

УДК 616.155.1

©Коллектив авторов

## **ПОДХОД К ИДЕНТИФИКАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФРАКЦИЙ ФОСФОЛИПИДОВ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЭЖХ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ**

*Д.А. Корженевский\*, А.А. Селищева, С.В. Савельев*

АНО Институт биомедпроблем, Новоданиловская наб, д. 4а, 117105, Москва,  
Россия; эл. почта: biomedpro@biomedpro.ru; babischew@rambler.ru

Предложена методика, позволяющая в рамках одного эксперимента разделить и идентифицировать молекулярные фракции фосфолипидов различных классов в составе сложных экстрактов, которая включает обратную-фазовую (ОФ) ВЭЖХ с масс-спектрометрическим анализатором. Используя данную методику произведен анализ глицерофосфолипидов и сфинголипидов, входящих в состав эритроцитов человека. В их числе обнаружены несколько фракций церамидов, прежде неидентифицированных аналогичными методами. Используемая схема эксперимента позволила сократить число процедур, необходимых для получения полного фосфолипидного профиля.

**Ключевые слова:** фосфолипиды, липидомика, ВЭЖХ, масс-спектрометрия, эритроциты.

**ВВЕДЕНИЕ.** Возможность использования tandemной масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением для определения индивидуальных молекулярных фракций различных классов фосфолипидов (ФЛ) непосредственно в грубом липидном экстракте из тканей или биологических жидкостей была показана достаточно давно в работах Nan и др. и Kerwin и др. [1, 2]. По аналогии с изучением генетического и белкового профилей организма, эту область исследований стали называть “липидомикой”. С тех пор была проведена значительная работа по установлению основных путей фрагментации различных классов ФЛ в МС/МС экспериментах, направленная на однозначную идентификацию отдельных компонентов таких экстрактов [3, 4]. Однако, с развитием метода стало ясно, что прямой масс-спектрометрический (МС) эксперимент может давать искаженную картину фосфолипидного профиля. Одной из причин этого является образование большого числа изобарических ионов, которые могут относиться как к одному, так и к разным классам ФЛ. В подобных случаях исследователи часто постулировали наличие в липидном экстракте различных изобарических фракций ФЛ, не всегда имея тому достаточного экспериментального подтверждения [1]. Кроме того, данные Zacarias и др. [5] свидетельствуют, что эффективность ионизации молекул ФЛ нередко изменяется в присутствии других ФЛ. Таким образом, анализ

---

\* - адресат для переписки

многокомпонентных смесей в прямом МС-эксперименте сопряжён с возможностью значительной количественной ошибки, или полной потерей информации о наличии минорных компонентов. Предварительное разделение таких смесей путем сопряжения масс-спектрометра с ВЭЖХ позволяет частично преодолеть указанные трудности и получать легко анализируемые “профили” липидных экстрактов [6, 7], однако в связи с заметной продолжительностью такого разделения требуется сократить затраты времени на идентификацию компонентов.

Эритроциты являются интересным для исследования объектом, поскольку многие их свойства (скорость осаждения, ширина распределения, процентное содержание гемоглобина и т.д.) являются клинически значимыми показателями.

Ранее липидный состав мембран эритроцитов изучали, главным образом, методами ТСХ и ВЭЖХ, установив, что основными компонентами эритроцитарной мембраны являются фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ) и сфингомиелин (СМ), а минорным – фосфатидилсерин (ФС) [8]. В этих исследованиях нет сведений о наличии ФЛ других классов. Отдельно было показано наличие во фракции ФЭ плазмалогенов, в молекуле которых в 1-ом положении вместо ацильной располагается 1-О-алк-1'-енильная группа, при этом химическую структуру таких ФЭ подтверждали методом ЭС-МС [9]. Единственной попыткой полного профилирования эритроцитарных ФЛ методом МС был ранний эксперимент [1], однако в силу описанных выше причин его результаты требуют дальнейшего подтверждения и уточнения.

Labrousche и др. [8], определяя ФЛ-состав эритроцитов методом ТСХ продемонстрировали, что при развитии сахарного диабета происходит изменение соотношения между ФЭ и ФС, сопровождаемое изменениями реологических свойств клеток. Аналогичные данные об изменении фосфолипидного состава при диабете были получены методом ВЭЖХ с различными способами детекции [10]. Наряду с этим было установлено также изменение степени ненасыщенности остатков жирных кислот в молекуле ФЭ при диабете 2-го типа [11]. Эти данные говорят о том, что определение содержания не только классов фосфолипидов, но и их отдельных молекулярных фракций может быть информативным для изучения развития ряда патологий, сопровождающихся окислительным стрессом.

В данной работе описан подход, позволяющий эффективно проанализировать сложную смесь природных фосфолипидов в рамках одного ВЭЖХ-МС эксперимента, на примере тотального экстракта ФЛ из эритроцитов здоровых людей.

#### **МЕТОДИКА.**

*Реагенты и стандарты.* В качестве стандартов фосфолипидов использовали синтетические препараты производства “Avanti Polar Lipids”, США 99% чистоты: ФХ (16:0/16:0), ФХ (18:0/18:1), ФХ (18:0/18:2), ФЭ (16:0/16:0), ФЭ (16:0/18:2), ФС 16:0/16:0 и природные фосфолипиды с известным содержанием различных жирнокислотных остатков: СМ из мозга быка и фосфатидилинозиты (ФИ) из печени свиньи от того же производителя.

Органические растворители (изопропанол, метанол, хлороформ, триэтиламин) фирмы “Merck”, США.

Деионизованную воду с сопротивлением >18 МОм, получали на установке УВОИ-МФ-7, “Медиана-Фильтр”, Россия.

*Отбор крови и подготовка образцов.* Отбор венозной крови проводили у здоровых добровольцев (обоих полов в возрасте от 22 до 65 лет), которые были отобраны на основе результатов биохимического анализа крови. Такие показатели как уровень глюкозы, триацилглицеринов, холестерина, ионов кальция и гликированного гемоглобина находились в норме. Кровь (1 мл) собирали в пробирки, содержащие ЭДТА и немедленно центрифугировали 10 мин при 900 g и 4°C. Плазму удаляли, а эритроцитарную массу использовали для получения грубого липидного экстракта.

*Приготовление липидного экстракта.* Производили согласно методу Folch и др. [12]. К эритроцитам, выделенным из 1 мл крови, добавляли 3 мл смеси

метанола и 0,2 мл воды. Экстракцию проводили при интенсивном перемешивании 15 мин. Далее добавляли 3 мл хлороформа и продолжали перемешивание ещё 15 мин. Смесь центрифугировали при комнатной температуре и 1000 g в течение 15 мин, супернатант отбирали, к осадку добавляли 3 мл смеси хлороформ-метанол 2:1 (об) ещё раз перемешивали в течение 20 мин. Центрифугировали в тех же условиях, второй супернатант отбирали и объединяли с предыдущим. К объединенному экстракту добавляли 0,5 объема 1% NaCl, перемешивали 10 мин, центрифугировали. Нижний хлороформный слой отбирали и упаривали досуха на роторном испарителе.

Сухую пленку липидов растворяли в 1,5 мл смеси ацетонитрил : 2-пропанол (2:3, об). В данном образце определяли содержание фосфолипидов по неорганическому фосфору методом Ditmer и др. [13].

**ВЭЖХ-МС анализ.** Разделение молекулярных фракций отдельных классов фосфолипидов производился на колонке Polaris C18 (Varian) 2×100 мм. Общее количество наносимых ФЛ составляло около 10 нмоль для ВЭЖХ-МС или 20 нмоль для ВЭЖХ-МС/МС экспериментов. В качестве элюента применяли линейный градиент растворителей А и Б от 75 до 95% Б за 20 минут, за которым следует 5-минутный изократический участок с соотношением растворителей 5:95, где А – водный раствор формиата триэтиламония (0,1% (об) муравьиной кислоты и 0,1% (об) триэтиламина) и Б – смесь ацетонитрил:изопропанол (2:3, об), содержащая те же количества муравьиной кислоты и триэтиламина, что и А. Расход элюента в течение всего процесса анализа составлял 0,2 мл/мин.

В качестве детектора был использован квадрупольный масс-спектрометрический анализатор (Varian MS 1200), снабженный электрораспылительным источником ионов. В качестве осушающего газа в источнике применен азот с температурой 220°C. Напряжение на источнике составляло -4500 В.

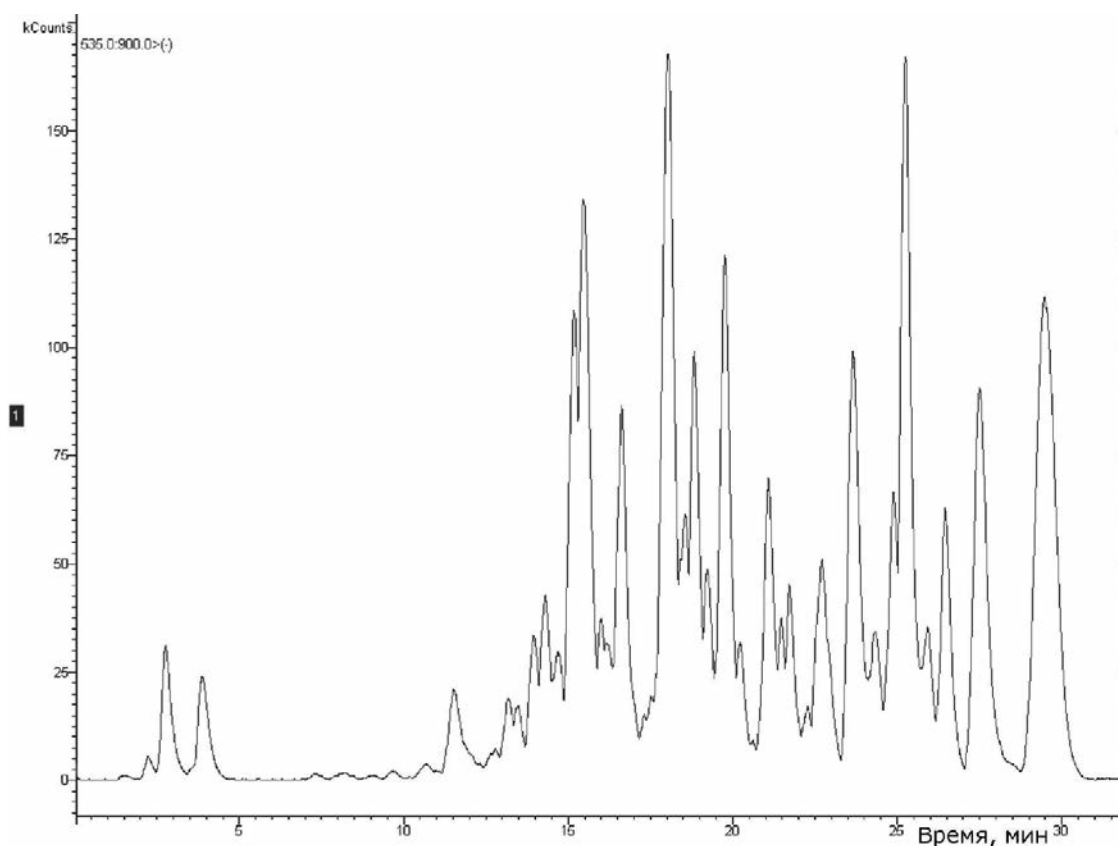
Для обнаружения молекулярных ионов фосфолипидов осуществляли сканирование диапазона  $m/z$  от 500 до 920 в режиме детектирования отрицательных ионов. Оптимальное время сканирования составляет 0,5 с. В этом режиме производили запись хроматограммы по полному ионному току.

Для идентификации жирнокислотного состава отдельных фракций применяли фрагментацию соударением, регистрируя на хроматограмме (условия хроматографического разделения описаны выше) спектры родительских ионов для каждого из возможных остатков жирных кислот с четным числом атомов углерода (от 16:0 до 22:6). При фрагментации молекулярных ионов ФЛ использовали аргон под давлением 1,5 мТорр и ускоряющий потенциал 30 В. Эксперименты по фрагментации в источнике проводили, увеличивая разность потенциалов на входном капилляре до 150 В.

При интерпретации получаемых масс-спектров использовали общедоступную базу данных о спектрах молекулярных ионов ФЛ проекта LIPID MAPS ([www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org)).

**Пример записи молекулярной фракции ФЛ.** Как принято в литературе, фосфолипиды обозначены следующим образом: ФЛ N1:M1/N2:M2, где ФЛ – класс фосфолипида, N1, N2 – число атомов углерода в ацильном заместителе в положениях sn1 и sn2, соответственно, M1, M2 – число двойных связей в указанных заместителях. В случае плазмалогенов к обозначению заместителя добавляется буква “п”, при этом наличие двойной связи между положениями 1 и 2 в заместителе не указывается. Для сфинголипидов указывается только число атомов углерода и двойных связей в N-ацильном фрагменте.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Типичный вид хроматограммы липидного экстракта эритроцитов, записанной в режиме ионного тока с дискриминацией по массам, приведён на рисунке 1. Спектры молекулярных ионов (данные не показаны) свидетельствуют, что большинство пиков на ней представляют собой либо индивидуальные ФЛ, либо смесь двух недостаточно разрешённых по времени компонентов.



**Рисунок 1.**

Типичная хроматограмма липидного экстракта эритроцитов в режиме ионного тока с дискриминацией по массам. Условия эксперимента соответствуют описанным в разд. "Методика".

Анализ хроматограмм экстрактов эритроцитов здоровых людей обоего пола (всего 24 пробы) показал, что их качественный состав (набор регистрируемых ионов) практически постоянен и соответствует приведенному в таблице 1.

Далее была проведена идентификация масс-ионов фосфолипидов, обнаруживаемых при хроматографическом разделении липидного экстракта эритроцитов с масс-спектрометрическим детектированием в режиме образования отрицательных ионов. Общий алгоритм идентификации представлен на рисунке 2.

Основным инструментом такой идентификации является фрагментация соударением. Ранними исследованиями [2, 3] было показано, что главными продуктами фрагментации анионов глицерофосфолипидов в приборах квадрупольного типа являются соответствующие жирные кислоты и в меньшей степени – продукты отщепления полярной части молекулы (фосфоэтаноламин, фосфосерин, фосфоинозитол и продукт деметилирования фосфохолина). Отщепление О-алк-1-енильных остатков происходит с меньшей эффективностью и ведет к продуктам неоднозначного строения [9], так что среди продуктов фрагментации плазмалогенов обычно обнаруживается только одна жирная кислота. Анионы сфинголипидов вообще, по-видимому, не способны отщеплять что-либо кроме полярной группы [2].

Таким образом, на первом этапе идентификации нами были получены хроматограммы родительских ионов для всех описанных в тканях животного происхождения О-ацильных остатков (табл. 2, рис. 3) и произведено их сопоставление с общим списком обнаруженных ионов. Поиск обнаруженных родительских ионов в базе данных проекта LIPID MAPS позволил однозначно идентифицировать большинство фракций ФЭ, плФЭ, ФС и единственную фракцию ФИ.

Таблица 1. Фосфолипиды и церамиды, идентифицированные в липидных экстрактах эритроцитов человека (приведены реально наблюдаемые значения  $m/z$ ).

Время удерживания	$M/Z$	Класс ФЛ	жирнокислотный состав
2,67	540,3	лФХ	16:0
3,68	568,3	лФХ	18:0
10,18	719,5	СМ	14:0
10,3	745,5	СМ	16:1
10,4	826,4	ФХ	18:2/18:2
11,1	762,6	ФЭ	18:2/20:4
14,58	738,5	ФЭ	16:0/20:4
11,59	850,4	ФХ	16:0/22:6
12,7	733,5	СМ	15:0
13,9	762,4	ФЭ	16:0/22:6
14,3	826,4	ФХ	16:0/20:4
14,55	834,3	ФС	18:0/22:6
15,19	802,5	ФХ	16:0/18:2
15,46	747,5	СМ	16:0
15,62	810,4	ФС	18:0/20:4
15,99	714,4	ФЭ	16:0/18:2
16,17	748,5	пФЭ	п16:0/22:5
16,62	722,5	пФЭ	п18:1/20:4
17,3	766,5	ФЭ	16:0/22:4
18,04	804,5	ФХ	16:0/18:1
18,55	830,5	ФХ	18:0/18:2
18,43	766,2	ФЭ	18:0/20:4
18,62	778,6	ФХ	16:0/16:0
19,26	742,5	ФЭ	18:0/18:2
18,83	716,5	ФЭ	16:0/18:1
18,64	774,6	пФЭ	п18:0/22:6
19,23	775,6	СМ	18:0
19,76	750,5	пФЭ	16:0/22:4
20,21	700,5	пФЭ	16:0/18:1
21,09	832,5	ФХ	18:0/18:1
21,25	855,4	СМ	24:2
21,47	778,6	пФЭ	п18:0/22:4
21,66	806,6	ФХ	16:0/18:0
21,72	744,5	ФЭ	18:0/18:1
22,43	690,5	Цер	24:2
22,88	728,5	пФЭ	п18:0/18:1
23,67	857,5	СМ	24:1
24,91	831,5	СМ	22:0
25,25	692,5	Цер	24:1
26,46	666,6	Цер	22:0
27,5	859,5	СМ	24:0
29,48	694,6	Цер	24:0



# ФОСФОЛИПИДЫ ЭРИТРОЦИТОВ, ОПРЕДЕЛЕННЫЕ ВЭЖХ И МС



Рисунок 2.

Общий алгоритм идентификации фосфолипидов в сложном экстракте с помощью ВЭЖХ-МС.

Таблица 2. Основные ацильные фрагменты, обнаруживаемые при МС/МС анализе различных классов глицерофосфолипидов.

<b><i>M/Z</i>(-)</b>	<b>Элементарная формула (число двойных связей)</b>	<b>Наименование</b>
255,0	C16H31O2 (0)	пальмитат
279,0	C18H31O2 (2)	линолеат
281,0	C18H33O2 (1)	олеат
283,0	C18H35O2 (0)	стеарат
303,0	C20H31O2 (4)	арахидонат
327,1	C22H31O2 (6)	докозогексаеноат
329,1	C22H33O2 (5)	докозопентаеноат
331,1	C22H35O2 (4)	докозотетраеноат

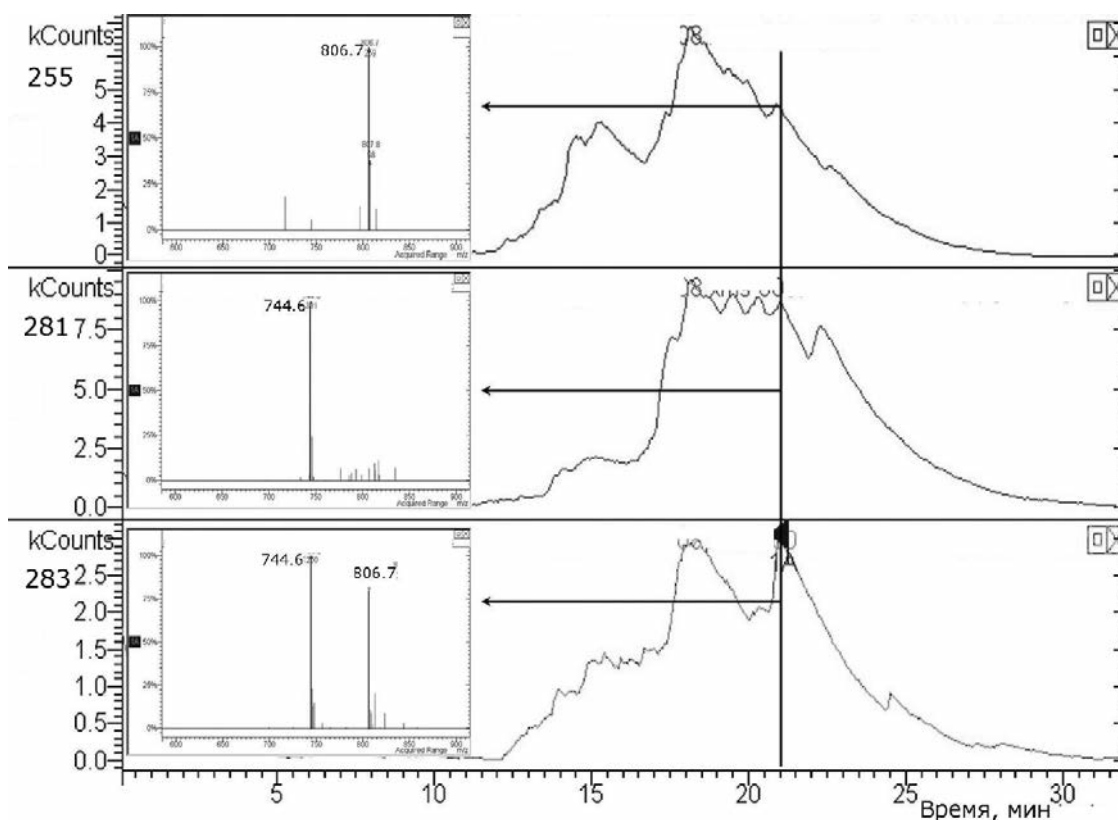


Рисунок 3.

Пример идентификации двух ФЛ с временем удерживания 21 мин с помощью хроматограмм родительских ионов, образующих фрагменты с  $m/z$  255,0<sup>-</sup> (пальмитат), 281,0<sup>-</sup> (олеат) и 283,0<sup>-</sup> (стеарат). Видно, что анион с  $m/z$  744,6<sup>-</sup> содержит олеат и стеарат, что позволяет после сравнения с базой данных идентифицировать его как ФЭ (18:0/18:1). Анион 806,6<sup>-</sup> содержит пальмитат и стеарат, что, после коррекции величины  $m/z$  на массу, соответствующую потере  $\text{CH}_3$ -группы и образованию аддукта с ацетатом, даёт идентификацию его как ФХ (16:0/18:0).

Процесс идентификации ФХ этим путём встретил некоторые затруднения. Образование анионов холинсодержащих ФЛ (ФХ и СМ) происходит за счёт отщепления метильной группы от холинового основания, происходящего непосредственно в электроспрее, как это указано в целом ряде работ [2, 11]. Описано также формирование различных аддуктов с анионами низших жирных кислот. Соответственно, наблюдаемые массы образуемых ионов могут существенно отличаться от номинальных. Масс-спектрометрический анализ стандартов ФХ и СМ с известными молекулярными массами показал, что в выбранных нами условиях они образуют аддукт  $[\text{M}+45]^-$ , который легко распадается в источнике ионов с образованием иона  $[\text{M}-60]^-$  (рис. 4). Наиболее вероятной причиной такой картины является описанное Kerwin и др. [2] присоединение уксусной кислоты к продукту деметилирования четвертичного амина. Отсутствие ацетат-анионов в использованной нами подвижной фазе заставляет предположить, что они самопроизвольно образуются в источнике ионов за счёт гидратации ацетонитрила. Косвенным свидетельством в пользу данной гипотезы может служить отсутствие подобных аддуктов при использовании иных растворителей [11], однако она требует и прямого экспериментального подтверждения. В любом случае, необходимо дополнение существующих баз данных массами подобных продуктов. После произведенной

## ФОСФОЛИПИДЫ ЭРИТРОЦИТОВ, ОПРЕДЕЛЕННЫЕ ВЭЖХ И МС

нами коррекции масс удалось идентифицировать ионы всех молекулярных фракций ФХ и лизо-ФХ. Для подтверждения корректности такой идентификации были изучены паттерны фрагментации некоторых из них, при этом наблюдалось образование описанного для ФХ характеристического фрагмента  $m/z$  168<sup>-</sup>, представляющего собой деметилированный фосфохолин.

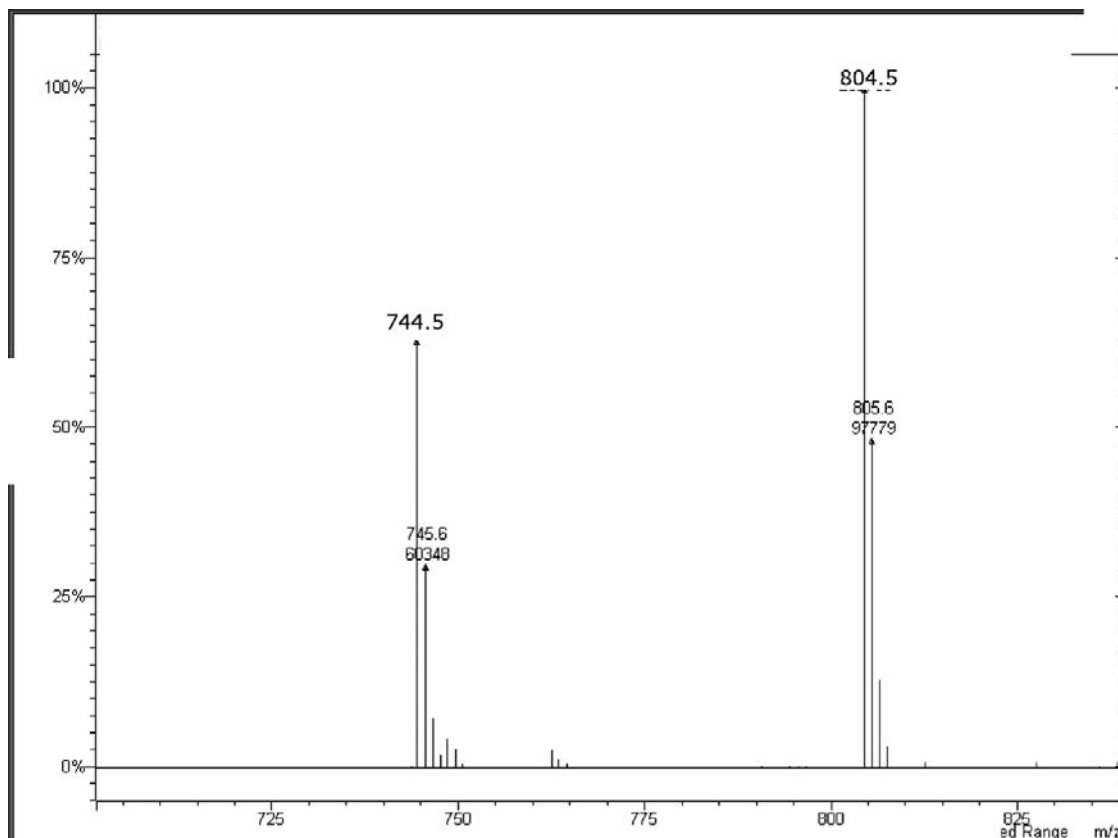


Рисунок 4.

Частичный распад ацетатного аддукта ФХ (16:0/18:1) ( $m/z$  804,5) при фрагментации в источнике ионов. Образующийся продукт  $m/z$  744,5- соответствует потере анализируемым веществом одной N-метильной группы.

Задача идентификации СМ одновременно является простой и сложной. С одной стороны, все анионы СМ должны: а) иметь нечётную номинальную массу, по которой их легко можно отличить от ФХ, и б) образовывать лишь один характеристический продукт  $m/z$  168<sup>-</sup> при фрагментации [2], что отличает их от также нечётных анионов ФИ. С другой – теоретически возможно наличие в образце иных анионов с нечетной номинальной массой, также образующих указанный продукт, которые могут быть, в этом случае, ошибочно приняты за СМ. Тем не менее, все анионы, удовлетворяющие этим двум условиям, массы которых имелись в базе данных LIPID MAPS, были идентифицированы нами как сфингомиелины. Анализ хорошо охарактеризованной стандартной смеси СМ из мозга быка показал, что многие его компоненты имеют те же величины  $m/z$  и времена удерживания, что и идентифицированные нами компоненты экстракта эритроцитов, так что принятый подход можно считать оправданным. Вместе с тем, низкая информативность спектров фрагментации СМ как в анионной, так и в катионной форме может скрывать часть важной структурной информации. Так, в экстрактах эритроцитов нами были обнаружены две фракции СМ с  $m/z$  857<sup>-</sup>,



которые незначительно различаются по времени удерживания. Подобная картина наблюдалась и для некоторых компонентов стандартной смеси природных СМ. Объяснением этого феномена было бы присутствие в составе природных СМ не только сфингозинового (C18:1), но и сфинганинового (C18:0) основания. В этом случае анион 857<sup>-</sup> является продуктом как N-олеоил сфингозинфосфохолина, так и N-линолеил сфинганинфосфохолина. Однако, имеющаяся методическая и аппаратная база не позволяет подтвердить данное предположение. Возможно, такое подтверждение может быть получено в экспериментах МС<sup>3</sup>, с использованием масс-спектрометрических анализаторов класса “ионная ловушка”.

По завершении описанных выше процедур обнаружилось наличие на хроматограммах нескольких пиков ( $m/z$  666, 690, 692, 694), которые не идентифицировались описанными выше способами. Достаточно высокие значения времен удерживания, вместе с общим паттерном взаиморасположения хроматографических пиков, напоминающим наблюдавшийся у СМ, позволили предположить наличие в экстракте церамидов (Цер) с жирнокислотным составом, соответствующим идентифицированным СМ. Поскольку молекулы Цер неионогенны, указанные выше массовые числа должны были являться массами аддуктов с каким либо анионом. Эксперимент по фрагментации в источнике легко выявил для всех этих ионов потерю массы 46, эквивалентную муравьиной кислоте, и образование анионов с  $m/z$  620<sup>-</sup>, 644<sup>-</sup>, 646<sup>-</sup>, 648<sup>-</sup>, что соответствует депротонированным формам различных Цер (рис. 5). Следует обратить внимание, что в экстракте присутствуют главным образом Цер с очень большой (22-24 атома углерода) длиной ацильного остатка, тогда как для СМ характерна значительно большая вариабельность жирнокислотных цепей. Это ещё раз подтверждает то, что Цер являются нормальным компонентом мембран, а не только продуктом распада СМ. Возможно, что, как уже указывалось ранее [14], именно длинноцепочечные Цер ответственны в первую очередь за регуляцию состояния мембран.

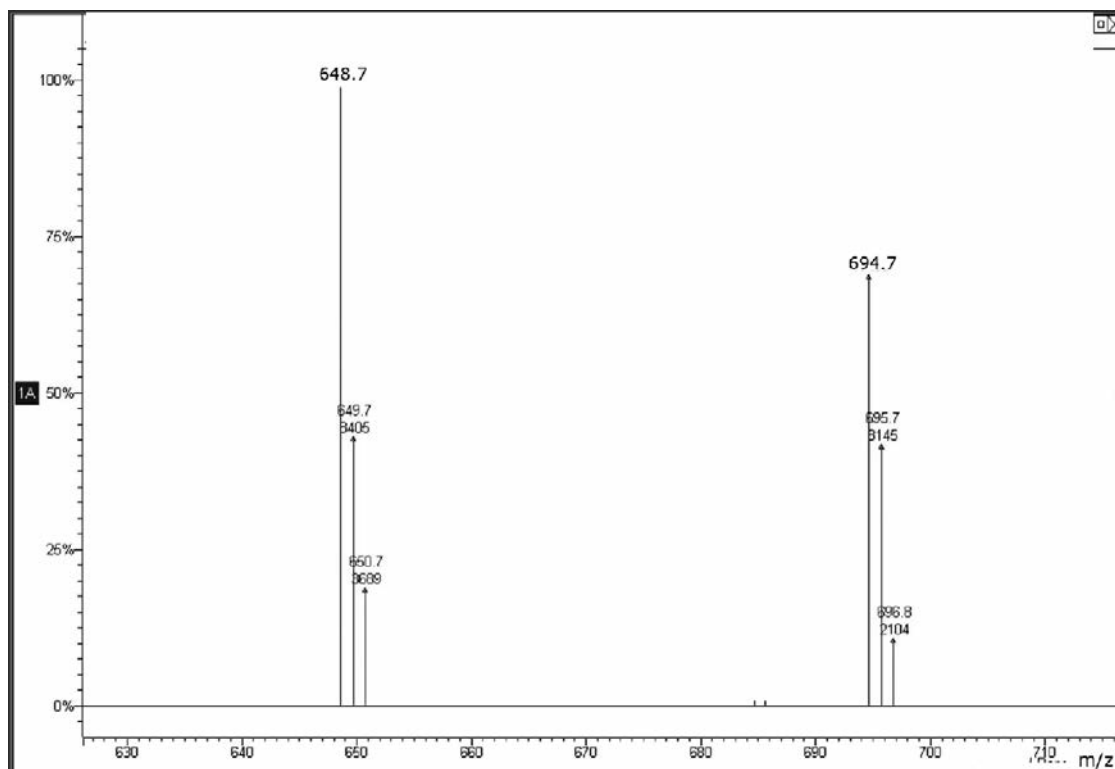


Рисунок 5.

Частичный распад формиатного аддукта (с нейтральной потерей 46, соответствующей муравьиной кислоте) при фрагментации в источнике иона с  $m/z$  694,7<sup>-</sup> (предположительно Цер (24:0)).

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** При ионизации методом электрораспыления большинство фосфолипидов имеет тенденцию образовывать однозарядные ионы [4]. Несмотря на то, что фосфолипиды некоторых классов принято исследовать масс-спектрометрическими методами в катионной форме в силу их склонности к приобретению положительного заряда, такой подход неприменим при комплексном масс-спектрометрическом анализе природных смесей ФЛ по нескольким причинам. Во-первых, некоторые ФЛ вообще не способны к образованию катионов (как, например, ФИ), либо образуют их крайне плохо (ФС) в силу преобладания в их структуре электроно-акцепторных фрагментов. В то же время все ФЛ, традиционно изучаемые МС в форме катионов, обладают способностью при соответствующих параметрах источника электроспрея приобретать и отрицательный заряд. Таким образом, отрицательная ионизация позволила нам анализировать фосфолипидный состав исследуемых образцов в рамках одного МС-эксперимента. Число процедур, необходимых для установления структуры отдельных компонентов также уменьшилось по сравнению с ранними работами [2, 4, 6], при этом сокращение получаемой структурной информации было полностью компенсировано широким использованием наработанных к настоящему времени баз масс-спектрометрических данных по ФЛ.

Традиционно принято исследовать природные фосфолипидные смеси с помощью тех или иных вариантов нормально-фазовой хроматографии (ТСХ, ВЭЖХ) [6, 8, 10, 11]. Такой подход позволяет эффективно разделить основные классы ФЛ, однако разделение внутри классов, основанное на различиях в жирнокислотном составе, практически отсутствует. Это препятствует получению легко анализируемых уникальных “профилей” липидных экстрактов, а также количественному масс-спектрометрическому анализу. Кроме того, нормально-фазовая ВЭЖХ связана с использованием недолговечных сорбентов и высоколетучих, не смешиваемых с водой растворителей, плохо совместимых с ионизацией электрораспылением. В свою очередь, хроматография в обращенной фазе основана на разделении веществ по степени гидрофобности, которая, в случае ФЛ, определяется составом как неполярной, так и полярной частей молекулы. Теоретически это означает возможность получить все компоненты фосфолипидного экстракта в виде индивидуальных пиков на хроматограмме. Тем не менее, устойчивое предубеждение о чрезмерном сродстве ФЛ к обращенным фазам сдерживало использование этого метода. Использование в качестве элюента 2-пропанола, предложенное ранее в работе [7], преодолевает указанный недостаток и демонстрирует все преимущества применения ОФ-ВЭЖХ. Высокая эффективность разделения ФЛ на молекулярные фракции (более 40 компонентов на 33 пика в рамках 30-минутного анализа) позволила, в частности, сделать обоснованные предположения о природе неизвестных компонентов смеси, впоследствии охарактеризованных в рамках отдельного эксперимента как церамиды. Следует отметить, что, несмотря на доказанную роль Цер как молекул, регулирующих свойства мембраны и через это – состояние клеток [14], их анализу в липидомных исследованиях уделялось мало внимания.

Таким образом, мы показали, что методом ОФ-ВЭЖХ-МС с отрицательной ионизацией могут быть эффективно и полно охарактеризованы молекулярные фракции фосфо- и сфинголипидов, входящих в состав сложных липидных экстрактов. С помощью избранного подхода показано наличие в экстрактах эритроцитов человека различных ФХ, диацил и ацил-алкенил ФЭ (плазмалогенов), ФС, ФИ, СМ, а также ранее не идентифицированных лизоФХ и Цер. Продemonстрировано постоянство качественного состава указанных эритроцитарных ФЛ.

Полученные результаты могут быть использованы для изучения развития различных изменений (в том числе количественных) липидного обмена, в частности - патологий, связанных с активацией перекисного окисления фосфолипидов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Han X., Gross R.W. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 10635-10639.
2. Kerwin J.L., Tuininga A.R., Ericsson L.H. (1994) J. Lipid Res., **35**, 1102-1114.
3. Larsen A., Uran S., Jacobsen P.B., Skotland T. (2001) Rapid Commun. Mass Spectrom., **15**, 2393-2398.
4. Brooks S., Clark G.T., Wright S.M., Trueman R.J., Postle A.D., Cossins A.R., Maclean N.M. (2002) J. Exper. Biol., **205**, 3989-3997.
5. Zacarias A., Bolanowski D., Bhatnagar A. (2002) Anal. Biochem., **308**, 152-159.
6. Uran S., Larsen A., Jacobsen P.B., Skotland T. (2001) J. Chrom. B, **758**, 265-275.
7. Sestak T.L., Subbaiah P.V., Jaskowiak N.T., Bagdade J.D. (1989) Anal. Biochem., **191**, 156-159.
8. Labrousse S., Freyburger G., Gin H., Boisseau M.R., Cassagne C. (1996) Metabolism, **45**, 57-62.
9. Zemski Berry K.A., Murphy R.C. (2004) J. Am. Soc. Mass Spectrom., **15**, 1499-1508.
10. Freuburger G., Gin H., Heape A., Juguelin H. (1989) Metabolism, **38**, 671-678.
11. Wang C., Kong H., Guan Y., Yang J., Gu J., Yang S., Xu G. (2005) Anal. Chem., **77**, 4108-4116.
12. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. (1957) J. Biol. Chem., **226**, 497-509.
13. Ditmer J.C., Feminella J.L., Hanahan D.J. (1958) J. Biol. Chem., **233**, 862-867.
14. Van Blitterswijk W.J., Van der Luit A.H., Veldman R.J., Verheij M., Borst J. (2003) Biochem. J., **369**, 199-211.

Поступила: 20. 03. 2009.

### AN APPROACH TO THE IDENTIFICATION OF THE PHOSPHOLIPID MOLECULAR SPECIES IN HUMAN ERYTHROCYTES USING HPLC WITH MASS-SPECTROMETRIC DETECTION

*D.A. Korzhenevskiy, A.A. Selischeva, S.V. Saveliev*

The Institute of biomedicinal problems. Novodanilovskaya nab, 4a, Moscow, 117105, Russia;  
e-mail: biomedpro@biomedpro.ru, babischew@rambler.ru

A modified RP-HPLC-MS approach has been proposed for a single run separation and identification of the molecular species of different phospholipid classes in a complex extract. This approach has been applied to the analysis of glycerol- and sphingolipid composition of human erythrocytes and a number of ceramide fractions have been identified; these fractions were missed in previous studies employing similar methods. The fine experimental design leads to the decrease in the number of procedures needed for a complete phospholipid profiling of the sample.

**Key words:** phospholipids, lipidomics, HPLC, mass-spectrometry, erythrocytes.