimie. 2014. V. 102. P. 9–18.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.03.010>
15. *Wall R., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Stanton C.* // Nutr. Rev. 2010. V. 68. № 5. P. 280–289.
<https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00287.x>
16. *Thomas J., Thomas C., Radcliffe J., Itsiopoulos C.* // Biomed Res. Int. 2015. V. 2015. Article ID 172801. 13 p.
<https://doi.org/10.1155/2015/172801>
17. *Bielawska K., Dziakowska I., Roszkowska-Jakimiec W.* // Toxicol. Mech. Methods. 2010. V. 20. № 9. P. 526–537.
<https://doi.org/10.3109/15376516.2010.515081>
18. *Dołowy M., Pyka A.* // J. Chem. 2015. V. 2015. Article ID 120830. 20 p.
<https://doi.org/10.1155/2015/120830>
19. *Wu Z., Zhang Q., Li N., Pu Y., Wang B., Zhang T.* // J. Sep. Sci. 2017. V. 40. № 1. P. 288–298.
<https://doi.org/10.1002/jssc.201600707>
20. *Tedone L., Costa R., De Grazia S., Ragusa S., Mondello L.* // Phytochem. Anal. 2014. V. 25. № 5. P. 468–475.
<https://doi.org/10.1002/pca.2518>
21. *Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.* Harper's Illustrated Biochemistry. N.Y.: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2003. 693 p.
doi.org/10.6.20.12:80/handle/123456789/48617
22. *Shantha N.C., Napolitano G.E.* // J. Chromatogr. A. 1992. V. 624. № 1–2. P. 37–51.
[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85673-H](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85673-H)
23. *Cruz-Hernandez C., Thakkar S.K., Masserey-Elmelegy I., Buosi W., Fontannaz P., Giuffrida F.* // J. Sep. Sci. 2017. V. 40. № 16. P. 3289–3300.
<https://doi.org/10.1002/jssc.201700030>
24. *Casal S., Oliveira B.* // Encyclopedia of Chromatography. 3 ed. / Ed. J. Cazes. N.Y.: CRC Press, 2009. P. 833–845.
25. *Eder K.* // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 1995. V. 671. № 1–2. P. 113–131.
[https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00142-6](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00142-6)
26. *Ostermann A.I., Müller M., Willenberg I., Schebb N.H.* // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 2014. V. 91. № 6. P. 235–241.
<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2014.10.002>
27. *Seppänen-Laakso T., Laakso I., Hiltunen R.* // Anal. Chim. Acta. 2002. V. 465. № 1–2. P. 39–62
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00397-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00397-5)
28. *Morrison W.R., Smith L.M.* // J. Lipid Res. 1964. V. 5. № 4. P. 600–608.
29. *Bondia-Pons I., Castellote A.I., López-Sabater M.C.* // J. Chromatogr. B. 2004. V. 809. № 2. P. 339–344.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.07.002>
30. *Araujo P., Nguyen T.T., Frøyland L., Wang J., Kang J.X.* // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1212. № 1–2. P. 106–113.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.006>
31. *Murrieta C.M., Hess B.W., Rule D.C.* // Meat Sci. 2003. V. 65. № 1. P. 523–529.
[https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00244-9](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00244-9)
32. *Thomas M.L., Brown Jr A.H., Kellogg D.W., Rule D.C., Baublits R.T., Johnson Z.B., Anschutz K.S., Murrieta C.M.* // J. Food Qual. 2008. V. 31. № 2. P. 189–204.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2008.00190.x>
33. *Mondello L., Tranchida P.Q., Dugo P., Dugo G.* // J. Pharm. Biomed. Anal. 2006. V. 41. № 5. P. 1566–1570.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.01.027>
34. *Ichihara K., Fukubayashi Y.* // J. Lipid Res. 2010. V. 51. № 3. P. 635–640.
<https://doi.org/10.1194/jlr.D001065>
35. *Lands W.E.M., Libelt B., Morris A., Kramer N.C., Prewitt T.E., Bowen P., Schmeisser D., Davidson M.H., Burns J.H.* // Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis. 1992. V. 1180. № 2. P. 147–162.
[https://doi.org/10.1016/0925-4439\(92\)90063-S](https://doi.org/10.1016/0925-4439(92)90063-S)
36. *Vognild E., Elvevoll E.O., Brox J., Olsen R.L., Barstad H., Aursand M., Østerud B.* // Lipids. 1998. V. 33. № 4. P. 427–436.
<https://doi.org/10.1007/s11745-998-0224-8>
37. *Bauer A.K., Dwyer-Nield L.D.* // Methods in Cell Biology. V. 163. Chapter 10 /Eds. L. Galluzzi, A. Buqué. N.Y.: Academic Press, 2021. P. 151–173.
<https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2020.07.003>
38. *Vičkačkaitė V., Lingytė A., Kasperovičienė J., Bugelytė B., Koreivienė J., Savadova K.* // Chemija. 2016. V. 27. № 4.
39. *Burdge G.C., Wright P., Jones A.E., Wootton S.A.* // Br. J. Nutr. 2000. V. 84. № 5. P. 781–787.
<https://doi.org/10.1017/S0007114500002154>
40. *Ichihara K., Kohsaka C., Tomari N., Kiyono T., Wada J., Hirooka K., Yamamoto Y.* // Anal. Biochem. 2016. V. 495. P. 6–8.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.11.009>
41. *Sampels S., Pickova J.* // Food Chem. 2011. V. 128. № 3. P. 811–819
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.089>
42. *Cruz-Hernandez C., Destailats F.* // Encyclopedia of Lipidomics. / Ed. M. Wenk. Dordrecht: Springer, 2016.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-7864-1_66-1
43. *Liu Z., Ezernieks V., Rochfort S., Cocks B.* // Food Chem. 2018. V. 261. P. 210–215.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.053>
44. *Akinyemi O., Bruckner G., Johnson J., Lennie T.A., Hildebrand D.* // Open Nutr. J. 2017. V. 11. № 1.
<https://doi.org/10.2174/1874288201711010017>
45. *Delmonte P., Kramer J.K.G.* // Reference Module in Food Science. Amsterdam: Elsevier, 2016.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03051-1>
46. *Juárez M., Polvillo O., Contò M., Ficco A., Ballico S., Failla S.* // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1190. № 1–2. P. 327–332.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.004>
47. *Drechsel D., Dettmer K., Engewald W.* // Chromatographia. 2003. V. 57. № 1. P. S283–S289.
<https://doi.org/10.1007/BF02492117>
48. *Tsai C.J., Liu C.C., Hung L.B., Pan B.S.* // J. Am. Oil Chem. Soc. 2012. V. 89. № 1. P. 9–16.
<https://doi.org/10.1007/s11746-011-1880-2>

49. Gutnikov G. // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 1995. V. 671. № 1–2. P. 71–89.
[https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00116-Z](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00116-Z)
50. Johnson S.B., Brown R.E. // J. Chromatogr. A. 1992. V. 605. № 2. P. 281–286.
[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85248-R](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85248-R)
51. Brondz I. // Anal. Chim. Acta. 2002. V. 465. № 1–2. P. 1–37.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01467-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01467-2)
52. Dai L., Gonçalves C.M.V., Lin Z., Huang J., Lu H., Yi L., Liang Y., Wang D., An D. // Talanta. 2015. V. 135. P. 108–114.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.12.039>
53. Zou Y., Wu H. // Agilent Technologies Application Note. 2018. № 5991-8706EN. https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-8706EN_37-fattyacid_FAME_application.pdf
54. Tammekivi E., Vahur S., Kekišev O., Van der Werf I.D., Toom L., Herodes K., Leito I. // Anal. Methods. 2019. V. 11. № 28. P. 3514–3522.
<https://doi.org/10.1039/C9AY00954J>
55. Moon J.Y., Kong T., Jang H., Kang H.C., Cho Y.Y., Lee J., Lee H. // J. Chromatogr. B. 2018. V. 1093–1094. P. 82–90.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.059>
56. Yang Y.J., Choi M.H., Paik M.J., Yoon H.R., Chung B.C. // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 2000. V. 742. № 1. P. 37–46.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00098-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00098-0)
57. He L., Proadhan M.A.I., Yuan F., Yin X., Lorkiewicz P.K., Wei X., Feng W., McClain C., Zhang X. // J. Chromatogr. B. 2018. V. 1092. P. 359–367.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.028>
58. Kurkiewicz S., Dzierzewicz Z., Wilczok T., Dworzanski J. // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2003. V. 14. P. 58–62.
[https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(02\)00817-6](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(02)00817-6)
59. Wetzel D.L., Reynolds J.E., Christie W.W., Budge I.S., Iverson S., Koopman H. // Mar. Mamm. Sci. 2007. V. 23. № 4. P. 989–992.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2007.00158.x>
60. Garrido J.L., Medina I. // Anal. Chim. Acta. 2002. V. 465. № 1–2. P. 409–416
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00207-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00207-6)
61. Choi M.H., Chung B.C. // Anal. Biochem. 2000. V. 277. № 2. P. 271–273.
<https://doi.org/10.1006/abio.1999.4407>
62. Bodoprost J., Rosemeyer H. // Int. J. Mol. Sci. 2007. V. 8. P. 1111–1124. [10.3390/i8111111](https://doi.org/10.3390/i8111111)
63. Majnooni M.B., Mohammadi B., Jalili R., Babaei A., Bahrani G. // J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2016. V. 39. P. 877–881.
<https://doi.org/10.1080/10826076.2016.1275000>
64. Shrestha R., Miura Y., Hirano K., Chen Z., Okabe H., Chiba, H., Hui S. // Anal. Sci. 2018. V. 34. P. 575–582.
<https://doi.org/10.2116/analsci.17P557>
65. Bravi E., Perretti G., Montanari L. // J. Chromatogr. A. 2006. V. 1134. № 1–2. P. 210–214.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.007>
66. Suchocka Z., Gronostajska D., Suchocki P., Pachecka J. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2003. V. 32. № 4–5. P. 859–865.
[https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00188-2](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00188-2)
67. Garscha U., Nilsson T., Olliv E.H. // J. Chromatogr. B. 2008. V. 872. № 1–2. P. 90–98.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.07.013>
68. Lee S.H., Blair I.A. // BMB Rep. 2009. V. 42. № 7. P. 401.
<https://doi.org/10.5483/BMBRep.2009.42.7.401>
69. Ahern K.W., Serbulea V., Wingrove C.L., Palas Z.T., Leitinger N., Harris T.E. // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-47693-5>
70. Godzjen J., Ciborowski M., Martínez-Alcázar M.P., Samczuk P., Kretowski A., Barbas C. // J. Proteome Res. 2015. V. 14. № 8. P. 3204–3216.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00169>
71. Reis A., Rudnitskaya A., Blackburn G.J., Fauzi N.M., Pitt A.R., Spickett C.M. // J. Lipid Res. 2013. V. 54. № 7. P. 1812–1824.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M034330>
72. Zhao Z., Xu Y. // J. Lipid Res. 2010. V. 51. № 3. P. 652–659.
<https://doi.org/10.1194/jlr.D001503>
73. Pellegrino R.M., Di Veroli A., Valeri A., Goracci L., Cruciani G. // Anal. Bioanal. Chem. 2014. V. 406. № 30. P. 7937–7948.
<https://doi.org/10.1007/s00216-014-8255-0>
74. Hu C., Van Dommelen J., Van Der Heijden R., Spijksma G., Reijmers T.H., Wang M., Slee E., Lu X.Xu G., van der Greef J., Hankemeier T. // J. Proteome Res. 2008. V. 7. № 11. P. 4982–4991.
<https://doi.org/10.1021/pr800373m>
75. Kortz L., Dorow J., Becker S., Thiery J., Ceglarek U. // J. Chromatogr. B. 2013. V. 927. P. 209–213.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.03.012>
76. Pettinella C., Lee S.H., Cipollone F., Blair I.A. // J. Chromatogr. B. 2007. V. 850. № 1–2. P. 168–176.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.023>
77. Klesper E., Corwin A.H., Turner D.A. // J. Org. Chem. 1962. V. 27. P. 700–701.
<https://doi.org/10.1021/jo01049a069>
78. Taylor L.T. // J. Supercrit. Fluids. 2009. V. 47. № 3. P. 566–573.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.09.012>
79. Hartmann A., Ganzera M. // Planta Med. 2015. V. 81. № 17. P. 1570–1581.
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1545911>
80. Bernal J.L., Martín M.T., Toribio L. // J. Chromatogr. A. 2013. V. 1313. P. 24–36.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.022>
81. Hirata Y., Sogabe I. // Anal. Bioanal. Chem. 2004. V. 378. № 8. P. 1999–2003.
<https://doi.org/10.1007/s00216-003-2487-8>
82. Svan A., Hedeland M., Arvidsson T., Pettersson C.E. // Anal. Chim. Acta. 2018. V. 1000. P. 163–171.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.10.014>
83. François I., Sandra P. // J. Chromatogr. A. 2009. V. 1216. № 18. P. 4005–4012.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.078>
84. de Oliveira M.A.L., Solis V.E., Gioielli L.A., Polakiewicz B., Tavares M.F. // Electrophoresis. 2003. V. 24. № 10. P. 1641–1647.
<https://doi.org/10.1002/elps.200305394>

85. *de Oliveira M.A.L., Porto B., Faria I., Lopes P., Barra P., Castro R., Sato R.* // *Molecules*. 2014. V. 19. № 9. P. 14094–14113.
<https://doi.org/10.3390/molecules190914094>
86. *Haddadian F., Shamsi S.A., Warner I.M.* // *J. Chromatogr. Sci.* 1999. V. 37. № 4. P. 103–107.
<https://doi.org/10.1093/chromsci/37.4.103>
87. *Gao F., Dong J., Li W., Wang T., Liao J., Liao Y., Liu H.* // *J. Chromatogr. A*. 2006. V. 1130. № 2. P. 259–264.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.070>
88. *Gabriel H., Amelia T.V., Cristina F., Aura R.* // *Acta Marisensis – Seria Medica*. 2015. V. 61. № 4.
<https://doi.org/10.1515/amma-2015-0103>
89. *Porto B.L.S., de Souza M.V.N., de Oliveira M.A.L.* // *Anal. Sci.* 2011. V. 27. № 5. P. 541–541.
<https://doi.org/10.2116/analsci.27.541>
90. *Correia B.S.B., Torrinas R.S., Ohashi W.Y., Tasic L.* // *Advances in Lipid Metabolism*. Chapter 2. /Ed. R.V. Baez. IntechOpen, 2018.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.81523>
91. *Chi Y., Gupta R.K.* // *Am. J. Hypertens.* 1998. V. 11. № 3. P. 340–348.
[https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(97\)00456-1](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(97)00456-1)
92. *Emwas A.H., Roy R., McKay R.T., Tenori L., Saccenti E., Gowda G.A.N. et al.* // *Metabolites*. 2019. V. 9. № 7. P. 123.
<https://doi.org/10.3390/metabo9070123>

Methodological Aspects of Analysis of Fatty Acids in Biological Samples

V. A. Zotov^{a, *}, V. V. Bessonov^a, and D. V. Risnik^a

^a *Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, 109240 Russia*

**e-mail: arkont-87@yandex.ru*

The review considers principal methods for determination of fatty acids (FA) in biological objects, as well as less common but promising methods. The advantages, disadvantages and prospects of these methods are described and compared. Special attention is paid to the specificities of the preparation of biological samples, such as the extraction of lipids and derivatization process of fatty acids. The methodological aspects of the determination of fatty acids by gas chromatography (GC) and high-performance liquid chromatography (HPLC), the features of the use of various types of stationary phases used for chromatographic separation of FA are considered. The possibilities of using capillary electrophoresis (CE) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) for the analysis of fatty acids are analyzed. Special requirements and limitations of these methods concerning to work with biomaterials are also considered.

Keywords: lipids, polyunsaturated fatty acids, gas chromatography, liquid chromatography, capillary electrophoresis, supercritical fluid chromatography, NMR spectroscopy