

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЭТЕРИФИЦИРОВАННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ: РАЗЛИЧНЫЕ СПОСОБЫ ПРОБОПОДГОТОВКИ

Н.С. Морозова, аспирант, В.А. Акмурзина, аспирант,

А.В. Матвеев, аспирант, А.Ю. Миленцев, аспирант,

Д.И. Прохоров, научный сотрудник, *А.О. Ружицкий, научный сотрудник,

Г.М. Сорокоумова, доцент, А.А. Селищева, ведущий научный сотрудник,

В.И. Швец, заведующий кафедрой

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

* Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

e-mail: morozova_natalia@mail.ru

В

данной работе представлены подходы к пробоподготовке для определения незэтерифицированных жирных кислот в составе суммарного липидного экстракта плазмы крови человека методом газовой хроматографии.

Approaches to sample preparation for estimation of free fatty acids composition by gas chromatography are presented. These fatty acids are included in the total lipid extract of human plasma.

Ключевые слова: незэтерифицированные жирные кислоты, твердофазная экстракция, этерификация, переэтерификация, определение жирнокислотного состава, *N,N*-карбонилдиимидазол.

Key words: free fatty acids, solid-phase extraction, esterification, transesterification, evaluation of fatty acid composition, *N,N*-carbonyldiimidazole.

Введение

Интерес к количественному определению незэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в биологических жидкостях и тканях обусловлен, прежде всего, их участием в жизненном цикле клеток в норме, а также патогенным воздействием на клетки их повышенных концентраций. С одной стороны, НЭЖК являются источником питания клеток наряду с глюкозой, с другой стороны, они способны связываться со специфическими рецепторами на поверхности клеток эукариот и влиять на метаболизм клеток. Например, при связывании с Toll-подобными рецепторами возможно развитие воспалительной реакции [1]. В цитозоле клеток эукариот и прокариот НЭЖК либо находятся в комплексе со специфическими белками, связывающими жирные кислоты (ЖК), либо в виде ацил-КоА участвуют в метаболизме других типов липидов [2].

Для количественного определения НЭЖК в плазме крови ранее применяли колориметрический метод, основанный на образовании комплекса ЖК с ионами кобальта и меди [3, 4], ферментативный метод [5] и метод газовой хроматографии (ГХ), который позволяет определить не только содержание НЭЖК, но и их состав [6]. ЖК анализируют методом ГХ, как правило, в виде метиловых эфиров, для чего предварительно необходимо провести реакцию этерификации ЖК различными способами [7]. Сложность определения НЭЖК в экстрактах биологических образцов (например, в плазме крови) заключается в том, что присутствующие

в составе липиды (нейтральные липиды, гликолипиды, фосфолипиды) могут подвергаться реакции переэтерификации в условиях проведения основной реакции этерификации НЭЖК с образованием метиловых эфиров, увеличивая тем самым содержание анализируемых метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК). Существует два пути решения этой проблемы. Один из них заключается в отделении НЭЖК с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) или твердофазной экстракции (ТФЭ). Эффективность метода ТФЭ была доказана на смеси стандартов липидов разных классов и НЭЖК [8], а затем метод был применен для плазмы крови [9]. Другой путь – это подбор таких условий метилирования НЭЖК в составе суммарного липидного экстракта (СЛЭ) плазмы крови, когда не происходит переэтерификации липидов, входящих в его состав, например, моноацилглицеринов (МАГ), диацилглицеринов (ДАГ), триацилглицеринов (ТАГ), фосфолипидов (ФЛ) и пр. Для этого используют мягкие условия проведения реакции (низкую температуру, небольшое время проведения реакции, отсутствие кислых или основных катализаторов) и специальные метилирующие агенты (диазометан или *N,N*-карбонилдиимидазол) [10, 11].

Целью данной работы был поиск методов пробоподготовки, позволяющих количественно и качественно определять НЭЖК в составе суммарного липидного экстракта (СЛЭ) плазмы крови человека методом ГХ и/или ГЖХ-МС, и подбор условий для проведения селективной реакции этерификации НЭЖК в СЛЭ плазмы.

Результаты и их обсуждение

Подбор условий реакции этерификации НЭЖК. На первом этапе работы мы подбирали условия реакции этерификации НЭЖК на разных модельных системах с оценкой ее селективности. Исходя из анализа литературных данных [12] и на основании данных ТСХ СЛЭ плазмы крови были предложены следующие модельные смеси веществ.

Первая смесь веществ состояла из различных липидов (1-пальмитоил-2-линолеилфосфатидилхолин (16:0/18:2), эфир холестерина (18:0) и триолеилглицерин (18:1)) и НЭЖК (лауриновая кислота (12:0), арахионовая

кислота (20:4)), присутствующих в плазме крови. После проведения этерификации в условиях кислого катализа с серной кислотой анализировали МЭЖК методом ГХ. На полученной хроматограмме, приведенной на рис. 1, присутствовали пики не только МЭЖК (12:0) и (20:4), но и МЭЖК (16:0) и (18:2), что указывает на протекание побочной реакции переэтерификации ЖК в составе фосфатидилхолина. Кроме того, в образце присутствовали МЭЖК (18:0) и (18:1), образовавшиеся в результате реакции переэтерификации соответствующих эфиров холестерина и триацилглицерина.

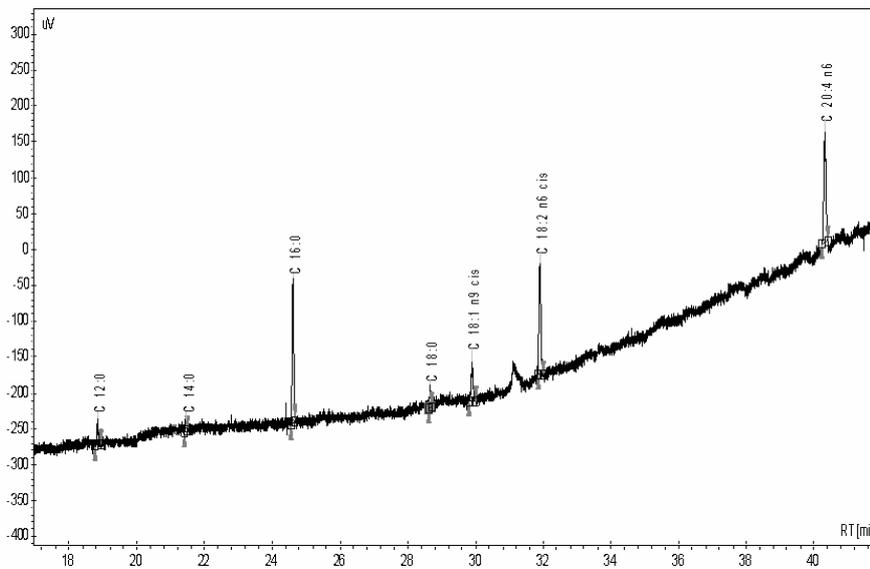


Рис. 1. Хроматограмма (метод ГХ) МЭЖК, полученных в результате реакции этерификации в условиях кислого катализа в присутствии серной кислоты смеси веществ: лауриновая (12:0) и арахионовая (20:4) кислоты, 1-пальмитоил-2-линолеилфосфатидилхолин (16:0/18:2), эфир холестерина (18:0) и триолеилглицерин (18:1).

Из литературных данных известно, что при проведении этерификации в условиях кислого катализа в безводной среде с использованием абсолютных растворителей реакция образования эфиров НЭЖК должна проходить без протекания побочной реакции переэтерификации [7]. С целью создания таких условий нами использовался метанольный раствор хлороводорода или генерация хлороводорода *in situ*, образующегося при взаимодействии ацетилхлорида с избытком метанола. При проведении реакции в описанных условиях на второй модельной смеси веществ, состоящей из миристиновой кислоты (14:0) и трипальмитоилглицерина (16:0), было показано, что помимо основной реакции с образованием МЭЖК также происходила переэтерификация трипальмитоилглицерина. При обоих температурных режимах (25 и 80°C) проведения этерификации среди продуктов реакции был обнаружен метиловый эфир пальмитиновой кислоты, кроме того, при комнатной температуре степень конверсии миристиновой кислоты была неполной (данные не приведены).

Таким образом, условия кислого катализа делают невозможным ни качественное, ни количественное определение НЭЖК в модельных смесях веществ, когда в состав пробы помимо НЭЖК входят и липиды. Поэтому на следующем этапе работы: 1) предварительно выделяли НЭЖК из СЛЭ плазмы крови с последующим проведением этерификации в кислых условиях; 2) подбирали условия для проведения селективной реакции этерификации НЭЖК в СЛЭ плазмы крови без предварительного выделения НЭЖК.

Выделение НЭЖК из липидного экстракта плазмы крови методом ТФЭ. К плазме крови добавляли метанол и муравьиную кислоту, затем проводили экстракцию хлороформом и смесью хлороформ–метанол. НЭЖК выделили из СЛЭ с помощью метода ТФЭ с использованием колонки с аминопропилсиликагелем. Анализ полученных фракций методом ТСХ в системах гексан–диэтиловый эфир–уксусная кислота (55:45:1) и хлороформ–метанол–вода (65:25:4) показал, что в первой фракции

содержатся нейтральные липиды, а именно, ди- и триацилглицерины, эфиры холестерина и холестерин, во второй фракции – НЭЖК и в третьей – фосфолипиды (рис. 2).

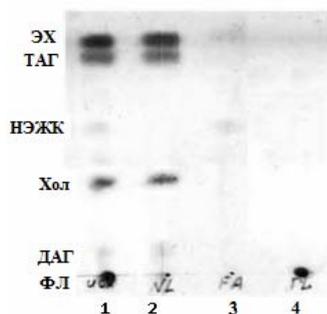


Рис. 2. ТСХ липидов в системе гексан–диэтиловый эфир–уксусная кислота (55:45:1). Проявление 10% H₂SO₄ в метаноле. Данные о составе проб 1–4 приведены далее в тексте.

Состав проб (рис. 2): 1 – смесь стандартных веществ; 2 – фракция 1 (ди- и триацил-

глицерины (ДАГ *R_f* 0.10) и ТАГ *R_f* 0.84); эфиры холестерина (ЭХ *R_f* 0.90) и холестерин (Хол *R_f* 0.36)); 3 – фракция НЭЖК (*R_f* 0.58); 4 – фракция фосфолипидов (*R_f* 0.00).

Количественный анализ МЭЖК методом ГХ. Количественное определение МЭЖК (полученных при этерификации НЭЖК, выделенных из плазмы крови методом ТФЭ) проводили методом ГХ с использованием калибровочных кривых стандарта Supelco 37 FAME Mix (рис. 3), концентрация каждого метилового эфира ЖК находится в диапазоне от 2 до 40 мкг/мл.

В таблице перечислены идентифицированные ЖК, среди которых преобладающими кислотами являются 16:0, 18:1, 18:0 и 18:2 (пальмитиновая, линолевая, олеиновая, стеариновая), что согласуется с литературными данными [13–15]. По введенному внутреннему стандарту (лауриновая кислота (12:0)) были рассчитаны потери на всех этапах, которые составили не более 15%.

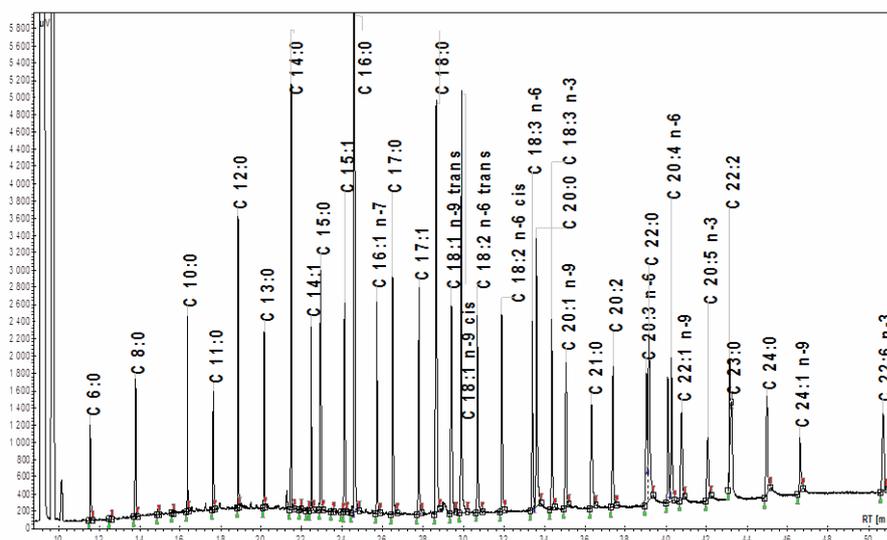


Рис. 3. Хромотограмма (метод ГХ) стандартов метиловых эфиров ЖК Supelco 37 FAME Mix.

Содержание НЭЖК в плазме крови доноров*			
НЭЖК	Содержание, мкмоль/л	НЭЖК	Содержание, мкмоль/л
Насыщенные	255.28 ± 56.19	Полиненасыщенные	57.11 ± 18.69
14:0	22.72 ± 9.39	18:2 n-6 t	2.54 ± 1.25
16:0	134.04 ± 29.20	18:2 n-6 c	31.89 ± 17.37
18:0	93.95 ± 18.04	18:3 n-3 c	1.31 ± 0.39
20:0	1.83 ± 0.38	20:2 n-6 c	1.06 ± 0.43
22:0	1.26 ± 0.24	20:3 n-6 c	2.36 ± 0.5 5
24:0	1.48 ± 0.5 4	20:3 n-3 c	3.02 ± 1.39
Мононенасыщенные	85.75 ± 33.13	20:4 n-6 c	2.95 ± 0.91
16:1 n-7 c	8.30 ± 2.85	20:5 n-6 c	1.95 ± 0.16
16:1 n-9 c	5.88 ± 4.08	22:2 n-6 c	2.76 ± 1.04
16:1 n-11 c	3.01 ± 0.62	22:4 n-6 c	1.47 ± 0.5 2
18:1 n-9 t	6.20 ± 3.56	22:5 n-6 c	3.89 ± 1.37
18:1 n-9 c	55.03 ± 27.99	22:6 n-3 c	1.90 ± 0.79
18:1 n-11 c	2.79 ± 2.19		
20:1	2.72 ± 2.15		
22:1	1.81 ± 0.38	Сумма НЭЖК	397.84 ± 84.23

* Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы «Statistica 8»

Использование в данной работе калибровок для МЭЖК с разным числом атомов углерода позволило корректно рассчитать общее содержание НЭЖК в плазме как сумму отдельных кислот, которое равнялось 0.4 ммоль/л, а нормальный диапазон содержания НЭЖК в плазме крови доноров находится в области 0.3–0.5 ммоль/л. Полученные значения хорошо согласуются с описанными в литературе результатами тех исследований, в которых проводили выделение фракции НЭЖК из суммарного экстракта [6], а также при использовании колориметрического и энзиматического методов.

Подбор условий этерификации карбоновых кислот в условиях нейтрального катализа с

использованием *N,N*-карбонилдимидазола. Выше нами было показано, что при проведении этерификации НЭЖК в составе модельных смесей в условиях кислого катализа, помимо основной реакции, проходит побочная реакция переэтерификации липидов. Поэтому нами был проведен анализ литературных данных с целью выявления способов этерификации карбоновых кислот в нейтральных условиях [7, 10, 11]. Поскольку использование диазометана сопряжено с определенными трудностями работы с данным веществом и сложностью аппаратного оформления, нами было принято решение использовать *N,N*-карбонилдимидазол (CDI) (рис. 4).

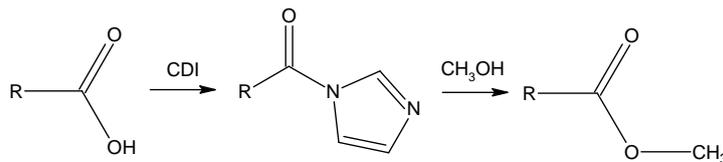


Рис. 4. Схема этерификации карбоновых кислот в условиях нейтрального катализа в присутствии *N,N*-карбонилдимидазола (CDI) [11].

Известно, что плазма крови человека содержит несколько типов липидов, таких как моно-, ди- и триацилглицерины, НЭЖК [16], холестерин и его эфиры, фосфолипиды [17], поэтому подбор условий этерификации НЭЖК проводили на модельной смеси веществ, близкой по составу плазме крови человека. В качестве НЭЖК была взята миристиновая кислота (14:0), также в смесь вошли дипальмитоилфосфатидилхолин (16:0), монолауроилглицерин (12:0), 1-стеароил-2-арахиноилглицерин (18:0/20:4),

1,3-диолеоилглицерин (18:1), триарахиноилглицерин (20:0). Реакцию этерификации карбоновых кислот проводили в нейтральных условиях с использованием CDI по варианту 1 (см. Экспериментальную часть). Анализ продуктов реакции осуществляли методом ГЖХ-МС (рис. 5).

Результаты эксперимента на модельной смеси показали, что все классы липидов, включенные в модельную смесь, подвергаются переэтерификации.

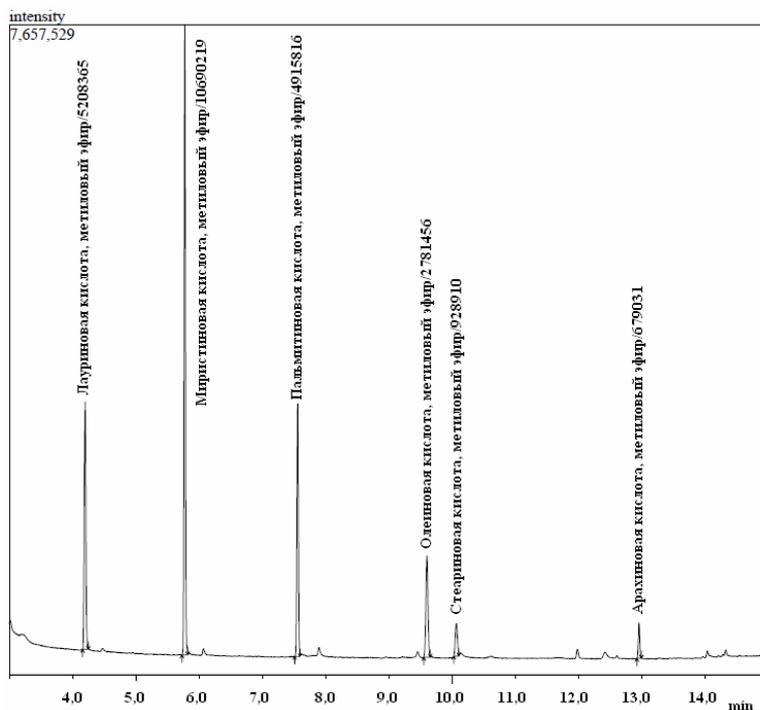


Рис. 5. Хроматограмма (метод ГЖХ-МС) продуктов реакции этерификации в нейтральных условиях с использованием CDI (вариант 1) смеси стандартных веществ: миристиновая кислота (14:0), дипальмитоилфосфатидилхолин (16:0), монолауроилглицерин (12:0), 1-стеароил-2-арахиноилглицерин (18:0/20:4), 1,3-диолеоилглицерин (18:1), триарахиноилглицерин (20:0) с образованием продуктов переэтерификации.

Исходя из литературных данных, свободные гидроксильные группы могут вступать в реакцию с имидзолидами кислот [18], поэтому мы использовали имидзолид

уксусной кислоты для защиты свободных гидроксильных групп липидов (рис. 6), после чего проводили этерификацию с помощью CDI (вариант 2).

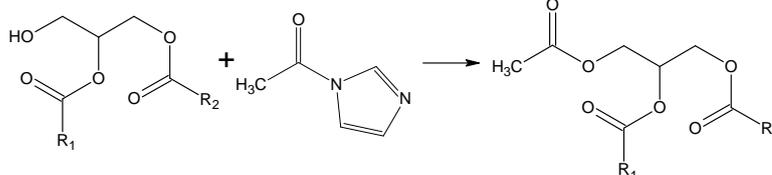


Рис. 6. Схема взаимодействия имидзолида уксусной кислоты с диацилглицерином.

После обработки реакционной смеси, с помощью ГХ было установлено отсутствие продуктов переэтерификации жирнокислотных остатков липидов, входящих в данную смесь (рис. 7).

Вместе с этим использование калибровочных растворов миристиновой кислоты при анализе образцов методом ГХ позволило рассчитать конверсию миристиновой кислоты, которая составила 96±4%.

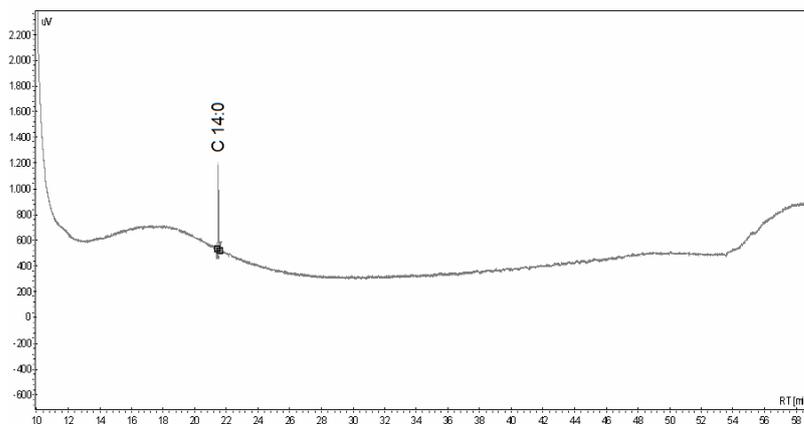


Рис. 7. Хроматограмма (метод ГХ) МЭЖК, полученных в результате реакции этерификации в условиях нейтрального катализа с использованием CDI (вариант 2) смеси стандартных веществ: миристиновая кислота (14:0), дипальмитоилфосфатидилхолин (16:0), монолауроилглицерин (12:0), 1-стеароил-2-арахидоилглицерин (18:0/20:4), 1,3-диолеилглицерин (18:1), триарахидоилглицерин (20:0).

Из полученных результатов видно, что этерификация в нейтральных условиях с использованием CDI с предварительной обработкой образцов имидзолидом уксусной кислоты позволяет проводить селективную реакцию этерификации НЭЖК, при этом не происходит переэтерификации жирнокислотных остатков, входящих в состав фосфо- и нейтральных липидов.

Следующим этапом работы было сравнение двух методов пробоподготовки для определения НЭЖК в составе СЛЭ плазмы крови: с предварительным выделением НЭЖК с помощью метода ТФЭ и последующей этерификацией в кислых условиях (рис. 8А) и без предварительного разделения СЛЭ, с этерификацией в нейтральных условиях с использованием CDI по варианту 2 (рис. 8Б).

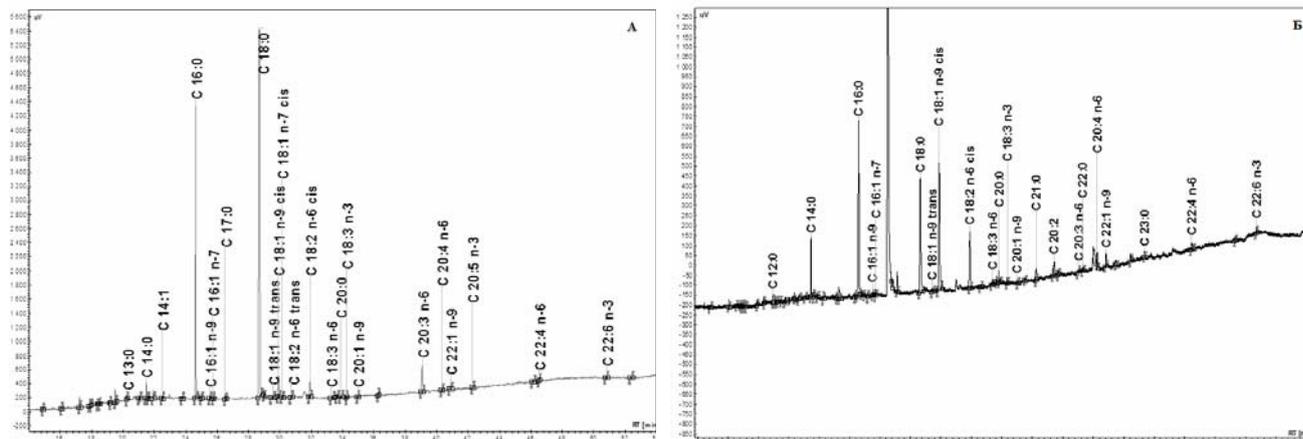


Рис. 8. Хроматограмма (метод ГХ) МЭЖК, полученных в результате этерификации НЭЖК из СЛЭ плазмы крови: А – с предварительным выделением НЭЖК методом ТФЭ, этерификация в кислых условиях; Б – без предварительного выделения НЭЖК, этерификация в условиях нейтрального катализа с использованием CDI (вариант 2) (в образец Б был введен внутренний стандарт – гептадекановая кислота (17:0)).

Сравнение двух подходов к пробоподготовке показало, что оба метода дают одинаковые результаты по качественному составу НЭЖК в плазме крови.

Экспериментальная часть

Реагенты. В работе использовали следующие органические вещества и растворители: изопропанол, метанол, хлороформ, гексан производства «Merck» (Германия); диэтиловый эфир, бензол, тетрагидрофуран, серная, уксусная и муравьиная кислоты отечественного производства; трифторуксусный ангидрид и 0.5 н. раствор хлороводорода в метаноле производства «Supelco» (США), ацетилхлорид производства «Fluka» (Швейцария); *N,N*-карбонилдимидазол производства «Sigma» (США).

Абсолютирование метанола и тетрагидрофурана проводили по стандартным методикам.

Для метода ТСХ использовали пластины с нанесенным на них силикагелем TLC Silica gel 60 F₂₅₄ производства фирмы «Merck» (Германия).

В качестве стандартных веществ использовали синтетический препарат 95% чистоты производства «Acros Organics» (Бельгия): миристиновая кислота (14:0); препараты 99% чистоты производства «Fluka» (Швейцария): лауриновая (12:0) и арахидоновая (20:4) кислоты; дипальмитоилфосфатидилхолин (16:0) и 1-пальмитоил-2-линолеилфосфатидилхолин (16:0/18:2); монолауроилглицерин (12:0); 1-стеароил-2-арахиноилглицерин (18:0/20:4); 1,3-диолеилглицерин (18:1); трипальмитоилглицерин (16:0); триолеилглицерин (18:1); триарахиноилглицерин (20:0); эфир холестерина (18:0); метиловый эфир миристиновой кислоты отечественного производства; смесь стандартов «Supelco 37 component FAME Mix», содержащую 37 метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) производства «Supelco» (США).

Деионизованную воду с сопротивлением >18 МОм получали на установке УВОИ-МФ-7 производства «Медиана-Фильтр» (Россия).

Объект исследования. В качестве объекта исследования использовали плазму крови здоровых доноров.

Проведение газовой хроматографии (ГХ).

Качественный и количественный анализ МЭЖК проводили на хроматографе Varian 3900 (США), оборудованным капиллярной колонкой с покрытием для разделения МЭЖК (CP-selectCBforFAME, 100 м × 0.25 мм, Chrompack, США), позволяющим разделять различные изомеры жирных кислот. Объем вводимого образца 2 мкл. Применяли режим деления потока 1:25. Использовали следующую температурную программу: от 100 до 180°C со скоростью 10°C/мин, затем 180°C в течение 10 мин, далее от 180 до 220°C со скоростью 8°C/мин, затем 220°C в течение 10 мин, далее от 220 до 240°C со скоростью 8°C/мин и 240°C в течение 10 мин. В качестве газа-носителя использовали гелий с постоянной скоростью

потока 1 мл/мин. Температуры инжектора и пламенно-ионизационного детектора составляли 170 и 245°C соответственно. Времена выхода и концентрации индивидуальных МЭЖК были определены с применением стандарта Supelco 37 component FAME Mix.

Проведение газовой-жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии (ГЖХ-МС). Качественный и количественный анализ МЭЖК проводили на хроматографе Agilent 6850 Series II Network GC System (США) с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5975B inert XL MSD в режиме градиента температуры от 120 до 260°C. Температурные параметры хроматографа: термостат – 140°C; инжектор – 200°C; интерфейс – 210°C; детектор – 200°C. Для хроматографирования применяли капиллярную колонку HP-1 фирмы Agilent Technologies (США) с неполярной привитой неподвижной фазой (100% диметилполисилоксан), диаметр – 0.32 мм, длина – 30 м, толщина привитой фазы – 0.25 мкм. Начальная температура термостата 120°C (продолжительность термостатирования 3 мин), затем она увеличивалась с градиентом 20°C в минуту до 260°C (4–10 минута) и удерживалась при данной температуре в течение 3 минут. Общее время хроматографирования составляло, таким образом, 13 мин. Скорость потока газа-носителя (гелий) составляла 1.0 мл/мин, объем вносимой в инжектор пробы 1 мкл. Ввод пробы осуществлялся без деления потока (Splitless). Температура на инжекторе – 280°C, температура источника ионизации – 230°C, температура трансферлайна – 280°C, температура квадруполя – 150°C. Масс-спектрометр работал в режиме ионизации типа «электронный удар» (EI) с энергией ионизирующих электронов 70 эВ, в режиме мониторинга по полному ионному току (Fullscan).

Этерификация карбоновых кислот в условиях кислого катализа с использованием серной кислоты. Смесь веществ: лауриновая кислота (12:0) (100 мкг, 0.5 ммоль), арахидоновая кислота (20:4) (100 мкг, 0.33 ммоль), 1-пальмитоил-2-линолеилфосфатидилхолин (16:0/18:2) (100 мкг, 0.14 ммоль), эфир холестерина (18:0) (100 мкг, 0.15 ммоль) и триолеилглицерин (100 мкг, 0.11 ммоль) обрабатывали 15% раствором конц. серной кислоты в абс. метаноле в течение 1 ч при температуре 62°C. Анализ продуктов реакции этерификации проводили методом ГХ.

Этерификация карбоновых кислот в условиях кислого катализа с использованием метанольного раствора хлороводорода. К раствору миристиновой кислоты (14:0) (50 мг, 0.22 ммоль) и трипальмитоилглицерина (16:0) (14 мг, 0.017 ммоль) в 0.5 мл абс. бензола прибавляли 200 мкл трифторуксусного ангидрида и 200 мкл 0.5 н. раствора HCl в метаноле.

Реакцию проводили как при комнатной температуре, так и при 80°C в течение 1 ч. Растворители удаляли под вакуумом на роторном испарителе. Образцы анализировали методами ТСХ и ГЖХ-МС, для чего их растворяли для первого метода в 1 мл хлороформа, для второго – в 1 мл бензола. Объем анализируемой пробы 2 мкл. ТСХ проводили в системе хлороформ, проявляли в парах йода (жирные кислоты (миристиновая и пальмитиновая) – R_f 0.17; трипальмитоилглицерин – R_f 0.42; МЭЖК (миристиновой и пальмитиновой) – R_f 0.73), в качестве стандартов были использованы исходные реагенты и метиловый эфир миристиновой кислоты.

Этерификация карбоновых кислот в условиях кислого катализа с генерацией хлороводорода *in situ*. К раствору миристиновой кислоты (14:0) (50 мг, 0.22 ммоль) и трипальмитоилглицерина (16:0) (14 мг, 0.017 ммоль) в 0.5 мл абс. метанола прибавляли 20 мкл (0.282 ммоль) ацетилхлорида. Реакцию проводили как при комнатной температуре, так и при 80°C в течение 1 ч. Растворители удалили под вакуумом на роторном испарителе. Образцы анализировали с помощью ТСХ и ГЖХ-МС, как описано в предыдущей методике.

Получение суммарного липидного экстракта (СЛЭ) плазмы крови. Для количественной оценки потерь на стадиях пробоподготовки в образцы плазмы крови вводили внутренний стандарт – лауриновую кислоту (12:0) (из расчета 12 мкг лауриновой кислоты (0.06 ммоль) на 100 мкл плазмы крови). Далее к 100 мкл плазмы добавляли 2 мл метанола и 1 мл 0.05 % водного раствора муравьиной кислоты, интенсивно перемешивали 1 мин с последующей обработкой в ультразвуковой ванне («Bandelin», Sonogex, Германия) в течение 5 мин. Затем добавляли 4 мл хлороформа и продолжали перемешивание в течение 5 мин. Смесь центрифугировали 10 мин при комнатной температуре и 500 g, супернатант отбирали, к остатку добавляли 6 мл смеси хлороформ-метанол (2:1) и 1 мл деионизированной воды, перемешивали в течение 5 мин, обрабатывали ультразвуком 5 мин, центрифугировали в тех же условиях. Второй супернатант отбирали и объединяли с предыдущим. К объединенному экстракту добавляли 0.5 объема 1% NaCl, перемешивали 10 мин, центрифугировали. Нижний хлороформный слой отбирали и удаляли растворитель под вакуумом на роторном испарителе («Heidolph», Германия) при 35°C. Из 100 мкл плазмы получили 0.55±0.08 мг СЛЭ.

Проведение твердофазной экстракции (ТФЭ). Для разделения полученного СЛЭ плазмы использовали картридж BondElut 1CCLRC-NH2 («VarianInc», США), содержащий 500 мг аминопропилсиликагеля. СЛЭ после экстракции пробы плазмы крови растворяли в 60 мкл

хлороформа. Колонку промывали 4 мл хлороформа и наносили 50 мкл СЛЭ. Элюцию проводили последовательно 5 мл смеси хлороформ-изопропанол (2:1), 5 мл смеси диэтиловый эфир-уксусная кислота (98:2) и 5 мл метанола [8]. Полученные фракции после удаления растворителей на роторном испарителе анализировали методом ТСХ в системах гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота (55:45:1) и хлороформ-метанол-вода (65:25:4). Проявление проводили раствором 10% H₂SO₄ в метаноле. В качестве стандартов были использованы жирные кислоты и различные липиды.

Получение метиловых эфиров НЭЖК (МЭЖК) плазмы крови. Фракцию НЭЖК плазмы, полученную после ТФЭ, обрабатывали 15% раствором конц. серной кислоты в метаноле в течение 60 мин при температуре 62°C. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и нейтрализовали 3 мл 6 мМ водного раствора K₂CO₃. Полученные МЭЖК экстрагировали 2 мл гексана. Органическую фазу отбирали, упаривали и растворяли в 200 мкл гексана перед анализом. Анализ проводили методом ГХ с использованием стандартов Supelco 37 component FAME Mix.

Этерификация карбоновых кислот в нейтральных условиях катализа с использованием *N,N*-карбонилдиимидазола (CDI).
Вариант 1. К раствору смеси: монолауроилглицерин (12:0) (2.7 мг, 0.010 ммоль), 1-стеароил-2-арахидоноилглицерин (18:0/20:4) (5 мг, 0.008 ммоль), 1,3-диолеилглицерин (18:1) (2.4 мг, 0.004 ммоль), триарахиноилглицерин (20:0) (2.7 мг, 0.003 ммоль), дипальмитоилфосфатидилхолин (16:0) (2.8 мг, 0.004 ммоль), миристиновая кислота (14:0) (2.8 мг, 0.012 ммоль) в 0.5 мл абс. тетрагидрофурана (ТГФ) прибавляли 1.15 экв. (по миристиновой кислоте) CDI, растворенного в 100 мкл абс. ТГФ. Реакцию проводили при комнатной температуре 25°C в течение 0.5 ч. Далее добавили 0.5 мл абс. метанола, перемешали и оставляли при комнатной температуре 25°C на 0.5 ч. Органические растворители удалили под вакуумом на роторном испарителе. Образцы анализировали методом ГЖХ-МС. Для построения калибровочной кривой использовали растворы метилового эфира миристиновой кислоты известных концентраций (21, 28, 43 мкг/мл).

Этерификация карбоновых кислот в нейтральных условиях катализа с использованием *N,N*-карбонилдиимидазола (CDI).
Вариант 2. К раствору смеси: монолауроилглицерид (12:0) (5 мг, 0.018 ммоль), 1-стеароил-2-арахидоноилглицерид (18:0/20:4) (5 мг, 0.008 ммоль), 1,3-диолеиноилглицерид (18:1) (5 мг, 0.008 ммоль), триарахиноилглицерид (20:0) (5 мг, 0.005 ммоль), дипальмитоилфосфатидилхолин (16:0) (5 мг, 0.007 ммоль), мирис-

тиновая кислота (14:0) (2 мг, 0.009 ммоль), растворенной в 0.5 мл абс. ТГФ, и отдельно к раствору 200 мкл СЛЭ плазмы крови в 0.5 мл абс. ТГФ прибавляли по 2 экв. (по миристиновой кислоте) имидазолида уксусной кислоты (полученного из 63 мкл (1.05 ммоль) ледяной уксусной кислоты и 200 мг (1 ммоль) CDI, растворенного в 5 мл абс. ТГФ за 10 мин до внесения в реакционную смесь). Реакцию проводили при комнатной температуре 25°C в течение 0.5 ч, затем прибавляли по 1.15 экв. (по миристиновой кислоте) CDI, растворенного в 100 мкл абс. ТГФ. После перемешивания оставляли при комнатной температуре 25°C на 0.5 ч. Затем добавляли по 0.5 мл абс. метанола к реакционным смесям и снова оставляли при комнатной температуре 25°C на 0.5 ч. Органические растворители удаляли под вакуумом на роторном испарителе. Контроль прохождения реакции осуществляли методом ТСХ, в системе ацетонитрил (после первой стадии), проявление проводили в парах йода в 1% растворе α -нафтола в ацетоне, и системе гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота (55:45:1) (после второй стадии), проявление проводили 60% раствором серной кислоты в метаноле. Образец, полученный в ходе реакции этерификации смеси веществ, анализировали с помощью метода ГЖХ-МС, образец СЛЭ плазмы крови – методом ГХ. Для построения калибровочной кривой использовали растворы метилового эфира миристиновой кислоты известных концентраций (21, 28, 43 мкг/мл).

Заключение

В ходе работы проанализированы различные методы этерификации НЭЖК в составе модельных смесей и подобраны условия для проведения реакции селективной этерификации. На модельных смесях было доказано, что способ этерификации карбоновых кислот в нейтральных условиях с использованием имидазолида уксусной кислоты и *N,N*-карбонилдиимидазола является селективным и количественным, а также была продемонстрирована возможность применения данного метода на биологических образцах плазмы крови. К достоинствам проведения реакции этерификации с участием CDI, с предварительной обработкой реакционных смесей имидазолидом уксусной кислоты, можно отнести возможность осуществления всей пробоподготовки, за исключением экстракции из плазмы крови, в одной колбе; доступность и относительную безопасность применяемых реагентов. Среди недостатков метода следует отметить наличие после обработки достаточно большого количества имидазола, который, однако, не затрудняет проведение анализа образцов методом ГХ и/или ГЖХ-МС.

Работа выполнена при финансовой поддержке и в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК №14.740.11.0120).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ichimura A., Hirasawa A., Hara T. Free fatty acid receptors act as nutrient sensors to regulate energy homeostasis // *Prostaglandins Lipid Mediators*. 2009. V. 10. P. 82–88.
2. Storch Ju., Thumser A. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1486. P. 28–44.
3. Villiers S., Van Der Walt J.G., Procos J. An accurate, sensitive and reproducible method for the colorimetric estimation of free fatty acids in plasma // *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1977. V. 44. P. 169–172.
4. Hron W.T., Menahan L.A. A sensitive method for the determination of free fatty acids in plasma // *J. Lipid Res.* 1981. V. 22. P. 377–381.
5. Kiziltunc A., Akcay F. An enzymatic method for the determination of free fatty acids in serum / plasma // *Clin. Chem. Lab. Med.* 1998. V. 36. P. 83–86.
6. Polette A., Durand P., Floccard B., Blachel D. A method for specific analysis of free fatty acids in biological samples by capillary gas chromatography // *Analyt. Biochem.* 1992. V. 206. P. 241–245.
7. Christie W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis // *Adv. Lipid Methodol.* 1993. V. 2. P. 69–111.
8. Kaluzny M.A., Duncan L.A., Merritt M.V., Epps D.E. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns // *J. Lipid Res.* 1985. V. 26. P. 135–140.
9. Burdge G.C., Wright P., Jones A.E., Wootton S.A. A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid-phase extraction // *British J. Nutrition*. 2000. V. 84. P. 781–787.
10. Pace-Asciak C.R. One-step rapid extractive methylation of plasma nonesterified fatty acids for gas chromatographic analysis // *J. Lipid Res.* 1989. V. 30. P. 451–454.
11. Ko H., Royer M.E. A gas-liquid chromatographic assay for plasma free fatty acids // *J. Chromatogr.* 1974. V. 88. P. 253–263.
12. Curry S., Brick P., Franks N.P. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999. V. 1441. P. 131–140.

13. Melchert H.-U., Limsathayourat N., Mihajlovi H., Eichberg J., Thefeld W., Rottka H. Fatty acid patterns in triglycerides, diglycerides, free fatty acids, cholesteryl esters and phosphatidylcholine in serum from vegetarians and non-vegetarians // *Atherosclerosis*. 1987. V. 65. P. 159–166.
14. Decsi T., Szabó E., Kozári A., Erhardt E., Marosvölgyi T., Soltész G. Polyunsaturated fatty acids in plasma lipids of diabetic children during and after diabetic ketoacidosis // *Acta Paediatr.* 2005. V. 94. P. 850–855.
15. Hodson L, Skeaff C.M., Fielding B.A. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans // *Progr. Lipid Res.* 2008. V. 47. P. 348–380.
16. Fielding B.A., Humphreys S.M., Allman R.F.C., Frayn K.N. Mono-, di- and triacylglycerol concentrations in human plasma: Effects of heparin injection and of a high-fat meal // *Clin. Chim. Acta* . 1993. V. 216. P. 167–173.
17. Lalanne F., Prineta V., Bernard S., Ponsin G. Distribution of diacylglycerols among plasma lipoproteins in control subjects and in patients with non-insulin-dependent diabetes // *Eur. J. Clin. Invest.* 1999. V. 29. P. 139–144.
18. Paul R., Anderson G.W. N,N'-Carbonyldiimidazole, a new peptide forming reagent // *J. Amer. Chem. Soc.* 1960. V. 82. № 17. P. 4596–4600.