

27. *Dresvyannikov A.F., Kolpakov M.E.* // Materials Research Bulletin. 2002. V.37. №2. P.291.  
28. *Дресвянников А.Ф., Колпаков М.Е.* // Журнал общей химии. 2005. Т.75. №2. С.177.  
29. *Matthies S., Lutterotti L., Wenk H.-R.* // J. Applied Crystallography. 1997. V.30, №1. P.31.  
30. The Rietveld method / Edited by *R.A. Young*. Int. Union of Cryst., Oxford University Press, New York, 1993. 402 p.

---

© **А. Ф. Дресвянников** – д-р хим. наук, проф. каф. аналитической химии, сертификации и менеджмента качества; **М. Е. Колпаков** – канд. хим. наук, доц. той же кафедры; **О. А. Лапина** – асп. той же кафедры; **Е. В. Пронина** – студ. КГТУ; **М. А. Цыганова** – студ. КГТУ.

УДК 543.544.43:612.123:612.397.22

**Л. Р. Салахова, Е. В. Никитина, А. В. Гарусов**

## **ЭКСПРЕССНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В КАПИЛЛЯРНОЙ КРОВИ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

*На основе обследования 109 пациентов с атеросклерозом сонных артерий и группы контроля из 16 человек изучена возможность применения экспрессного метода определения жирнокислотного профиля крови с использованием капиллярной крови и хроматографического метода анализа и исследован жирнокислотный состав липидов крови, а также проведена статистическая оценка метод. Предложено использовать метод определения содержания жирных кислот (ЖК) в капиллярной крови методом газовой хроматографии в качестве одного из диагностических тестов при сердечно-сосудистых заболеваниях.*

### **Введение**

В структуре смертности населения всех стран ведущее место занимают сердечно-сосудистые заболевания, обусловленные преимущественно атеросклеротическим поражением сосудов. Атеросклероз - патологический процесс, способный привести к развитию инфаркта миокарда, инсульта и заболеваний периферических сосудов.

На развитие атеросклероза оказывают влияние многие факторы риска, значимость которых существенно изменяется в зависимости от наших знаний. Одним из основных модифицируемых факторов риска атеросклероза является дислипидемия.

Липиды – гетерогенная группа соединений, общим свойством которых является относительная нерастворимость в воде, но растворимость в неполярных растворителях – эфире, бензоле, хлороформе и т.д. [1,2] Липиды являются обязательным компонентом клеток и тканей организма. Особенно много липидов содержится в форме запасов в жировой ткани. Они обеспечивают значительную часть суточной потребности энергии, но не это является их основной функцией. Липиды действуют как пищевые растворители жирорастворимых витаминов, служат источником незаменимых жирных кислот, синтезировать которые организм неспособен.

В плазме крови человека присутствуют 4 основных класса липидов: холестерин и его эфиры, триглицериды, фосфолипиды и жирные кислоты. Жирные кислоты классифицируют по насыщенности атомами водорода углеродной цепи на ненасыщенные жирные кислоты (НЖК) (все атомы углерода соединены одинарными ковалентными связями) и ненасыщенные моно - (МНЖК) (в углеродной цепи имеется одна двойная связь) и поли- (ПНЖК) (несколько двойных связей). Ненасыщенные жирные кислоты (ННЖК) подразделяют на 3 семейства по месту расположения первой двойной связи от концевой метильной группы [3]- омега-9 (олеиновая), омега-6 (линолевая, гамма-линоленовая, арахидоновая кислоты) и омега-3 (альфа-линоленовая, эйкозопентаеновая и докозагексаеновая кислоты).

Более 20 лет назад было высказано предположение о влиянии омега-3 ПНЖК на снижение смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Было показано, что у народов (эскимосы Гренландии, жители Японии, аборигены Аляски), потреблявших с пищей морские продукты (основной источник омега-3 ПНЖК) распространенность этих заболеваний ниже. Дальнейшие исследования подтвердили положительное действие ПНЖК [4,5,6]. Ряд ученых установили, что нарушение обмена липидов при некоторых сердечно-сосудистых заболеваниях выражается в избытке насыщенных и недостатке ненасыщенных жирных кислот [7-10].

Определение качественного и количественного состава жирных кислот в биологических жидкостях и тканях стало возможным благодаря применению хроматографических методов анализа, среди которых наиболее удобным и надежным оказался метод газовой хроматографии [11-13].

Джеймс и Мартин [14] первыми описали разделение жирных кислот от муравьиной до додекановой с помощью газовой хроматографии на силиконовых неподвижных фазах с регистрацией на выходе из колонки сильно размытых зон разделенных кислот. Добавлением стеариновой кислоты в неподвижную фазу авторы улучшили симметрию пиков, исключив при этом димеризацию кислот. Этот метод, однако, оказался непригодным для высших жирных кислот, поскольку стеариновая кислота испаряется из колонки при температурах, необходимых для хроматографического разделения.

Кропер и Хейвуд [15] предложили более перспективное решение, переводя кислоты перед разделением в метиловые эфиры, которые являются более летучими, чем свободные кислоты и, кроме того, не обладают способностью димеризоваться. Им удалось разделить кислоты, содержащие от 12 до 22 атомов углерода, в соответствии с числом атомов углерода, но степень разделения не была достаточной для выявления различия в степени ненасыщенности. В дальнейшем метод был улучшен другими исследователями путем использования более чувствительных детекторов и новых неподвижных фаз. [1, 16-19].

С помощью метода газовой хроматографии в настоящее время определяют жирнокислотный состав сыворотки крови в эксперименте и клинике, что позволяет получить более широкую информацию о состоянии жирового обмена у человека в норме и при различных патологических состояниях.

## Постановка задачи

Как указывалось выше, нарушение липидного обмена влияет на развитие сердечно-сосудистых заболеваний. Статистически обоснованные выводы о характере этого влияния могут быть сделаны на основе обследования больших групп пациентов. В связи с этим представляется важным провести оценку и апробацию экспрессного метода определения профиля жирных кислот с использованием капиллярной крови и газохроматографического метода анализа, а также оценить статистическую достоверность метода.

## Методы исследования

Всего обследованы 109 человек, 57 мужчин (52.3%) и 52 женщины (47.7%) в возрасте от 41 до 79 лет (средний –  $59.9 \pm 1.5$ ), страдающих ишемической болезнью сердца (ИБС), имеющих признаки атеросклероза сонных артерий. Группу контроля составили 16 человек (8 мужчин и 8 женщин), в возрасте от 45 до 70 лет ( $57.1 \pm 4.0$ ) без клинических проявлений ИБС, без ультразвуковых признаков атеросклероза сонных артерий и с уровнем общего холестерина менее 5.2 ммоль/л, холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС-ЛПНП) менее 3 ммоль/л.

Всем участникам проводили физикальное обследование (в том числе аускультацию сосудов шеи), биохимический анализ крови с определением показателей липидного профиля (общего холестерина, холестерина липопротеидов высокой плотности, ХС-ЛПНП, триглицеридов), ультразвуковое исследование сонных артерий в доплеровском режиме для выявления признаков атеросклероза (наиболее доступный и безопасный метод изучения поверхностно расположенных сосудов).

В ходе исследования концентрацию НЖК и ННЖК определяли в капиллярной крови методом газовой хроматографии [20]. Кровь для биохимического исследования брали из пальца утром натощак в день проведения анализа.

Полученной каплей крови пропитывали хроматографическую бумагу, которую затем помещали в стеклянную пробирку и приливали 1 мл 3N MeOH/HCl. Пробирку помещали в водяную баню. Гидролиз липидов и метилирование жирных кислот осуществляли путем нагревания пробирки с образцом крови на водяной бане при 90°C в течение 1 часа.

По окончании метилирования в пробу добавляли 2 мл дистиллированной воды, 2 мл насыщенного раствора KCl (хлорида калия) и экстрагировали 2 мл гексана 3-5 мин, после отстаивания верхний слой переносили в центрифужные пробирки, оставшийся осадок экстрагировали повторно 2 мл гексана. Экстракты объединяли и после центрифугирования упаривали досуха в струе азота, добавляли 0,1 мл гексана и 10 мкл конечной пробы вводили в газовый хроматограф.

Анализ метиловых эфиров жирных кислот осуществляли на газовом хроматографе «Хром – 5» (Чехия) с пламенно-ионизационным детектором. Для анализа использовали две аналитические колонки: набивную металлическую (250x0,04см) с 5% мас. «Реоплекса-400» и капиллярную - (30м x 0.32мм) с ZB-Wax (Phenomenex, США), что позволило сравнить результаты, получаемые в различных условиях. Применялось ступенчатое программирование температуры от 160°C 3 °/мин до 190°C (6 мин) и затем до 210°C (10 °/мин). Температура испарителя и детектора - 260°C. Газ-носитель – гелий. Оба варианта анализа дали сопоставимые результаты, ошибка определения не превышала 5%.

Идентификации метиловых эфиров жирных кислот проводилась по временам удерживания с использованием стандартов метиловых эфиров жирных кислот (SIGMA). Количественный расчет содержания метиловых эфиров жирных кислот проводили методом

простой нормировки по площадям пиков в относительных процентах от общей суммы площадей пиков.

Статистические расчеты выполнены с помощью программы Microsoft Excel. Рассчитывали средние величины, их стандартные (среднеквадратические) отклонения, ошибки репрезентативности (средние ошибки средней арифметической величины). Гипотезу о равенстве средних оценивали по t-критерию Стьюдента (непарный двухвыборочный t-критерий).

### Результаты

Всего в крови идентифицировано восемь жирных кислот, из них две НЖК (пальмитиновая, стеариновая), и ННЖК (МНЖК олеиновая и ПНЖК линолевая, арахидоновая (омега-6), альфа-линоленовая, эйкозопентаеновая и докозагексаеновая кислоты (омега-3)).

В группе контроля на долю двух НЖК приходится  $41.3 \pm 5.2\%$ , из них большую часть составляет пальмитиновая кислота –  $26.7 \pm 3.2\%$ ; концентрация стеариновой кислоты –  $14.6 \pm 3.3\%$ . Содержание ННЖК составляет  $58.0 \pm 4.3\%$ : МНЖК –  $17.7 \pm 3.2\%$ , ПНЖК –  $40.4 \pm 5.6\%$  (линолевая –  $23.5 \pm 5.1\%$ , альфа-линоленовая –  $0.9 \pm 0.4\%$ , арахидоновая –  $9.0 \pm 4.6\%$ , эйкозапентаеновая –  $4.2 \pm 1.7\%$  и докозагексаеновая –  $2.7 \pm 2.5\%$ ).

У больных ИБС с ультразвуковыми признаками атеросклероза сонных артерий при сравнении с группой контроля было выявлено статистически достоверное увеличение относительного содержания НЖК ( $48.8 \pm 5.4\%$ ,  $p < 0.001$ ), преимущественно из-за пальмитиновой кислоты ( $34.6 \pm 5.3\%$ ), а также снижение фракции ННЖК ( $51.2 \pm 5.4\%$ ,  $p < 0.001$ ), в основном за счет ПНЖК ( $32.6 \pm 5.7\%$ ,  $p < 0.001$ ), а особенно – омега-3 жирных кислот – ЭПК ( $3.0 \pm 2.4\%$ ), ДГК ( $1.1 \pm 0.9\%$ ) и альфа-линоленовой ( $0.5 \pm 0.3\%$ ). Содержание омега-6 арахидоновой кислоты у пациентов с ИБС было ниже, чем в группе контроля ( $5.7 \pm 2.2\%$ ,  $p < 0.01$ ). Достоверных различий между содержанием стеариновой ( $14.2 \pm 2.3\%$ ), олеиновой ( $18.6 \pm 3.2\%$ ), линолевой ( $22.4 \pm 4.1\%$ ) кислот не выявлено.

Результаты определения содержания жирных кислот в крови больных ИБС и в группе контроля представлены в таблице 1.

**Таблица 1 - Процентное распределение жирных кислот в капиллярной крови лиц из группы контроля и больных ИБС**

Жирная кислота	Группа контроля ( $M_{cp} \pm S.D.$ ), %	Больные ИБС ( $M_{cp} \pm S.D.$ ), %	p
Пальмитиновая	$26.7 \pm 3.2$	$34.6 \pm 5.3$	$< 0.001$
Стеариновая	$14.6 \pm 3.3$	$14.2 \pm 2.3$	-
Олеиновая	$17.7 \pm 3.2$	$18.6 \pm 3.2$	-
Линолевая	$23.5 \pm 5.1$	$22.4 \pm 4.1$	-
α-линоленовая	$0.9 \pm 0.4$	$0.5 \pm 0.3$	0.003
Арахидоновая	$9.0 \pm 4.6$	$5.7 \pm 2.2$	0.01
Эйкозапентаенвая	$4.2 \pm 1.7$	$3.0 \pm 2.4$	0.02
Докозагексаеновая	$2.7 \pm 2.5$	$1.1 \pm 0.9$	0.03
Сумма НЖК	$41.3 \pm 5.2$	$48.8 \pm 5.4$	$< 0.001$
Сумма ННЖК	$58.0 \pm 4.3$	$51.2 \pm 5.4$	$< 0.001$
Сумма ПНЖК	$40.4 \pm 5.6$	$32.6 \pm 5.7$	$< 0.001$

## Выводы

Проведенное сравнительное исследование содержания жирных кислот у больных с документированным атеросклерозом сонных артерий и пациентов без атеросклероза сонных артерий показало, что нарушение липидного обмена при атеросклерозе сопровождается изменением состава жирных кислот. Было установлено, что у больных с атеросклерозом сонных артерий изменение спектра жирных кислот выражается в статистически достоверном увеличении фракции НЖК и снижении ННЖК, особенно ПНЖК.

Процентное распределение восьми жирных кислот (пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой, альфа-линоленовой, арахидоновой, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой) в крови контрольной группы и больных ИБС существенно различается. Количество жирных кислот в крови больных характеризуется более высоким содержанием пальмитиновой кислоты и низким - омега-3 альфа - линоленовой, эйкозапентаеновой, докозагексаеновой и арахидоновой кислот

Методика определения профиля жирных кислот в крови, основанная на газохроматографическом анализе капиллярной крови, собираемой на хроматографическую бумагу с последующим метилированием, позволяет получать статистически обоснованные результаты и может быть использована в качестве одного из диагностических тестов при сердечно-сосудистых заболеваниях.

## Литература

1. Берчфилд Г., Сторрс Э. Газовая хроматография в биохимии. М: Мир, 1964. 503с.
2. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии. Справочник. С-Пб: Интермедиа, 2002. 600 с.
3. Перова Н.В. Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты в кардиологии// Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2005. Т.4. №4. С.101-107.
4. Bemelmans W.J.E., Lefrandt J.D., Edith J.M. et al. Change in saturated fat intake is associated with progression of carotid and femoral intima-media thickness, and with levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 // *Atherosclerosis*. 2002. Vol.163. is. 1. P.113-120.
5. Hino A., Adachi H., Toyomasu K et al. Very long chain n-3 FA intake and carotid atherosclerosis .An epidemiological study evaluated by ultrasonography // *Atherosclerosis*. 2004. Vol.176. is. 1. P. 145-149.
6. Matsuda Y., Ootani T., Yamada C. et.al. The effects of dietary fatty acids contents on the atherosclerosis of carotid artery // *Atherosclerosis*. 1997. Vol. 134. is. 1-2. P.299.
7. Алимova Е.К. Жирнокислотный состав липидов сыворотки крови при атеросклерозе // Вопросы медицинской химии. 1970. Т. 16. Вып 3. С.310-316.
8. Аширматов А.Э. К вопросу о насыщенных жирных кислотах крови у больных атеросклерозом // Медицинский журнал Узбекистана. 1973. №10. С.21-23.
9. Pirro M., Mauriège P., Tchernof A et.al. Plasma free fatty acid levels and the risk of ischemic heart disease in men: prospective results from the Québec Cardiovascular Study // *Atherosclerosis*. 2002. Vol.160. is.2. P.377-384.
10. Albert C.V., Campos H., Stampfer M.J. et al. Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death // *N Engl J Med*. 200. № 346. P.1113-1118.
11. Прокопенко В.Ф., Покрасен Н.М. Определение высших жирных кислот сыворотки крови методом газо-жидкостной хроматографии с применением диазометана для их метилирования// Лабораторное дело. 1975. №2. С.90-92.
12. Мансурова И.Д., Султанова У.К. Определение содержания высших жирных кислот в сыворотке крови здоровых и больных хроническим панкреатитом методом газовой хроматографии// Лабораторное дело. 1975. №9. С.524-527.
13. Сняк К.М., Оргель М.Я., Крук В.И. Метод приготовления липидов крови для газохроматографического исследования// Лабораторное дело. 1976. №1. С.37-41.

14. *James A.T., Martin A.J.P.* Gas-liquid partition chromatography. The separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid // *Biochem.J.* 1952. Vol.50. P.679-69.
15. *Cropper F.R., Heywood A.* Analytical separation of the methyl esters of the C12-C22 fatty acids by vapour-phase chromatography. *Nature.* 1953. Vol.172. P.1101-1102.
16. *Seppanen-Laakso T., Laakso I., Hiltunen R.* Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. // *Anal. Chim. Acta.* 2002. Vol. 465. P.39-62.
17. *Brondz I.* Development of fatty acids analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques // *Anal. Chim. Acta.* 2002. Vol. 465. P.1-37.
18. *Chen S., Chuang Y.* Analysis of fatty acids by column liquid chromatography. // *Anal. Chim. Acta.* – 2002. Vol. 465. P.145-155.
19. *Lima E.S., Abdalla D.S.P.* High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples // *Anal. Chim. Acta.* 2002. Vol. 465. P.81-91.
20. *Marangoni F, Colombo C., Galli C.* A method for the direct evaluation of the fatty acid status in a drop of blood from a fingertip in humans: applicability to nutritional and epidemiological studies // *Anal. Biochem.* 2004. 326. P.267-272.

---

© **Л. Р. Салахова** – асп. каф. факультета терапии КГМУ; **Е. В. Никитина** – канд. биол. наук, доц. каф. технологии пищевых производств КГТУ; **А. В. Гарусов** - канд. хим. наук, вед. науч. сотр. каф. микробиологии КГУ.