



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА *MALDI/TOF/MS* ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПОНЕНТОВ ЖИРНЫХ МАСЕЛ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

О.О. НОВИКОВ
Д.И. ПИСАРЕВ
О.А. ВАНХИН

*Белгородский
государственный
национальный
исследовательский
университет*

e-mail: novikov@bsu.edu.ru

В статье представлены результаты изучения липофильных компонентов жирных масел, а именно триглицеридов и каротиноидов методом *MALDI/TOF/MS*. В результате авторами установлено, что используя метод *MALDI/TOF/MS* можно получить объем информации, позволяющий сделать объективный вывод о составе жирных масел и каротиноидов жирных масел. Кроме того, с помощью *MALDI/TOF/MS* удалось проконтролировать результаты гидролиза триглицеридов и определить состав жирных кислот, формирующих жирные масла.

Ключевые слова: жирные масла, триацилглицериды, каротиноиды, *MALDI/TOF/MS*.

Липиды формируют вместе с углеводами и белками главную массу органических веществ живой материи. Они присутствуют в организмах различного происхождения: растительных, животных, бактериальных. В высокой концентрации липиды (особенно фосфолипиды) обнаружены в различных органах животных и человека: головном и спинном мозге, крови, печени, сердце. Особенно велико содержание липидов в нервных тканях (20-25%). Липиды входят в состав всех структурных элементов клетки, в первую очередь, клеточных мембран и мембран субклеточных частиц. С участием липидов протекают такие важнейшие биохимические процессы, как передача нервного импульса, активный перенос через мембраны, транспорт жиров в плазме крови, синтез белка и другие ферментативные процессы, особенно связанные с цепью переноса электронов и окислительным фосфорилированием [1].

Растительные масла являются одними из наиболее часто употребляемых продуктов в пищевом рационе. Известно, что потребление растительных масел оказывает огромное влияние на физиологию человека, в том числе на липидный обмен, развитие хронических заболеваний и общее здоровье.

Жиры растительного происхождения являются источником эссенциальных жирных кислот. К эссенциальным относят линолевую, линоленовую, арахионовую и некоторые другие полиненасыщенные жирные кислоты.

Из гамма-линоленовой и линолевой кислот образуются эйкозапентаеновая и деказагексаеновая кислоты. Эти кислоты участвуют в регуляции метаболических процессов, синтезе простагландинов, в построении клеточных мембран. Они способствуют образованию митохондрий в клетках, понижают уровень холестерина и триглицеридов, уменьшают риск тромбообразования, нормализуют работу желез внутренней секреции, регулируют менструальный цикл, помогают при климаксе, оказывают противовоспалительное действие, снижают артериальное давление [1, 3].

При отсутствии или недостатке таких кислот в организме холестерин образует с насыщенными жирными кислотами сложные эфиры, очень трудно окисляющиеся при обмене веществ. Вследствие химической стойкости они накапливаются в крови и откладываются на стенках артерий. При достаточном количестве эссенциальных жирных кислот в организме они образуют с холестерином сложные эфиры, которые при обмене веществ окисляются до низкомолекулярных соединений и легко выводятся из организма.

Для анализа триацилглицеридов применяются различные методы. Классические хроматографические методы являются наиболее часто используемыми. В их числе ГЖХ, ВЭЖХ, ТСХ и сверхкритическая жидкостная хроматография. Но, несмотря на их широкое распространение, они имеют ряд недостатков. Например, трудности с элюированием триацилглицеридов из колонок ВЭЖХ и ГЖХ, факторы отклика детектора, необходимые особенно для количественной оценки. Таким образом, для достижения полной аналитической картины используются сочетания хроматографических методов, требующих длительной пробоподготовки и собственно хроматографирования. Кроме того, эти виды анализа не позволяют выявить фактические триацилглицериды, а только общий процент индивидуальных жирных кислот. В этих методах определяются не сами жирные масла, а их метиловые эфиры, поскольку они менее по-



лярны, чем соответствующие жирные кислоты, и поэтому лучше совместимы с различными хроматографическими системами.

При анализе «профиля липидов» масел достаточно широко используются как газовая хроматография (ГХ), так и жидкостная – ВЭЖХ [4, 9]. Разделение липидов методом ВЭЖХ можно проводить и без предварительной пробоподготовки и омыления липидов, используя вариант с обращенными фазами (ОФ ВЭЖХ) и неполярным растворителем. Единственным затруднением этого метода является то, что для идентификации пиков приходится использовать неселективные детекторы, в частности, испарительный детектор светорассеяния (*ELSD*). Такой детектор не обладает линейностью отклика, и с целью устранения этого недостатка используются добавки в образец холестерина, образующего молекулярные ассоциаты с триглицеридами, а также нитрата серебра для повышения чувствительности анализа [7].

Известно и применение масс-спектрометрических детекторов с той же целью. Например, в работе [8] исследован состав липидов рисового масла комплексной жидкостной хроматографией, включающей различные механизмы разделения (взаимодействие с ионом серебра и неводную ОФ ВЭЖХ). В качестве детектора использовался масс-спектрометр с химической ионизацией при атмосферном давлении (*APCI/MS*).

Установлено, что *MALDI/TOF/MS* можно использовать в анализе жирных кислот. Количественный анализ жирных кислот из пяти триацилглицеролов кокосового, пальмового масел, сала и масла какао проводился с использованием двух методов анализа: *MALDI/TOF/MS* и газовой хроматографии. Для газохроматографического анализа было использовано метилирование продуктов, в то время как для *MALDI/TOF/MS* анализа применяли омыление. При *MALDI/TOF/MS* условиях кислоты были обнаружены как аддукты с ионом натрия [RCOONa Na^+]⁽⁺⁾. Количественным анализом газовой хроматографией соответствующих метиловых эфиров триацилглицеридов получены данные, которые коррелировали с *MALDI/TOF/MS* данными. Кроме того, способность *MALDI/TOF/MS* для обнаружения низких концентраций жирных кислот делает ее более чувствительной, чем классическая газовая хроматография [5].

Затруднения при исследовании состава жирных кислот методом ГХ вызваны тем обстоятельством, что последние плохо разделяются на капиллярных колонках с неполярной неподвижной фазой. Наибольшими возможностями по разделению ненасыщенных жирных кислот обладают углеродистые колонки [6].

Другой важной группой липидов являются каротиноиды. Из всех классов природных пигментов каротиноиды, по-видимому, наиболее широко распространены и, несомненно, принадлежат к числу наиболее важных соединений. Они обнаружены у всех представителей растительного царства, а также часто встречаются у микроорганизмов. Каротиноиды и их производные имеют большое значение для животных, поскольку являются основой зрительных пигментов, ответственных за восприятие света и различение цветов [2].

Для идентификации каротиноидов в растительном сырье используют физико-химические методы, в первую очередь, УФ-спектроскопию.

MALDI/TOF/MS первоначально использовался в основном для анализа белков и пептидов, синтетических полимеров и полисахаридов.

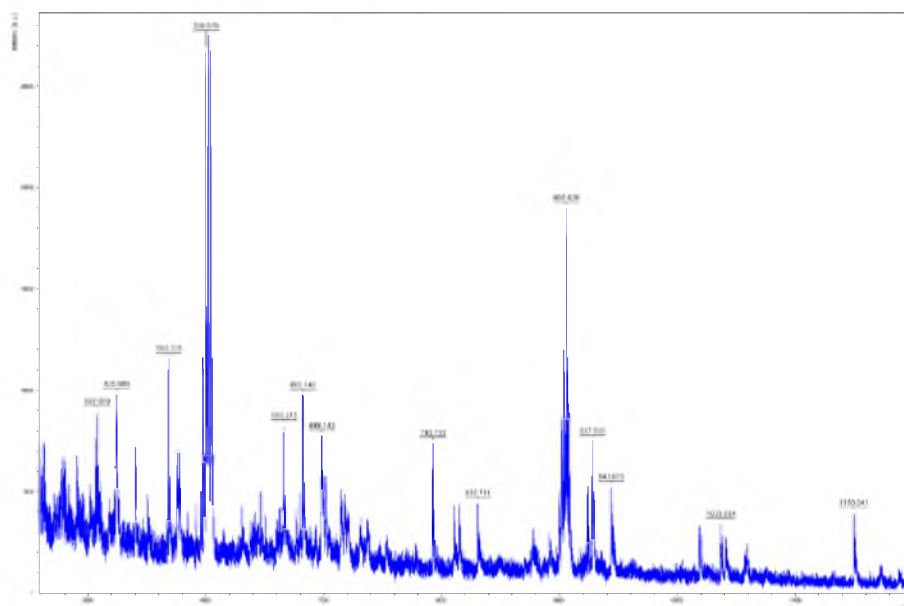
Таким образом, целью настоящего исследования является подтверждение использования метода *MALDI/TOF/MS* как легкого, быстрого и надежного способа идентификации триацилглицеридов и каротиноидов в растительных объектах.

Для установления возможности идентификации триацилглицеридов методом *MALDI/TOF/MS* использованы образцы широко используемых жирных масел облепихи крушиновидной – *Hippophae rhamnoides*, и шиповника – *Rosa canina*.

Указанные жирные масла в количестве по 0,5 μl помещали в пробирки градуированные ёмкостью 1,5 мл, прибавляли по 1 мл смеси 0,1%-ного раствора кислоты трифторуксусной и ацетонитрила в соотношениях 7:1 и встряхивали на шейкере. Полученные растворы наносили на мишень «*MTP 384 target plate matt steel TF*» и после высыхания сверху наносили каплю матрицы – α -цианокоричной кислоты. После высушивания проб мишень помещали в масс-спектрометр и регистрировали масс-спектры испытуемых образцов в диапазоне 400-1200 *Da*. Молекулярные массы сложных эфиров глицерина и высших жирных кислот должны находиться в диапазоне 800-1000 *Da*/ а также каротиноидов, которыми богаты испытуемые масла. Каротиноиды обнаруживаются в диапазоне 460-600 *Da*.

Полученные спектры представлены на рис. 1-2.

На представленных рисунках присутствуют пики молекулярных ионов в диапазоне от $m/z = 901$ до 907 *Da*, хотя молекулярные массы триацилглицеридов лежат в пределах 878-882 *Da*. Это свидетельствует о том, что анализируемые триацилглицериды находятся в виде аддуктов с ионом натрия.





ненасыщенных жирных кислот – линолевой и олеиновой.

Чтобы установить состав жирных масел в проанализированных извлечениях, был проведён щелочной гидролиз триацилглицеридов. Продукты гидролиза подвергли масс-спектрометрированию. На полученных спектрах можно обнаружить присутствие жирных кислот в виде аддуктов с ионом натрия. Масс-спектрометрический профиль продуктов гидролиза во всех случаях оказался однотипным, поэтому на рис. 3 представлен унифицированный спектр жирных кислот, обнаруженных во всех образцах.

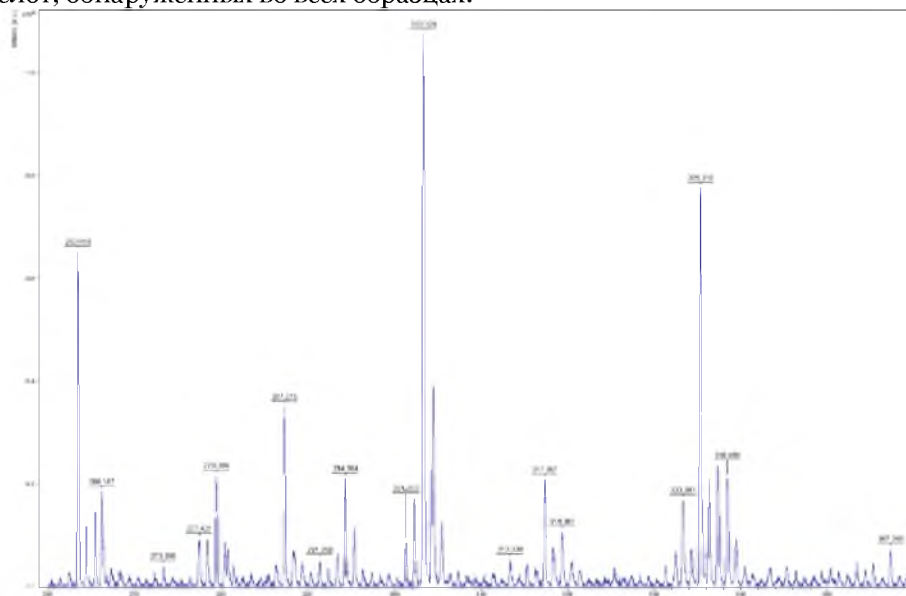


Рис. 3. Масс-спектр жирных кислот исследуемых триацилглицеридов

Состав жирных кислот, установленных в ходе масс-спектрометрического изучения, представлен в табл. 2.

Таблица 2

Результаты идентификации жирных кислот, полученных методом масс-спектрометрии

<i>m/z</i>	Жирные кислоты, входящие в состав триацилглицерида	Число атомов углерода и двойных связей
279	Пальмитиновая	16:0
301	Линоленовая	18:3
303	Линолевая	18:2
305	Олеиновая	18:1
335	Арахидиновая	20:0

Согласно приведённым в табл. 2 результатам, во всех образцах установлено присутствие 5 жирных кислот как насыщенного ряда (пальмитиновая, арахидиновая), так и ненасыщенного (олеиновая, линолевая, линоленовая).

Таким образом, в ходе настоящего исследования нами установлено, что, используя метод *MALDI/TOF/MS*, можно получить объём информации, позволяющий сделать объективный вывод о составе жирных масел и каротиноидов жирных масел. Кроме того, с помощью *MALDI/TOF/MS* удалось проконтролировать результаты гидролиза триглицеридов и определить состав жирных кислот, формирующих жирные масла.

Литература

1. Биохимия : учебник / Т. Л. Алейникова, Л. В. Авдеева, Л. Е. Андрианова [и др.] ; под ред. Е. С. Северина. – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 784 с. – (XXI век).
2. Бриттон, Г. Биохимия природных пигментов / Г. Бриттон ; пер. с англ. В. Д. Цыдендамбаева ; под ред. М. Н. Запрометова. – М. : Мир, 1986. – 422 с.
3. Сравнительное экспериментальное изучение влияния масел семян ослинника, календулы, эхинацеи, лоуха на репаративные процессы в коже и слизистой оболочке желудка животных / А. И. Багинская, В. К. Колхир, Т. Е. Лескова [и др.] // Сборник научных трудов / Рос. акад. с.-х. наук, Всерос. науч.-исслед. ин-т лекарств. и аромат. растений (ВИЛАР) ; под общ. ред. В. А. Быкова. – М., 2006. –



Т. 17 : Химия, технология, медицина : материалы междунар. конф., посвящ. 75-летию образования Всерос. науч.-исслед. ин-та лекарств. и аромат. растений. – С. 437-443.

4. Buchgraber, M. Cluster Analysis for the Systematic Grouping of Genuine Cocoa Butter and Cocoa Butter Equivalent Samples Based on Triglyceride Patterns / M. Buchgraber, F. Ulberth, E. Anklam // *J. Agric. Food Chem.* – 2004. – Vol. 52, № 12. – P. 3855-3860.

5. Comparative quantitative fatty acid analysis of triacylglycerols using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and gas chromatography / C. Hlongwane, I. G. Delves, L. W. Wan [et al.] // *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* – 2001. – Vol. 15, № 21. – P. 2027-2034.

6. Gaudin, K. Retention behavior of unsaturated fatty acid methyl esters on porous graphitic carbon / K. Gaudin, P. Chaminade, A. Baillet // *J. Sep. Sci.* – 2004. – Vol. 27, № 1-2. – P. 41-46.

7. Héron, S. Post-column addition as a method of controlling triacylglycerol response coefficient of an evaporative light scattering detector in liquid chromatography-evaporative light-scattering detection / S. Héron, M. Dreux, A. Tchaplal // *J. Chromatogr. A.* – 2004. – Vol. 1035, № 2. – P. 221-225.

8. Silver-ion reversed-phase comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in lipidic food analysis / L. Mondello, P. Q. Tranchida, V. Stanekb [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2005. – Vol. 1086, № 1-2. – P. 91-98.

9. Triacylglycerol profiling by using chromatographic techniques / M. Buchgraber, F. Ulberth, H. Emons [et al.] // *European Journal of Lipid Science and Technology.* – 2004. – Vol. 106, № 9. – P. 621-648.

THE USE OF MALDI / TOF / MS FOR RESEARCH OF FATTY OILS COMPONENTS OF VEGETABLE ORIGIN

O.O. NOVIKOV
D.I. PISAREV

*Belgorod National
Research University*

e-mail: novikov@bsu.edu.ru

The article presents the results of a study of lipophilic components of fatty oils, namely triglycerides and carotenoids by MALDI / TOF / MS. As a result, the authors found that the method using MALDI / TOF / MS can get the amount of information that allows you to draw objective conclusions about the composition of fatty oils, fatty acids and carotenoids. Furthermore, using MALDI / TOF / MS results under controlled hydrolysis of triglycerides and fatty acids to determine the composition, forming a fatty oil.

Key words : fatty oils, triacylglycerides, carotenoids, MALDI / TOF / MS.