

## ТЕХНОЛОГИЯ ОБРАБОТКИ ГИДРОБИОНТОВ

УДК 577.115.3

Р.М. Султанов<sup>1</sup>, Е.В. Ермоленко<sup>1</sup>, Н.А. Латышев<sup>1</sup>, Ю.Г. Блинов<sup>2</sup>,  
С.П. Касьянов<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,  
690059, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17;

<sup>2</sup> Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр,  
690091, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4

<sup>3</sup> Дальневосточный федеральный университет,  
690950, Владивосток, ул. Суханова, 8

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ  
АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ (20:4n-6) ИЗ РАЗЛИЧНЫХ  
ИСТОЧНИКОВ

Рассмотрены методы выделения арахидоновой кислоты (АК) из животных и растительных природных источников. В качестве исходного сырья использовались традиционно применяемые для этих целей липиды из говяжьей печени и, как альтернатива, красная водоросль *Gracilaria vermiculophylla*. Для выделения АК использовали набор известных методик концентрирования полиненасыщенных жирных кислот — отделение насыщенных жирных кислот в виде литиевых солей, йод-лактонизацию, высокоэффективную жидкостную хроматографию. При использовании липидов печени крупного рогатого скота были последовательно применены все вышеперечисленные методы, поскольку содержание АК от общей суммы жирных кислот не превышало 7,7 %. Данными процедурами получена АК чистотой 98,76 % и выходом 50,8 %. Исходное содержание АК в водоросли было значительно выше (до 35 %) при незначительном содержании n-3 полиненасыщенных жирных кислот. Для концентрирования АК из водоросли использовали только два метода — осаждение жирных кислот в виде литиевых солей и высокоэффективную жидкостную хроматографию. Была получена АК с чистотой 97,60 % и выходом 68,3 %. Таким образом, использование в качестве источника АК водоросли *G. vermiculophylla* и простых воспроизводимых методов выделения высокоочищенной АК с высоким выходом экономически более оправдано.

**Ключевые слова:** арахидоновая кислота, ПНЖК, технология выделения, биологическая активность.

**Sultanov R.M., Ermolenko E.V., Latyshev N.A., Blinov Yu.G., Kasyanov S.P.**  
Comparative assessment for efficiency of isolation of arachidonic acid (20:4n-6) from various sources // Izv. TINRO. — 2016. — Vol. 186. — P. 223–230.

\* Султанов Руслан Миргасимович, аспирант, e-mail: sultanovruslan90@ya.ru; Ермоленко Екатерина Владимировна, аспирант, e-mail: ecrire\_711@mail.ru; Латышев Николай Алексеевич, старший научный сотрудник, e-mail: latyshev65@yandex.ru; Блинов Юрий Григорьевич, доктор биологических наук, профессор, первый заместитель директора, e-mail: tinro@tinro.ru; Касьянов Сергей Павлович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: serg724@yandex.ru.

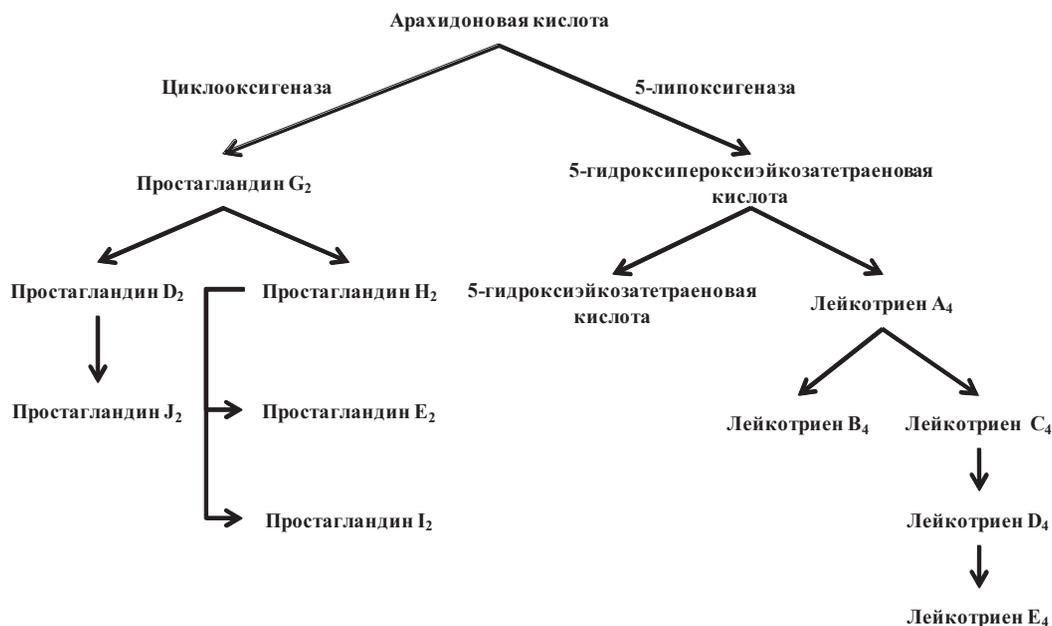
Sultanov Ruslan M., post-graduate student, e-mail: sultanovruslan90@ya.ru; Ermolenko Ekatherina V., post-graduate student, e-mail: ecrire\_711@mail.ru; Latyshev Nickolay A., senior researcher, e-mail: latyshev65@yandex.ru; Blinov Yury G., D.Sc., professor, deputy director, e-mail: tinro@tinro.ru; Kasyanov Sergey P., Ph.D., senior researcher, e-mail: serg724@yandex.ru.

Methods of arachidonic acid (AA) isolation from animal and vegetal natural sources are considered. Traditional raw material as the lipids of beef liver and alternative source as the red alga *Gracilaria vermiculophylla* are tested. The AA was isolated by a sequence of known techniques for concentration of polyunsaturated fatty acids: sedimentation of saturated fatty acids in the form of their lithium salts, iodo-lactonization, and high performance liquid chromatography. All these techniques were applied for isolation of AA from the beef liver lipids, where the AA content did not exceed 7.7 % of total lipids, and the yield of AA with purity of 98.76 % was 50.8 %. The AA content in the algae lipids was significantly higher (> 35 %), while the amount of n-3 polyunsaturated fatty acids was insignificant, so two techniques only were applied (sedimentation of lithium salts and liquid chromatography), and the yield of AA with purity of 97.60 % was 68.3 %. Thus, high-purity arachidonic acid could be isolated from the algae *G. vermiculophylla* using simple and reproducible procedure. Taking into account the high yield of AA, this method is economically feasible and is proposed for biochemical and medical researches.

**Key words:** arachidonic acid, polyunsaturated fatty acid, isolation technology, biological activity.

## Введение

Арахидоновая кислота (АК) относится к эссенциальным жирным кислотам (ЖК) и является предшественником различных эйкозаноидов, выполняющих важнейшие регуляторные функции в организме млекопитающих. У млекопитающих АК образуется из синтезируемой в растениях линолевой кислоты 18:2n-6 через последовательные стадии элонгирования и десатурирования (Sprecher, 2000). Однако основной источник АК для млекопитающих — это диета, поскольку собственный биосинтез ограничен и не может полностью удовлетворить все потребности организма. В тканях млекопитающих АК аккумулируется в фосфолипидах клеточных мембран и некоторых сигнальных молекулах, например фосфоинозотидах, и отщепляется под действием различных по специфичности внутриклеточных фосфолипаз А<sub>2</sub>. Далее она под действием различных специфических циклооксигеназ и липоксигеназ превращается в различные окисленные производные, объединенные общим термином эйкозаноиды. Схема образования эйкозаноидов в каскаде АК представлена на рисунке.



Каскад арахидоновой кислоты (Calder, 2001)  
Arachidonic acid cascade (from: Calder, 2001)

Исследования АК как потенциального субстрата для синтеза и биосинтеза биологически активных веществ связаны с большим регуляторным потенциалом ее производ-

дных и, как следствие, с участием во многих патологиях человека. Однако доступность высокоочищенных препаратов АК для медико-биологических исследований часто связана с их относительной недоступностью и высокой стоимостью. Так, например, фирма «Sigma-Aldrich» предлагает АК (98,5 %) по 1130 евро за грамм.

Основными вопросами, с которыми сталкиваются технологи на производстве, являются источники сырья и количественное содержание в них АК. До середины 20-го века единственным источником АК была печень крупного рогатого скота (Сергеева, Варфоломеева, 2006), однако относительно невысокое содержание АК и сложный липидный состав не позволяли получать высокоочищенные полиненасыщенные кислоты (ПНЖК) с приемлемым выходом. Кроме того, для обработки липидов печени необходимо использовать много трудоемких методов предварительного концентрирования, что существенно повышает стоимость конечного продукта. В значительной степени подобное положение изменилось после обнаружения в липидах некоторых морских макро- и микроводорослей высокого количества АК, причем в ряде случаев, как, например, в липидах красной водоросли *Gracilaria vermiculophylla*, содержание АК достигало 56,7 % (Хотимченко, 2003). Малое присутствие в составе жирных кислот водоросли других ПНЖК (эйкозапентаеновой, ЭПК, 20:5n-3, и докозагексаеновой, ДГК, 22:6n-3) существенно упрощает процедуру получения высокоочищенной АК. Доступность сырья, простой состав ЖК и возможность в рамках технологического процесса получения полисахаридов извлекать ЖК позволяет рассматривать данный источник как перспективный.

Использование микроводорослей в качестве источников АК было обосновано работой Cohen (1990), который разработал систему непрерывного, проточного культивирования микроводоросли *Porphyridium cruentum* в условиях жаркого климата для получения АК. Надо отметить, что открытие новых видов одноклеточных микроорганизмов, специфичных по биосинтезу n-6 и n-3 ПНЖК, привело к тому, что в технологии получения индивидуальных ПНЖК практически исключили использование животных источников при получении АК.

Методология выделения АК из липидов основана на различии физико-химических свойств индивидуальных ЖК, таких как температуры плавления, растворимость в различных растворителях, связывание с различными комплексообразователями. С развитием методов хроматографии и появлением специфичных сорбентов и приборов стало доступным получение высокоочищенных индивидуальных ПНЖК (Giménez, et al., 1998). Однако использование одного метода при концентрировании ПНЖК не позволяет выделить из многокомпонентной смеси индивидуальную ЖК в одну стадию, поэтому в практике чаще всего реализуются технологические схемы выделения концентратов ПНЖК с комбинированным набором методов. Такие схемы включают следующие стадии: 1) получение свободных ЖК из липидных смесей; 2) низкотемпературное осаждение длинноцепочечных насыщенных ЖК; 3) осаждение с мочевиной остатков насыщенных и моноеновых ЖК. Как правило, при выполнении этих процедур, в зависимости от исходного состава ЖК, можно получить концентраты ПНЖК до 50–75 %. Для выделения индивидуальных ПНЖК, например АК, ЭПК или ДГК, необходимы химические методы — йод-лактонизация (Corey, Wright, 1984) или хроматографические процедуры на силикагеле, импрегнированном азотнокислым серебром, или высокоэффективная жидкостная хроматография ВЭЖХ (Giménez et al., 1998). Таким образом, получение индивидуальных ПНЖК требует 5–6 стадий, что существенно снижает выход конечного продукта и увеличивает его стоимость (Shahidi, Wanasundara, 1998).

Целью настоящего исследования была разработка метода выделения чистой АК с высоким выходом из доступного сырья, позволяющего максимально упростить саму процедуру выделения АК и сделать ее приемлемой для исследовательской лаборатории.

В данной работе приведено сравнение методов выделения высокоочищенной АК из липидов печени крупного рогатого скота и красной водоросли *G. vermiculophylla*. Наглядно показаны технологические преимущества морского источника для получения АК с чистотой 97+ %. Предлагаемая технологическая схема использует две стадии — осаждение насыщенных жирных кислот в виде Li-солей и ВЭЖХ.

## Материалы и методы

Все используемые реактивы и растворители были марки «хч»; силикагель производства «Chemapol» (Чехия), безводный NaI («Sigma-Aldrich», США), триметилхлорсилан, TMS-Cl («Acros Organics», Бельгия), мочеви́на, гидроксид лития, этанол и петролейный эфир 40–60 °C («Реагент», Москва).

В эксперименте использовалась печень крупного рогатого скота. Красная водоросль *G. vermiculophylla* была собрана в зал. Петра Великого в октябре 2015 г. До использования весь материал хранили при температуре минус 20 °C.

Тонкослойную хроматографию липидов для контроля за процессами осуществляли на пластинках с закрепленным слоем силикагеля («Sorbfil», Россия) с элюирующими системами: 1) 80 : 20 : 1, гексан — диэтиловый эфир — уксусная кислота, об/об/об, 2) 2-кратное элюирование бензолом для идентификации йод-лактонов ЖК.

Метилвые эфиры жирных кислот липидов были получены согласно методике (Carreau, Dubacq, 1978). Анализ эфиров жирных кислот проводили газовой хроматографией на хроматографе Shimadzu GC-17A («Shimadzu», Kyoto, Japan) с пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой 30 м × 0,25 мм «Supelcowax 10» (Bellefonte, USA), условия анализа: температура колонки 190 °C, инжектора и детектора 240 °C, газ-носитель гелий. Идентификацию пиков метиловых (этиловых) эфиров жирных кислот проводили по времени удерживания индивидуальных эфиров жирных кислот, стандартным смесям ПНЖК («Supelco», Bellefonte, USA) и с использованием значений эквивалентной длины цепи (Christie, 2003).

**Экстракция и гидролиз общих липидов.** Замороженную говяжью печень измельчали на гомогенизаторе и экстрагировали липиды смесью этанол—хлороформ, 1 : 1 об/об. Экстракцию повторяли 2 раза, экстракты объединяли и фильтровали через плотную ткань под давлением. Фильтраты объединяли и частично упаривали, затем добавляли воду и, после расслаивания на водный и хлороформный слой, отбирали нижний слой. Верхний водно-спиртовый слой повторно экстрагировали хлороформом, экстракты объединяли и упаривали. Липиды гидролизовали 7 %-ным раствором КОН в 50 %-ном этаноле в соотношении липиды — раствор 1 : 4 кг/л, при температуре 50 °C в течение 60 мин. Смесь охлаждали и нейтрализовали щелочь концентрированной соляной кислотой до pH = 3, разбавляли в 2 раза водой и свободные ЖК экстрагировали петролейным эфиром, экстракты объединяли и упаривали.

Водоросль измельчали на гомогенизаторе и добавляли 2 %-ный раствор КОН в 95 %-ном этаноле в соотношении гомогенат водоросли — растворитель 1 : 5 кг/л. Щелочную обработку водоросли проводили при температуре 50 °C в течение 2 ч. Далее гомогенат фильтровали через плотную ткань, осадок промывали подогретым до 50 °C 95 %-ным этанолом. Оба фильтрата объединяли и подкисляли концентрированной соляной кислотой до pH = 3. Свободные ЖК экстрагировали 2 раза петролейным эфиром, объединенный экстракт промывали 1 %-ным водным раствором NaCl, обезвоживали, пропуская экстракт через сульфат натрия, упаривали.

**Осаждение ЖК в виде Li-солей.** Насыщенные жирные кислоты удаляли осаждением в виде литиевых солей из ацетона по Хилдичу (Hildich, 1949) с небольшими изменениями. Свободные ЖК растворяли в 10-кратном объеме ацетона (250 г ЖК в 2,5 л ацетона) и добавляли 2 мл 2 %-ного раствора фенолфталеина в ацетоне в качестве маркера pH раствора. ЖК титровали 4N водным раствором LiOH при температуре 40 °C ЖК до появления характерной малиновой окраски (pH = 8,5), раствор выдерживали 2 ч, осадок отфильтровывали, фильтрат подкисляли соляной кислотой до pH = 3 и упаривали.

**Йод-лактонизация.** Реакцию йод-лактонизации ЖК проводили в расчете на все ЖК, образующие лактоны, по способу, предложенному ранее (Пат. № 1631067). Концентрацию свободных ЖК растворяли в 5-кратном объеме 95 %-ного этанола и переводили в Na-соли добавлением по стехиометрии водного раствора бикарбоната натрия. Свободный йод растворяли в 95 %-ном этаноле до концентрации раствора 5 % и добавляли последний на делительной воронке порциями к перемешиваемой смеси солей ЖК.

Непрореагировавший йод нейтрализовали до обесцвечивания насыщенным водным раствором тиосульфата натрия. Смесь образовавшихся йод-лактонов ЖК в этаноле разбавляли 2 объемами воды и экстрагировали йод-лактоны ЖК 3 раза петролевым эфиром. Поскольку йод-лактоны образуются исключительно из ПНЖК, имеющих  $\Delta 5$  (ЭПК и АК) и  $\Delta 4$  (ДГК) двойные связи, в то время как все остальные ЖК остаются в растворе в нативном виде, то их связывают в натриевые соли добавлением 2 %-ного  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в 40 %-ном этаноле. Йод-лактоны экстрагировали петролевым эфиром 2 раза и промывали водой, подкисленной соляной кислотой до  $\text{pH} = 3$ . Фильтрат осушали, пропуская через сульфат натрия, и упаривали. Для отделения йод-лактонов АК от йод-лактонов ДГК использовали колоночную хроматографию на силикагеле (100–160 мкм). Силикагель суспендировали в бензоле, наносили на хроматографическую колонку и промывали 2 объемами растворителя. Затем наносили суммарные йод-лактоны ЖК (соотношение йод-лактоны ЖК — силикагель 1 : 10 г/г). Элюирование проводили бензолом. Контроль осуществляли тонкослойной хроматографией. Фракции с чистым  $\delta$ -йод-лактоном АК объединяли и упаривали.

**Раскрытие йод-лактона АК.** Раскрытие йод-лактона АК проводили в 3 %-ном растворе безводного  $\text{NaI}$  в ацетонитриле. К смеси при перемешивании добавляли  $\text{TMS-Cl}$  с 10 %-ным избытком, по 1 мл каждые 15 мин, затем выдерживали 1 ч, после чего выделившийся йод нейтрализовали насыщенным водным раствором  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , смесь разбавляли 4 объемами воды и экстрагировали липиды петролевым эфиром.

Свободные ЖК связывали 2 %-ным  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в 40 %-ном этаноле с образованием натриевых солей и промывали щелочной экстракт петролевым эфиром от непрореагировавших йод-лактонов, добавляли равный объем воды, подкисляли концентрированной соляной кислотой до  $\text{pH} = 3$  и экстрагировали свободные ЖК петролевым эфиром, экстракт высушивали, фильтруя через сульфат натрия, упаривали.

**Получение этиловых эфиров (ЭЭ) ЖК.** Жирные кислоты вносили в 1 %-ный раствор серной кислоты в абсолютном этаноле при соотношении ЖК — этанол 1 : 10 об/об. Смесь нагревали до  $50^\circ\text{C}$  при перемешивании в течение 1,5 ч, далее разбавляли 3 объемами воды и экстрагировали этиловые эфиры ЖК петролевым эфиром. Упаренный экстракт очищали на колонке с силикагелем, элюент — петролевым эфиром.

**Выделение этилового эфира АК методом ВЭЖХ.** Разделение смеси этиловый эфир — ЖК осуществляли на колонке «Supelco Discovery HS C-18» (250 мм  $\times$  50 мм). Элюирование осуществляли в изократическом режиме в системе этанол—вода, 80 : 20 об/об, при скорости 50 мл/мин. Количество смеси этиловый эфир — ЖК, наносимых на колонку, составило 1 мл (0,9 г), расход элюирующей системы на одно разделение составлял в среднем 2,7 л. Фракции, содержащие этиловый эфир — АК с концентрацией более 97 %, объединяли и упаривали.

## Результаты и их обсуждение

С развитием методов культивирования и генной инженерии микроорганизмов в конце 20-го века была решена проблема получения биомассы с достаточно высоким содержанием ПНЖК, и прежде всего АК. Однако культивирование, особенно автотрофных микроорганизмов, требует повышенных до  $30^\circ\text{C}$  температур и интенсивного освещения для фотосинтеза (US Patent 5,338,673). Это делает процессы культивирования очень энергозатратными. Данная проблема легче решается в странах с жарким климатом, но в России с ее климатическими условиями подобные технологии могут резко увеличить стоимость конечного продукта.

Традиционным источником АК долгое время были внутренние органы крупного рогатого скота, такие как печень, надпочечники, поджелудочная железа, семенники. Обязательной стадией выделения являются экстракция общих липидов органическими растворителями и последующее получение свободных ЖК. В данной работе на примере липидов печени мы использовали классический набор методов выделения и концентрирования ПНЖК, а именно: экстракцию, омыление, осаждение балластных

насыщенных ЖК в виде солей лития. В технологическую схему мы включили оригинальный метод концентрирования — йод-лактонизацию, поскольку он позволяет селективно извлекать из обедненных ПНЖК смесей АК, ЭПК и ДГК (Gaiday et al., 1991; Пат. № 1631067). Эта процедура позволила увеличить концентрацию АК до 90 %. Надо отметить, что йод-лактонизация является единственным химическим методом концентрирования наиболее важных, с точки зрения биохимии, ПНЖК. Последней, 4-й, стадией концентрирования была выбрана ВЭЖХ, поскольку только этим методом можно получить ПНЖК, и в частности АК, с чистотой более 97 %.

В ранее опубликованной работе (Имбс и др., 2012) было показано, что в общих липидах, выделенных из красной водоросли *G. vermiculophylla*, содержание АК составляло 45,4 % от суммы общих ЖК и в определенные периоды жизненного цикла она может продуцировать простагландин  $A_2$ , образованный из АК. В зал. Петра Великого *G. vermiculophylla* распределена неравномерно на малых глубинах (0,1–0,6 м) вдоль берега, хотя местами образует обширные поля с апреля по сентябрь с урожайностью до 2,5 кг/м<sup>2</sup> (Лапшина и др., 1991; Козьменко, Колмаков, 2012) и может быть использована для получения высококачественного агара (Игнатова и др., 2011). Однако *G. vermiculophylla* как источник рассматривалась только в связи с обнаружением в ее липидах простагландина  $A_2$  (Имбс и др., 2012). Для выделения общих свободных ЖК мы использовали метод обработки водорослей в 2 %-ном растворе калиевой щелочи в этаноле. Подобная процедура используется при получении агара из грацилярии (Лапшина и др., 1991; Пат. № 2435443). При этом образуются калиевые соли ЖК, которые после подкисления можно экстрагировать петролейным эфиром. Эта стадия позволяет исключить наиболее трудоемкий процесс гомогенизации и экстракции общих липидов из водоросли. При промышленном получении агара из грацилярии выбрасываемые промывочные щелочные воды можно использовать как источник свободных ЖК для выделения АК.

Вследствие высокого содержания в исходных липидах АК (30,3 %) и значительного содержания насыщенных ЖК (47 %) (см. таблицу) второй стадией при концентрировании АК из водоросли было выбрано осаждение последних в виде солей лития (Hildich, 1949). Обычно насыщенные ЖК предпочитают удалять осаждением с мочевиной, но в связи с низкой степенью осаждения комплексов мочевины с короткоцепочечными насыщенными ЖК и большими потерями ПНЖК в настоящее время технологи предпочитают использовать метод с литиевыми солями.

Как видно из данных таблицы, концентрация АК в свободных ЖК, экстрагированных после щелочной обработки водоросли, составляла 30,3 %, а сумма насыщенных ЖК — 47,8 %. При таком соотношении использование традиционных методов осаждения насыщенных ЖК, а именно низкотемпературной кристаллизации (А.с. 641963) и осаждения с мочевиной (Shahidi, Wanasundara, 1998), может дать не более чем 2–3-кратное концентрирование ПНЖК. Однако главный недостаток этих методов заключается в низком выходе АК — не более 30 % от общего ее содержания в исходных липидах (А.с. 585152). Использование литиевых солей в качестве осаждающего агента для насыщенных ЖК позволило с высоким выходом (98 %) удвоить концентрацию АК (60,5 %) в смеси. Далее, учитывая, что в составе ЖК водорослей нет значимого количества ЭПК и ДГК, АК из этой смеси выделяли способом ВЭЖХ.

Таким образом, сравнительный анализ данного эксперимента показал преимущества работы с морским сырьем, красной водорослью *G. vermiculophylla*, при выделении АК. Во-первых, это неиспользуемое и широко распространенное в Японском море сырье, во-вторых, АК изначально присутствует в липидах водоросли в значительном количестве, в-третьих, липиды водоросли не содержат ДГК, а содержание ЭПК менее 1,5 % (в 20 раз меньше, чем АК). Такой состав ЖК обеспечивает использование в технологии получения АК минимального количества методов и получение высокообогащенной кислоты с высоким выходом, что существенно снижает стоимость конечного продукта.

Состав и содержание (% от общего состава жирных кислот) концентратов  
 арахидоновой кислоты из источников наземного и морского происхождения  
 Composition and content of the arachidonic acid concentrates (% of total fatty acids)  
 in certain raw materials of terrestrial and marine origin

ЖК*	Печень говьяжья				Красная водоросль <i>Gracilaria vermiculophylla</i>		
	Общие липиды	Концентрат после осаждения Li-солей	Йод-лакто- низация**	ВЭЖХ***	Общие липиды	Концентрат после осаждения Li-солей	ВЭЖХ
14:0	0,96	1,11			4,34	1,64	
14:1					0,28	0,56	
15:0-i					0,66	1,19	
15:0	0,48	0,20			0,29	0,00	
16:0-i					0,15	0,22	
16:0	16,29	3,00			39,54	4,22	
16:1n-7	1,71	8,50			5,18	7,14	<b>1,28</b>
17:0-i					0,66	0,66	
17:0-a	0,33	0,52			0,16	0,29	
Phytanic					0,28	0,46	
17:0	1,40	0,25			0,13	0,00	
17:1	0,74	0,51					
16:3n-3					0,24	0,52	
18:0	26,16	2,45			1,42	0,45	
18:1n-9	15,04	12,98			6,35	7,29	
18:1n-7	2,37	7,25			1,97	2,21	
18:2n-6	11,73	18,84			1,14	1,70	<b>1,12</b>
18:2n-4					0,17	0,36	
18:3n-6	0,22	2,96			0,46	0,93	
18:3n-3	0,43	1,22			0,84	1,34	
18:4n-3	0,48	0,81	0,25		0,35	0,68	
20:0					0,18	0,00	
20:1n-9					0,12	0,23	
20:2n-6	0,13	0,13			0,11	0,00	
20:3n-6	5,72	8,09			2,81	4,69	
<b>20:4n-6</b>	<b>7,69</b>	<b>13,27</b>	<b>90,01</b>	<b>98,76</b>	<b>30,26</b>	<b>60,46</b>	<b>97,60</b>
20:5n-3	0,51	1,49	7,74		1,44	2,74	
22:1n-11					0,45	0,00	
22:4n-6	2,13	3,01					
22:5n-3	3,94	8,82					
22:6n-3	1,55	4,58	1,99	1,24			
Σ НЖК	45,61	7,54	0,00	0,00	47,83	9,12	0,00
Σ МЖК	19,87	29,25	0,00	0,00	14,35	17,45	1,28
Σ ПНЖК	34,52	63,22	100,00	100,00	37,82	73,43	98,72
Выход на стадии, %	92,5	97,3	68,6	82,3	97,6	98,0	71,4
Общий выход, %, в расчете на:							
содержание в сырье				50,8			68,3
содержание в выделенных липидах				54,9			70,0

\* Первая цифра обозначает количество углеродных атомов в цепи жирной кислоты, вторая — количество ненасыщенных связей, n-3 или др. — расположение первой двойной связи от метильной группы.

\*\* Выход приведен на 3 процедуры — йод-лактонизацию, хроматографическое разделение лактонов и их раскрытие.

\*\*\* Выход приведен на 2 процедуры — получение ЭЭ ЖК и их разделение ВЭЖХ.

## Заключение

Разработана новая технология выделения АК из жирных кислот липидов красной водоросли *G. vermiculophylla* комбинацией двух методов — фракционированием литиевых солей ЖК и ВЭЖХ. В результате получена АК с чистотой 97,6 % и выходом 68,3 %.

Липиды водоросли, изначально характеризующиеся высоким содержанием АК (> 30 %) и малым содержанием ЭПК, предпочтительнее использования липидов из животных тканей. Таким образом, предложен несложный и воспроизводимый метод выделения чистой АК, доступный для реализации в лабораториях, использующих АК в биохимических и медицинских исследованиях.

*Исследование поддержано грантом Российского научного фонда, проект № 14-50-00034.*

## Список литературы

**Игнатова Т.А., Подкорытова А.В., Чимиров Ю.И. и др.** Технология получения агара из *Gracilariopsis* и *Gracilaria*: сравнительная характеристика способов очистки агаровых экстрактов // Хранение и переработка сельхозсырья. — 2011. — № 6. — С. 39–44.

**Имбс А.Б., Латышев Н.А., Светашев В.И. и др.** Распределение полиненасыщенных жирных кислот в красных водорослях рода *Gracilaria* — перспективном источнике простагландинов // Биол. моря. — 2012. — Т. 38, № 4. — С. 318–324.

**Козьменко В.Б., Колмаков П.В.** Биология и жизненная стратегия *Gracilaria verrucosa* в лагунах Хасанского района Приморского края // Науч. тр. Дальрыбвтуза. — 2012. — Т. 27. — С. 14–24.

**Лапшина А.А., Иванова Е.Г., Титлянов Э.А., Усов А.И.** Агар из приморской неприкрепленной водоросли *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. // Биоорганич. химия. — 1991. — Т. 17, № 11. — С. 1494–1499.

**Сергеева М.Г., Варфоломеева А.Т.** Каскад арахидоновой кислоты : моногр. — М. : Нар. образ., 2006. — 256 с.

**Хотимченко С.В.** Липиды морских водорослей-макрофитов и трав: структура, распределение, анализ : моногр. — Владивосток : Дальнаука, 2003. — 233 с.

**Calder P.C.** Polyunsaturated fatty acids, Inflammation, and Immunity // *Lipids*. — 2001. — Vol. 36. — P. 1007–1024.

**Carreau J.P., Dubacq J.P.** Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts // *J. Chromatogr.* — 1978. — Vol. 151, № 3. — P. 384–390.

**Christie W.W.** *Lipid Analysis: Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids.* — Bridgwater (UK) : The oily Press, 2003. — 416 p.

**Cohen Z.** The production potential of eicosapentaenoic and arachidonic acids by the red alga *Porphyridium cruentum* // *JAOCS*. — 1990. — Vol. 67, № 12. — P. 916–920.

**Corey E.J., Wright S.W.** A simple process for the purification of arachidonic acid // *Tetrahedron letters*. — 1984. — Vol. 25, № 26. — P. 2729–2730.

**Gaiday N.V., Imbs A.B., Kuklev D.V., Latyshev N.A.** Separation of natural polyunsaturated fatty-acids by means of iodolactonization // *JAOCS*. — 1991. — Vol. 68, № 4. — P. 230–233.

**Giménez A.G., González M.J.I., Medina A.R. et al.** Downstream processing and purification of eicosapentaenoic (20:5n-3) and arachidonic acids (20:4n-6) from the microalga *Porphyridium cruentum* // *Bioseparation*. — 1998. — Vol. 7. — P. 89–99.

**Hildich T.P.** *The Chemical constitution of natural fats.* — L. : Chapman&Hall Ltd., 1949. — 554 p.

**Shahidi F., Wanasundara U.N.** Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies // *Trends Food Sci. Technol.* — 1998. — Vol. 9. — P. 230–240.

**Sprecher H.** Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids // *BBA*. — 2000. — Vol. 1486. — P. 219–231.

*Поступила в редакцию 7.04.16 г.*