

ОТ АНАЛИЗА ЛИПИДОВ К ЛИПИДОМИКЕ**В.А. Акмурзина, аспирант, А.А. Селищева, ведущий научный сотрудник,****В.И. Швец, заведующий кафедрой, *научный консультант**

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

*ООО «Технология лекарств», г. Химки Московской области

e-mail: akmurzina31@mail.ru

Данный обзор содержит информацию о существующих методах анализа липидов. Описаны методы извлечения, разделения и количественного анализа липидов, которые включают в себя как широко известные методики, так и современные достижения аналитической химии в липидном анализе.

This review provides information on the existing methods of lipid analysis. We describe the methods of extraction, separation and quantitative analysis of lipids, which include both well-known techniques and recent advances in analytical chemistry of lipid analysis.

Ключевые слова: липидомика, экстракция, хроматография, масс-спектрометрия, электрофорез, спектроскопия.

Key words: lipidomics, extraction, chromatography, mass spectrometry, electrophoresis, spectroscopy.

1. Введение

Липидомика – новое и интенсивно развивающееся направление науки, осуществляющее всеобъемлющий анализ липидных метаболитов биологических объектов. Обращая внимание на основные преимущества липидомики (и метаболомики вообще) перед другими «омными» технологиями, можно указать на ее особую роль для медицины. В составе метаболитов наиболее быстро и выражено отображаются все изменения, происходящие в организме, инициируемые как внутренними, так и внешними факторами. Данное обстоятельство делает метаболомику высоко эффективным средством диагностики заболеваний, мониторинга результатов лечения больного и токсических воздействий на организм. Сложности метаболомных исследований происходят от имеющегося разнообразия метаболитов, относящихся к разным классам химических веществ и, соответственно, имеющих различные физико-химические свойства. Однако исследователи уже сегодня имеют возможность выбрать из арсенала метаболомных технологий именно ту, которая наиболее полно подходит для достижения поставленных целей.

Метаболическое профилирование больше подойдет для тех специалистов, которые ориентируются на детальное изучение отдельных групп метаболитов с возможностью их идентификации, либо заняты поиском биомаркеров заболеваний.

Данная работа представляет собой обзор последних событий в быстро меняющемся мире липидного анализа, в котором будут рассмотрены как наиболее часто используемые системы извлечения липидов из разных образцов, так и аналитические методы, применяющиеся для разделения, идентификации и количественного анализа липидов. Наряду с традиционными методами тонкослойной, газовой, жидкостной хроматографии и электрофоретическими мето-

дами, будут описаны и самые последние применения методов масс-спектрометрии, ядерного магнитного резонанса и колебательной спектроскопии.

2. Классификация липидов

На сегодняшний день не существует удовлетворительного общепринятого определения липидов, хотя большинство химиков и биохимиков, которые работают с этими природными объектами, интуитивно понимают этот термин. Большинство учебников описывают липиды как группу соединений, хорошо растворимых в неполярных органических растворителях. Тем не менее, определение такого рода вводит в заблуждение, поскольку многие из веществ, которые в настоящее время широко рассматриваются как липиды, могут быть почти так же хорошо растворимы в воде, как и в органических растворителях. По мнению авторов [1], это определение ограничивает использование термина «липиды» по отношению к жирным кислотам и их производным, а также к веществам, биосинтетически или функционально подобным этим соединениям. Fahy с соавт. [2], в целях достижения всеобъемлющей системы классификации липидов определили липиды как небольшие гидрофобные или амфифильные молекулы, которые могут полностью или частично образовываться путем карбанионной конденсации тиоэфиров (жирные кислоты, поликетиды и т. д.) и/или карбкатионной конденсации единиц изопрена (пренол (2-метилбутен-2-ол-4), стеринны и др.).

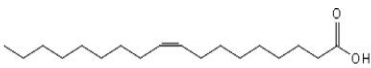
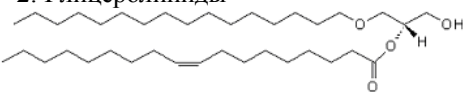
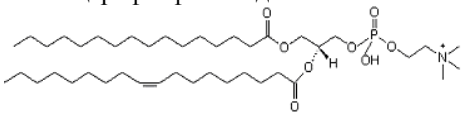
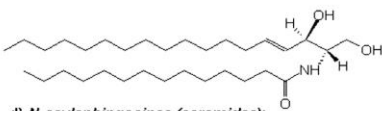
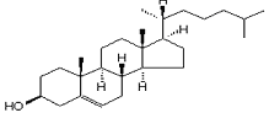
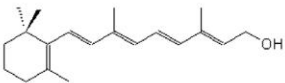
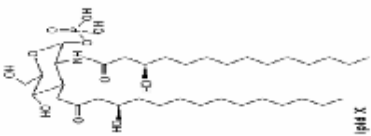
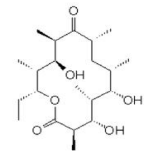
Липиды делятся на два больших класса. Простые липиды определяются как липиды, при гидролизе которых образуются не более двух типов основных продуктов в расчете на моль. Сложные липиды образуют три или более первичных продуктов гидролиза на моль. Сложные липиды подразделяются на глицерофосфоли-

пиды (или фосфолипиды), которые содержат полярную часть (остаток фосфорной кислоты) и глицериновый остов, и гликолипиды (гликоглицеролипиды или гликофинголипиды), которые содержат полярные углеводные части. Картина

еще более усложняется существованием фосфогликолипидов и сфингофосфолипидов.

В табл. 1 представлены различные классы липидов [2] и некоторые виды, принадлежащие к каждому классу.

Таблица 1. Классификация липидов

Класс липидов	Сокращение	Виды липидов
1. Вещества ацильной природы  9z-Октадеценовая кислота (олеиновая кислота)	Ац	Жирные кислоты Октадеcanoиды Эйкозаноиды Докозаноиды Жирные спирты Жирные альдегиды Жирные эфиры
2. Глицеролипиды  1-Гексадеcanoил-2-(9z-октадеценоил)- <i>sn</i> -глицерин	ГЛ	Моноацилглицерины Диацилглицерины Триацилглицерины
3. Глицерофосфолипиды  1-Гексадеcanoил-2-(9z-октадеценоил)- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин	ГФЛ	Фосфатидные кислоты Фосфатидилхолины Фосфатидилсерины Фосфатидилглицерины Фосфатидилэтанол амины Фосфатидилинозитолы Фосфатидилинозитиды Кардиолипиды Плазмалогены
4. Сфинголипиды  N-(Тетрадеcanoил)-сфинг-4-енин (церамид)	СФЛ	Сфингоидные основания Церамиды Фосфосфинголипиды Фосфоносфинголипиды Нейтральные гликофинголипиды Кислые гликофинголипиды
5. Стероидные липиды  Холест-5-ен-3β-ол	СТЛ	Стерины Стероиды Секостероиды Желчные кислоты
6. Пренольные липиды  C ₂₀ -изопрен: ретинол, витамин А	ПЛ	Изопреноиды ХКвиноны и гидроквиноны Полипренолы
7. Гликолипиды  Ациламиносахар: липид X	ГлЛ	Ациламиносахара Ациламиносахарогликаны Ацилтригалоzy Ацилтригалоzyгликаны
8. Поликетиды  Диоксизитронолид В	ПК	Макролиновые поликетиды Ароматические поликетиды Нерибосомальные пептидные поликетидные гибриды

Вещества ацильной природы (Ац) являются группой разнообразных молекул, синтезированных в реакции удлинения цепи при помощи ацетил-КоА. Соединения с глицериновым остовом представлены двумя классами: глицеролипиды (ГЛ), включающие в основном моно-, ди- и тризамещенные глицерины, и глицерофосфолипиды (ГФЛ), которые определяются наличием фосфатной группы, этерифицирующей одну из гидроксильных групп глицерина.

Следующий класс соединений – сфинголипиды (СФЛ), которые в качестве основной структурной единицы содержат длинноцепочечное основание (аминоспирт). Стероидные липиды (СТЛ) содержат в своем составе циклопентанпергидрофенантроновое ядро. К этому классу соединений относятся спирты с гидроксильной группой в третьем положении – стерины и их эфиры с жирными кислотами. Наиболее распространенным стеринном у животных является холестерин, который в неэтерифицированном виде входит в состав клеточных мембран. Пренольные липиды (ПЛ) представляют собой первичные алифатические спирты, состоящие из 6-20 звеньев изопрена. Гликолипиды (ГЛЛ) представляют собой класс липидов, содержащих остатки моно- или олигосаха-

ридов. Они могут быть как производными глицерина, так и сфингозина. Последний класс липидов включает в себя поликетиды (ПК), которые представляют собой группу метаболитов из растений и микроорганизмов, чей биосинтез осуществляется полимеризацией ацетильных и пропиловых групп.

3. Биологическая роль липидов

Биологические функции липидов весьма разнообразны. Липиды играют фундаментальную роль в сохранении целостности клеточной структуры путем формирования двухслойной мембраны, состоящей из фосфолипидов, в животных и растительных тканях. Они выступают основной формой накопления энергии (в виде триацилглицеринов) и обеспечивают соответствующую гидрофобную среду для взаимодействий мембранных белков. Кроме того, мембранные липиды являются источником липидных вторичных мессенджеров, которые образуются под действиями различных внутриклеточных ферментов [3]. На рис. 1 представлены некоторые молекулярные виды липидов, выполняющие различные биологические функции.

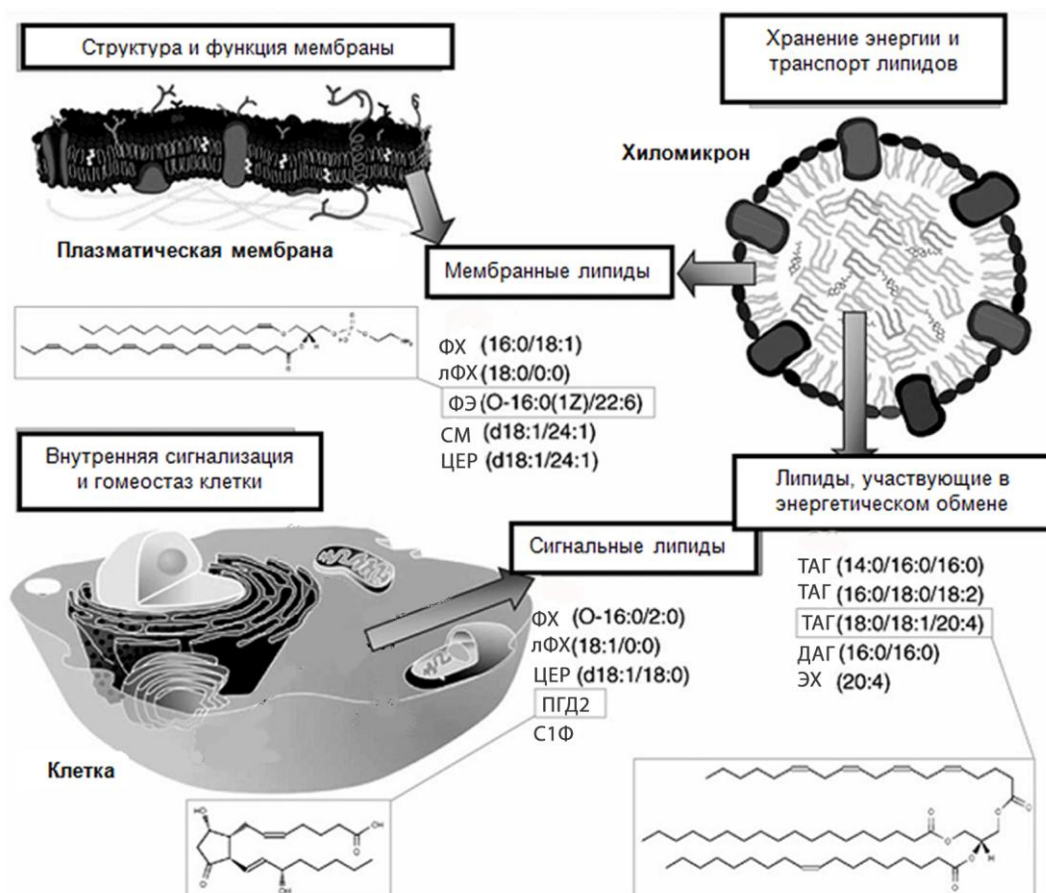


Рис. 1. Биологическая роль липидов. Показана химическая структура фосфатидилэтаноламина ФЭ (O-16:0(1Z)/22:6), простагландина D₂ (ПГД2) и триацилглицерина (ТАГ (18:0/18:1/20:4)). ФХ – фосфатидилхолин, лФХ – лизофосфатидилхолин, ДАГ – диацилглицерин, ЦЕР – церамид, СМ – сфингомиелин, ЭХ – эфир холестерина, С1Ф – сфингозин-1-фосфат [3].

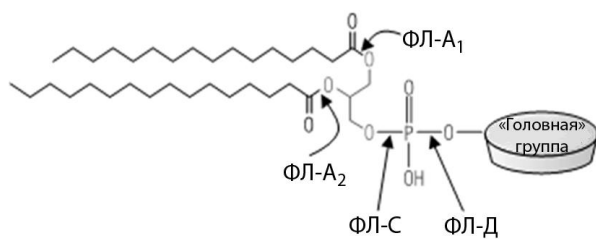
Считается, что липидная сигнализация качественно отличается от других классических парадигм сигнализации, поскольку липиды могут свободно диффундировать через мембраны. Одним из следствий этого является то, что липидные мессенджеры не хранятся в везикулах до высвобождения, поэтому они часто синтезируются в ответ на потребность их в предполагаемом месте действия. Таким образом, многие сигнальные липидные молекулы не могут свободно циркулировать в растворе, и в сыворотке крови они существуют связанные со специальными белками-носителями.

Одной из основных групп клеточных липидов, участвующих в передаче сигнала, являются глицерофосфолипиды. Основные классы фосфолипидов, содержащихся в мембранах клеток млекопитающих, включают в себя: фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозитол (ФИ) и фосфатидилглицерин (ФГ).

Метаболизм фосфолипидов регулируется как с помощью G-белков, так и при помощи тирозинкиназного пути, в нем участвуют ферменты: фосфолипазы C, D, A₁ и A₂ (ФЛ-С, ФЛ-D, ФЛ-A₁ и ФЛ-A₂), а также несколько липидных киназ и фосфатаз. Эти ферменты преобра-

зуют липиды в биологически активные сигнальные молекулы, такие как фосфатидная кислота (ФК), диацилглицерин (ДАГ) и фосфоинозитолы [4–6]. Общая структура фосфолипидов и места действия фосфолипаз показаны на рис. 2.

Механизмы липидной сигнализации представляют собой сложную систему взаимосвязанных путей. ФК, полученная в результате гидролиза ФХ при помощи ФЛ-D, связана с рядом клеточных процессов, таких как секреция, эндоцитоз, активация киназ и др. [6]. Лизофосфатидная кислота (ЛФК) может образовываться с помощью нескольких сигнальных путей: гидролиза ФК при помощи ФЛ-A₂, а также гидролиза лизо-ФХ при помощи лизо-ФЛ-D. ЛФК тесно связана с дифференцировкой, ростом, подвижностью и выживанием клетки и, таким образом, играет важную роль в физиологических и патофизиологических процессах, включая воспаление, ангиогенез и канцерогенез [7]. Фосфатидилинозитол-3,4-бисфосфат (ФИ-Ф₂, липидный «вторичный мессенджер») активирует фермент Akt, который имеет решающее значение для многочисленных биологических процессов, в том числе запрограммированной гибели клеток [8].



«Головная» группа	Фосфолипид
ОН	ФК
Холин	ФХ
Этаноламин	ФЭ
Серин	ФС
Глицерин	ФГ
Инозитол	ФИ
Инозитолмонофосфат	ФИ-Ф ₁
Инозитолдифосфат	ФИ-Ф ₂
Инозитолтрифосфат	ФИ-Ф ₃

Рис. 2. Общая структура фосфолипидов и места действия различных фосфолипаз (ФЛ).

Многие липиды являются крайне необходимыми для жизни. Так, незаменимыми факторами питания являются определенные жирные кислоты (например, линолевая кислота и α-линоленовая кислота), потому что они не могут быть синтезированы из простых предшественников в нашем рационе. Однако, аномальные уровни некоторых липидов, в частности, холестерина (при гиперхолестеринемии) и *транс*-жирных кислот, являются факторами риска для развития сердечно-сосудистых заболеваний. Чрезмерное поглощение жиров повышает риск развития ожирения, диабета и атеросклероза.

Более полная картина липидного обмена и липидной регуляции появится тогда, как только новые аналитические методы измерения преодолеют ограничения, связанные с разнообразием, быстротой взаимодействия и изменения

липидных видов. Таким образом, разработка и улучшение методов анализа липидов являются основополагающими задачами в науке, промышленности и клинических анализах.

Несмотря на то, что липиды представляют непростые вещества для анализа, поскольку они могут заметно отличаться по полярности и у них недостаточно хромофоров, которые могли бы облегчить их спектрофотометрическое обнаружение, в последнее десятилетие наметился явный прогресс в липидном анализе.

В принципе, аналитические процедуры для определения отдельных липидных соединений включают в себя три основных шага:

- 1) извлечение из образца;
- 2) аналитическое разделение;
- 3) идентификация и количественное определение.

Это означает, что после успешного извлечения липидов из их источника, должен быть проведен анализ для выявления конкретных соединений. Рис. 3 показывает три основных этапа в анализе липидов, а также все используемые аналитические методы.

Еще одна проблема аналитического определения липидов проистекает из-за неустойчивости данных соединений. Окисление ненасыщенных жирных кислот является одной из

наиболее фундаментальных реакций в химии липидов. Когда ненасыщенные липиды подвергаются воздействию воздуха, то образуются окисленные соединения. Синглетный кислород, полученный в результате фотоокисления в присутствии сенсбилизатора (например, некоторых пигментов – хлорофилл, гемоглобин) или металлов (железо, свинец или медь), атакует двойные связи в жирных кислотах с образованием пероксидных соединений.



Рис. 3. Аналитические процедуры, используемые для анализа липидов.

ЖЖЭ – жидкостная экстракция, ТФЭ – твердофазная экстракция, СФЭ – сверхкритическая флюидная экстракция, МВЭ – микроволновая экстракция, ТСХ – тонкослойная хроматография, ГХ – газовая хроматография, ЖХ – жидкостная хроматография, ПИД – пламенно-ионизационный детектор, МС – масс-спектрометрия, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, ELSD – лазерный детектор испарительного светорассеяния, CAD – детектор заряженного аэрозоля, КЭ – капиллярный электрофорез, ЯМР – ядерный магнитный резонанс.

Линолевая кислота окисляется в 20 раз быстрее, чем олеиновая кислота, и каждая дополнительная двойная связь в жирных кислотах увеличивает скорость деградации в 2-3 раза. Фосфолипиды, содержащие ненасыщенные жирные кислоты, в основном линолевую и арахидоновую, более восприимчивы к окислению. Полная информация об окислении липидов представлена в монографии [1].

4. Извлечение липидов из биологических образцов

Перед анализом нового биологического образца аналитик должен решить три сложные задачи:

- 1) выделить липиды из матрицы;
- 2) удалить из экстракта нелипидные соединения;
- 3) фракционировать и определить классы липидов в экстракте [9].

В некоторых случаях два первых этапа являются целью анализа (например, когда определяется содержание жира в пищевых продуктах и кормах). Из-за того, что липиды обычно не встречаются в свободном виде в организмах, а встроены в матрицу, то для их анализа необходим этап экстракции. В настоящее время наиболее часто применяются следующие виды

экстракции: жидкостная, твердофазная, сверхкритическая флюидная экстракция.

4.1. Жидкостная экстракция

Набор веществ, полученных в липидном экстракте, зависит от используемого метода экстракции, особенно от выбранного растворителя. Плохо растворяясь в воде, липиды требуют особых подходов при их выделении и разделении. Важное место в исследовании липидов занимают неполярные растворители (например, гексан, петролейный эфир), которые используются для экстракции простых нейтральных липидов (например, сложных эфиров жирных кислот и ацилглицеринов). Более сложные и более полярные липиды (например, фосфолипиды, липопротеины, гликолипиды) и свободные жирные кислоты требуют более полярных растворителей (например, метанол или ацетонитрил). В качестве экстрагентов были предложены различные растворители или их комбинации, но наиболее частое сочетание растворителей – смесь хлороформа и метанола в двухстадийной экстракции. Этот подход был разработан в конце 1950-х Фолчем [10] и использует систему хлороформ–метанол в соотношении 2:1 и большие объемы солевого раствора для вымывания нелипидных компонентов. Для макси-

мальной степени извлечения отдельных интересующих липидных компонентов из матрицы были разработаны модификации метода Фолча [1, 11–13].

Экстракция органическими растворителями, как правило, является первым шагом в процессе анализа липидов, поэтому результаты различных исследовательских групп, использующих различные методы выделения липидов, могут отличаться. Поэтому когда исследователи хотят извлечь все простые и сложные липиды из

ткани в ближайшем количественном соотношении, то они обычно используют метод Фолча или его варианты.

4.2. Твердофазная экстракция

Для выделения отдельных интересующих классов липидов и для очистки липидного экстракта используют предварительные аналитические методики разделения, такие как твердофазная экстракция (ТФЭ).

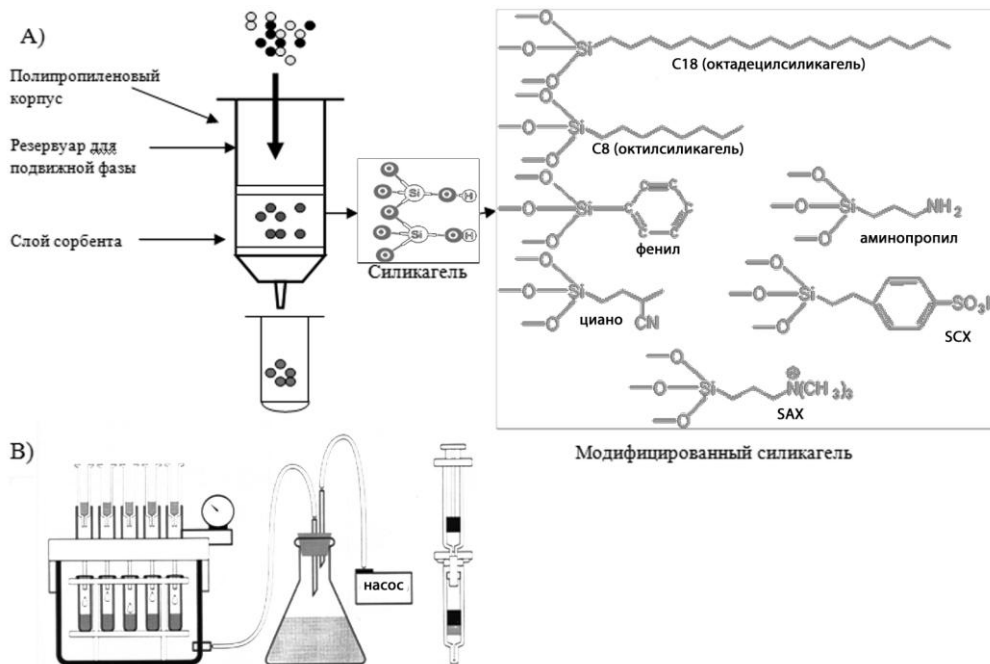


Рис. 4. Схема (А) и установка (В) для твердофазной экстракции.

Метод основан на распределении целевого компонента между подвижной и неподвижной фазами в результате сорбционных и/или ионообменных процессов, протекающих в специальной колонке (картридже) для ТФЭ. Неподвижная фаза представляет собой силикагель с модифицированной поверхностью (рис. 4). Различают два основных вида твердофазной экстракции. При проведении *удерживающей* ТФЭ целевой компонент сначала удерживается на сорбенте, при этом мешающие примеси сорбентом не удерживаются, а затем происходит элюирование целевого компонента. При *неудерживающей* ТФЭ на сорбенте сразу оседают мешающие примеси, а целевой компонент проходит через колонку, не задерживаясь. Таким образом, достигается его очистка от мешающих примесей. В ТФЭ используются три основных режима разделения: обращенно-фазовый, нормально-фазовый и ионный обмен. **Обращенно-фазовый** режим разделения – экстракция неполярных соединений из водных образцов за счет Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. **Нормально-фазовый** режим разделения – экстракция полярных соединений из неполярных органических растворителей за

счет водородных связей, диполь-дипольных и π - π взаимодействий. **Ионообменный** режим разделения – экстракция заряженных соединений из органических или водных растворов с низкой ионной силой за счет кулоновских взаимодействий

ТФЭ уменьшает объем растворителя, который необходим для жидкостной экстракции и не требует использования смеси растворитель/вода [14]. Также преимуществами ТФЭ по сравнению с жидкостной экстракцией являются высокая воспроизводимость, селективность, специфичность, высокий выход (более 75%) и легкость в обращении.

Современные методы разделения для анализа липидных классов и родственных соединений на основе ТФЭ были опубликованы в работе [15].

4.3. Сверхкритическая флюидная экстракция

Однако в последние годы в качестве альтернативы традиционным методам был разработан метод сверхкритической флюидной экстракции (СФЭ). Сверхкритические флюиды создаются в результате повышения температуры и давления жидкости. Повышение температуры приводит к увеличению коэффициента диффузии и, следовательно, к увеличению скорости

экстракции, в результате чего сокращается время экстракции [16]. СФЭ основана на газо- и жидкостноподобных свойствах сверхкритической жидкости, как правило, диоксида углерода (иногда смешанной с органическими модификаторами), что позволяет извлекать органические аналиты из твердых матриц при температуре $>31.1^{\circ}\text{C}$ и давлении 74.8 атм (1070.4 пси).

Незначительные изменения липидных соединений при экстракции, удаление растворителя из экстракта и отсутствие токсичности являются одними из наиболее важных преимуществ СФЭ. Кроме того, оборудование для СФЭ может быть соединено с хроматографическими системами, обеспечивая тем самым возможность для автоматизации анализа липидов.

Липидные экстракты чувствительны к окислению. Их следует хранить растворенными в неполярных растворителях (например, гексан или хлороформ) при -20°C в стеклянной таре в атмосфере азота. Температура охлаждения $0-4^{\circ}\text{C}$ является приемлемой для краткосрочного хранения липидов. Для длительного хранения контейнеры должны быть запечатаны в вакууме [1].

В любом случае, необходимо подчеркнуть важность высоко контролируемых, стандартизованных процессов пробоподготовки и анализа образца. В настоящее время не существует единой платформы, с помощью которой в одном эксперименте можно было бы измерить все липидные компоненты ткани, клетки или любого образца, несмотря на усилия, предпринимаемые в этом направлении [17]. Эти усилия поддерживаются с помощью быстрого развития и совершенствования аналитического оборудования, но пока многие классы липидов должны быть проанализированы отдельно.

5. Методы разделения и количественного определения липидов

5.1. Классические методы

Большое количество классических химических методов применяется для оценки качества и химических характеристик липидов в пищевых продуктах. Наиболее часто для характеристики качества жиров используются: число омыления, йодное число, кислотность и количество перекисей.

Эти параметры применяются для определения чистоты (число омыления), количества ненасыщенных соединений (йодное число) и содержания свободных жирных кислот (кислотность). Хотя эти классические методы по-прежнему широко используются для анализа липидного состава пищевых продуктов, они все чаще заменяются более быстрыми и современными методами, особенно в лабораториях контроля качества продуктов питания.

5.2. Хроматографические методы

В анализе липидов наиболее широкое применение нашли методы хроматографии.

5.2.1. Тонкослойная хроматография

Тонкослойная хроматография (ТСХ) была первым хроматографическим методом, использованным для оценки липидов, и используется до сих пор. Данная методика позволяет провести быстрый скрининг изучаемых образцов. ТСХ дает много полезной информации в сочетании с небольшими усилиями и позволяет разделить смеси липидов с различной полярностью за один анализ. На рис. 5 представлена хроматограмма липидных стандартов, полученная на пластинах Alugram Sil G/UV₂₅₄.

Для достижения хороших аналитических результатов применяют автоматическую ТСХ. Однако этот метод имеет два серьезных недостатка – низкую разрешающую способность и низкую чувствительность.

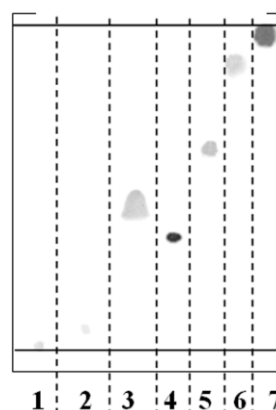


Рис. 5. ТСХ липидных стандартов в системе гексан–диэтиловый эфир–уксусная кислота (55:45:1), проявитель 10% раствор серной кислоты в метаноле: 1 – фосфатидилхолин (16:0/18:1), 2 – моноолеин, 3 – диолеин, 4 – холестерин, 5 – олеиновая кислота, 6 – триолеин, 7 – холестерина олеат.

В последние годы в целях улучшения эффективности разделения была разработана высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ), обычно в сочетании с денситометрией [1, 18].

5.2.2. Газовая хроматография

Традиционно липиды анализируют с помощью метода газовой хроматографии (ГХ) с пламенно-ионизационным детектированием. Метод ГХ имеет ограничения, поскольку соединения должны быть термически стабильными и, не разрушаясь, испаряться во время инъекции. Хотя получение производных (дериватизация) может решить ряд проблем, связанных с недостаточной летучестью и стабильностью аналитов при работе с простыми молекулами, для сложных биомолекул необходима более сложная дериватизация, включающая несколько химических стадий. Подготовка образца для ГХ может включать в себя предварительное разделение липидных классов, гидролиз, дериватизацию или пиролиз [19]. Липиды гидролизуются

ются при нагревании их с обратным холодильником с избытком разбавленного водно-этанольного раствора щелочи. Свободные жирные кислоты и любые водорастворимые продукты гидролиза (омыляемая фракция) и неполярные компоненты (неомыляемые компоненты) отделяются для дальнейшего анализа. Неомыляемая фракция будет содержать углеводороды, длинноцепочечные спирты (жирные спирты) и стерины, изначально присутствующие в липидных образцах в свободной или этерифицированной форме.

Жирнокислотный состав жиров и масел, как правило, определяется методом ГХ путем анализа соответствующих производных жирных кислот – метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) [1]. Жиры и масла преимущественно составляют эфиры глицерина с жирными кислотами (ацилглицерины). Для получения МЭЖК в метанольной среде применяется реакция переэтерификации с использованием щелочного или кислотного катализа. Если сначала был проведен гидролиз, то для получения МЭЖК

омыляемых фракций используют метилирование в кислых условиях. Разделение МЭЖК обычно достигается на весьма полярных жидких фазах, и аналиты разделяются в зависимости от их длины цепи и степени насыщенности. Для окончательной идентификации МЭЖК необходимо сравнить времена удерживания стандартов с временами удерживания образцов. Так как не все стандарты жирных кислот являются коммерчески доступными, то целесообразно использовать методы газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) или ИК-спектроскопию. Разделение *цис*- и *транс*-изомеров жирных кислот, как правило, не получается исключительно с помощью ГХ, и может быть необходимо сочетание ГХ с другими видами хроматографии [20].

На рис. 6 приведена хроматограмма стандартов метиловых эфиров жирных кислот, полученная методом ГХ с пламенно-ионизационным детектором на капиллярной колонке длиной 100 м.

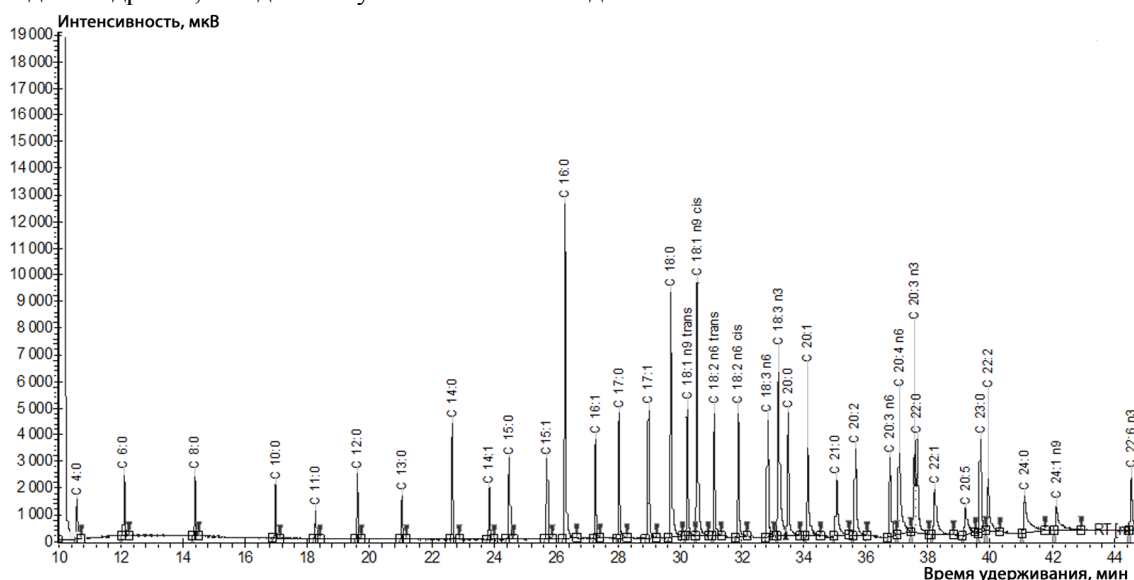


Рис. 6. Хроматограмма стандартов метиловых эфиров жирных кислот FAME Supelco mix-37.

Будучи весьма точным количественным методом, метод ГХ является трудоемким (разделение занимает час и более), и в процессе подготовки возможно искажение информации о структуре аналитов. Получение МЭЖК является критическим этапом анализа. Неполный выход реакции переэтерификации, изменение структуры жирных кислот (например, изменения в положении и геометрии изомеров) и образование артефактных соединений – все это влияет на полученную аналитическую информацию.

Тем не менее, современные ГХ-разделения стремятся к сочетанию высокой скорости и высокого разрешения. Например, интересно отметить статью, в которой МЭЖК изучаются в различных липидных матрицах с использованием быстрой ГХ в течение нескольких

минут [21]. Bondia-Pons и др. [22] применяли аналогичную стратегию для разделения 35 видов МЭЖК из человеческой плазмы в течение 3.2 мин. ГХ также может использоваться для прямого разделения триацилглицеринов в соответствии с числом атомов углерода. Анализ обычно выполняется при высоких температурах на неполярных капиллярных колонках или колонках средней полярности, в этом случае получается разделение в группе триацилглицеринов в соответствии с их числом атомов углерода. Лучшее разрешение пиков может быть достигнуто при использовании капиллярных колонок с более полярной стационарной фазой.

Кроме того, ГХ может сочетаться с ИК-преобразованием Фурье (GC-FTIR). GC-FTIR может быть использована для идентификации раз-

личных видов МЭЖК [23], хотя низкая чувствительность является основным недостатком данного метода. Основное применение GC-FTIR находит в качестве дополнительного инструмента к ГХ-МС для выявления изомеров и выяснения структуры соединений.

5.2.3. Жидкостная хроматография

Жидкостная хроматография (ЖХ) или высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) имеет гораздо более широкое применение в липидном анализе, чем ГХ.

В жидкостной хроматографии выделяют два режима разделения в зависимости от относительной полярности двух хроматографических фаз:

- нормально-фазовая ЖХ (НФ-ЖХ), которая обычно используется для разделения липидов на классы;
- обращенно-фазовая ЖХ (ОФ-ЖХ), с помощью которой разделяют липиды в соответствии с жирнокислотным составом [24].

Schaefer и др. [25] разработали НФ-ЖХ-метод идентификации и количественной оценки 12 липидных классов. ОФ-ЖХ является подходящим методом для определения позиционных изомеров триацилглицеринов, быстрого анализа свободных жирных кислот или МЭЖК и для идентификации геометрических изомеров в разнообразных биологических образцах.

Набор пиков триацилглицеринов, разделенных методом ОФ-ЖХ, отличается от набора пиков, полученных с помощью ГХ, где эти соединения разделяются в соответствии с различиями в числе атомов углерода. В ОФ-ВЭЖХ компоненты разделяются в соответствии с совокупным влиянием длины цепи жирнокислотных фрагментов, содержащихся в данном виде триацилглицерина, и их степенью ненасыщенности. Каждая двойная связь уменьшает время удерживания, что эквивалентно примерно двум атомам углерода. Для анализа липидов были разработаны методы ОФ-ЖХ с использованием как водных, так и неводных растворов.

Особенным типом ЖХ в липидном анализе является хроматография с комплексобразованием, в которой ионы серебра связаны с неподвижной фазой. Ионы серебра обратимо взаимодействуют с двойными связями липидных цепей с образованием полярных комплексов, поэтому соответствующие липиды сильнее удерживаются в колонке. Этот вид хроматографии называют ВЭЖХ на основе ионов серебра (Ag-ВЭЖХ) [26]. В Ag-ВЭЖХ порядок элюции триацилглицеринов легко понять, потому что участвует только одно свойство молекул – степень ненасыщенности. Ag-ВЭЖХ является чрезвычайно мощным методом для аналитического и полупрепаративного разделения, а также для выделения *цис*- и *транс*-геометрических и позиционных изомеров МЭЖК и триглицеринов.

Более подробная информация о классических методах ЖХ для оценки минорных липидов можно найти в [1] и других специализированных источниках (например, для фосфолипидов [27]). Новые технологии привели к созданию колонок с размером частиц менее 2 мкм (микро-ЖХ), с высоким давлением (ультраэффективная ЖХ (УЭЖХ) [28]), что позволяет получить более 100 пиков аналитов за один анализ.

Для обнаружения липидов используют следующие детекторы:

1. Рефрактометрический детектор
2. УФ-детектор
3. Детектор испарительного светорассеяния (ELSD)
4. Электрохимический детектор
5. Кондуктометрический детектор
6. Детектор заряженного аэрозоля (CAD)

Следует отметить, что ELSD является универсальным детектором и реагирует на любые аналиты, которые менее летучи, чем подвижная фаза. Он имеет низкий фоновый сигнал, совместим с широким спектром растворителей, а также позволяет использовать градиентное элюирование (в отличие от рефрактометрического детектора), и сигнал не зависит от степени насыщения и длины ацильных цепей (в отличие от УФ-детектора). Авторы работы [29] с помощью ОФ-ВЭЖХ с детектором ELSD определили молекулярные фракции триацилглицеринов в составе липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП), предварительно отделив их от липидного экстракта методом ТФЭ на диольной колонке.

В последнее десятилетие детекторы, оснащенные лазером в качестве источника света, стали коммерчески доступны. Лазерный детектор испарительного светорассеяния (ELSD) превосходит другие детекторы светорассеяния (ELSD) по чувствительности, стабильности и воспроизводимости в течение длительного периода анализа. Детектор заряженного аэрозоля, разработанный в конце 2004 года, по-видимому, является более чувствительным, чем ELSD, и имеет широкий динамический диапазон [30].

Разрешающая способность хроматографических методов анализа может быть повышена путем использования многомерной хроматографической системы, которая по существу объединяет два самостоятельных шага разделения. В недавнем обзоре [31] было рассмотрено применение многомерной хроматографии для липидного анализа, в том числе методы ГХ-ГХ, ЖХ-ЖХ, ЖХ-ГХ.

Для получения более подробной информации о применимости методов ЖХ к липидному анализу, в том числе о менее популярных методах (например, хиральной хроматографии [32], противоточной хроматографии или гель-филт-

рационной хроматографии), следует обратиться к специализированным монографиям [1, 33].

5.3 Электрофоретические методы

Существует несколько примеров, основанных на применении капиллярного электрофореза (КЭ) для разделения несколько классов липидов или соединений, принадлежащих к одному классу липидов. КЭ имеет несколько режимов, наиболее часто используемых для определения липидов, среди которых:

- капиллярно-зонный электрофорез,
- капиллярная электрохроматография,
- электрокинетическая хроматография,
- мицеллярная электрокинетическая хроматография
- микроэмульсионная электрокинетическая хроматография.

Основные проблемы при использовании метода КЭ для анализа липидов – это плохая растворимость липидов в воде и их низкий

коэффициент поглощения в УФ-диапазоне. КЭ предоставляет альтернативу методам ВЭЖХ в анализе фосфолипидных классов из-за своей высокой эффективности разделения, большой гибкости и простых приборов. Однако, из-за недостатков, отмеченных выше, было проведено лишь несколько работ по разделению фосфолипидов, которые включают в себя методы мицеллярной электрокинетической хроматографии с УФ- или флуоресцентным детектированием, неводный КЭ с различными детекторами и капиллярную электрохроматографию [34, 35].

Метод КЭ был применен и для анализа жирных кислот. В результате были успешно проанализированы сложные смеси жирных кислот, имеющих от 10 до 24 атомов углерода [36]. В табл. 2 приведены хроматографические и электрофоретические методы, с помощью которых проанализированы различные классы липидов.

Таблица 2. Примеры липидов, проанализированных с помощью хроматографических и электрофоретических методов

Аналитический метод разделения	Липиды	
Хроматографические методы	ТСХ	Большинство липидных классов
	ГХ	Жирные кислоты, ДАГ, ТАГ, стерины, нейтральные гликофинголипиды, глицерофосфолипиды
	ВЭЖХ	Жирные кислоты, глицерофосфолипиды, стерины, сфинголипиды, фенольные липиды, ДАГ, ТАГ
	ГХ/ГХ	Жирные кислоты, стерины, жирные эфиры
	ЖХ/ЖХ	ТАГ
	ЖХ/ГХ	ТАГ, стерины, жирные кислоты
Электрофоретические методы	КЭ	Жирные кислоты, глицерофосфолипиды, кардиолипины, сфинголипиды

5.4. Масс-спектрометрия

Наблюдаемое в последнее десятилетие развитие масс-спектрометрической техники привело к формированию ряда методов, позволяющих эффективно изучать метаболом и его изменения при различных патологиях, генетических вариациях и внешних воздействиях. Высокая селективность и чувствительность масс-спектрометров, а также возможность их комбинирования с хроматографической техникой сделали масс-спектрометрию идеальным средством для подобных исследований, и уже имеющиеся на сегодняшний день научные публикации являются неоспоримым тому подтверждением. Тем не менее, метаболомика (и липидомика в том числе) продолжает интенсивно развиваться и, скорее всего, в ближайшее время можно будет наблюдать повсеместное внедрение метаболомных технологий в научную практику, подобно тому, как это недавно наблюдалось в отношении протеомных технологий. Существуют многочисленные типы масс-спектрометров, которые различаются по методу ио-

низации и масс-анализаторам, которые в них используются. В данной работе мы рассмотрим роль масс-спектрометрии в области липидного анализа.

В зависимости от способа разделения липидов масс-спектрометрический анализ реализуется в виде:

- 1) прямого масс-спектрометрического анализа;
- 2) высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС);
- 3) газовой хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией (ГХ/МС);
- 4) капиллярного электрофореза, сопряженного с масс-спектрометрией (КЭ/МС).

Масс-спектрометрия основана на разделении ионов в магнитном и электрическом полях. На рис. 7 приводится схема устройства типичного масс-спектрометра, на которой отмечены способы введения образца в МС, источники ионов и масс-анализаторы, применяемые в анализе липидов. В ионном источнике незаря-

женные органические молекулы ионизируются, образуя как положительно, так и отрицательно заряженные ионы.

Различают методы жесткой ионизации, которые дают значительный и хорошо воспроизводимый набор фрагментов (например, ионизация электронным ударом), и методы мягкой ионизации (например: матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI), ионизация электроспреем (ESI), термоспрей (TS), бомбардировка быстрыми атомами (FAB), химическая ионизация (CI), химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI), фотоионизация при атмосферном давлении (APPI)).

Полученные ионы разделяются в масс-анализаторе на основе их отношения m/z (то есть отношения молекулярной массы иона к заряду иона). Основными видами анализаторов, которые используются для анализа липидов, являются: квадрупольный (Q); ионная ловушка (ion-trap, IT); квадрупольно-ионная ловушка (Q-IT); тройной квадрупольный (QQQ); времяпролет-

ный (TOF); квадрупольный времяпролетный (Q-TOF); масс-анализатор ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием (FT-ICR), орбитальная ионная ловушка Orbitrap (IT-OT).

Тройной квадруполь или квадрупольный времяпролетный анализатор позволяют проводить фрагментацию липидов для их структурного анализа или идентификации. Ионные ловушки позволяют многократно фрагментировать липиды (получать фрагменты фрагментов), что увеличивает информативность получаемых масс-спектров и повышает вероятность идентификации липидов. Эти масс-анализаторы имеют различные свойства, в том числе диапазон m/z , который они могут охватывать, точность определения массы и разрешение.

В результате применения МС аналитик может получить информацию о точной молекулярной массе соединения, элементном составе и изотопном распределении, а применяя tandemную МС (МС/МС), аналитик получает структурную информацию и набор фрагментов соединения.



Рис. 7. Схема устройства типичного масс-спектрометра.

5.4.1. Прямой масс-спектрометрический анализ

Прямой масс-спектрометрический анализ подразумевает непосредственное внесение анализируемого материала в источник ионизации масс-спектрометра без предварительного хроматографического или электрофоретического разделения. В области липидного анализа было проведено много важных и новаторских исследований, в которых не применялось никакого предварительного разделения липидов на классы [37]. Для непосредственного ввода проб обычно используют инфузионные шприцы, с помощью которых можно вводить растворенный липидный экстракт при скоростях потока от нескольких мкл/мин до нл/мин (в наноисточниках). Во время непрерывной инфузии

пробы можно подбирать условия анализа и при этом можно существенно увеличить отношение сигнал/шум для минорных липидных видов. Основным преимуществом данного ввода проб является короткое время анализа. В основном, анализы с непосредственным вводом пробы были выполнены с использованием электроспрейного источника ионизации (ESI/ЭИИ) [13, 38]. На рис. 8 представлен масс-спектр липидного экстракта плазмы крови человека, полученный прямым масс-спектрометрическим анализом при использовании ЭИИ в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов и масс-детектора, имеющего тройной квадруполь (см. схему на рис. 10).

Были разработаны липидные библиотеки для идентификации и количественной оценки около 450 отдельных видов фосфолипидов из

грубых липидных экстрактов биологических жидкостей или тканей с применением ЭИИ и прямым вводом пробы [39]. Для повышения

эффективности масс-спектрометрии некоторые исследователи применяют ЭИИ с нанопотоком впрыскиваемой пробы (нано-ЭИИ).

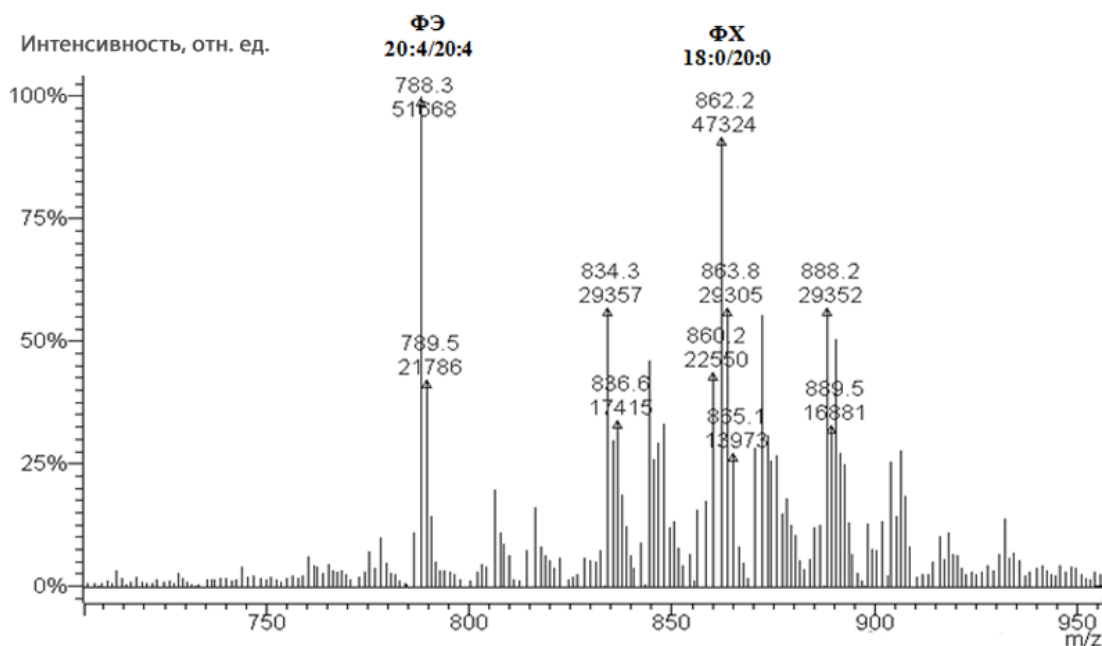


Рис. 8. Масс-спектр липидного экстракта плазмы крови взрослого человека.

Хотя масс-спектрометрический анализ с прямым вводом является быстрым и хорошо воспроизводимым методом, он имеет ряд серьезных недостатков. К примеру, химические изомеры из-за идентичности молекулярной массы не могут быть распознаны этим методом. Подавление ионизации является основным недостатком в этом виде масс-спектрометрических экспериментов. Подавление ионизации можно рассматривать как «конкуренцию за ионизацию» между молекулами, введенными в источник ионов одновременно. Для того, чтобы избежать совместного введения молекул, действующих как подавляющие агенты, требуется предварительное разделение с использованием разнообразных методов разделения (например, любых методов хроматографии, капиллярного электрофореза).

Эти методы могут уменьшить подавление ионизации, вызванное совместным элюированием соединений и изобарических примесей, и зачастую помогут отделить изомеры. Кроме того, хорошее аналитическое разделение приведет к улучшению пределов обнаружения и качества масс-спектрометрических данных в связи с уменьшением фонового шума.

5.4.2. Газовая хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией (ГХ/МС)

Основным условием успешного ГХ/МС-анализа является достаточная летучесть и термическая стабильность анализируемых веществ. Обычно перед анализом полярных соединений для увеличения их термической стабильности и летучести дериватизируют заряженные функциональные группы. Тиольные, amino-, гидр-

окисильные и карбоксильные группы могут быть дериватизированы алкилированием, ацилированием или силилированием. Пробоподготовка биологических жидкостей для ГХ/МС может включать лиофилизацию.

Первые достижения масс-спектрометрии в области химии липидов были получены с использованием метода электронной ионизации (ГХ/ЭИ/МС). Как и в ГХ, в ГХ/ЭИ/МС липидные соединения можно анализировать в нативном виде [40], но часто их дериватизируют [41]. В 1970-х годах метод ГХ с масс-спектрометрическим детектированием с электронной ионизацией превратился в мощный и популярный инструмент для идентификации структуры липидов, а в 1980-х годах стали доступными поисковые базы данных, содержащие структурную информацию о многих жирных кислотах и липидах.

Эффективность метода ЭИ была продемонстрирована при исследовании больших липидов (например, триглицериды, гликолипиды, фосфолипиды), но определение молекулярных видов липидов, их остовы и головных групп оставалось очень трудоемкой задачей. Появление методов мягкой ионизации сделало революцию в использовании масс-спектрометрии в липидном анализе и в значительной степени продвинуло вперед область липидомики.

Метод мягкой ионизации – химическая ионизация (ХИ) – также широко применяется для анализа многих липидов. Когда ХИ используется с ГХ, то наиболее распространенным газом-реагентом для ХИ является аммиак. Небольшие липидные молекулы (например, эфиры

жирных кислот) подходят для анализа с помощью ГХ/ХИ/МС, но есть некоторые публикации, где данным методом также были исследованы глицерофосфолипиды.

В исследованиях с применением ГХ/МС (рис. 9) используют квадрупольные [42] или времяпролетные масс-анализаторы [43] и

практически не используют ионные ловушки, считающиеся не адаптированными для ГХ. Времяпролетные масс-анализаторы преимущественно применяют из-за возможности быстрой детекции аналитов, что, например, крайне важно при анализе плазмы или сыворотки крови человека.

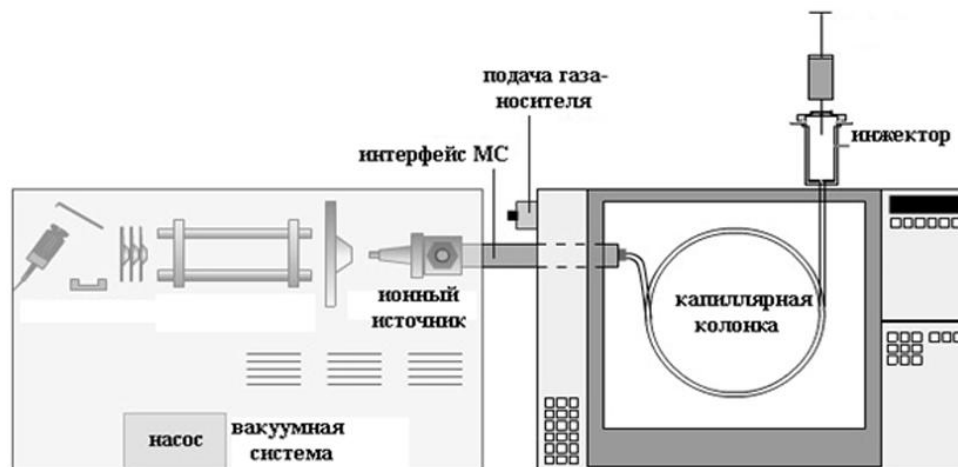


Рис. 9. Устройство газового хроматографа с масс-спектрометрическим детектором.

5.4.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС)

В целях устранения недостатков, проявляющихся при прямом масс-спектрометрическом анализе сложных биологических объектов, разделение метаболитов с помощью жидкостной хроматографии может предшествовать масс-спектрометрическому детектированию. Жидкостная хроматография существенно снижает подавление ионизации и, устраняя фоновый шум, увеличивает динамический диапазон детектирования метаболитов. Как правило, для анализа липидов используют обращенно-фазовую жидкостную хроматографию с неподвижной фазой из углеводных цепочек длиной 18 атомов, прикрепленных к частицам размером 3–5 мкм. Однако, традиционное применение обращенно-фазовой ВЭЖХ часто недостаточно для разделения сложных биологических смесей. Одним из способов увеличения разрешающей способности хроматографии является использование частиц с меньшим размером. К недостаткам данного подхода можно отнести существенное увеличение давления, необходимого для осуществления потока элюентов через подобные колонки, что делает необходимым использование специальных УЭЖХ-систем. Перспективным для липидных исследований является применение нано-ВЭЖХ/МС. Эффективное разделение веществ хроматографией с нанопотоками элюентов значительно нивелирует подавление ионизации и позволяет количественно детектировать метаболиты.

Первым методом мягкой ионизации, который был разработан для метода ЖХ/МС, стал термоспрей. Для анализа липидов методом ЖХ наиболее широко используются следующие методы мягкой ионизации: FAB, ESI, APPI, APCI и MALDI.

Во многих исследованиях использовали метод FAB-MS для изучения структуры больших липидов (молекулярный вес >400) [44]. Основной недостаток этого метода ионизации в высоком уровне базового химического шума, который может ограничить чувствительность, особенно для липидов с низкой молекулярной массой. Использование этого метода ионизации снижается в последние годы.

Среди методов ионизации при атмосферном давлении (API) выделяют ESI, APCI и APPI. Широкое распространение для профилирования сложных липидных смесей получил ЭИИ (ESI) (рис. 10) [45]. Это мягкий метод ионизации редко нарушает химическую структуру аналита до попадания в масс-анализатор, что является особенно полезным для анализа полярных липидов (например, фосфолипидов и сфинголипидов), которые могут быть обнаружены в виде молекулярных ионов. Все цвиттер-ионные фосфолипиды (ФХ, лизо-ФХ, СМ, ФЭ) могут ионизироваться в режиме регистрации отрицательных и положительных ионов, за исключением ФЭ, который более эффективно ионизируется в режиме положительных ионов. Анионные фосфолипиды (ФИ, ФК, ФГ, ФС) из-за их отрицательного заряда при нейтральном pH образуют в основном молекулярные ионы $[M - H]^-$ (депротонированная молекула сохраняет отрицательный заряд) и легко детектируется в режиме отрицательных ионов. Таким

образом, для каждого образца можно получить два набора масс-спектров: один в режиме регистрации положительных ионов и второй – в отрицательных ионах. Идентификация структуры интересующих аналитов проводится на основе данных тандемной МС [46, 47]. Соответствующие ионы подвергаются индуцированным столкновениям с молекулами газа (азот, аргон). По спектрам фрагментации можно определить состав ацильных цепей и полярных групп фосфолипида.

Также и неполярные липиды (например, диацилглицерины и триацилглицерины), которые, как правило, лучше ионизируются методом АРСІ, были успешно проанализированы с помощью ЭИИ [48]. В последние годы применение ЭИИ в тандемной масс-спектрометрии (ESI-MS²) для липидного анализа продемон-

стрировало несколько ключевых преимуществ:

- ESI-MS² спектры отдельных липидов часто могут быть получены из грубого липидного экстракта без необходимости предварительного разделения, гидролиза или дериватизации;

- тандемные масс-спектры основных классов липидов четко определяют длину углеродной цепи и степени ненасыщенности жирных кислот.

Методы ESI-MS² были использованы в качестве основы для новой области липидного профилирования, которая стала известна как липидомика. Из двух других методов ионизации при атмосферном давлении (APCI и APPI), APCI широко применяется для анализа неполярных липидов (например, триглицеринов, стероидов, и сложных эфиров жирных кислот) [49, 50].

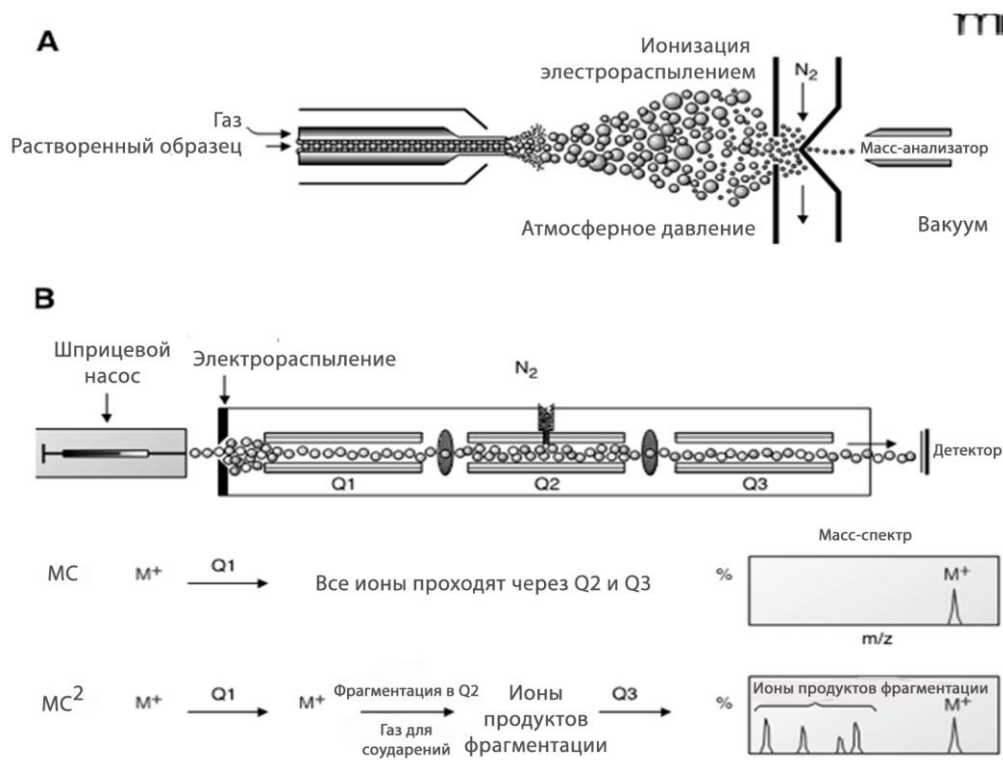


Рис. 10. Схема электроспрейного источника ионизации (А) и масс-спектрометра с тройным квадрупольным масс-анализатором (В).

Это метод ионизации легко производит ионы с мягкой фрагментацией крупных нейтральных молекул. Молекулы, которые легко ионизируются (например, фосфолипиды) образуют молекулярные ионы и диагностически полезные фрагментарные ионы. Простота и универсальность АРСІ делают его идеальным инструментом для использования в решении очень трудных аналитических задач.

APPI является новейшим методом мягкой ионизации, который продемонстрировал способность ионизировать эфиры жирных кислот, моноацилглицерины, диацилглицерины и триацилглицерины с более высокой эффектив-

ностью, чем другие два метода АРІ [51]. Стоит отметить, что некоторые производители приборов ВЭЖХ-МС продают сменные камеры ионизации, что позволяет использовать ESI, АРСІ и APPI (в двух полярностях) с тем же прибором, присоединив соответствующие камеры распыления.

MALDI является методом мягкой ионизации, который часто используется для анализа белков, но также успешно применяется для анализа липидов. Одним из преимуществ MALDI является скорость анализа. Анализ может быть выполнен менее чем за 1 мин с хорошей воспроизводимостью и минимальной пробоподго-

товкой [52]. Большинство приборов MALDI оборудованы времяпролетными ионными анализаторами (TOF) и обычно не требуют предварительного хроматографического разделения образца (рис. 11). MALDI-TOF обычно применяют для скрининга полярных и неполярных липидов из различных источников.

В некоторых биохимических исследованиях использовали MALDI-TOF для получения данных о молекулярных видах фосфолипидов, и

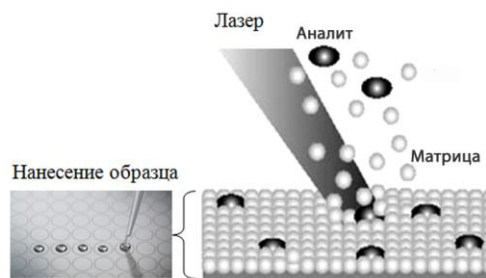


Рис. 11. Схема процесса ионизации в спектрометре MALDI-TOF.

хотя понятно, что ЭИИ до сих пор используется в большинстве исследований в липидомике, MALDI, вероятно, станет более популярным методом в этой области [53].

В табл. 3 приведены источники ионизации, с помощью которых методом МС были проанализированы липиды различных классов. Более конкретная аналитическая информация по использованию различных источников ионизации доступна в [54].

Последние достижения в области масс-спектрометрии расширили аналитические возможности применения метода изотопного обогащения для определения интактных веществ. Введение изотопно-меченых предшественников (стабильных изотопов) дает возможность оценить кинетику синтеза и метаболизма липидов (динамическая липидомика). Введение дейтерированного холина, инозитола и этаноламина дает информацию о кинетике отдельных фосфолипидных молекулярных видов [55]. Данный подход имеет значительный потенциал для исследования заболеваний, связанных с нарушением липидного метаболизма. Более подробную информацию можно найти в обзоре [56].

Таблица 3. Примеры липидов, проанализированных методами масс-спектрометрии

Аналитический метод	Липиды	
Масс-спектрометрия	Электронная ионизация	Жирные кислоты, глицерофосфолипиды
	Химическая ионизация	ТАГ, жирные кислоты
	Ионизация быстрыми атомами	Жирные кислоты, глицерофосфолипиды, желчные кислоты, стероиды, ТАГ
	MALDI	Жирные кислоты, глицерофосфолипиды, сфинголипиды, ДАГ, ТАГ, стероиды
	Электрораспыление	Жирные кислоты, глицерофосфолипиды, сфинголипиды, фенольные липиды, желчные кислоты, стероиды
	Химическая ионизация при атм. давлении	Жирные кислоты, глицерофосфолипиды, ТАГ, стерины
	Фотоионизация при атм. давлении	Жирные кислоты, глицеролипиды, стерины (свободные и этерифицированные)
	Полевая десорбция	Глицерофосфолипиды
	Термоспрей	Глицерофосфолипиды, МАГ, ДАГ, эйкозаноиды

5.4.4. Капиллярный электрофорез, сопряженный с масс-спектрометрией (КЭ/МС)

Капиллярный электрофорез в комбинации с масс-спектрометрией можно применять как средство анализа липидов. Однако, в сравнении с ВЭЖХ, капиллярный электрофорез существенно проигрывает в разрешающей способности, что привело к его более редкому применению в липидомике. Подробно недостатки и достоинства КЭ/МС рассмотрены в обзоре Monton и Soga [57].

Почти во всех случаях для анализа липидов был использован ЭИИ. Так, Zamfir с соавт. разработали подход для анализа ганглиозидов [58].

Неводный КЭ в сочетании с МС [59] был использован для разделения основных классов фосфолипидов.

Ранее перспективным методом для метаболомных исследований считалась капиллярная электрохроматография, являющаяся гибридом КЭ и ВЭЖХ, совместное применение которой с масс-спектрометрией подробно описано в обзоре Klampfl [60]. На сегодняшний день данный подход также не получил распространения в метаболомных исследованиях.

5.5. Спектроскопические методы

В последние годы спектроскопические методы стали рассматривать как привлекательные,

перспективные аналитические методы для липидного анализа. Эта тенденция связана с инструментальным развитием, широким использованием компьютеров и разработкой соответствующих хемометрических процедур. В этом разделе представлены характеристики, преимущества, ограничения и возможности некоторых спектроскопических методов.

5.5.1. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) стала универсальным методом в липидном анализе. Метод позволяет выявить структуру, качественно и количественно проанализировать даже сложные смеси [61]. Не все ядра доступны для ЯМР, но те, которые доступны, играют важную роль в химии липидов (например, ^1H , ^{13}C и ^{31}P). ЯМР является мощным инструментом для выяснения молекулярных структур очищенных липидов (^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР) или для исследования структуры и динамики липидных мембран (^1H -ЯМР, ^2H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР с высоким разрешением и твердотельный ЯМР).

Метод ^{13}C -ЯМР на сегодняшний день является наиболее подходящим для анализа фосфолипидных смесей. Линейный отклик и относительно высокая скорость ^{13}C -ЯМР позволяет точно и селективно проанализировать большое количество образцов.

По сравнению с хроматографическими методами (например, ГХ и ВЭЖХ), ЯМР-спектроскопия имеет некоторые преимущества. ЯМР является неразрушающим методом и для количественного определения не требуется никаких специфических стандартов. Тем не менее, по сравнению с МС, методы ЯМР менее чувствительны. Кроме того, методы липидного анализа, основанные на ЯМР, как правило, ограничиваются перекрыванием сигналов в ^1H -ЯМР

спектрах и низкой природной распространенностью атомов ^{13}C .

Метод ВЭЖХ/ЯМР является одним из наиболее мощных методов разделения и структурного определения неизвестных соединений в смесях и, таким образом, представляет собой потенциально интересный, дополнительный к ВЭЖХ/МС метод для анализа сложных биологических матриц. Но как ни странно, пока не существует публикаций, которые могут продемонстрировать полезность метода ВЭЖХ/ЯМР в липидном анализе.

5.5.2. Колебательная спектроскопия

В целом, методы колебательной спектроскопии применимы для обнаружения изменений в режиме реального времени, в естественных условиях, без каких-либо меток и с пространственным разрешением в мкм-диапазоне, поэтому они признаны перспективными аналитическими методами [62]. Спектроскопия средней ИК-области имеет давнюю историю в химии липидов, вместе с двумя другими видами колебательной спектроскопии (т.е. ближняя ИК-область (NIR) и спектроскопия комбинационного рассеяния (Raman)). Большинство фундаментальных работ по ИК-спектроскопии липидов проводилось в период 1945-1965 гг., после чего интерес уменьшился, так как были разработаны новые методы (например, ГХ и ЯМР-спектроскопия). Однако, возрождение количественного липидного анализа методом ИК-спектроскопии началось в середине 1970-х годов с развитием ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием (FTIR).

В табл. 4 представлены различные типы ЯМР- и колебательной спектроскопии и классы липидов, которые могут быть проанализированы в каждом конкретном случае. В работе [63] представлена более подробная информация по многим спектральным методам.

Таблица 4. Примеры липидов, проанализированных различными спектроскопическими методами

Аналитический метод	Липиды
ЯМР	^1H Все липиды
	^{31}P Глицерофосфолипиды
	^{13}C Все липиды
Колебательная спектроскопия	NIR Жирные кислоты, стероидные липиды
	Raman Глицерофосфолипиды, стероидные липиды, сфинголипиды
	FTIR Жирные кислоты

6. Заключение

В настоящее время для анализа липидов используется широкий спектр аналитических платформ, в том числе ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия с непосредственным вводом пробы, ИК-спектроскопия с Фурье-преобразованием, ГХ/МС, ВЭЖХ/МС. Однако, несмотря на то, что значительный прогресс уже

достигнут, вероятно, ни одна из этих платформ не удовлетворяет всем критериям, необходимым для идеального глобального профилирования липидов. Чем больше результатов мы получим, используя разнообразные дополнительные методы, тем больше информации об образце мы будем иметь.

Большинство путей метаболизма липидов уже известны. Однако до сих пор до конца не

ясно, как эти пути реализуются в сложных биологических системах и, еще более важно знать то, какие именно изменения в регулировании этих систем могут привести к серьезным метаболическим и воспалительным заболеваниям. Новое направление – липидомика – это системное изучение всех липидов и молекул, с которыми они взаимодействуют, и их функции внутри клетки.

К счастью для исследователей, в настоящее время появляются аналитические методики, необходимые для построения этих интегрированных знаний. Новые аналитические возможности обещают сделать прорыв в понимании биологии липидов и тех изменений в регулировании их метаболизма, которые приводят к развитию различных патологий.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Lipid Analysis. Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids / W.W. Christie, X. Han (Eds.). – The Oily Press, 2003. 446 p.
2. Fahy E., Subramaniam S., Brown H.A. A comprehensive classification system for lipids // *J. Lipid Res.* 2005. V. 46. P. 839–861.
3. Orešič M., Hänninen V.A., Vidal-Puig A. Lipidomics: A new window to biomedical frontiers // *Trends in Biotechnology.* 2008. V. 26. P. 647–652.
4. Brown H.A., Gutowski S., Moomaw C.R., Slaughter C. ADP ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity // *Cell.* 1993. V. 75. P. 1137–1144.
5. Singer W.D., Brown H.A., Sternweis P.C. Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D // *Annu. Rev. Biochem.* 1997. V. 66. P. 475–509.
6. Wing M., Bourdon D.M., Harden T.K. PLC- ϵ : A shared effector protein in Ras-, Rho-, and G $\alpha\beta\gamma$ -mediated signaling // *Mol. Interv.* 2003. V. 3. P. 273–280.
7. Mills G.B., Moolenaar W.H. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer // *Nat. Rev. Cancer.* 2003. V. 3. P. 3582–5391.
8. Franke T.F., Kaplan D.R., Cantley L.C., Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate // *Science.* 1997. V. 275. P. 665–668.
9. Christie W.W. Preparation of lipid extracts from tissues // *Adv. Lipid Methodol.* 1993. V. 2. P. 195–213.
10. Folch J., Ascoli I., Lees M. Preparation of lipid extracts from brain tissue // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 191. P. 833–841.
11. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // *Biochem. Physiol.* 1959. V. 37. P. 911–917.
12. Lin J.T., Liu D.Y., Yang M.H. Ethyl acetate/ethyl alcohol mixtures as an alternative to Folch reagent for extracting animal lipids // *J. Agric. Food Chem.* 2004. V. 52. P. 4984–4986.
13. Matyash V., Liebisch G., Kurzchalia T.V. Lipid extraction by methyl-*tert*-butyl ether for high-throughput lipidomics // *J. Lipid Res.* 2008. V. 49. P. 1137–1146.
14. Kim H.Y., Salem Jr.N. Separation of lipid classes by solid phase extraction // *J. Lipid Res.* 1990. V. 31. P. 2285–2289.
15. Ruiz-Gutierrez V., Perez-Camino M.C. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds // *J. Chromatogr. A.* 2000. V. 885. P. 321–341.
16. Isaac G. Development of enhanced analytical methodology for lipid analysis from sampling to detection. A targeted lipidomics approach: thesis. – Sweden, Uppsala University, 2005. 230 p.
17. Han X., Yang J., Cheng H. Toward fingerprinting cellular lipidomes directly from biological samples by two-dimensional electrospray ionization mass spectrometry // *Anal. Biochem.* 2004. V. 330. P. 317–331.
18. Halkina T., Sherma J. Determination of sterols and fatty acids in prostate health dietary supplements by silica gel high performance thin layer chromatography with visible mode densitometry // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2007. V. 30. P. 2329–2335.
19. Christie W.W. *Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide.* – The Oily Press, 1989. 191 p.
20. Mossoba M.M., Adam M., Lee T. Rapid determination of total trans fat content – an attenuated total reflection infrared spectroscopy international collaborative study // *J. AOAC Int.* 2001. V. 84. P. 1144–1150.
21. Mondello L., Casilli A., Tranchida P.Q. Evaluation of fast gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry in the analysis of lipids // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1035. P. 237–247.
22. Bondia-Pons I., Castellote A.I., Lopez-Sabater M.C. Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination // *J. Chromatogr. B.* 2004. V. 809. P. 339–344.
23. Mossoba M.M., McDonald R.E., Yurawecz M.P. Application of on-line capillary GC-FTIR spectroscopy to lipid analysis // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2001. V. 103. P. 826–830.
24. Lin J.T. HPLC separation of acyl lipid classes // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2007. V. 30. P. 2005.

25. Schaefer A., Kuchler T., Simat T.J. Migration of lubricants from food packagings. Screening for lipid classes and quantitative estimation using normal-phase liquid chromatographic separation with evaporative light scattering detection // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 1017. P. 107–116.
26. Nikolova-Damyanova B., Momchilova S. Silver ion HPLC for the analysis of positionally isomeric fatty acids // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2002. V. 25. P. 1947–1965.
27. Peterson B.L., Cummings B.S. A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples // *Biomed. Chromatogr.* 2006. V. 20. P. 227–243.
28. Rainville P.D., Stumpf C.L., Shockcor J.P., Plumb R.S., Nicholson J.K. Novel application of reversed-phase UPLC-oeTOF-MS for lipid analysis in complex biological mixtures: A new tool for lipidomics // *Proteome Res.* 2007. V. 4. P. 552–558.
29. Perona J.S., Ruiz-Gutierrez V. Simultaneous determination of molecular species of monoacylglycerols, diacylglycerols and triacylglycerols in human very-low-density lipoproteins by reversed-phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. B*. 2003. V. 785. P. 89–99.
30. Moreau R. The analysis of lipids via HPLC with a charged aerosol detector // *Lipids*. 2006. V. 41. P. 727–734.
31. Mondello L., Tranchida P., Dugo P., Dugo G. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: A review // *Mass Spectrom Rev.* 2008. V. 27. P. 101–124.
32. Lesellier E. Analysis of non-saponifiable lipids by super-/subcritical-fluid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2001. V. 936. P. 201–214.
33. Lin J.T. HPLC of Acyl Lipids. – HNB Publishing, 2005. 576 p.
34. Gao F., Dong J., Li W. Separation of phospholipids by capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet detection // *J. Chromatogr. A*. 2006. V. 1130. P. 259–264.
35. Chen Y.L., Xu Y. Determination of lysophosphatidic acids by capillary electrophoresis with indirect ultraviolet detection // *J. Chromatogr. B*. 2001. V. 753. P. 355–363.
36. Mofaddel N., Desbene-Monvernay A. Fatty acid analysis using capillary electrophoresis // *Analysis*. 1999. V. 27. P. 120–124.
37. Han H., Gross R.W. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: A bridge to lipidomics // *J. Lipid Res.* 2003. V. 44. P. 1071–1079.
38. Liebisch G., Binder M., Schifferer R. Glycerophospholipid identification and quantitation by electrospray ionization mass spectrometry // *Methods in Enzymol.* 2007. V. 432. P. 21–57.
39. Ivanova P.T., Milne S.B., Forrester J. S. LIPID arrays: New tools in the understanding of membrane dynamics and lipid signaling // *Mol. Interv.* 2004. V. 4. № 2. P. 86–96.
40. Biedermann W., Luercker E., Poerschmann J. Structural characterization of some fatty acids from the brain as biomarkers of BSE risk material // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 379. P. 1031–1038.
41. Keller S., Jahreis G. Determination of underivatized sterols and bile acid trimethyl silyl ether methyl esters by gas chromatography-mass spectrometry-single ion monitoring in faeces // *J. Chromatogr. B*. 2004. V. 813. P. 199–207.
42. Roessner U., Willmitzer L., Fernie A.R. High-resolution metabolic phenotyping of genetically and environmentally diverse potato tuber systems. Identification of phenocopies // *Plant Physiol.* 2001. V. 127. P. 749–764.
43. Winder C.L., Dunn W.B., Schuler S. Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures: An evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 2939–2948.
44. Kayganich-Harrison K.A., Murphy R.C. Characterization of chain-shortened oxidized glycerophosphocholine lipids using fast atom bombardment and tandem mass spectrometry // *Anal. Biochem.* 1994. V. 221. P. 16–24.
45. Milne S., Ivanova P., Forrester J. Lipidomics: An analysis of cellular lipids by ESI-MS // *Methods*. 2006. V. 39. P. 92–103.
46. Han X., Gross R.W. Structural determination of picomole amounts of phospholipids via electrospray ionization tandem mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1995. V. 6. P. 1202–1210.
47. Smith P.B., Snyder A.P., Harden C.S. Characterization of bacterial phospholipids by electrospray ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* 1995. V. 67. P. 1824–1830.
48. Han X., Gross R.W. Quantitative analysis and molecular species fingerprinting of triacylglyceride molecular species directly from lipid extracts of biological samples by electrospray ionization tandem mass spectrometry // *Anal. Biochem.* 2001. V. 295. P. 88–100.
49. Byrdwell W.C. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids // *Lipids*. 2001. V. 36. P. 327–346.
50. Rezanka T., Sigler K. Structural analysis of a polysaccharide from *Chlorella kessleri* by means of gas chromatography-mass spectrometry of its saccharide alditols // *Curr. Anal. Chem.* 2007. V. 52. P. 246–252.

51. Cai S.S., Syage J.A. Comparison of atmospheric pressure photoionization, atmospheric pressure chemical ionization, and electrospray ionization mass spectrometry for analysis of lipids // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. P. 1191–1199.
52. Schiller J., Suss R., Arnhold J. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research // *Prog. Lipid Res.* 2004. V. 43. P. 449.
53. Schiller J., Suss R., Fuchs B. MALDI-TOF MS in lipidomics // *Front. Biosci.* 2007. V. 12. P. 2568–2579.
54. Murphy R.C., Fiedler J., Hevko J. Analysis of nonvolatile lipids by mass spectrometry // *Chem. Rev.* 2001. V. 110. P. 479–526.
55. Bernhard W., Pynn C.J., Jaworski A., Rau G.A., Hohlfeld J.M., Freihorst J., Poets C.F., Stoll D., Postle A.D. Mass spectrometric analysis of surfactant metabolism in human volunteers using deuteriated choline // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004. V. 170. P. 54–58.
56. Postle A.D., Hunt A.N. Dynamic lipidomics with stable isotope labeling // *J. Chromatogr. B.* 2009. V. 877. P. 2716–2721.
57. Monton M.R., Soga T. Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2007. V. 1168. P. 237–246.
58. Zamfir A., Vukelic Z., Peter-Katalinic J. A capillary electrophoresis and off-line capillary electro-phoresis/electrospray ionization-quadrupole time of flight-tandem mass spectrometry approach for ganglioside analysis // *Electrophoresis.* 2002. V. 23. P. 2894–2903.
59. Fetsch D., Havel J. Capillary zone electrophoresis for the separation and characterization of humic acids // *J. Chromatogr. A.* 1998. V. 802. P. 189–202.
60. Klampfl C.W. Review coupling of capillary electrochromatography to mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1044. P. 131–144.
61. Diehl B.W.K. Multinuclear high resolution NMR spectroscopy / In: *Lipid Analysis of Oils and Fats.* – London: Chapman & Hall, 1998. 87 p.
62. Voort F.R., Sedman J., Russin T. Lipid analysis by vibrational spectroscopy // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2001. V. 103. P. 815–826.
63. Dufour E. Spectroscopic techniques (NMR, infrared and fluorescence) for the determination of lipid composition and structure in dairy products. – Springer, 2006. 240 p.