

**АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В АНАЛИЗЕ ЖИРНЫХ
КИСЛОТ, КАРОТИНОИДОВ И СТЕРОИДОВ В ЛИПИДАХ И
ЛИПИДНЫХ ПРЕПАРАТАХ ИЗ ГИДРОБИОНТОВ**

© 2006 г. В.Г. Рыбин, К.Г. Павель, А.Е. Караулов

Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр,
Владивосток 690950

Поступила в редакцию 13.05.2005 г.

Окончательный вариант получен 20.09.2005 г.

Показано применение высокоэффективной жидкостной хроматографии для осуществления достоверной идентификации ряда веществ липидной природы в тканях гидробионтов и получаемых из них препаратах. Предложены условия проведения ВЭЖХ анализа сложных смесей жирных кислот в виде их этаноламидов. Разработаны условия и обоснованы критерии идентификации пространственных изомеров каротиноидов в процессе проведения ВЭЖХ анализа. Разработаны и обоснованы условия одновременного определения некоторых стероидных гормонов, в том числе и экдистероидов. Результаты были применены в анализе липидных субстанций промысловых видов гидробионтов: сайры *Cololabis saira*, кукумарии *Cucumaria japonica*, краба-стригуна *Chionoecetes opilio* и камчатского краба *Paralithodes camtschatica*.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время одним из ключевых методов в тонком биохимическом анализе является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Список разнообразных веществ, к которым когда-либо применялся данный метод, очень велик. Не являются исключением и вещества липидной природы. Тем не менее, так как представители данного класса метаболитов очень многообразны и различны по строению и свойствам, то процедуре одновременного хроматографического анализа могут быть подвергнуты, как правило, отдельные, близкие по структуре и свойствам представители этого класса веществ. В связи с этим, несмотря на разнообразие существующих методик, они не являются универсальными. Кроме того, особенности происхождения анализируемой биосубстанции определяют необходимость апробации известных методик, а, в случае необходимости, их корректировки. При этом необходимо учитывать как происхождение определяемых веществ, так и их структурные особенности. Например, высокоэффективная жидкостная хроматография применялась к анализу смесей жирных кислот липидов различного происхождения (Coors, 1993a), однако различия в составе жирных кислот липидов разных биологических объектов определяют свой специфический подход в их анализе. То же самое можно отнести и к другим представителям веществ липидной природы – каротиноидам (Britton et al., 1995a), стероидам (Вельтер, 1988; Coors, 1993b), жирорастворимым

витаминам (Mladek, 1993) и пр. Особую важность имеет и происхождение биологического объекта, липиды которого исследуются. С этой точки зрения, гидробионты, несмотря на повышенный к ним интерес – как источникам биологически ценного сырья, в этом отношении остаются в большинстве своем не достаточно хорошо исследованными. Поэтому необходимо проводить постоянную регулировку аналитических систем и подходов, в том числе и хроматографических, для готовности их применения как к любому, заведомо выбранному биологическому объекту, так и продукции, получаемой из него.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Биологический материал.

Образцы сайры *Cololabis saira* были собраны в восточном прибрежном районе Тихого океана малой Курильской гряды в августе 2004 г. Образцы кукумарии *Cucumaria japonica* были собраны в заливе Петра Великого Японского моря в июне 2004 г. Образцы крабов *Chionoecetes opilio* и *Paralithodes camtschatica* были собраны в заливе Петра Великого Японского моря в октябре 2004 г. Все образцы хранились при минус 20 °С.

Реактивы и растворители.

Все используемые в работе реактивы были квалификации «хч». Растворители были квалификации «хч» и очищались перед работой по стандартным методикам (Гордон, Форд, 1976). Стандарты эстрона, Δ^4 -андростендиона, 5α -андростан-3,17-диона, эпиандростерона, 5α -андростан-3 α ,17 β -диола, тестостерона, 17 β -эстрадиола, 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизона, интегристерона А, α -экдизона и 20-гидроксиэкдизона были приобретены у химической компании «Sigma», США. Этаноламиды жирных кислот получали, как описано ранее (Karaulov et al., 2004).

Экстракция липидов.

Экстракцию общих липидов из *Col. saira* и *C. japonica* осуществляли по методу Блайя и Дайера (Bligh, Dyer, 1959). Экстракцию экистероидов осуществляли следующим образом: образцы гемолимфы *Ch. opilio* и *P. camtschatica* смешивали с системой растворителей хлороформ-этанол (1:1) и центрифугировали при 6 300 g. Хлороформно-спиртовой слой отделяли и сушили над безводным сульфатом натрия. Органические растворители удаляли в вакууме (остаточное давление 30-40 мм. рт. ст.) при температуре 35 °С. Сухой остаток взвешивали и растворяли в 95%-ном водном этаноле. Для удаления гидрофобных соединений экстракт промывали гексаном (2 x 10 мл). Водно-спиртовую фракцию сушили в вакууме до постоянного веса, сухой остаток растворяли в 5 мл 10%-го водного этанола. Твердофазную экстракцию экистероидов осуществляли на колонке Supelclean C₁₈ («Supelco», США) с использованием водно-этанольных систем в качестве элюента.

Тонкослойная хроматография.

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Silufol («Kavalier», Чехия) с использованием в качестве элюентов следующих систем растворителей: гексан-диэтиловый эфир (1:1) – для анализа общих липидов и каротиноидов, гексан-ацетон (1:1) – для анализа этаноламидов жирных кислот, хлороформ-этанол (4:1) – для анализа экистероидов. Пластинки проявляли опрыскиванием 10%-ным раствором фосфорномолибденовой кислоты в этаноле – для анализа общих липидов и каротиноидов, а также этаноламидов жирных кислот, и ванилин-серным реактивом (3 г ванилина, 100 мл этанола, 0,5 мл серной кислоты) с последующим подогревом до 110 °С во всех случаях.

Колоночная хроматография каротиноидов.

Хроматографию проводили на колонке с 10 г силикагеля L Chemapol (Чехия) с размерами частиц 40-100 мкм. На колонку наносили 300 мг сухой смеси липидов из внутренностей *Cucumaria japonica*. Элюировали в следующей последовательности: сначала гексаном (100 мл), затем бензолом (200 мл) и далее смесью бензол-диэтиловый эфир (1:1, 300 мл). Элюат собирали в пробирки по 10-15 мл. Фракции, по данным ТСХ содержащие близкие по составу смеси, объединяли и упаривали в вакууме (остаточное давление 30-40 мм. рт. ст.) до постоянного веса при температуре 35 °С.

Высокоэффективная жидкостная хроматография.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) осуществляли на хромато-масс-спектрометре 1100 Series LC/MSD («Agilent», США), снабженном УФ-детектором на диодной матрице («Agilent», США) и рефрактометрическим детектором RID-6A («Shimadzu», Япония), в режиме химической ионизации при атмосферном давлении (ХИАД). Диапазон регистрируемых масс составил 150-1 000 Да (режим регистрации положительных ионов), напряжение на фрагменторе 70 В, напряжение в ионизационной камере 4 кВ, поток газа-осушителя (азот) 6 л/мин и давление газа-распылителя (азот) 50 кгс/см². УФ-сигнал регистрировали в диапазоне 200-800 нм. В работе использовалась колонка Hypersil ODS (4,0 x 250 мм, 5 мкм), температура колонки 55 °С. В качестве элюента использовали: ацетонитрил – анализ каротиноидов (расход элюента 0,5 мл/мин), систему растворителей ацетонитрил-вода (20:80) – анализ экистероидов (расход элюента 1 мл/мин), систему растворителей ацетонитрил-вода (50:50) – анализ стероидных гормонов (расход элюента 1 мл/мин). Анализ этаноламидов жирных кислот проводили в режиме линейного градиентного элюирования от 55%-го водного ацетонитрила до 100%-го ацетонитрила со скоростью 2,25% в мин (расход элюента 1 мл/мин).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Характеристика состава жирных кислот липидов.

ВЭЖХ может быть легко применима в анализе состава жирных кислот как липидов, так и получаемых из них препаратов. Несмотря на широко использующийся в настоящее время подход к анализу жирных кислот методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ), ВЭЖХ анализ предпочтителен в ряде особых случаев. Например, если нужно осуществить определение свободных жирных кислот, то в случае их анализа методом ГЖХ возникает ряд осложнений, связанных с необходимостью проведения предварительного этапа отделения анализируемой субстанции от суммарных липидов. На этом этапе существует риск потери жирных кислот, и, как следствие, снижается точность анализа. Применение ВЭЖХ в анализе свободных жирных кислот не требует обязательного сепарирования анализируемой липидной субстанции, а использование комплекса детекторов (рефрактометрический, флуоресцентный, УФ-, масс-селективный – в зависимости от характера дериватизации жирных кислот), позволяет проводить достоверную, основанную на структурных особенностях жирных кислот, их идентификацию в сложных липидных смесях. При этом, мы ранее предлагали проведение дериватизации карбоксильных групп свободных жирных кислот посредством их трансформации в дансилгидразиды (флуоресценция, хорошая ионизируемость в условиях ХИАД для масс-селективного детектирования, разрешение проблемы «критических пар») (Грецкая и др., 2001). Мы установили, что в случае трансформации жирных кислот в этаноламиды, облегчается идентификация последних благодаря хорошей ионизируемости в условиях ХИАД для масс-селективного детектирования, разрешается проблема «критических пар», а также появляется возможность фильтрации хроматографического сигнала по четности/нечетности m/z . При этом проведение этерификации как промежуточной стадии синтеза этаноламидов жирных кислот не влияет на качество проведения анализа (Karaulov et al., 2004). Мы разработали оптимальные условия проведения аналитических процедур для данного варианта.

На рисунке 1 в качестве примера приведены результаты проведения ВЭЖХ анализа сложной смеси этаноламидов жирных кислот из жира *Col. saira*. Как видно на хроматограмме, на участке элюирования всех исследуемых этаноламидов жирных кислот отсутствуют другие липидные компоненты анализируемой смеси – полярные элюируются раньше производных гексадекатетраеновой ($n-3$) кислоты, а неполярные – позже производных докозеновой кислоты, последней, элюирующейся в анализируемой смеси жирных кислот. В случае ВЭЖХ анализа жирных кислот в виде их этаноламидов кроме разрешения проблемы критических пар, например тетрадекановая и эйкозапентаеновая ($n-3$) кислоты, были идентифицированы некоторые жирные кислоты, определение которых газо-жидкостной хроматографией по значениям их индексов удерживания

вызывает некоторые затруднения. Это пентадеценовая, гексадекатетрасная (два изомера), изогептадекановая, эйкозадеценовая (*n*-9), докозапентаеновая (*n*-6) и тетраэзогексаеновая кислоты. Полный состав жирных кислот, определенный на основании результатов ВЭЖХ анализа их этаноламидов, приведен в таблице 1.

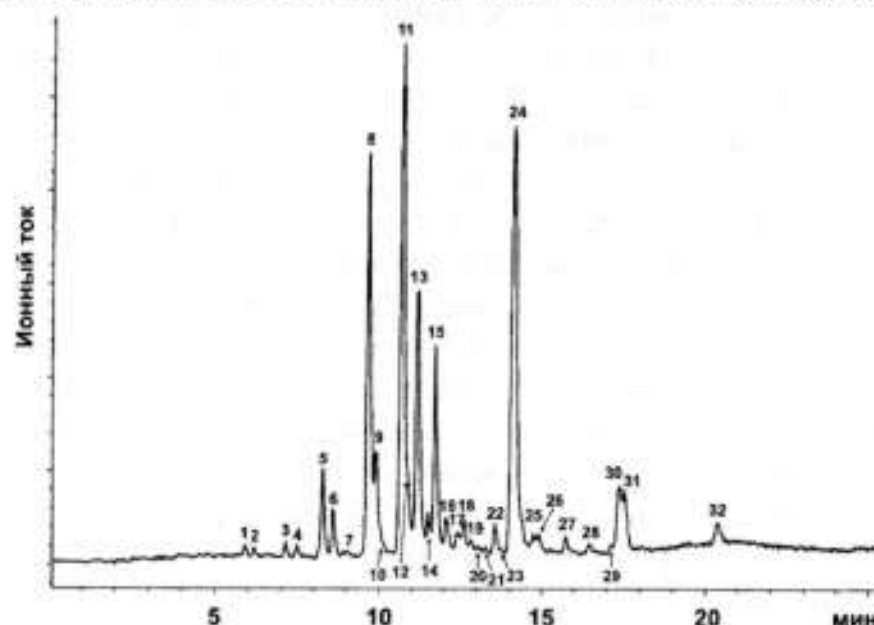


Рис. 1. ВЭЖХ анализ этаноламидов жирных кислот из жира *Col. saira*. Отнесение сигналов показано в таблице 1.

Fig. 1. HPLC analysis of fatty acids ethanolamides prepared from *Col. saira* oil. Signals assignment is shown in table 1.

Таблица 1. Отнесение сигналов хроматографических пиков (рис. 1).

Table 1. Signals assignments of chromatographic peaks (fig. 1).

№ пика	$[M+H]^+$, m/z	Отнесение (этаноламид)	№ пика	$[M+H]^+$, m/z	Отнесение (этаноламид)
1	292	16:4n-3	18	312	17:1
2	292	16:4n-?	19	350	20:3n-6
3	294	16:3n-3	20	300	16:0-изо
4	270	14:1	20	374	22:5n-6
5	320	18:4n-3	21	400	24:6n-?
6	296	16:2n-6	22	300	16:0
7	284	15:1	23	376	22:4n-3
8	346	20:5n-3	24	326	18:1n-9
9	272	14:0	25	314	17:0-изо
10	322	18:3n-3	26	352	20:2n-6
11	298	16:1n-7	27	340	19:1
12	348	20:4n-3	28	328	18:0-изо
13	372	22:6n-3	29	328	18:0
14	348	20:4n-6	30	354	20:1n-9
15	324	18:2n-6	31	356	20:0
16	374	22:5n-3	32	382	22:1
17	312	17:1-изо			

Таким образом, предложенные нами способы дериватизации жирных кислот для их последующего ВЭЖХ анализа позволяют осуществлять достоверную идентификацию свободных жирных кислот в сложных липидных субстанциях.

2. Характеристика состава каротиноидов.

В настоящее время ВЭЖХ широко применяется в анализе каротиноидов. Однако, несмотря на многочисленные литературные данные, подробно освещающие этот вопрос, существует ряд случаев, которые не попадают в общие закономерности хроматографического разделения и дальнейшей идентификации каротиноидов. В этом ряду отдельно стоит вопрос об идентификации пространственных изомеров каротиноидов, которые достаточно плохо разделяются как при хроматографировании на прямой, так и на обращенной фазе. Процесс изомеризации может происходить при изготовлении препаратов и другой продукции из биологического сырья, содержащего каротиноиды. Термическая обработка биологических субстанций, а также их контакт с некоторыми органическими растворителями приводят к необратимой изомеризации каротиноидов (Goodwin, 1976), что нежелательно с точки зрения сохранения биологической ценности продукции. На примере каротиноидов кукумарии (*Cucumaria japonica*) мы разработали условия проведения хроматографического разделения близких по структуре пар изомерных каротиноидов, а именно: 9,9'-ди-*цис*-кукумариаксантина А и 9-*цис*-кукумариаксантина А; 9,9'-ди-*цис*-кукумариаксантина С и 9-*цис*-кукумариаксантина С; кантаксантина и моно-*цис*-кантаксантина с неустановленным положением *цис*-двойной связи.

Непосредственно ВЭЖХ анализу подвергались фракции, полученные после предварительного разделения общей смеси каротиноидов на силикагеле и содержащие изомерные пары каротиноидов (рис. 2). Критериями идентификации каротиноидов служили значения их m/z , установленные с помощью масс-селективного детектирования, и характеры УФ-спектров, записанные с помощью УФ-детектора на диодной матрице (табл. 2).

Используя тот факт, что наличие двойной связи в *цис*-конфигурации в структурах молекул каротиноидов формирует образование максимума поглощения в области 300–400 нм (так называемое «*цис*-плечо»), а увеличение соотношения оптических плотностей при этом максимуме и характеристическом максимуме поглощения каротиноидов (область 400–500 нм) кратно увеличению числа двойных связей в *цис*-конфигурации (Britton et al., 1995b; Lacker et al., 1999), мы установили последовательность элюирования пространственных изомеров каротиноидов при ВЭЖХ анализе их пар (рис. 2).

Таким образом, применяя предложенные условия анализа изомерного состава каротиноидов, можно осуществлять достоверный контроль качества содержащей каротиноиды продукции, изготавливаемой из биологического сырья.

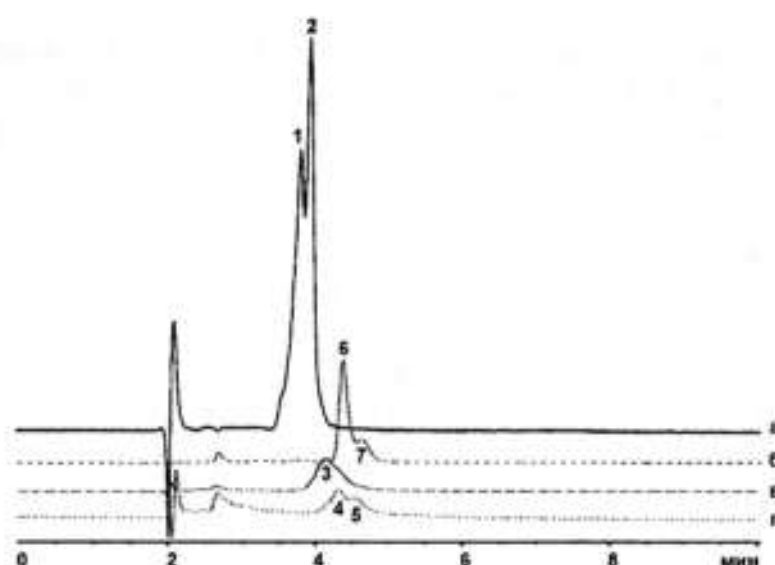


Рис. 2. ВЭЖХ анализ (УФ-хроматографический сигнал) каротиноидсодержащих фракций (а, б, в, г), полученных последовательно при проведении колоночной хроматографии липидного экстракта из *C. japonica*. 1 – кукумариаксантин А (9,9'-ди-*цис*-), 2 – кукумариаксантин А (9-*цис*-), 3 – кукумариаксантин В (9,9'-ди-*цис*-), 4 – кукумариаксантин С (9,9'-ди-*цис*-), 5 – кукумариаксантин С (9-*цис*-), 6 – кантаксантин, 7 – кантаксантин (моно-*цис*-).

Fig. 2. HPLC analysis (UV-signal) of carotenoids containing fractions, obtained by column chromatography of lipid extract from *C. japonica*. 1 – cucumariaxanthine A (9,9'-di-*cis*-), 2 – cucumariaxanthine A (9-*cis*-), 3 – cucumariaxanthine B (9,9'-di-*cis*-), 4 – cucumariaxanthine C (9,9'-di-*cis*-), 5 – cucumariaxanthine A (9-*cis*-), 6 – cantaxanthine, 7 – cantaxanthine (mono-*cis*-).

Таблица 2. Спектральные характеристики идентифицированных методом ВЭЖХ с комбинированным УФ- и масс-селективным детектированием каротиноидов в гонадах *C. japonica*.

Table 2. Spectral characteristics of carotenoids identified in *C. japonica* gonads by HPLC coupled UV with MS detections.

№ пика*	Отнесение	$[M+H]^+$, m/z	λ_{max} , нм	Отношение $A_{(412)}/A_{(472)}$
1	Кукумариаксантин А (9,9'-ди- <i>цис</i> -)	569	326 (<i>цис</i> -плечо), 388,406,432,460	0,137
2	Кукумариаксантин А (9- <i>цис</i> -)	569	326 (<i>цис</i> -плечо), 388,414,436,466	0,116
3	Кукумариаксантин В (9,9'-ди- <i>цис</i> -)	571	328 (<i>цис</i> -плечо), 394,416,438,468	0,139
4	Кукумариаксантин С (9,9'-ди- <i>цис</i> -)	573	328 (<i>цис</i> -плечо), 414,438,466	0,464
5	Кукумариаксантин С (9- <i>цис</i> -)	573	328 (<i>цис</i> -плечо), 412,436,464	0,266
6	Кантаксантин (полностью <i>транс</i> -)	565	472	-
7	Кантаксантин (моно- <i>цис</i> -)	565	364 (<i>цис</i> -плечо), 464	0,256

3. Характеристика состава стероидов.

Стероидные гормоны и родственные соединения являются неотъемлемыми компонентами различных органов многих представителей гидробионтов. Их высокая биологическая активность предопределила развитие различных методических подходов для определения стероидоподобных структур. Одним из таких подходов является ВЭЖХ анализ стероидных соединений. Тем не менее, разнообразие представителей этих веществ является фактором, осложняющим одновременное определение ряда структурноподобных стероидов. Мы разработали условия проведения ВЭЖХ анализа и достоверной идентификации ряда стероидных веществ, а именно, эстрона, Δ^4 -андростендиона, 5α -андростан-3,17-диона, эпиандростерона, 5α -андростан-3 α ,17 β -диола, тестостерона, 17 β -эстрадиола и экдистероидов: 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизона, интегростерона А, α -экдизона и 20-гидроксиэкдизона. Последняя группа веществ в последнее время пользуется особым вниманием, благодаря другим механизмам действия на организм человека, отличным от механизмов классических стероидных гормонов, а также отсутствию негативных гормональных эффектов.

При использовании ВЭЖХ для анализа соединений стероидной природы необходимо учитывать, что они могут значительно отличаться друг от друга по количеству гидроксильных групп (например, тестостерон содержит одну гидроксильную группу, а 20-гидроксиэкдизон – шесть). Отмеченное обстоятельство значительно осложняет проведение анализа биологических субстанций на предмет содержания различных стероидов без обязательного проведения предварительного фракционирования компонентов исследуемых смесей, например, по их относительной полярности.

Масс-спектры стероидов регистрировались в режиме ХИАД(+) и характеризовались наличием основных сигналов квазимолекулярных ионов состава $[M+H]^+$ и сигналов ионов состава $[M+H-n(H_2O)]^+$, обусловленных последовательной дегидратацией квазимолекулярных ионов. Кроме того, стероиды, не содержащие в своей структуре карбонильную группу, анализировали в режиме ХИАД(-). Их масс-спектры характеризовались наличием основных сигналов квазимолекулярных ионов $[M-H]^+$ и сигналами ионов $[M-H-n(H_2O)]^+$. При этом, в масс-спектрах 17 β -эстрадиола и эстрона мы не наблюдали дегидратации, связанной с потерей фенольной гидроксильной группы. В масс-спектрах полигидроксилированных экдистероидов: интегростерона А, 20-гидроксиэкдизона, 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизона и α -экдизона, содержащих от пяти до семи гидроксильных групп, мы не наблюдали сигналов ионов состава $[M+H-n_{\text{max}}(H_2O)]^+$, обусловленных потерей всех гидроксильных групп, что, по-видимому, связано с трудностью дегидратации при С-14 атоме (гидроксильная группа при третичном атоме углерода). Характеристические ионы, наблюдаемые в масс-спектрах в режиме ХИАД(+) исследованных стероидов, показаны в таблице 3.

Таблица 3. Состав ионов, наблюдаемых в масс-спектрах в режиме ХИАД стероидных гормонов.

Table 3. Ions composition in mass-spectra (APCI) investigated sterols.

Вещество	Ион, m/z (относительная интенсивность, %)		
	$[M+H]^+$	$[M+H-H_2O]^+$	$[M+H-2H_2O]^+$
Эстрон	271 (100)	-	-
Δ^4 -андростендион	287 (100)	-	-
5 α -андростан-3,17-дион	289 (100)	-	-
Эпиандростерон	289 (100)	271 (3)	-
5 α -андростан-3 α ,17 β -диол	293 (60)	275 (100)	257 (50)
Тестостерон	289 (100)	271 (2)	-
17 β -эстрадиол	273 (40)	255 (100)	-

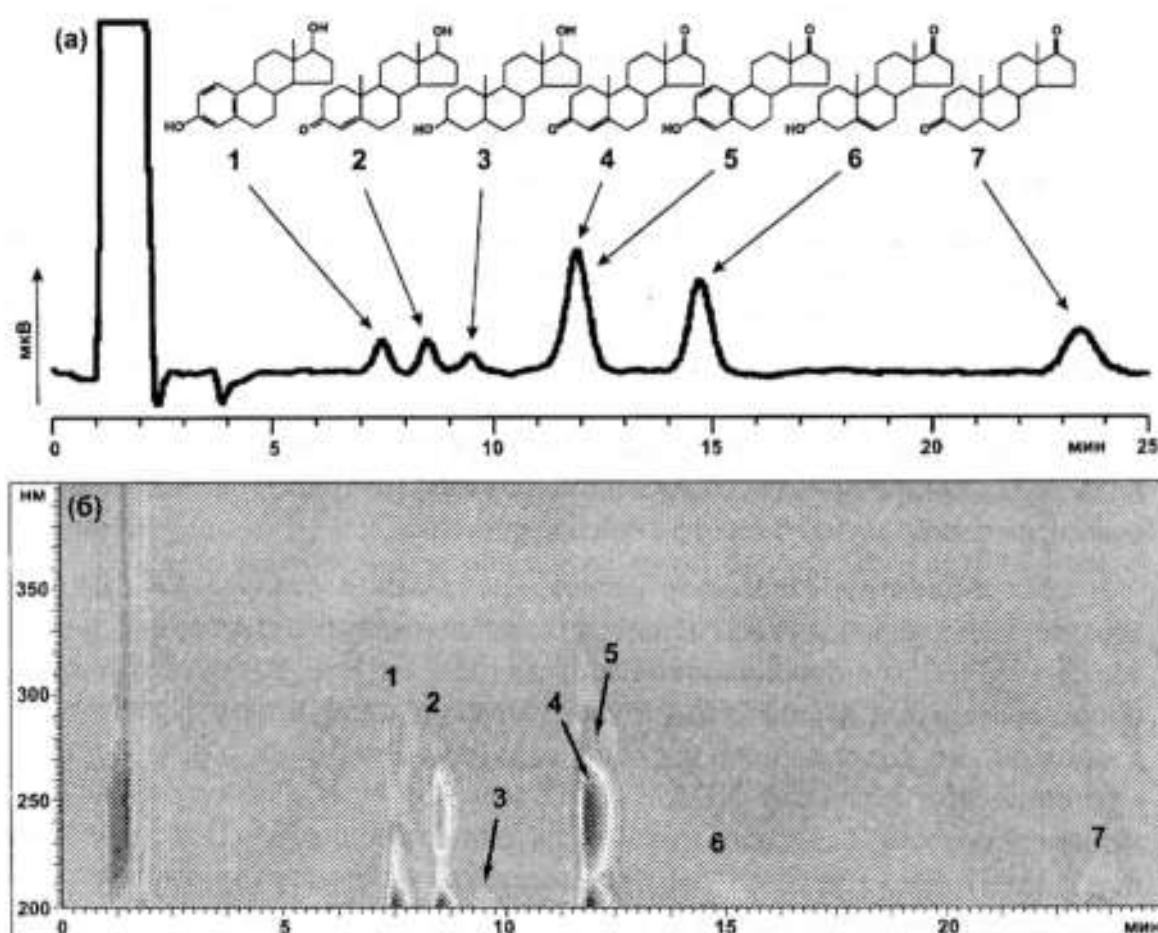


Рис. 3. ВЭЖХ анализ смеси стероидных гормонов: а – детектирование по рефрактометрии, б – УФ-детектирование. 1 – 17 β -эстрадиол, 2 – тестостерон, 3 – 5 α -андростан-3 α ,17 β -диол, 4 – Δ^4 -андростендион, 5 – эстрон, 6 – эпиандростерон, 7 – 5 α -андростан-3,17-дион.

Fig. 3. HPLC analysis of sterols mixture: а – refractometric detection, б – UV- detection. 1 – 17 β -estradiol, 2 – testosterone, 3 – 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol, 4 – Δ^4 -androstenedione, 5 – estrone, 6 – epiandrosterone, 7 – 5 α -androstane-3,17-dione.

Было показано, что при проведении анализа стероидосодержащих субстанций желательно применять комбинированное детектирование, а именно, последовательную регистрацию хроматографического сигнала рефрактометрическим детектором и УФ-детектором на диодной матрице. При этом в первом случае отражается полнота состава исследуемой смеси, а во втором достоверно регистрируются сигналы хромофорсодержащих компонентов смеси (рис. 3), отражающие их структурные особенности. Например, исследованные стероиды, содержащие ароматические структурные фрагменты, могут быть достоверно определены, благодаря отчетливому отклику УФ-детектора при 280 нм (пики 1,4 на хроматограмме), стероиды, содержащие α,β -ненасыщенный карбонильный структурный фрагмент достоверно определяются при регистрации поглощения при 240 нм. Стероиды, не имеющие в составе своих структур хромофоров, являются прозрачными в области достоверной регистрации хроматографического сигнала в УФ-диапазоне спектра электромагнитных колебаний, и их обнаружение может быть осуществлено только на основании результатов рефрактометрической регистрации сигнала. Однако использование масс-селективного детектирования может легко разрешить вопрос о составе стероидов в подобных смесях.

В ВЭЖХ анализе экистероидов проблем с проведением идентификации не возникло, и полученные результаты свидетельствовали в пользу применимости данного инструментального метода для одновременного определения этих веществ.

При использовании стандартов индивидуальных экистероидов была определена последовательность удерживания последних на неполярных сорбентах, которая определила следующий порядок их элюирования (рис. 5, 6): интегристерон А \rightarrow 20-гидроксизекдизон \rightarrow α -экидизон \rightarrow 2-дезоксизекдизон. Причем два последних соединения являются изомерами по положению гидроксильной группы, и это различие предопределило хорошую разрешимость соответствующих им на хроматограммах пиков (№3 и №4). Отличительные особенности структур исследуемых экистероидов (рис. 4) определили некоторые сходства и различия в характерах их масс-спектров. Так, характер масс-спектрометрической фрагментации квазимолекулярного иона 20-гидроксизекдизона был практически идентичен фрагментации квазимолекулярного иона 2-дезоксизекдизона, структура которого отличается отсутствием гидроксильной группы при 2-м положении. Кроме того, в масс-спектрах обоих этих соединений наблюдалась высокая интенсивность (100%) квазимолекулярных ионов. И напротив, в масс-спектрах интегристерона А и α -экидизона интенсивность квазимолекулярных ионов составила лишь 7 и 3%, соответственно, что в свою очередь можно объяснить крайней нестабильностью образующихся при ионизации в режиме ХИАД полигидроксилированных интермедиатов с быстрой потерей формульного элемента воды. В масс-спектрах

всех исследуемых экдистероидов наблюдалось последовательное отщепление молекул воды, однако фрагментные ионы, образованные при потере всех гидроксильных групп, отсутствовали. Вероятно, данный факт обусловлен значительной затрудненностью потери гидроксильной группы при третичном (14-е положение) атоме углерода. Сравнивая структуры «стабильных» экдистероидов с «нестабильными», можно отметить, что отсутствие гидроксильной группы при 2-м положении не приводит к снижению стабильности квазимолекулярного иона, а отсутствие гидроксильной группы в 20-м и наличие ее в 1-м положениях определяют быстрый отрыв молекулы воды и, как следствие, значительное снижение интенсивности квазимолекулярного иона. Благодаря этому, идентификация изомеров (α -экдизона и 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизона) при использовании масс-селективного детектирования в режиме ХИАД значительно упрощается даже в отсутствии стандартов.

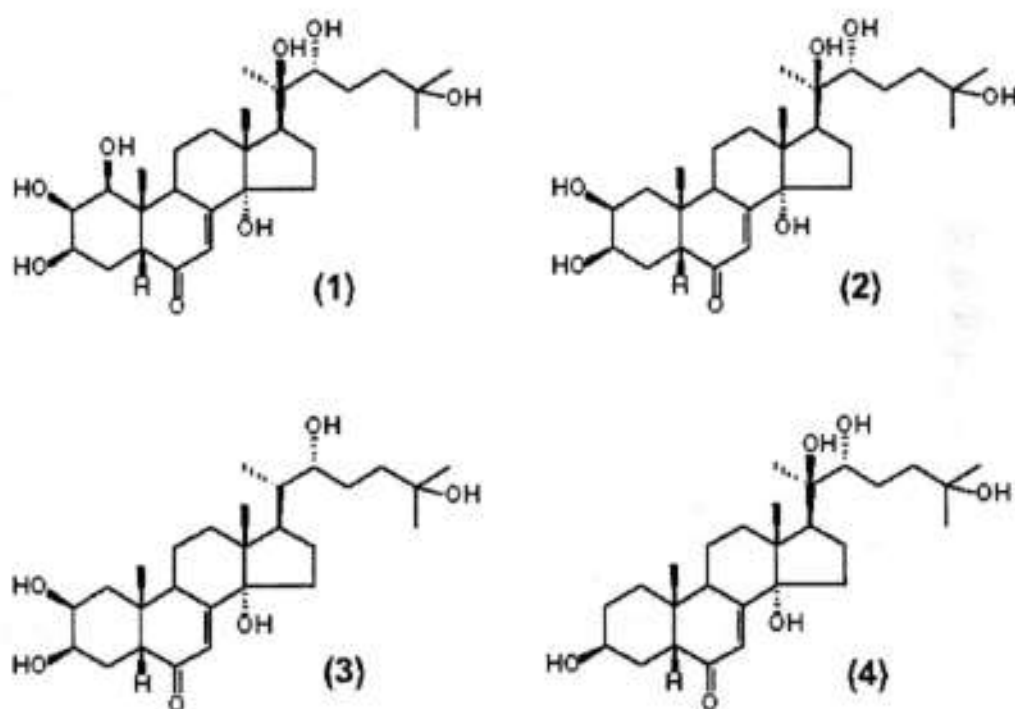


Рис. 4. Структуры исследуемых экдистероидов.

Fig. 4. Structures of studied ecdysteroids. 1 – Integristerone A, 2 – 20-hydroxyecdysone, 3 – α -ecdysone, 4 – 2-deoxy-20-hydroxyecdysone.

Следует отметить, что, несмотря на наличие обширной базы экдистероидов (описано более 300 соединений, принадлежащих данному классу (Володин, 2003)), достоверные данные по результатам масс-спектрометрического исследования в режиме ХИАД структур большинства из них до сих пор отсутствуют либо не систематизированы. Кроме того, одновременное определение четырех исследуемых соединений не проводилось. Полученные результаты хромато-масс-спектрометрического исследования суммы экдистероидов приведены в таблице 4.

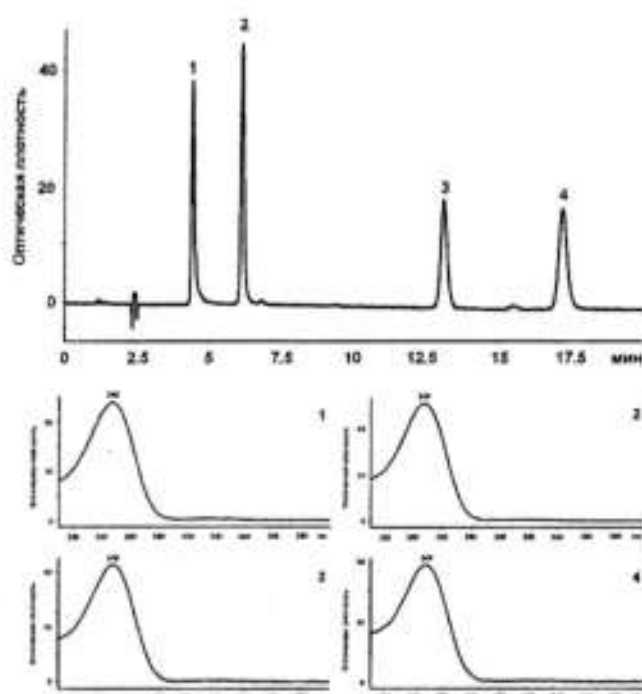


Рис. 5. ВЭЖХ-УФ анализ смеси интегристерона А (1), 20-гидроксиэкдизона (2), α -экдизона (3) и 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизона (4).

Fig. 5. HPLC-UV analysis of Integristerone A (1), 20-hydroxyecdysone (2), α -ecdysone (3) and 2-deoxy-20-hydroxyecdysone (4) mixture.

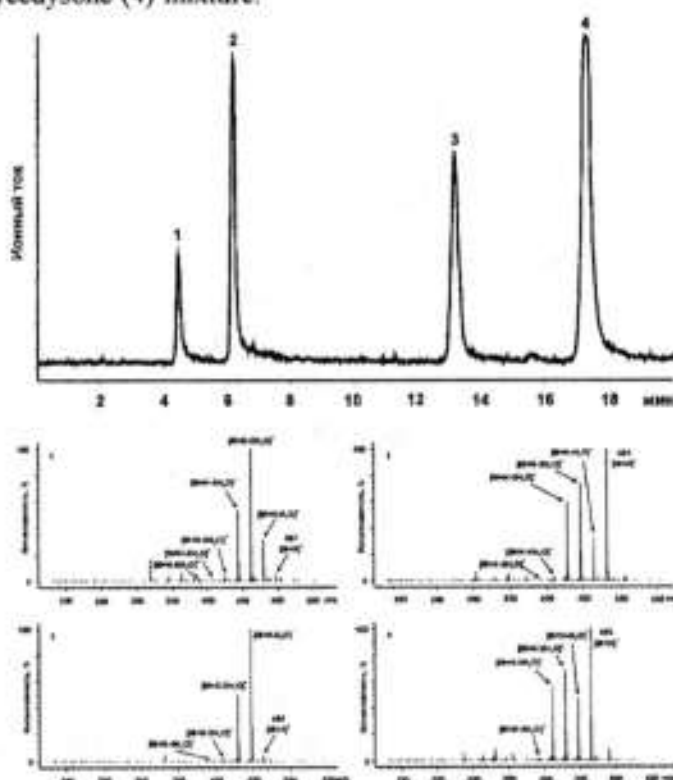


Рис. 6. ВЭЖХ-масс-спектрометрическое исследование смеси интегристерона А (1), 20-гидроксиэкдизона (2), α -экдизона (3) и 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизона (4).

Fig. 6. HPLC-MS analysis of Integristerone A (1), 20-hydroxyecdysone (2), α -ecdysone (3) and 2-deoxy-20-hydroxyecdysone (4) mixture.

Таблица 4. Спектральные (УФ, МС(ХИАД)) и хроматографические (ВЭЖХ) характеристики интегристерона А, 20-гидроксиэкдизона, α -экдизона и 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизона.

Table 4. Spectral (UV, MS(APCI)) and chromatographic (HPLC) data of Integristerone A, 20-hydroxyecdysone, α -ecdysone and 2-deoxy-20-hydroxyecdysone.

Соединение	k'	λ_{max} нм (lg ϵ)	Основные ионы, m/z (относительная интенсивность, %)
Интегристерон А	2,80	248 (4,09)	497 [M+H] ⁺ (7), 479 (32), 461 (100), 443 (53), 425 (4), 407 (1), 389 (0,5)
20-гидроксиэкдизон	4,34	248 (4,23)	481 [M+H] ⁺ (100), 463 (30), 445 (75), 427 (62), 409 (5), 391 (1)
α -экдизон	10,32	248 (4,12)	465 [M+H] ⁺ (3), 447 (100), 429 (48), 411 (1), 393 (0,5)
2-дезоксид-20-гидроксиэкдизон	13,82	248 (4,09)	465 [M+H] ⁺ (100), 447 (48), 429 (68), 411 (55), 393 (1,5)

В разработанных нами условиях были проанализированы экстракты из гемолимфы *Ch. opilio* и *P. camtschatica*. В результате в гемолимфе *Ch. opilio* были обнаружены 20-гидроксиэкдизон и интегристерон А, а в гемолимфе *P. camtschatica* – только 20-гидроксиэкдизон. Образцы обоих видов этих ракообразных были взяты непосредственно перед наступлением стадии линьки. В то же время, если гемолимфу крабов использовать в качестве перспективного источника экистероидсодержащих препаратов, то контроль содержания нормируемых веществ (экистероидов) можно будет осуществлять по предлагаемому нами методу.

Таким образом, разработаны условия ВЭЖХ анализа комплексных смесей веществ стероидной природы и обозначены критерии их идентификации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важной особенностью гидробионтов является то, что они представляют собой источники ценного для здоровья человека комплекса биологически активных веществ, в том числе липидной природы. Разработка технологий биопрепаратов из гидробионтов, равно как и производство продуктов питания, нуждается в постоянном контроле содержания биологически ценных компонентов используемого сырья. Достоверный контроль может быть осуществлен разными методами и их приборными реализациями. Постоянное совершенствование уже используемых методов и методических подходов, а также разработка новых, безусловно являются необходимыми этапами для получения высококачественных сертификатов на продукцию из гидробионтов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Вельтер В. Стероидные гормоны. В кн.: Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии. М.: Мир, 1988. С. 528-577.

Володин В.В. Фитоэкистероиды. СПб.: Наука, 2003. 294 с.

Гордон Ф., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976. 541 с.

Грецакая Н.М., Куклев Д.В., Безуглов В.В. и др. Новый эффективный метод хромато-масс-спектрометрического анализа жирных кислот в виде их дансилгидразидов // Изв. ТИНРО. 2001. Т. 129. С. 40-51.

Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. 1959. V. 37. Pp. 911-917.

Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids Berlin: Birkhauser Verlag. 1995a. V. 1A. 328 p.

Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids Berlin: Birkhauser Verlag. 1995b. V. 1B. 360 p.

Coors U. Analysis of food ingredients. Components in food with a high fat content. Fatty acids // In HPLC in food control and research Lancaster.: Technomic Publ. Comp. Inc. 1993a. Pp. 151-158.

Coors U. Analysis of food ingredients. Components in food with a high fat content. Fatty acids // In HPLC in food control and research Lancaster.: Technomic Publ. Comp. Inc. 1993b. P. 159.

Goodwin T.W. Chemistry and biochemistry of plant pigments N.-Y.: Acad. Press, 1976. V. 2. 165 p.

Karaulov A.E., Rybin V.G., Kuklev D.V., Akulin V.N. Synthesis of Fatty-Acid Ethanolamides from *Limn. catharticum* Oil and *Cololabis saira* Fat // Chem. Nat. Comp. 2004. V. 40. №3. Pp. 222-226.

Lacker T., Strohschein S., Albert K. Separation and identification of various carotenoids by C₃₀ reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to UV and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection // J. Chromatogr. A. 1999. V. 854. Pp. 37-44.

Maldek Ch. Analysis of food ingredients. Vitamins // In HPLC in food control and research Lancaster.: Technomic Publ. Comp. Inc. 1993. Pp. 183-233.

ASPECTS OF APPLICATION OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY IN ANALYSIS OF FATTY ACIDS, CAROTENOIDS AND STEROLS IN LIPIDS AND LIPID PREPARATIONS FROM MARINE ORGANISMS

© 2006 y. V.G. Rybin, K.G. Pavel, A.E. Karaulov

Pacific Scientific Research Fisheries Center, Vladivostok

Application of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for carrying out of identification of some lipids substances in tissues of marine organisms and biopreparations has been shown. Conditions of HPLC analysis of fatty acids complex mixtures with conversion of them in to ethanolamides have been proposed. Conditions and criterions of identifications of carotenonoids *cis-trans*-isomers during HPCL analysis have been developed and proved. Conditions of simultaneous determination some sterols, including ecdysteroides, have been developed and proved. The results were applied to analysis of lipids of some food species of marine organisms such as *Cololabis saira*, *Cucumaria japonica*, *Chionoecetes opilio* and *Paralithodes camtschatica*.