ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-4-2464
https://elibrary.ru/JWGHGY

Оригинальная статья
https://fptt.ru

Комплексный методический подход в определении липидов моллюсков

А. В. Бородина[1,*], Ю. О. Веляев[2,], А. Р. Осокин[2]**

[1] *Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия*

[2] *Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия*

Поступила в редакцию: 17.03.2023
Принята после рецензирования: 17.05.2023
Принята к публикации: 06.06.2023

**А. В. Бородина: borodinaav@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-8468-8372*
***Ю. О. Веляев: velyaevyo@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-0372-2458*
А. Р. Осокин: https://orcid.org/0009-0003-5962-1899

© А. В. Бородина, Ю. О. Веляев, А. Р. Осокин, 2023

Аннотация.
Морские двустворчатые моллюски характеризуются повышенным содержанием полиненасыщенных жирных кислот. В Средиземном и Чёрном морях к потенциально промысловым относится моллюск *Cerastoderma glaucum*, который содержит омега-3, омега-6 и омега-9 жирные кислоты. Однако липидный состав этого вида гидробионтов слабо изучен. При определении общих липидов, их классов и состава жирных кислот стандартные методы часто необходимо адаптировать к особенностям объекта исследования и имеющейся приборной базе. Цель работы – предложить вариант комплексной методики определения липидов гидробионтов на примере двустворчатого моллюска *C. glaucum*.
Объектом исследования была сумма мягких тканей моллюска *C. glaucum*, распространенного в зоне псевдолиторали на песочно-иловом грунте Севастопольского побережья Чёрного моря. Применяли хроматографические методы установления общих липидов, разделения их на классы (фосфолипиды, моноглицериды, диглицериды, стеролы, триацилглицерины) и последующего денситемтрического определения с использованием планшетного сканера и программы TCX менеджер 4.0.2.3D. Исследование состава жирных кислот с помощью хромато-масс-спектрометрического метода проводили для общих липидов.
В работе привели методические указания по адаптации известных методов в липидологии по определению общих липидов, их классов и жирнокислотного состава в тканях моллюсков *C. glaucum*. Описали метод определения общих липидов. Показали подготовку оборудования и реактивов для разделения общих липидов на классы методом многомерной тонкослойной хроматографии. Представили авторскую схему хроматографических ванн для осуществления ступенчатого разделения. Провели денситометрическое измерение. Привели примеры хроматограммы жирных кислот и масс-спектров. Предложили вариант проведения пробоподготовки к определению жирных кислот в общих липидах методом газовой хроматографии, который отличается минимальной потерей нативной структуры веществ и является более мягким по сравнению с широко применяемым методом дериватизации проб.
Применение предлагаемого метода для определения липидов моллюсков является экономичным и менее затратным по времени и реактивам. Метод рекомендуется использовать для небольших лабораторий, занимающихся фундаментальными исследованиями энергетики организмов или в прикладных целях для сравнительных анализов гидробионтов.

Ключевые слова. Общие липиды, классы липидов, тонкослойная хроматография, денситограмма, хроматограмма, хромато-масс-спектрометрия, моллюски

Финансирование. Работа выполнена по теме № 121041400077-1 государственного задания Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН (ФИЦ ИнБЮМ) «Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом». В работе использовано оборудование ЦКП «Молекулярная структура вещества» Севастопольского государственного университета (СевГУ).

Для цитирования: Бородина А. В., Веляев Ю. О., Осокин А. Р. Комплексный методический подход в определении липидов моллюсков // Техника и технология пищевых производств. 2023. Т. 53. № 4. С. 662–671. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-4-2464

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-4-2464
https://elibrary.ru/JWGHGY

Original article
Available online at https://fptt.ru/en

Comprehensive Methodological Approach to Determining Lipids in Clams

Alexandra V. Borodina[1,*], Yurii O. Veliaev[2,], Alexander R. Osokin[2]**

[1] *A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russia*

[2] *Sevastopol State University, Sevastopol, Russia*

Received: 17.03.2023
Revised: 17.05.2023
Accepted: 06.06.2023

**Alexandra V. Borodina: borodinaav@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-8468-8372*
***Yurii O. Veliaev: velyaevyo@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-0372-2458*
Alexander R. Osokin: https://orcid.org/0009-0003-5962-1899

© A.V. Borodina, Yu.O. Veliaev, A.R. Osokin, 2023

Abstract.
Marine bivalves are rich in polyunsaturated fatty acids. *Cerastoderma glaucum* is a potentially commercial sea cockle that inhabits the Mediterranean and the Black Seas. This bivalve mollusk contains omega-3, omega-6, and omega-9 fatty acids. However, its lipid composition remains understudied. When determining total lipids, their classes, and fatty acid composition, standard methods often have to be adapted to the object in hand and tools available. The research objective was to develop a complex lipid analysis method for aquatic organisms.
The study featured total soft tissues of *C. glaucum* harvested from the pseudolittoral zone on the sand and silt soil of the Sevastopol coast of the Black Sea. The chromatographic methods made it possible to identify total lipids and classify them into phospholipids, monoglycerides, diglycerides, sterols, and triacylglycerols. The subsequent densimetric determination involved a flatbed scanner and the TLC Manager 4.0.2.3D software. The fatty acid composition for total lipids was studied using the chromatography-mass spectrometric method.
The existing methods in lipidology were adapted for determining total lipids, their classes, and the fatty acid composition of total lipids in *C. glaucum*. The article introduces a detailed description of the method for determining total lipids, as well as of how to prepare equipment and reagents to classify common lipids using multidimensional thin layer chromatography. It also contains an authentic scheme of chromatographic baths for stepwise separation, densitometric measurements, and examples of fatty acid chromatograms and mass spectra. The new sample preparation method for determining fatty acids in total lipids by gas chromatography demonstrated a minimal loss in native structure and proved to be less aggressive than standard methods of sample derivatization.
The new method for lipid analysis of clam tissues appeared to be economical, less time-consuming, and reagent-intensive. It can be recommended for small laboratories engaged in bioenergetics or comparative analyzes of aquatic organisms.

Keywords. Total lipids, lipid classes, thin layer chromatography, densitogram, chromatogram, fatty acids, gas chromatography/mass spectrometry, shellfish

Funding. The work part of State Assignment to A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS (IBSS), research topic No. 121041400077-1: Functional, metabolic, and toxicological aspects of hydrobionts and their populations in biotopes with different physical and chemical modes. The research was conducted on the premises of Core Facilities Centre of Molecular Matter Structure, Sevastopol State University.

For citation: Borodina AV, Veliaev YuO, Osokin AR. Comprehensive Methodological Approach to Determining Lipids in Clams. Food Processing: Techniques and Technology. 2023;53(4):662–671. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-4-2464

Введение

Липиды – это обширная группа жиров и жироподобных веществ с различным химическим строением, которые способны растворяться в неполярных растворителях. Липиды содержатся в каждой живой клетке от 2 до 90 %, результатом чего является их широкий спектр функций в организме: энергетическая, структурная, запасающая, защитная, теплоизоляционная и др. Суммарные общие липиды принято разделять на классы: триацилглицерины (или жиры), фосфолипиды, гликолипиды, стероиды, воска и терпены. Информация о содержании или изменении

каждого класса в организме может дать информацию для исследователя, например, о состоянии мембран (фосфолипиды, гликолипиды и стеролы) или о степени жирового запаса (триацилглицерины). В составе жиров, поступающих через пищу в организм, есть группы насыщенных, моно- и полиненасыщенных жирных кислот, которые играют важную роль в регулировании основных процессов в организме [1–3]. С этой точки зрения следует отметить пищевую ценность группы жирных кислот типа омега (омега-3, омега-6 и омега-9), которые необходимы для нормального функционирования организма.

Морепродукты обладают высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот. Морские двустворчатые моллюски обладают повышенным содержанием триацилглицеринов и полиеновых жирных кислот n-3 семейства [4]. Одним из таких видов является широко распространенный и потенциально промысловый как в Средиземном, так и в Чёрном морях двустворчатый моллюск *Cerastoderma glaucum* [5–7]. Его липидный состав все еще слабо изучен, но содержит омега-3, омега-6 и омега-9 жирные кислоты [8].

При изучении липидов исследователи сталкиваются с выбором методик для определения общих липидов, их классов и состава жирных кислот. С каждым годом увеличивается количество новых открытий и усовершенствований не только в области цифровых технологий, обработок и программного обеспечения к существующим методам и приборам, но и модернизируются процессы пробоподготовок. Однако за основу выделения общих липидов берется метод Фолча [9]. Это приводит к тому, что исследователи адаптируют этот метод под свой объект исследования, лабораторные условия и т. п., а для начинающих ученых есть широкий выбор с чего начинать. Похожая ситуация наблюдается в разнообразных методах разделения общих липидов с помощью методов многомерной тонкослойной хроматографии (одномерные и многомерные системы разделения) с использованием различных растворителей для разделения общих липидов на классы: фосфолипиды, моноглицериды, диглицериды, стерины, свободные жирные кислоты и триацилглицерины [10–13]. Однако чаще используют одномерный метод разделения. Например, в системе гексан – диэтиловый эфир – ледяная уксусная кислота в разных соотношениях [4]. В литературе можно найти описание многомерного способа разделения общих липидов на классы с помощью тонкослойной хроматографии, который имеет достоинства и недостатки [11]. Количественное определение фракций липидов осуществляется с помощью гидроксаматного метода [4]. Однако создаются не только новые денситометрические приборы, но и программные продукты, которые определяют концентрацию фракции многомерной тонкослойной хроматографии (% от общих липидов) денситометрическим методом с помощью оцифровывания пятна на многомерном тонкослойном хроматографе. Такие программы успешно зарекомендовали себя в ряде химических и медицинских исследований [14–16].

После установления соотношения различных классов липидов или выделения конкретно необходимой группы липидов можно использовать более детальный метод определения качественного состава липидов, а именно хромато-масс-спектрометрию. Достоинство данного метода заключается в высокой чувствительности и специфичности. Чаще всего метод хромато-масс-спектрометрии используется для установления количественного и качественного состава жирных кислот, входящих в состав почти всех классов общих липидов. Хромато-масс-спектрометрию можно использовать для установления состава жирных кислот как отдельного класса липидов, так и общих липидов. Для проведения таких исследований необходимо проводить пробоподготовку, которая позволяет перевести содержащиеся в пробе определяемые объекты в летучую форму. В нашем случае это метиловые эфиры жирных кислот. Процесс метилирования должен сопровождаться меньшими потерями нативной структуры изучаемых веществ и должен быть мягким и неагрессивным, но в то же время максимально продуктивным, позволяющим получить целевые аналитические формы изучаемых объектов. В литературе описываются комплексные методы с использованием газовой хроматографии, масс-спектроскопии и ВЭЖХ.

Существует множество вариантов, основанных на базовых методах по определению общих липидов, разделению методом многомерной тонкослойной хроматографии и идентификации хромато-масс-спектрометрическим методом. В большинстве работ среди достоинств описывается более качественное разделение, упрощение способа проявления фракций липидов, сокращение затраченного времени и реактивов и т. п. Обновление программного обеспечения и расширение технических возможностей и оборудования лабораторий требуют обновления и приспособления к новому в рамках своих лабораторий.

Цель работы – предложить комплексный подход, в основе которого лежат современные, более упрощенные, экономические и по времени менее затратные процедуры по проведению полного анализа липидов с определением общих липидов, разделением их на классы методом многомерной тонкослойной хроматографии, идентификацией жирных кислот методом газовой хроматографии и масс-спектроскопии на примере анализа липидов одного из видов двустворчатого моллюска – *Cerastoderma glaucum*.

Объекты и методы исследования

В качестве объекта для комплексного исследования липидов были выбраны двустворчатые моллюски *Cerastoderma glaucum*, широко распространенные в зоне псевдолиторали на песочно-иловом грунте Севастопольского побережья Чёрного моря. Исследовали сумму мягких тканей всего моллюска.

Для определения общих липидов и последующего их разделения методом многомерной тонкослойной хроматографии на классы использовали следующие реактивы и оборудование: хлороформ (хч), метанол (хч), гексан (хч), диэтиловый эфир, этанол (хч), 10 % спиртовый раствор фосфорно-молибденовой кислоты, дистиллированная вода, фильтровальная бумага, ножницы, весы лабораторные, мерные пробирки со шлифом, сушильный шкаф (70 и 100 °С), стеклянные бюксы, стаканчики (на 50 и 300 мл), мерные цилиндры (на 25 мл), воронки, дозаторы 1–5 мл, эксикатор, пластинки многомерного тонкослойного хроматографа, хроматографические капилляры или шприц для нанесения пробы на многомерный тонкослойный хроматограф, камеры для хроматографии, пинцеты (пластиковый и обычный), стандарты для классов липидов, планшетный сканер, программа для денсиметрического определения липидов.

При проведении хромато-масс-спектрометрического анализа на содержание жирных кислот для пробоподготовки использовали следующие реактивы и оборудование: диметилсульфоксид (ТУ 6-09-3818-89), 25 % метанольный раствор тетраметиламмония гидроксида (CAS: 75-59-2), йодметан (CAS: 74-88-4), гексан (ТУ 2631-158-44493179-13), лабораторный шейкер ПЭ-6300, центрифуга-вортекс Микроспин FV-2400.

Анализ проводили на аппаратно-программном комплексе для медицинских исследований на базе хроматографа Хроматэк-Кристалл 5000, исполнение 2 (ТУ 9443-004-12908609-99) с масс-спектрометрическим детектором 214.2.840.068, модель 2.840.083-10. Разделение проводили на капиллярной колонке HP-5MS UI (Agilent, Cat. № 19091S-433UI) с неподвижной фазой 5 %-фенил-95 %-метилполисиликсан. Длина колонки – 30 м, внутренний диаметр – 0,25 мм, толщина неподвижной фазы – 0,25 мкм. В качестве газа-носителя применялся гелий (ТУ 0271-001-45905715-2016) с постоянным расходом 1 мл/мин. Температурный режим колонки – градиент с начальной температурой 80 °С, изотермой 2,0 мин и нагревом 5 °С/мин до 280 °С. На испарителе деление потока соответствовало 20:1, температура 280 °С, а объем вводимой пробы был 1 мкл. Анализ проводился с использованием масс-спектрометрического детектора с электронной ионизацией (70 эВ), температурой ионного источника 230 °С и переходной линии 280 °С. Спектр регистрировали в диапазоне масс от 30 до 650 m/z.

Для обработки полученной хромато-масс-спектрометрической информации использовалось программное обеспечение Хроматэк Аналитик 3.1 (сборка 3.1.2211.3), NIST MS Search v.2.66.121.82 и библиотека масс-спектров NIST 2020 с базой данных от 2 июня 2020 года.

Результаты и их обсуждение

Определение общих липидов. Основу определения общих липидов моллюсков составляет метод Фолча с адаптациями к их тканям [9, 17]. Основой метода является экстракция липидов и субклеточных образований хлороформ-метанольной смесью (2:1) (реактив Фолча), отмывание экстракта от водорастворимых примесей, высушивание и определение концентрации липидов весовым методом по сухому остатку. После препарирования тканей моллюска их промокали фильтровальной бумагой, взвешивали на весах и растирали в фарфоровой ступке пестиком с постепенным добавлением хлороформ-метанольной смеси до получения гомогената. Полученную суспензию переносили в мерную пробирку на 10–15 мл со шлифом и доводили до полного объема реактивом Фолча из расчета 1:20 (масса ткани: объем реактива Фолча). Через 10–15 мин смесь профильтровывали через бумажный фильтр. Полученный липидный экстракт очищали от нелипидных водорастворимых примесей: в небольшой стаканчик объемом около 50 мл наливали дистиллированную воду и дозатором переносили липидную фракцию из пробирки, выпуская ее по стенке на самое дно стаканчика. Затем стеклянный сосуд ставили в еще больший стакан объемом 0,3–0,5 л, наполненный до метки дистиллированной водой. Систему оставляли на ночь в вытяжном шкафу при комнатной температуре, чтобы процедура по извлечению липидов укладывалась в сутки. После разделения в сосуде наблюдали прозрачно-желтоватую липидную фракцию, белую, тонкую и более плотную прослойку и водно-метанольную часть, которую затем удаляли. Белую часть растворяли в метаноле, добавляя несколько капель. После растворения липидный экстракт количественно переносили в предварительно взвешенный бюкс, упаривали или высушивали при температуре 60–70 °С до суха. После остывания определяли концентрацию липидов весовым методом, 1 г липидов на 100 г ткани.

Перед разделением общих липидов методом многомерной тонкослойной хроматографии проводили ряд подготовительных процедур. Хлороформ был перегнан и стабилизирован 1 % метанолом. 10 % спиртовый раствор фосфорно-молибденовой кислоты (хч) готовили с учетом плотности спирта с использованием обезвоженного перегнанного этанола. Возможна замена его на метанол или изопропанол. Например, при использовании обезвоженного перегнанного этилового спирта с учетом его плотности (0,82 г/см^3) на 0,5 л раствора потребуется 41 г фосфорно-молибденовой кислоты (хч). Для полного растворения спиртовую смесь подогревали на водяной

бане. После растворения фильтровали с получением раствора соломенно-желтого цвета, который хранили в холодильнике при температуре 0–5 °С.

Определение классов липидов методом многомерной тонкослойной хроматографии. После получения сухого остатка общих липидов проводили их разделение на классы (было описано для мидий): фосфолипиды, моноглицериды, диглицериды, стерины, свободные жирные кислоты и триацилглицерины [11]. Сущность метода использования градиента полярности растворителя с помощью принципа «камера в камере» для разделения липидов на классы была изложена ранее [11]. Для анализа использовали пластинки Sorbfil Plates ПТСХ-АФ-А (Краснодар, Россия), предварительно промытые этилацетатом для удаления возможных органических соединений. После очистки пластинки обрабатывали спиртовым раствором фосфорно-молибденовой кислоты, сушили под струей воздуха и хранили в эксикаторе до использования до 3 суток [11]. В качестве хроматографических камер использовали 3 стеклянных сосуда (рис. 1).

Стеклянные камеры состояли из 3-х сосудов, входящих один в другой, как показано на рисунке 1. Соотношение 2-го сосуда к 1-му – 2:3, на дне 2-го располагается маленькая чашка Петри.

Первую камеру заполняли гексаном, вторую – смесью гексан:диэтиловый эфир (9:1), третью – маленькой чашкой Петри с 2 мл хлороформа. Первую и вторую камеру изнутри покрывали фильтровальной бумагой для создания насыщенных паров. Размер пластинки зависит от высоты и ширины камер, она должна быть выше второй камеры примерно на 1/4. Такое расположение пластинки с нанесенной пробой позволяет постепенно поднимающемуся хлороформу испаряться с одновременной сорбцией менее полярной системы гексан:эфир (9:1). За пределами 2-ой камеры происходит постепенная замена этой системы неполярным гексаном. Таким образом, в камерах создается градиент полярности растворителей, что улучшает качество разделения.

Заполнив первые две камеры и закрыв их, приступили к нанесению пробы. На пластинке Sorbfil Plates, подобранной по размеру камер, отступая от нижнего края 10 мм, нанесли микрошприцем/капилляром пробу 1–5 мг липидов в хлороформе, рядом нанесли стандарты. В качестве стандарта на многомерном тонкослойном хроматографе для триацилглицеринов использовали стандартные образцы ГСО 9437-2009 (жиры), для фосфолипидов – лецитин (BioChemica). Установив первую камеру по уровню в вытяжном шкафу, после объединения всех камер их закрывали притертой крышкой. При подъеме растворителя до конца пластины ее вынимали и сушили в потоке воздуха до видимого испарения растворителя. Затем повторно ставили в ту же систему камер. После повторного поднятия растворителей полное разделение можно считать законченным. Разделенные на фракции липиды легко обруживаются при 3–5 мин нагреве пластинки в сушильном шкафу при температуре 100 °С. Время и температура должны быть строго фиксированы, т. к. от этого зависит воспроизводимость результатов. Порядок распределения липидных фракций по классам на многомерном тонкослойном хроматографе снизу вверх выглядит так: фосфолипиды, диглицериды, стерины, свободные жирные кислоты, триацилглицерины (рис. 2).

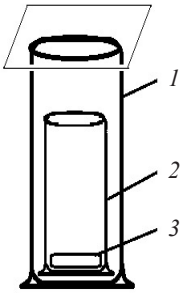


Рисунок 1. Схема камер для разделения методом многомерной тонкослойной хроматографии: 1 – первая камера; 2 – вторая камера; 3 – маленькая чашка Петри

Figure 1. Chambers for multidimensional thin layer chromatography: 1 – chamber 1; 2 – chamber 2; 3 – small Petri dish

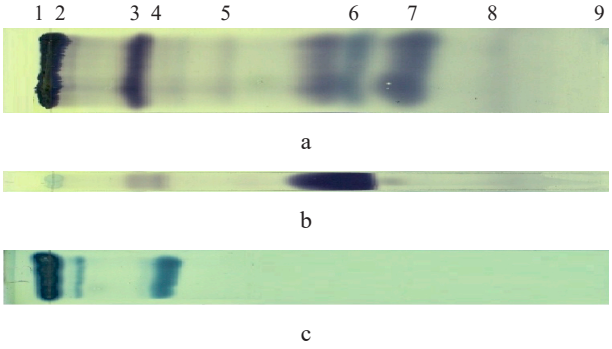


Рисунок 2. a – хроматограмма классов липидов моллюсков *Cerastoderma glaucum*, % общих липидов; b – стандарт для триацилглицеринов; c – стандарт для фосфолипидов

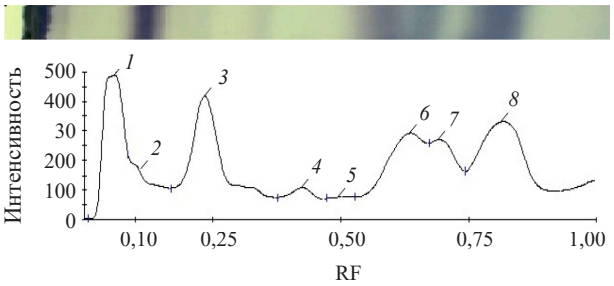
Figure 2. a – chromatogram of lipid classes of *Cerastoderma glaucum*, % total lipids; b – standard for triacylglycerols; c – standard for phospholipids

Количественная обработка результатов проводилась денситометрически. С помощью сканера HP Scanjet 200 сканировали полученное изображение фракций на многомерном тонкослойном хроматографе. После обработки файлов их сохраняли с расширением jpg (или bmp) и использовали для расчетов концентраций в программе ТСХ менеджер 4.0.2.3D (разработка И. Н. Плахотный, www.garryc.chat.ru). Описание и подход в работе данной программы

опубликованы [15, 16]. После обработки многомерной тонкослойной хроматографией программа ТСХ менеджер 4.0.2.3D выводит отчет в формате pdf и doc, фрагмент которого показан на рисунке 3.Количественное определение липидных фракций фосфолипидов, диглицеридов, стеринов, свободных жирных кислот и триацилглицеринов (% от общих липидов) соответствует площади пиков на денситограмме (рис. 3).

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с применением программы Grapher 7. К недостаткам данного метода разделения общих липидов на классы можно отнести расположение на старте фосфолипидов вместе с другими такими же

Cerastoderma glaucum



№ пика	Rf	Высота	Площадь	Площадь, %	^ = ^	Rs
1	0,06	482	19571	18,19	1-2	0,9128944
2	0,13	109	9092	8,45	2-3	0,9056544
3	0,23	392	27242	25,32	3-4	1,560402
4	0,42	28	3514	3,27	4-5	1,251999
5	0,49	24	644	0,60	5-6	2,933825
6	0,64	225	16928	15,73	6-7	0,9452748
7	0,69	196	9836	9,14	7-8	1,256295
8	0,81	245	20755	19,29		

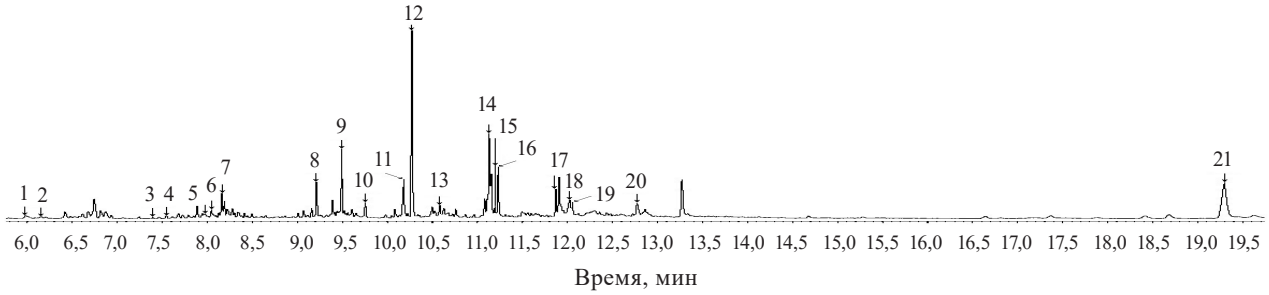
Рисунок 3. Денситограмма многомерной тонкослойной хроматографии липидов моллюска *Cerastoderma glaucum*

Figure 3. Multidimensional thin layer chromatography of lipids in *Cerastoderma glaucum*: densitogram

по полярности примесями. Это снижает точность определения класса фосфолипидов.

Определение состава жирных кислот в общих липидах методом хромато-масс-спектрометрии. Жирные кислоты в образце липидной фракции необходимо предварительно дериватизировать, чтобы сделать возможным детектирование эфирных форм газохроматографическим методом [18]. Известно много способов дериватизации объектов, содержащих жирнокислотные фракции, которые необходимо перевести в сложноэфирные соединения, обладающие повышенной по отношению к исходным веществам летучестью и пониженной температурой кипения [19–28].

Обработка дериватизирующими агентами должна проходить в мягких условиях, чтобы избежать разрушения кратных связей в дериватизируемых молекулах, но при этом должна быть быстрой и эффективной. Так как для получения изучаемого образца использовали живой объект, представляющий сложную матрицу, был выбран метод дериватизации, применяющийся для аналогичных объектов [19, 21, 22]. Для этого сконцентрированный липидный экстракт растворяли в смеси диметилсульфоксида и 25 % метанольного раствора тетраметиламмония гидроксида как 9:1 с соотношением Ж:Т к исходному концентрату жиров 200:1. Полученную суспензию выдерживали при постоянном перемешивании 2 мин и добавляли йодметан в количестве, равном семикратному недостатку по отношению к смеси диметилсульфоксида и гидроксида тетраметиламмония. Полученную взвесь выдерживали 20 мин при комнатной температуре для достижения полноты реакции дериватизации. К дериватизированной смеси добавляли пятикратный избыток гексана и перемешивали 5 мин на горизонтальном шейкере. Затем смесь центрифугировали 5 мин со скоростью 3000 об/мин. Гексановый экстракт отделяли и закалывали в хроматограф. Полученная хроматограмма представлена на рисунке 4.



1 – пеларгоновая кислота; 2 – адипиновая кислота; 3 – ундециловая кислота; 4 – суберановая кислота; 5 – терефталевая кислота; 6 – лауриновая кислота; 7 – азелаиновая кислота; 8 – миристиновая кислота; 9 – 4,8,12-триметил-тридекановая кислота; 10 – пентадекановая кислота; 11 – пальмитолеиновая кислота; 12 – пальмитиновая кислота; 13 – маргариновая кислота; 14 – 8-октадеценовая кислота; 15 – олеиновая кислота; 16 – стеариновая кислота; 17 – арахидоновая кислота; 18 – гадолеиновая кислота; 19 – гондоевая кислота; 20 – докозагексаеновая кислота; 21 – холестерин

Рисунок 4. Хроматограмма жирных кислот моллюска *Cerastoderma glaucum*

Figure 4. Fatty acid chromatogram of *Cerastoderma glaucum*

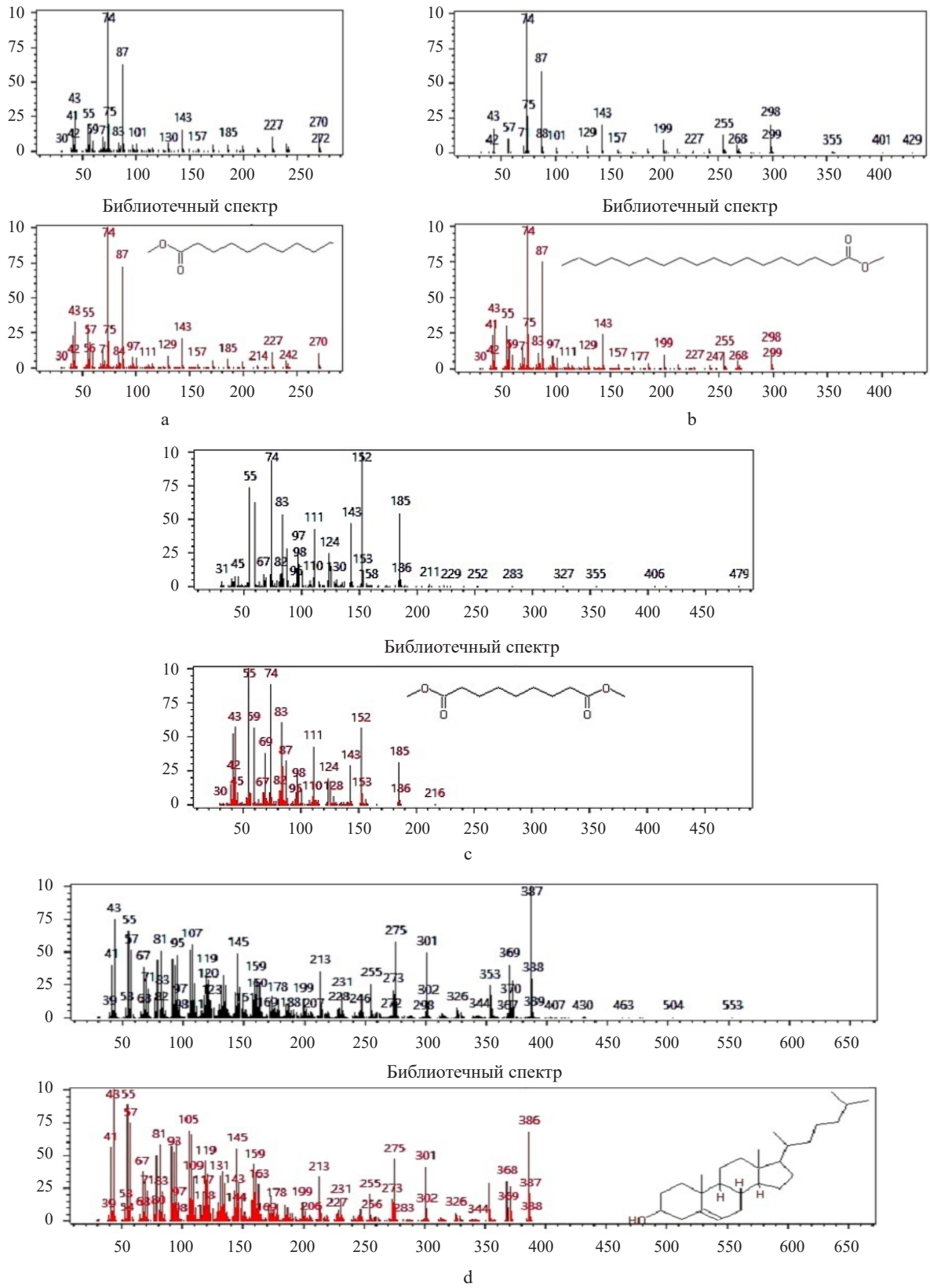


Рисунок 5. Полученные масс-спектры идентифицируемых веществ в сравнении с их эталонными спектрами метиловых эфиров следующих кислот и соединений: a – пальмитиновая (вероятность совпадения 79 %); b – стеариновая (81 %); c – азелаиновая (91 %); d – холестерин (63 %)

Figure 5. Mass spectra of identified substances vs. reference spectra of methyl esters with coincidence probability, %: a – palmitic (79%); b – stearic (81%); c – azelaic (91%); d – cholesterol (63%)

На рисунке 5 для сравнения приведены масс-спектры некоторых соединений из числа представленных на рисунке 4, по которым проводилась идентификация веществ согласно вероятностному критерию совпадения полученного масс-спектра с эталонным.

Выводы

На примере определения липидов в двустворчатом моллюске *Cerastoderma glaucum* в стандартные методы, благодаря обновлению технических средств и авторским идеям, был внесе ряд дополнений и уточнений. Это позволяет сократить расход реактивов по сравнению с классическим методом Фолча.

Применение двумерного способа разделения общих липидов на классы методом многомерной тонкослойной хроматографии позволило разделить их на фосфолипиды, моноглицериды, диглицериды, стеролы, свободные жирные кислоты и триацилглицерины, используя наименьшее количество реактивов и времени за счет снижения точности определения класса фосфолипидов. Денситометрический метод расчета концентраций классов липидов с помощью программы TCX менеджер 4.0.2.3D упрощает процесс расчета и улучшает качество и точность определения.

Предложенный вариант проведения пробоподготовки для определения жирных кислот в общих липидах методом хромато-масс-спектрометрии имеет такое преимущество, как минимальная потеря нативной структуры веществ, и является более мягким по сравнению с широко применяемым методом дериватизации проб.

Применение этого комплексного подхода в определении липидов моллюсков является экономичным, менее затратным по времени и реактивам, а также подходит для применения в небольших биохимических лабораториях.

Критерии авторства

А. В. Бородина предложила тему исследования, собрала материал и поставила методы определения общих липидов и их разделения на классы с помощью многомерной тонкослойной хроматографии, а также денситометрическое измерение фосфолипидов, моноглицеридов, диглицеридов, стеринов и триацилглицеринов соответственно. А. В. Бородина отвечает за общее оформление работы и написание первой методической части работы (определение общих липидов и разделение многомерной тонкослойной хроматографией), а также за переписку с редакцией.

Ю. О. Веляев предложил способ дериватизации образца, содержащего общие липиды, провел пробоподготовку образца предложенным методом и настройку метода ввода пробы, а также газохроматографический анализ. Ю. О. Веляев отвечает за вопросы по описанию метода определения жирных кислот в общих липидах методом хромато-масс-спектрометрии.

А. Р. Осокин выполнил обработку и интерпретацию полученных данных, а также оформление части рукописи, которая касалась описания процесса газохроматографического исследования и пробоподготовки образца, содержащего общие липиды.

Конфликт интересов

Авторы утверждают, что у них нет конфликта интересов.

Contribution

A.V. Borodina proposed the research topic, collected the material, and set up methods for determining total lipids and their classification, as well as densitometric measurement of phospholipids, monoglycerides, diglycerides, sterols and triacylglycerols. A.V. Borodina also developed the general research design, wrote the paragraphs on total lipids and separation, and provided correspondence with the editors.

Yu.O. Veliaev proposed the method for derivatization of total lipids, performed the sample preparation, adjusted the injection method, and conducted the gas chromatographic analysis. Yu.O. Veliaev also described the method for determining fatty acids in total lipids by chromatography-mass spectrometry.

A.R. Osokin processed and interpreted the data, as well as described the gas chromatographic research and the sampling for total lipids.

Conflict of interest

The authors declared no conflict of interests regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. Parnova RG. Lipids as signaling platforms and signaling molecules. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2020;56(7):824–825. (In Russ.). https://doi.org/10.31857/S0044452920072176

2. Lisovaya EV, Viktorova EP, Sverdlichenko AV, Zhane MR. Effect of ultrasonic exposure on the efficiency of de-oiling fluid lecithins. Food Processing: Techniques and Technology. 2023;53(3):445–454. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-3-2447

3. Bakaytis VI, Golub OV, Miller YuYu. Fresh and processed wild *Cantharellus cibarius* L. growing in West Siberia: food value. Foods and Raw Materials. 2021;9(2):234–243. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2021-2-234-243

4. Fokina NN, Ruokolainen TR, Nemova NN, Martynova DM, Sukhotin AA. Fatty acids distribution in seston, tissues, and faecal pellets of blue mussels *Mytilus edulis* L. Doklady Biochemistry and Biophysics. 2020;495(1):624–631. (In Russ.). https://doi.org/10.31857/S2686738920060074

5. Mahony KE, Egerton S, Lynch SA, Blanchet H, Goedknegt MA, Groves E, *et al.* Drivers of growth in a keystone fished species along the European Atlantic coast: The common cockle *Cerastoderma edule*. Journal of Sea Research. 2022;179. https://doi.org/10.1016/j.seares.2021.102148

6. Carss DN, Brito AC, Chainho P, Ciutat A, de Montaudouin X, Otero RMF, *et al.* Ecosystem services provided by a non-cultured shellfish species: The common cockle *Cerastoderma edule*. Marine Environmental Research. 2020;158. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.104931

7. Kopiy VG, Bondarenko LV. Atlas of the inhabitants of the pseudo-littoral of the Sea of Azov – Black Sea coast of Crimea. Sevastopol: IBSS; 2020. 120 p. (In Russ.). https://doi.org/10.21072/978-5-6044865-1-1

8. Bejaoui S, Chaâbane M, Fouzai C, Chetoui I, Chalbi E, Nechi S, *et al.* Exploring the impacts of mercury chloride exposure on fatty acids profile, oxidative stress response and histomorphological aspect of *Cerastoderma edule* detoxifying organs. Ecological Indicators. 2020;118. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106798

9. Folch J, Lees M, Sloane Stanley CH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. Journal of Biological Chemistry. 1957;226(1):497–509. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5

10. Mikryakov DV, Mikryakov VR, Gordeev II. Lipid composition and oxidation processes in the blood and internal organs of the Antarctic toothfish *Dissostichus mawsoni* Norman, 1937 (Nototheniidae). Russian Journal of Marine Biology. 2021;47(3):160–166. (In Russ.). https://doi.org/10.31857/S0134347521030098

11. Kopytov YuP. A new variant of thin-layer chromatography for lipids and hydrocarbons. Ekologiya moray. 1983;13:76–80. (In Russ.). [Копытов Ю. П. Новый вариант тонкослойной хроматографии липидов и углеводородов // Экология моря. 1983. Т. 13. С. 76–80.]. https://elibrary.ru/YURATJ

12. Murzina SA, Pekkoeva SN, Churova MV, Nefedova ZA, Filippova KA, Falk-Petersen S, *et al.* Daily dynamics of lipids and fatty acids and the activity of enzymes of the energy and carbohydrate metabolism in young fish of the daubed shanny *Leptoclinus maculatus* (Fries, 1838) at different developmental stages during polar night. Ontogenez. 2020;51(2):143–153. (In Russ.). https://doi.org/10.31857/S047514502002007X

13. Merdzhanova A, Panayotova V, Dobreva D, Bratoeva K, Makedonski L. Health-beneficial properties of Black Sea shellfish for the Bulgarian consumers. Proceedings of the Nutrition Society. 2020;79. https://doi.org/10.1017S0029665120005285

14. Eibler D, Krüger S, Skírnisson K, Vetter W. Combined thin layer chromatography and gas chromatography withmass spectrometric analysis of lipid classes and fatty acids inmalnourished polar bears (*Ursus maritimus*) which swam to Iceland. Journal of Chromatography B. 2017;1046:138–146. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.01.043

15. Voronin AV. The densitometric quantitation of some drugs in whole blood. Bashkortostan Medical Journal. 2018;13(2):40–43. (In Russ.). [Воронин А. В. Денситометрическое определение некоторых лекарственных веществ в крови // Медицинский вестник Башкортостана. 2018. Т. 13. № 2. С. 40–43.]. https://elibrary.ru/USBUNE

16. Renkevich AYu, Kulikov AYu. Developing and validating a quantitative determination method for 4-aminobutanoic acid in sodium alendronate tablets using micellar thin layer chromatography. Methods and Objects of Chemical Analysis. 2013;8(4):199–206. (In Russ.). [Ренкевич А. Ю., Куликов А. Ю. Разработка и валидация методики количественного определения 4-аминобутановой кислоты в таблетках алендроната натрия методом мицеллярной тонкослойной хроматографии // Методы и объекты химического анализа. 2013. Т. 8. № 4. С. 199–206.].

17. Zakharenko AM, Kirichenko KYu, Vakhniuk IA, Golokhvast KS. Supercritical extraction technology of obtaining polyunsaturated acids from starfish (*Lysastrosoma anthosticta* Fisher, 1922). Food Processing: Techniques and Technology. 2021;51(4):753–758. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-4-753-758

18. Chen C, Li R, Wu H. Recent progress in the analysis of unsaturated fatty acids in biological samples by chemical derivatization-based chromatography-mass spectrometry methods. Journal of Chromatography B. 2023;1215. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123572

19. Juarez M, Polvillo O, Contò M, Ficco A, Ballico S, Failla S. Comparison of four extraction/methylation analytical methods to measure fatty acid composition by gas chromatography in meat. Journal of Chromatography A. 2008;1190(1–2):327–332. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.004

20. Irwinda R, Hiksas R, Siregar AA, Saroyo YB, Wibowo N. Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) status in severe preeclampsia and preterm birth: A cross sectional study. Scientific Reports. 2021;11. https://doi.org/10.1038/s41598-021-93846-w

21. Qiu J, Ji Y, Fang Y, Zhao M, Wang S, Ai Q, *et al.* Response of fatty acids and lipid metabolism enzymes during accumulation, depuration and esterification of diarrhetic shellfish toxins in mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Ecotoxicology and Environmental Safety. 2020;206. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111223

22. Panayotova V, Merdzhanova A, Stancheva R, Dobreva DA, Peycheva K, Makedonski L. Farmed mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Black Sea reveal seasonal differences in their neutral and polar lipid fatty acids profile. Regional Studies in Marine Science. 2021;44. https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101782

23. Hernando M, de Troch M, de la Rosa F, Giannuzzi L. Fatty acid response of the invasive bivalve *Limnoperna fortuneifed* with *Microcystis aeruginosa* exposed to high temperature. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology. 2021;240. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108925

24. Fiorini R, Ventrella V, Trombetti F, Fabbri M, Pagliarani A, Nesci S. Lipid-protein interactions in mitochondrial membranes from bivalve mollusks: Molecular strategies in different species. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2019;227:12–20. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.08.010

25. Anganea M, Gupta S, Fletcher GC, Summers G, Hedderley DI, Quek SY. Effect of air blast freezing and frozen storage on *Escherichia coli* survival, n-3 polyunsaturated fatty acid concentration and microstructure of Greenshell™ mussels. Food Control. 2020;115. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107284

26. Peñuela-Jiménez JH, Guevara M, Saucedo PE, Núñez MP, Troccoli L, Freites L. Influence of contrasting environmental variables on the fatty acid profile of the winged oyster *Pteria colymbus*. Regional Studies in Marine Science. 2021;41. https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101603

27. Chaâbanea M, Bejaoui S, Trabelsi W, Telahigue K, Chetoui I, Chalghaf M, *et al.* The potential toxic effects of hexavalent chromium on oxidative stress biomarkers and fatty acids profile in soft tissues of *Venus verrucosa*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2020;196. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110562

28. Almutairi AW, El-Sayed AE-KB, Reda MM. Combined effect of salinity and pH on lipid content and fatty acid composition of *Tisochrysis lutea*. Saudi Journal of Biological Sciences. 2020;27(12):3553–3558. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.07.027