

Оригинальная статья / Original article

УДК 612.3.397:543.05

<http://dx.doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-3-519-528>

Принципы дифференциального центрифугирования сложных смесей липидов в градиенте полярности

© В.А. Саркисян, Ю.В. Фролова, В.А. Шипелин, В.М. Коденцова, А.А. Кочеткова

Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи,
г. Москва, Российская Федерация

Резюме: Фосфолипиды являются одним из важнейших классов природных регуляторов физиологических процессов, в связи с чем поиск способов их аналитического и препаративного разделения представляет значительный интерес. Целью данного исследования являлась разработка принципов дифференциального центрифугирования сложных смесей липидов на примере фосфолипидов. В работе были использованы расчетные методы оценки параметров растворимости Хансена для фосфолипидов, а также инструментальные методы исследования, в том числе: тензометрия (измерение плотности), динамическое лазерное светорассеяние (оценка размера частиц), ИК-спектроскопия с преобразованиями Фурье. Данные методы были применены к образцам фосфолипидов, выделенных из головного мозга телят. Охарактеризовано сродство изучаемых фосфолипидов к отдельным слоям растворителей. В результате проведенных работ была предложена математическая модель процесса дифференциального центрифугирования сложных смесей фосфолипидов в градиенте полярности растворителя на основе уравнений Нэрнста – Бруннэра и основного уравнения центрифугирования. Установлены оптимальные параметры процесса центрифугирования (1500 об./мин в течение 15 мин при температуре 2–4 °С). В результате анализа ИК-спектров были выявлены существенные отличия между веществами на каждом слое растворителя, обусловленные разделением классов фосфолипидов между слоями растворителей. Отмечено, что для повышения эффективности разделения сложных смесей фосфолипидов необходим дальнейший поиск новых комбинаций растворителей, способствующих более специфичному разделению смеси. Также актуальными для дальнейших исследований являются модификация объема слоев растворителей и определение его соотношения с объемом введенной суспензии. Учитывая аппаратную простоту и низкую стоимость разработанного метода, его можно легко масштабировать на промышленные условия получения биологически активных веществ для включения их в состав пищевых продуктов.

Ключевые слова: фосфолипиды, дифференциальное центрифугирование, градиент полярности, параметры Хансена

Благодарности: Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 14-16-00055).

Информация о статье: Дата поступления 28 ноября 2018 г.; дата принятия к печати 5 сентября 2019 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2019 г.

Для цитирования: Саркисян В.А., Фролова Ю.В., Шипелин В.А., Коденцова В.М., Кочеткова А.А. Принципы дифференциального центрифугирования сложных смесей липидов в градиенте полярности // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9, N 3. С. 519–528. DOI: 10.21285/2227-2925-2019-9-3-519-528

Polarity gradient issues in differential centrifugation of complex lipid mixtures

© Varuzhan A. Sarkisyan, Yulia V. Frolova, Vladimir A. Shipelin,
Vera M. Kodentsova, Alla A. Kochetkova

Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russian Federation

Abstract: Since phospholipids are one of the most important classes of natural regulators of physiological processes, the search for methods allowing their analytical and preparative separation is of considerable interest. The aim of this study is to reveal principles underlying the differential centrifugation of complex lipid mixtures on

the example of phospholipids. The current study uses calculation methods for estimating the Hansen solubility parameters for phospholipids, as well as instrumental research methods comprising tensometry (density measurement), dynamic laser light scattering (particle size evaluation) and IR spectroscopy with Fourier transformation. These methods were applied to samples of phospholipids isolated from calf brain tissue. The affinity of the studied phospholipids to individual solvent layers was characterised. As a result of the work performed, a mathematical model of the process of differential centrifugation of phospholipid complex mixtures in the gradient of solvent polarity is proposed on the basis of the Nernst-Brunner equations and main centrifugation equation. The established optimal parameters of the centrifugation process comprise 1500 rpm for 15 minutes at a temperature of 2–4 °C. IR spectral analysis revealed significant differences between the substances of each solvent layer, which are due to the separation of the phospholipid classes between the layers of solvents. The necessity for further research into new combinations of solvents contributing to a more specific separation of the mixture and aimed at increasing the separation efficiency of phospholipid complex mixtures, is justified. The volume modification of solvent layers and determination of its ratio with the volume of the introduced suspension also appear to be relevant further research directions. Given the simplicity and low cost of the hardware, the developed method can be easily scaled to industrial conditions for the production of biologically active substances for inclusion in food products.

Keywords: phospholipids, differential centrifugation, polarity gradient, Hansen parameters

Acknowledgements: The study was funded by the Russian Science Foundation (Project no. 14-16-00055).

Information about the article: Received November 28, 2018; accepted for publication September 5, 2019; available online September 30, 2019.

For citation: Sarkisyan V.A., Frolova Yu.V., Shipelin V.A., Kodentsova V.M., Kochetkova A.A. Polarity gradient issues in differential centrifugation of complex lipid mixtures. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* [Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology]. 2019, vol. 9, no. 3, pp. 519–528. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2019-9-3-519-528

ВВЕДЕНИЕ

Структурное разнообразие липидов и их биологические функции в живых организмах позволяют отнести их к одним из важнейших классов природных регуляторов физиологических процессов [1, 2]. Изменения в липидном обмене играют важную роль в патогенезе большинства распространенных заболеваний [3–5] при этом степень изученности отдельных классов липидов недостаточна.

Все аналитические процедуры для определения отдельных липидных соединений включают три основные стадии: извлечение образца, аналитическое разделение, идентификация и количественное определение [6]. Существующие методы разделения и количественного определения липидов делятся на хроматографические, электрофоретические, масс-спектрометрические и спектроскопические [7, 8].

Одним из широко применяемых методов для аналитических и препаративных исследований (в связи с низкой стоимостью и высокой эффективностью) является дифференциальное центрифугирование в градиенте плотности, при котором изучаемые смеси разделяются на основании различия их плотностей. Существенным недостатком этого метода является то, что центрифугирование проводится в водных растворах, плотность которых всегда выше плотности веществ липидной природы, вследствие чего невозможно проводить дифференциальное разделение смесей липидов [9].

В связи с большим влиянием липидов на развитие заболеваний, а также сложностью их выделения разработка доступного метода их разделения является актуальной задачей. Учитывая, что фосфолипиды существенным образом отличаются по полярности, использование данного свойства представляется перспективным в качестве основы для разработки метода разделения. Целью данного исследования являлась разработка принципов дифференциального центрифугирования сложных смесей липидов на примере фосфолипидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для исследований непосредственно с завода-производителя (ООО «Пушкинский мясной двор») были получены мозги телят (до 1 года жизни) прошедшие ветеринарно-санитарную экспертизу. В качестве органических растворителей использовали: глицерин (ч.д.а., ГОСТ 6259-75), изобутиловый спирт (ч.д.а., ГОСТ 6016-77), ацетон (для спектроскопии, СТП ТУ СОМР 3-093-09), н-гексан (для спектроскопии, СТП ТУ СОМР 2-010-06). Все остальные реактивы категории «химически чистые».

Из исследуемых образцов головного мозга телят непосредственно после приема были отобраны партии белого вещества массой 80,0±2,0 г и помещены в герметичные емкости из темного стекла, содержащие 1 л смеси гексан:изопропанол (3:2) с 4,8 мг бутилгидроксанизола в качестве антиоксиданта. Полученные образцы хра-

нились при температуре минус 27 °С до момента использования.

Экстракция липидов была проведена согласно традиционной методике, предложенной А. Hara и N.S. Radin [10]. Полученные таким образом фракции общих липидов (объемом по 500 мл) были выпарены на ротормном испарителе Hei-VAP Value (Heidolph, Германия) до объема растворителя, равного 10–12 мл. В колбу с образцом было внесено 500 мл холодного ацетона (4–5 °С), полученная смесь была выдержана в ледяной бане при температуре 2–4 °С в течение 30 мин. Образовавшийся осадок, содержащий фракцию полярных липидов, дважды центрифугировали при 2500 об./мин в течение 15 мин при температуре 0–2 °С (центрифуга Beckman J-6B, США). Из полученного осадка методом ресуспендирования на ультразвуковом диспергаторе МФ 93.1 (МЭЛФИЗ, Россия) в холодном ацетоне (30 с, при 200 Вт/см²) получали суспензию фосфолипидов (10%-ный раствор) для дальнейших исследований.

Средний размер частиц фосфолипидов и распределение по размерам в суспензии измеряли методом динамического лазерного светорассеяния [11] на приборе Nanotrac Wave (Microtrac Inc., США) с использованием программного обеспечения Microtrac FLEX (v.11.0.01) по стандартным протоколам производителя. Образец анализировали шесть раз с получением среднего размера частиц. Испытания проводились при постоянной температуре – 22 °С.

Суспензию фосфолипидов разделяли методом центрифугирования в градиенте полярности.

При определении параметров, критичных для разделения смеси фосфолипидов в изучаемой системе, необходимо учитывать одновременное протекание двух процессов: растворения осадка фосфолипидов и оседание частиц при центрифугировании.

В качестве уравнения для расчета скорости растворения осадка фосфолипидов в отдельном слое растворителя было использовано диффузионное уравнение Нэрнста – Бруннэра, широко используемое в научной практике [12–14]:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DS}{Vh}(C_s - C_t), \quad (1)$$

где dC/dt – скорость растворения вещества; D – коэффициент диффузии; S – площадь растворяемых частиц; V – объем растворителя; h – толщина диффузного слоя; C_s – концентрация насыщенного раствора; C_t – концентрация вещества в момент времени.

При условии, что $\left| \frac{\Delta t}{t_0} \right| \ll 1$, уравнение (1)

имеет вид:

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{DS}{Vh}(C_s - C_t), \quad (2)$$

Коэффициент диффузии в данном уравнении равен соотношению

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}, \quad (3)$$

где k – константа Больцмана; T – абсолютная температура; η – вязкость растворителя; r – радиус частиц дисперсной фазы.

Принимая во внимание, что время, в течение которого происходит диффузия фосфолипидов в слое растворителя (Δt), является временем седиментации частиц осадка при центрифугировании [15], его можно выразить математически следующим выражением:

$$\Delta t = \frac{4,5\eta}{\omega^2 r^2 (\rho - \rho_{solv})} \ln \frac{R_{max}}{R_{min}}, \quad (4)$$

где ω – угловая скорость ротора; ρ – плотность частиц дисперсной фазы; ρ_{solv} – плотность растворителя; R_{max} – расстояние от оси вращения ротора до конца слоя растворителя; R_{min} – расстояние от оси вращения ротора до начала слоя растворителя.

Подставляя уравнения (3) и (4) в уравнение (2) при допущении, что частицы осадка фосфолипидов имеют сферическую форму и плохо растворимы, получим основное уравнение для расчета концентрации фосфолипидов на каждом отдельном слое растворителя:

$$\Delta C = \frac{1,5kTC_s}{\omega^2 r V h (\rho - \rho_{solv})} \ln \frac{R_{max}}{R_{min}}, \quad (5)$$

Согласно уравнению (5) процесс разделения липидов при центрифугировании в градиенте полярности растворителя при постоянной скорости вращения, толщине диффузного слоя и температуре зависит от расстояний до оси вращения, концентрации насыщенного раствора дисперсной фазы в слое растворителя, от разницы в плотности частиц дисперсной фазы и растворителя, а также от размера частиц.

Уравнение (5) объединяет процессы центрифугирования и диффузии, протекающие в рамках предложенного метода. Ключевым с точки зрения физического смысла данного уравнения является то, что количество растворенного на каждом слое вещества обратно пропорционально скорости оседания частиц. Таким образом, при замедлении скорости оседания частиц может быть достигнута наиболее полная диффузия растворимых в конкретном слое веществ (повышение ΔC). В случае слишком высокой скорости оседания частиц диффузия может проходить не полностью (снижение ΔC).

В условиях эксперимента расстояния слоев растворителя до оси вращения отличаются несущественно, следовательно, изменением $\ln(R_{max}/R_{min})$ можно пренебречь.

В связи с тем что прямое экспериментальное определение концентрации насыщенного раствора отдельных групп фосфолипидов затруднительно, в данной работе был использован косвенный критерий R_a^2 в качестве меры сродства к растворителю, основанный на расчетах параметров растворимости Хансена [16–18].

Параметры растворимости в отдельных слоях растворителя были определены для основных групп фосфолипидов мозга телят: фосфати

дилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилхолин (ФХ), сфингомиелин (СМ), а также алкенильная форма ФЭ. Для каждой из групп фосфолипидов расчет производили с тремя наборами углеводородных радикалов в sn-1 и sn-2 положении соответственно: C16:0,C16:0; C18:1,C18:1 и C18:0,C22:6, отличающихся по длине радикала и степени ненасыщенности. Алкенильная форма радикала в sn-1 положении обозначена символом «а». Общая характеристика исследуемых фосфолипидов приведена в таблице.

Характеристика исследуемых фосфолипидов

Characteristics of the studied phospholipids

Фосфолипид	Количество функциональных групп											Vm
	CH ₃	CH ₂	-CH=	-CH-	ОН	-CO- кет	-COO- сл.эф.	-O-	-PO ₄	-N<	-NH-	
C16:0,C16:0-СМ	2	29	2	2	1	1	0	0	1	1	1	752,2
C18:1,C18:1-СМ	2	29	6	2	1	1	0	0	1	1	1	810,1
C18:0,C22:6-СМ	2	29	14	2	1	1	0	0	1	1	1	863,6
C16:0,C16:0-ФХ	4	32	0	1	0	0	2	0	1	1	0	815,6
C18:1,C18:1-ФХ	4	32	4	1	0	0	2	0	1	1	0	873,5
C18:0,C22:6-ФХ	4	32	12	1	0	0	2	0	1	1	0	926,9
C16:0,C16:0-ФЭ	2	32	0	1	0	0	2	0	1	1	0	767,8
C18:1,C18:1-ФЭ	2	32	4	1	0	0	2	0	1	1	0	826,7
C18:0,C22:6-ФЭ	2	32	12	1	0	0	2	0	1	1	0	880,1
C16:0a,C16:0-ФЭ	2	29	2	1	0	0	1	1	1	1	0	751,1
C18:1a,C18:1-ФЭ	2	29	6	1	0	0	1	1	1	1	0	808,9
C18:0a,C22:6-ФЭ	2	29	14	1	0	0	1	1	1	1	0	862,3

Расчеты параметров растворимости были проведены при помощи метода Hoftyzer и Van Krevelen, согласно которому частичные параметры растворимости рассчитываются по формулам:

$$\delta_d = \frac{\sum F_{di}}{V}, \quad (6)$$

$$\delta_p = \frac{\sum F_{pi}^2}{V}, \quad (7)$$

$$\delta_h = \sqrt{\frac{\sum F_{hi}}{V}}, \quad (8)$$

где δ_d , δ_p , δ_h – частичные параметры растворимости, описывающие вклад лондоновских дисперсионных сил, диполь-дипольных взаимодействий и образования водородных связей соответственно, МПа^{1/2}; V – молярный объем вещества, см³/моль; F_{di} и F_{pi} – вклад функциональной группы молекулы в дисперсионную компоненту и диполь-дипольные взаимодействия, МПа^{1/2}·моль¹; E_{hi} – вклад функциональной группы в энергию образования водородных связей, Дж/моль.

Степень сродства изучаемых фосфолипидов к каждому слою растворителя была определена по приведенной ниже формуле (в скобках указана разница между соответствующими па-

раметрами растворителя и фосфолипида):

$$R_a^2 = 4 (\delta_{D2} - \delta_{D1})^2 + (\delta_{P2} - \delta_{P1})^2 + (\delta_{H2} - \delta_{H1})^2 \quad (9)$$

Измерение плотности смеси растворителей проводилось на тензиометре серии К 20S (KRUSS, Германия) при температуре 4–5 °С в трех повторностях.

Выделение сухого остатка фосфолипидов в каждом отдельном слое растворителя после центрифугирования проводили методом Фолча в системе хлороформ:метанол (2:1) с последующим упариванием растворителя в токе азота при 30±1 °С [19].

Спектроскопическое исследование образцов было проведено на ИК-Фурье спектрометре Tenzor 27 (Bruker, Германия) аналогично методу, описанному I. Dreissig с соавторами [20] с изменениями. Аликвоты хлороформного раствора фосфолипидов объемом 100 мкл были добавлены к 500 мг бромида калия (KBr) в агатовой ступке и высушены в течение 5 минут при 40 °С для удаления растворителя. Высушенные образцы были гомогенизированы в ступке в течение 5 с с последующим прессованием в таблетки. ИК-спектр для образцов был записан в диапазоне от 4000 до 400 см⁻¹ со спектральным разрешением 4 см⁻¹. Для исследований были использованы усредненные образцы от 100 сканирований. Все спектры были предварительно обработаны с использованием программы

OPUS 6.5 (Bruker, Германия) с целью коррекции базовой линии спектра и вклада паров воды и углекислого газа.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ SPSS Statistics 20. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для разделения суспензии фосфолипидов (10%-ный раствор в ацетоне), полученной по выше описанной методике, на первом этапе работы подбирались оптимальные соотношения растворителей. Разделение фосфолипидной фракции на субфракции может происходить в жидкостях различной полярности, плотности и их смесях. В качестве компонентов системы для разделения суспензии фосфолипидов были взяты изобутанол, глицерин и их смеси. Выбор данных растворителей обусловлен их взаимной растворимостью, способностью к образованию водородных связей между собой и с фосфолипидами при отсутствии необратимых химических взаимодействий, а также возможностью составления на их основе смесей различной полярности и плотности. Проведенные предварительные исследования распределения фосфолипидной суспензии показали, что при центрифугировании суспензии в изобутаноле (рис. 1.1) суспензия оседает на дне; при центрифугировании в глицерине (рис. 1.2) суспензия остается на поверхности глицерина; при соотношении изобутанол:глицерин (1:1) образуется двухкомпонентная система, в которой суспензия фосфолипидов остается на границе раздела фаз (рис. 1.3); при использовании системы изобутанол:глицерин (2:1) образуется однородная смесь растворителей, в которой суспензия фосфолипидов растворена полностью (рис. 1.4).

В дальнейшем была рассмотрена возможность растворения субфракций фосфолипидов в растворах с различной степенью полярности и плотности.

В исследуемой суспензии фосфолипидов определен средний гидродинамический диаметр частиц (рис. 2).

Результаты исследований показали, что 10%-ная суспензия фосфолипидов в ацетоне на 95,2% представлена частицами со средним гидродинамическим диаметром 1306 нм и на 4,8% – частицами 3780 нм; 10-й перцентиль составил 918 нм, 90-й перцентиль – 1782 нм. В суспензии содержатся как мелкие частицы фосфолипидов размером от 687 нм, так и крупные, размером до 6540 нм.

В рамках общих представлений было принято, что процесс разделения фосфолипидов должен протекать по следующей схеме (рис. 3).

Как показано на рис. 3, система градиентного центрифугирования составлена из несмешивающихся слоев растворителей с возрастанием плотности и полярности с увеличением доли глицерина. При этом подразумевалось, что растворенные на каждом слое фосфолипиды задерживаются в данном слое, а нерастворенный осадок под действием гравитационных сил проходит на следующий слой. Объемы слоев растворителей равны между собой и относятся к объему суспензии как 2:1.

Изменение плотности между слоями несет линейный характер (коэффициент Пирсона $r=0,999$), в связи с этим изменение времени прохождения частиц суспензии будет иметь также линейный характер согласно уравнению (4).

В соответствие с выше описанной методикой была определена степень сродства отдельных фосфолипидов по отношению к слою смеси растворителя (рис. 4).

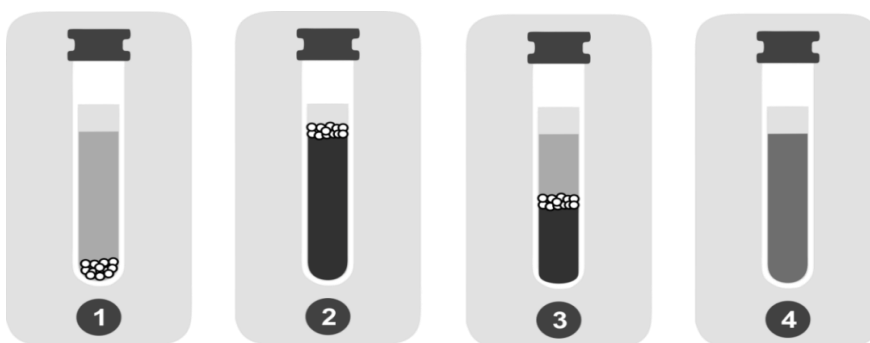


Рис. 1. Схематичное представление поведения фосфолипидной суспензии в исследуемых системах: 1 – изобутанол; 2 – глицерин; 3 – двухкомпонентная система изобутанол:глицерин (1:1); 4 – смесь изобутанол:глицерин (2:1); сферами обозначен осадок фосфолипидов

Fig. 1. Phospholipid suspension behavior in the studied systems: 1 – isobutanol; 2 – glycerol; 3 – isobutanol:glycerin (1:1); 4 – isobutanol:glycerin (2:1); spheres indicate the phospholipids precipitate

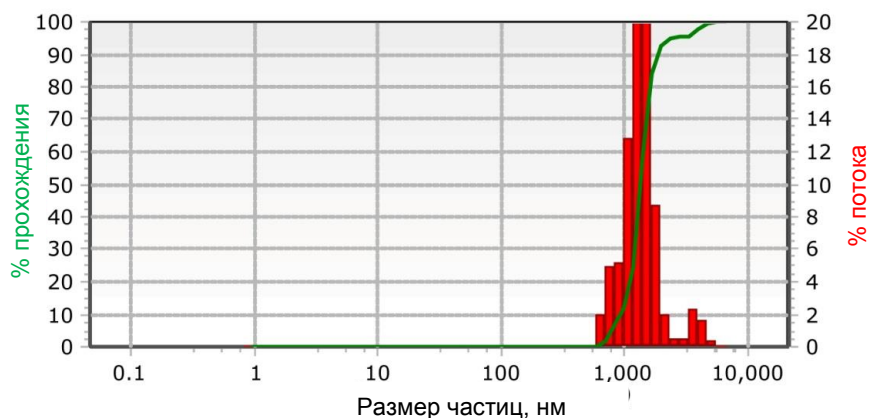


Рис. 2. Распределение размеров частиц суспензии фосфолипидов в зависимости от интенсивности светорассеяния

Fig. 2. Particle size distribution of the phospholipids suspension depending on the light scattering intensity

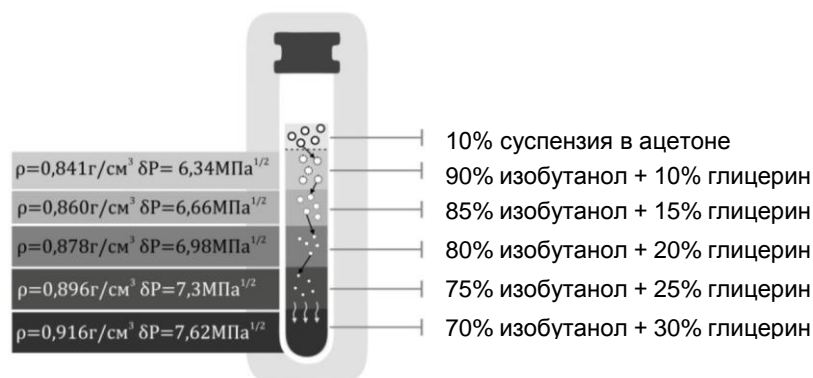


Рис. 3. Общая схема процесса разделения смеси фосфолипидов

Fig. 3. General scheme of the phospholipids separation process

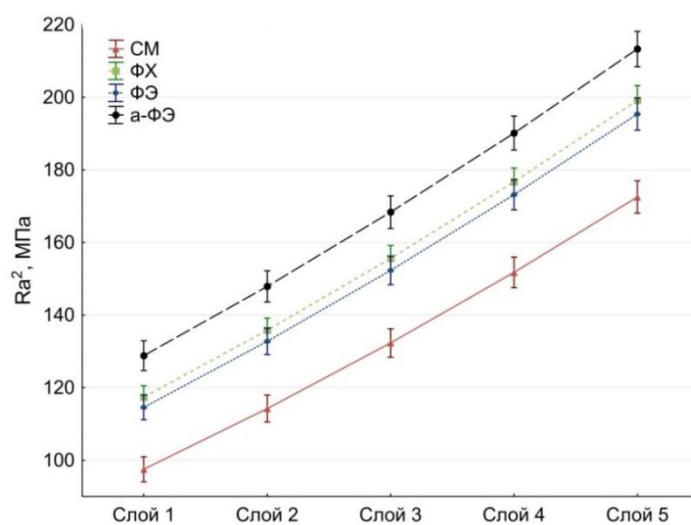


Рис. 4. Определение степени сродства отдельных классов фосфолипидов по отношению к слою смеси растворителя

Fig. 4. Determination of affinity degree of individual classes of phospholipids in relation to the solvent mixture layer

Как показано на рис. 4, отдельные классы фосфолипидов имеют существенные отличия в степени сродства к слоям растворителя. При этом отличия в зависимости от длины цепи или степени насыщенности несущественны внутри конкретного класса. В частности, в изучаемой системе растворителей расчетные значения Ra^2 для класса сфингомиелинов достоверно отличаются от данных значений для классов фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и алкенилфосфатидилэтаноламина. В то же время расчетные значения Ra^2 между классами фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина не имеют достоверных отличий.

Принимая во внимание проведенные исследования, на втором этапе работы было осуществлено центрифугирование образцов суспензии фосфолипидов в ацетоне. Установлено, что максимальная скорость центрифугирования, при которой осадок фосфолипидов полностью растворяется при прохождении через слои растворителя, составляет 1500 об./мин в течение 15 мин. В области температуры осаждения фосфолипидов в ацетоне температура центрифугирования поддерживалась на уровне 2–4 °C с целью исключения преждевременного рас-

творения осадка фосфолипидов. При этом отмечено, что при данной температуре смешение градиентных слоев растворителей минимально.

После проведения центрифугирования аликвоты от каждого слоя были отобраны и проанализированы методом ИК-Фурье спектроскопии. Характерные ИК-спектры веществ, растворенных в каждом слое растворителя, приведены на рис. 5.

Анализ спектров свидетельствует о том, что вещества, распределившиеся между слоями, имеют существенные отличия в характерных полосах поглощения, а именно: в области 1730–1750 cm^{-1} – валентные колебания C=O группы некоторых фосфолипидов и эфиров холестерина; в областях 1443 cm^{-1} – вибрационные колебания циклической CH_2 группы холестерина; 1465–1467, 1378–1381, а также 1365 cm^{-1} – вибрационные колебания CH_2 и CH_3 жирных кислот. Отмечены отличия в поглощении в областях 1243 cm^{-1} и 1225–1234 cm^{-1} , характерных для ассиметричных валентных колебаний SO_3 группы сульфатидов и PO_2 групп фосфолипидов, также существенны отличия в области отпечатков пальцев (ниже 1200 cm^{-1}) [20].

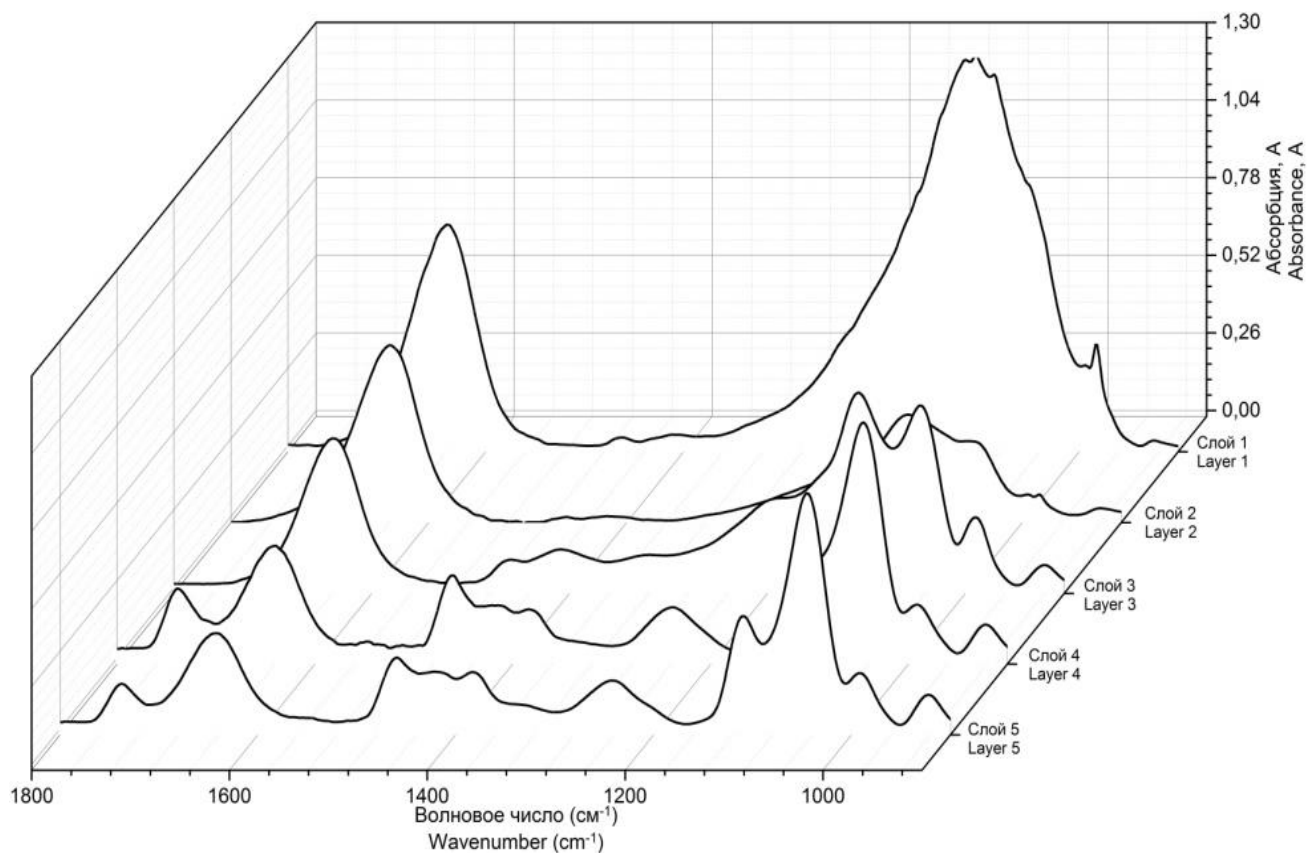


Рис. 5. ИК-спектры веществ, растворенных в каждом слое растворителя в процессе центрифугирования

Fig. 5. IR spectra of substances dissolved in each solvent layer in centrifugation process

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследований были разработаны принципы дифференциального центрифугирования сложных смесей фосфолипидов в системе глицерин:изобутанол, а также установлены оптимальные параметры проведения процесса ($V=1500$ об./мин, $t=15$ мин, $T=2-4$ °С).

Сущность разработанного метода заключается в том, что суспензия фосфолипидов в ацетоне под действием центробежных сил проходит последовательно через слои растворителей с повышением плотности и полярности, постепенно растворяясь в них (в зависимости от сродства к слою растворителя). Таким образом, в результате центрифугирования образуются слои растворителей, насыщенные фосфолипидами, имеющими наибольшее сродство с данным слоем.

На основе уравнений растворения Нэрнста-Бруннэра и скорости осаждения частиц при центрифугировании с заданными допущениями было предложено уравнение, описывающее

процесс разделения смеси фосфолипидов в зависимости от сродства к растворителю. В качестве критериев сродства были использованы параметры растворимости Хансена. Разделение смеси фосфолипидов между слоями было показано методом ИК-Фурье спектроскопии.

Применение сформулированных принципов метода позволит проводить направленное разделение смесей фосфолипидов. Однако для повышения эффективности разделения сложных смесей фосфолипидов необходим дальнейший поиск новых комбинаций растворителей, способствующих более специфичному разделению смеси. Для дальнейших исследований актуальным является модификация объема слоев растворителей и его соотношения с объемом введенной суспензии. Кроме того, разработанный метод довольно прост и дешев, что позволит легко адаптировать его к производству биологически активных веществ в промышленном масштабе для включения последних в состав пищевых продуктов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Orešič M., Hänninen V. A., Vidal-Puig A. Lipidomics: a new window to biomedical frontiers // Trends in biotechnology. 2008. Vol. 26. Issue 12. P. 647–652. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.09.001
2. Pietiläinen K.H., Róg T., Seppänen-Laakso T., Virtue S., Gopalacharyulu P., Tang J., Rodriguez-Cuenca S., Maciejewski A., Naukarinen J., Ruskeepää A.L., Niemelä P.S., Yetukuri L., Tan C.Y., Velagapudi V., Castillo S., Nygren H., Hyötyläinen T., Rissanen A., Kaprio J., Yki-Järvinen H., Vattulainen I., Vidal-Puig A., Orešič M. Association of lipidome remodeling in the adipocyte membrane with acquired obesity in humans // PLoS biology. 2011. Vol. 9. No. 6. P. e1000623. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000623
3. Kaddurah-Daouk R., McEvoy J., Baillie R.A., Lee D., Yao J.K., Doraiswamy P.M., Krishnan K.R.R. Metabolomic mapping of atypical antipsychotic effects in schizophrenia // Molecular psychiatry. 2007. Vol. 12. No. 10. P. 934–945.
4. Han X., Holtzman D.M., McKeel Jr D.W. Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry // Journal of neurochemistry. 2001. Vol. 77. No. 4. P. 1168–1180. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00332.x
5. Haughey N.J., Steiner J., Nath A., McArthur, Sacktor N., Pardo C., Bandaru V.V.R. Converging roles for sphingolipids and cell stress in the progression of neurological dysfunction in AIDS // Frontiers in bioscience: a journal and virtual library. 2008. Vol. 13. P. 5120–5130.
6. Angelini R., Vitale R., Patil V.A., Cocco T., Ludwig B., Greenberg M.L., Corcelli A. Lipidomics of intact mitochondria by MALDI-TOF/MS // Journal of lipid research. 2012. Vol. 53. No. 7. P. 1417–1425.
7. Акмурзина В.А., Селищева А.А., Швеи В.И. От анализа липидов к липидомике // Тонкие химические технологии. 2012. Т. 7. N 6. С. 3–21.
8. Wang T., Zhou D. Advances in phospholipid quantification methods // Current Opinion in Food Science. 2017. Vol. 16. P. 15–20. DOI: 10.1016/j.cofs.2017.06.007
9. Brasaemle D.L., Wolins N.E. Isolation of lipid droplets from cells by density gradient centrifugation // Current protocols in cell biology. 2016. Vol. 72. No. 1. P. 3–15. DOI: 10.1002/cpcb.10
10. Hara A., Radin N.S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent // Analytical Biochemistry. 1978. Vol. 90. No. 1. P. 420–426. DOI: 10.1016/0003-2697(78)90046-5
11. Stetefeld J., McKenna S.A., Patel T.R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences // Biophysical Reviews. 2016. Vol. 8. P. 409–427. DOI: 10.1007/s12551-016-0218-6
12. Siepmann J., Siepmann F. Mathematical modeling of drug dissolution // International journal of pharmaceuticals. 2013. Vol. 453. No. 1. P. 12–24.
13. Seager R.J., Acevedo A.J., Spill F., Zaman M.H. Solid dissolution in a fluid solvent is characterized by the interplay of surface area-dependent diffusion and physical fragmentation // Scientific reports. 2018. Vol. 8. No. 1. P. 7711.
14. Boger E., Wigström O. A Partial Differential Equation Approach to Inhalation Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling // CPT: Pharmacometrics Systems Pharmacology. 2018. Vol. 7. No. 10. P. 638–646. DOI:10.1002/psp4.12344
15. Livshits M.A., Khomyakova E., Evtushenko E.G., Lazarev V.N., Kulemin N.A., Semina S.E., Generozov E.V., Govorun V.M. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol // Scientific Reports. 2015. Vol. 5. P. 17319. DOI: 10.1038/srep17319
16. Van Krevelen D.W., Te Nijenhuis K. Properties of polymers: their correlation with chemical

structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions. Elsevier, 2009. 1004 p.

17. Hansen C.M. Hansen solubility parameters: a user's handbook. 2nd ed. CRC Press, 2007. 544 p.

18. Verheyen S., Augustijns P., Kinget R., Van den Mooter G. Determination of partial solubility parameters of five benzodiazepines in individual solvents // *International journal of pharmaceuticals*. 2001. Vol. 228. No. 1-2. P. 199–207.

19. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // *J Biol Chem*. 1957. Vol. 226. No 1. P. 497–509.

20. Dreissig I., Machill S., Salzer R., Krafft C. Quantification of brain lipids by FTIR spectroscopy and partial least squares regression // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009. Vol. 71. No. 5. P. 2069–2075. DOI: 10.1016/j.saa.2008.08.008

REFERENCES

1. Orešič M., Hänninen V. A., Vidal-Puig A. Lipidomics: a new window to biomedical frontiers. *Trends in biotechnology*. 2008, vol. 26, issue 12, pp. 647–652. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.09.001

2. Pietiläinen K.H., Róg T., Seppänen-Laakso T., Virtue S., Gopalacharyulu P., Tang J., Rodriguez-Cuenca S., Maciejewski A., Naukkarinen J., Ruskeepää A.L., Niemelä P.S., Yetukuri L., Tan C.Y., Velagapudi V., Castillo S., Nygren H., Hyötyläinen T., Rissanen A., Kaprio J., Yki-Järvinen H., Vattulainen I., Vidal-Puig A., Orešič M. Association of lipidome remodeling in the adipocyte membrane with acquired obesity in humans. *PLoS biology*. 2011, vol. 9, no. 6, pp. e1000623. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000623

3. Kaddurah-Daouk R., McEvoy J., Baillie R.A., Lee D., Yao J.K., Doraiswamy P.M., Krishnan K.R.R. Metabolomic mapping of atypical antipsychotic effects in schizophrenia. *Molecular psychiatry*. 2007, vol. 12, no. 10, pp. 934–945.

4. Han X., Holtzman D.M., McKeel Jr D.W. Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of neurochemistry*. 2001, vol. 77, no. 4. pp. 1168–1180. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00332.x

5. Haughey N.J., Steiner J., Nath A., McArthur, Sacktor N., Pardo C., Bandaru V.V.R. Converging roles for sphingolipids and cell stress in the progression of neurological dysfunction in AIDS. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2008, vol. 13, pp. 5120–5130.

6. Angelini R., Vitale R., Patil V.A., Cocco T., Ludwig B., Greenberg M.L., Corcelli A. Lipidomics of intact mitochondria by MALDI-TOF/MS. *Journal of lipid research*. 2012, vol. 53, no. 7, pp. 1417–1425.

7. Akmurzina V.A., Selishcheva A.A., Shvets V.I. From lipid analysis to lipidomics. *Tonkie khimicheskie tekhnologii*. 2012, vol. 7, no. 6, pp. 3–21. (In Russian)

8. Wang T., Zhou D. Advances in phospholipid quantification methods. *Current Opinion in Food Science*. 2017, vol. 16, pp. 15–20. DOI: 10.1016/j.cofs.2017.06.007

9. Brasaemle D.L., Wolins N.E. Isolation of lipid droplets from cells by density gradient centrifugation. *Current protocols in cell biology*. 2016, vol. 72, no. 1, pp. 3–15. DOI: 10.1002/cpcb.10

10. Hara A., Radin N.S. Lipid extraction of tissues

with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*. 1978, vol. 90, no. 1, pp. 420–426. DOI: 10.1016/0003-2697(78)90046-5

11. Stetefeld J., McKenna S.A., Patel T.R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*. 2016, vol. 8, pp. 409–427. DOI: 10.1007/s12551-016-0218-6

12. Siepmann J., Siepmann F. Mathematical modeling of drug dissolution. *International journal of pharmaceuticals*. 2013, vol. 453, no. 1, pp. 12–24.

13. Seager R.J., Acevedo A.J., Spill F., Zaman M.H. Solid dissolution in a fluid solvent is characterized by the interplay of surface area-dependent diffusion and physical fragmentation. *Scientific reports*. 2018, vol. 8, no. 1, pp. 7711.

14. Boger E., Wigström O. A Partial Differential Equation Approach to Inhalation Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling. *CPT: Pharmacometrics Systems Pharmacology*. 2018, vol. 7, no. 10, pp. 638–646. DOI: 10.1002/psp4.12344

15. Livshits M.A., Khomyakova E., Evtushenko E.G., Lazarev V.N., Kulemin N.A., Semina S.E., Generozov E.V., Govorun V.M. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Scientific Reports*. 2015, vol. 5, pp. 17319. DOI: 10.1038/srep17319

16. Van Krevelen D.W., Te Nijenhuis K. Properties of polymers: their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions. Elsevier, 2009, 1004 p.

17. Hansen C.M. Hansen solubility parameters: a user's handbook. 2nd ed. CRC Press, 2007, 544 p.

18. Verheyen S., Augustijns P., Kinget R., Van den Mooter G. Determination of partial solubility parameters of five benzodiazepines in individual solvents. *International journal of pharmaceuticals*. 2001, vol. 228, no. 1-2, pp. 199–207.

19. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957, vol. 226, no 1, pp. 497–509.

20. Dreissig I., Machill S., Salzer R., Krafft C. Quantification of brain lipids by FTIR spectroscopy and partial least squares regression. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009, vol. 71, no. 5, pp. 2069–2075. DOI: 10.1016/j.saa.2008.08.008

Критерии авторства

Саркисян В.А., Фролова Ю.В., Шипелин В.А., Коденцова В.М., Кочеткова А.А. выполнили экспериментальную работу, на основании полученных результатов провели обобщение и написали рукопись. Саркисян В.А., Фролова Ю.В., Шипелин В.А., Коденцова В.М., Кочеткова А.А. имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Саркисян Варужан Амбарцумович,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Федеральный исследовательский центр
питания, биотехнологии
и безопасности пищи,
✉ e-mail: sarkisyan.varuzhan@gmail.com

Фролова Юлия Владимировна,
научный сотрудник,
Федеральный исследовательский центр
питания, биотехнологии
и безопасности пищи,
e-mail: himic14@mail.ru

Шипелин Владимир Александрович,
к.м.н., старший научный сотрудник,
Федеральный исследовательский центр
питания, биотехнологии
и безопасности пищи,
e-mail: v.shipelin@yandex.ru

Коденцова Вера Митрофановна,
д.б.н., профессор,
ведущий научный сотрудник,
Федеральный исследовательский центр
питания, биотехнологии
и безопасности пищи,
e-mail: kodentsova@ion.ru

Кочеткова Алла Алексеевна,
д.т.н., профессор,
заведующая лабораторией,
Федеральный исследовательский центр
питания, биотехнологии
и безопасности пищи,
e-mail: kochetkova@ion.ru

Contribution

Varuzhan A. Sarkisyan, Yulia V. Frolova, Vladimir A. Shipelin, Vera M. Kodentsova, Alla A. Kochetkova carried out the experimental work, on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. Varuzhan A. Sarkisyan, Yulia V. Frolova, Vladimir A. Shipelin, Vera M. Kodentsova, Alla A. Kochetkova have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict of interests

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

AUTHORS' INDEX

Varuzhan A. Sarkisyan,
Ph.D. (Biology), Senior Researcher,
Federal Research Centre of Nutrition,
Biotechnology and Food Safety,
✉ e-mail: sarkisyan.varuzhan@gmail.com

Yulia V. Frolova,
Researcher,
Federal Research Centre of Nutrition,
Biotechnology and Food Safety,
e-mail: himic14@mail.ru

Vladimir A. Shipelin,
Ph.D. (Medicine), Senior Researcher,
Federal Research Centre of Nutrition,
Biotechnology and Food Safety,
e-mail: v.shipelin@yandex.ru

Vera M. Kodentsova,
Dr. Sci. (Biology), Professor, Lead Researcher,
Federal Research Centre of Nutrition,
Biotechnology and Food Safety,
e-mail: kodentsova@ion.ru

Alla A. Kochetkova,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Head of the Laboratory,
Federal Research Centre of Nutrition,
Biotechnology and Food Safety,
e-mail: kochetkova@ion.ru