

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ИКРЫ ЗЕЛЕННОГО МОРСКОГО ЕЖА

Краснов К.А.<sup>1</sup>, Подольская Е.П.<sup>1,2</sup>, Гладчук А.С.<sup>1,3</sup>, Утсаль В.А.<sup>1</sup>, Гафт С.С.<sup>1</sup>,  
Краснова А.А.<sup>1</sup>, Кельцьева О.А.<sup>2,1</sup>, Чумак Е.А.<sup>1,4</sup>, Яковенко Е.В.<sup>1,4</sup>, Иванов М.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии  
Федерального медико-биологического агентства» 192019, г. Санкт-Петербург, ул.

Бехтерева, д. 1, тел.: (812) 365-06-80, [institute@toxicology.ru](mailto:institute@toxicology.ru)

<sup>2</sup>Институт аналитического приборостроения Российской академии наук 190103, г.

Санкт-Петербург, пр. Рижский, д. 26, тел: (812) 363-07-19, [iap@ianin.spb.su](mailto:iap@ianin.spb.su)

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет 199034, г. Санкт-Петербург, наб.

Университетская, д. 7-9, тел: (812) 363-66-36, [spbu@spbu.ru](mailto:spbu@spbu.ru)

<sup>4</sup>ООО «СИ-Ю», 683024, г. Петропавловск-Камчатский, пр. Рыбаков, д. 1, тел: +7 (909)  
837-93-01

### РЕЗЮМЕ.

Изучен количественный и качественный состав основных биологически активных компонентов лиофилизированной икры камчатского зеленого морского ежа *S. droebachiensis*. Исследование проведено с использованием методов газовой, жидкостной и тонкослойной хроматографии, спектрофотометрии и МАЛДИ-МС. Предложены методы экспресс-оценки качества икры морского ежа на основе данных по составу жирных кислот, каротиноидов, по содержанию органического фосфора и иода.

*Ключевые слова:* морской еж, икра, лиофилизат, качество, анализ, каротиноиды, жирные кислоты, белки, спектрофотометрия, ТСХ, ВЭЖХ, МАЛДИ-МС.

## **ANALYTICAL APPROACHES TO ASSESSING THE QUALITY OF LYOPHYLIZED GREEN SEA URCHIN CAVIAR**

Krasnov K.A.<sup>1</sup>, Podolskaya E.P.<sup>1,2</sup>, Gladchuk A.S.<sup>1,3</sup>, Utsal V.A.<sup>1</sup>, Gaft S.S.<sup>1</sup>,

Krasnova A.A.<sup>1</sup>, Keltsieva O.A.<sup>2,1</sup>, Chumak E.A.<sup>1,4</sup>, Yakovenko E.V.<sup>1,4</sup>, Ivanov M.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Toxicology of Federal Medico-Biological Agency of Russia 192019, St. Petersburg, st. Bekhtereva, 1, phone: (812) 365-06-80, institute@toxicology.ru*

<sup>2</sup>*Institute of Analytical Instrumentation, Russian Academy of Sciences 190103, St. Petersburg, av. Rizhskiy, 26, phone: (812) 363-07-19, iap@ianin.spb.su*

<sup>3</sup>*St. Petersburg State University 199034, St. Petersburg, emb. Universitetskaya, 7-9, phone: (812) 363-66-36, spbu@spbu.ru*

<sup>4</sup> «CI-Yu» Ltd., 683024, Petropavlovsk-Kamchatsky, av. Rybakov, 1, phone: +7 (909) 837-93-01

### **ABSTRACT.**

The quantitative and qualitative composition of main biologically active components of the lyophilized caviar of Kamchatka's green sea urchin *S. droebachiensis* was studied. The study was carried out using gas, liquid and thin layer chromatography, spectrophotometry and MALDI-MS. Methods are proposed for rapid assessment of the quality of sea urchin caviar based on data of fatty acids and carotenoids composition, and on the measuring of an organic phosphorus and iodine.

*Key words:* sea urchin, caviar, lyophilisate, quality, analysis, carotenoids, fatty acids, proteins, spectrophotometry, TLC, HPLC, MALDI.

### **ВВЕДЕНИЕ.**

Гонады морских ежей (обычно называемые икрой), являются деликатесным пищевым продуктом, который по своей стоимости занимает промежуточное место между красной и черной икрой [1]. При этом, помимо деликатесных качеств, икра морских ежей служит уникальным источником полезных для здоровья биологически активных веществ (БАВ), таких как каротиноиды, фосфолипиды, полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), витамины группы А, В, D, Е, незаменимые аминокислоты, пептиды, микроэлементы и другие БАВ [1, 2]. Неслучайно широкое использование в пищу икры морского ежа в Японии считают одной из причин высокой продолжительности жизни в этой стране [3]. Употребление икры морских ежей способствует улучшению общего самочувствия, повышению физической и умственной работоспособности, внимания и памяти, снижению утомляемости, повышению устойчивости организма к

неблагоприятным, токсичным факторам, а также улучшает обменные процессы, повышает энергичность, половую активность и жизненный тонус [1].

Икра морских ежей используется в народной медицине ряда стран мира не только как ценный пищевой продукт, но и как высокоэффективная лечебно-профилактическая добавка. Например, в России выпускается биологически активная добавка (БАД) «Маристим», представляющая собой лиофилизированную икру морского ежа [3]. В медицинской литературе отмечаются ценные фармакологические свойства икры морских ежей, которая проявляет гиполипидемическое действие, нормализует липидный профиль крови [4], оказывает благоприятное действие на сердечно-сосудистую систему и функцию щитовидной железы [1], обладает антиоксидантным и мембранопротекторным эффектом [5]. Описано также противоопухолевое и противовоспалительное действие экстрактов из гонад морского ежа [6]. В связи с этим икру морских ежей и БАДы на ее основе рекомендуют для ускорения реабилитации после различных заболеваний, для профилактики атеросклероза и онкологических заболеваний, в качестве геропротекторного средства и многих других целей [3, 7].

Вместе с тем, несмотря на то, что состав икры морских ежей подробно изучен, при использовании ее в качестве терапевтического средства возникает ряд затруднений, связанных с отсутствием надлежащих методов контроля и стандартизации данного продукта. С этим, в частности, связана высокая доля фальсификаций, которая в случае БАД на основе икры морских ежей достигает 90% [8]. При заготовке качество икры оценивают по визуальным и органолептическим признакам (цвет, запах, вкус), а также по таким общим показателям, как сухой остаток и содержание белка и жиров [1, 9, 10]. Для пищевого сырья этого достаточно, но в случае медицинского назначения требуются более подробные данные о биологически активных компонентах, отвечающих за тот или иной эффект. Как известно, состав икры морского ежа существенно зависит от видовой принадлежности гидробионта, среды обитания, времени сбора, условий обработки, хранения и многих других факторов [1, 11, 12, 13]. Вместе с тем, очевидно, что полное исследование состава столь сложной смеси в рамках контрольного анализа невозможно. В связи с этим, существует необходимость в разработке алгоритма оценки качества икры морского ежа на основе определения важнейших биологически активных компонентов с помощью относительно простых и воспроизводимых химико-аналитических подходов. В настоящей работе мы исследовали состав икры зеленого морского ежа *S. droebachiensis* – одного из важнейших, но относительно менее изученных отечественных промысловых

представителей данного семейства, и сравнили возможности различных аналитических методов для контроля качества этого продукта.

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ.

Разработка алгоритма оценки качества икры морского ежа на основе ряда химико-аналитических подходов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Получение лиофилизата икры морского ежа. В работе использовались цельные свежие особи зеленого морского ежа *Strongylocentrotus droebachiensis* весом 150-250 г, собранные в районе Авачинской бухты (Камчатка) в период 15.10.19 - 27.10.19. Образцы транспортировали в охлажденном виде при +1(±1) °С. Гонады извлекали и быстро замораживали при -49 °С, после чего лиофилизировали в вакууме 0,5 мбар в течение 36 ч с досушкой при 0,05 мбар (6 ч). Из 191 г сырых гонад получено 45,8 г лиофилизата в виде пористой твердой массы желто-оранжевого цвета, с содержанием остаточной влаги до 2%. Лيوфилизированную икру хранили при -10 °С.

Определение жирнокислотного состава *S. droebachiensis*. Липиды извлекали из лиофилизата икры морского ежа дихлорметаном. После упаривания растворителя в вакууме из 1 г лиофилизата икры получали 181 мг липидной фракции в виде светло-желтого масла. Для определения общего жирнокислотного состава применяли процедуру дериватизации, переводя связанные и свободные жирные кислоты (ЖК) в метиловые эфиры, с последующим газохроматографическим анализом с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) в условиях ионизации электронным ударом 70 эВ [14]. Анализ проводили с помощью хромато-масс спектрометра Shimadzu 2100 (Shimadzu) с квадрупольным МС детектором и капиллярной кварцевой колонкой (30 м × 0,25 мм), модифицированной фенилсилоксановой фазой (0,25 мкм). Идентификацию ЖК осуществляли по масс-спектрам с использованием стандартной масс-спектрометрической библиотеки NIST, и по времени удерживания в сравнении со стандартными образцами.

Для определения свободных ЖК лиофилизат икры измельчали и экстрагировали липиды гексаном. Анализ свободных ЖК в полученных гексановых экстрактах осуществляли по методике [15, 16], основанной на получении монослоев Ленгмюра с последующим анализом ЖК в виде монокарбоксилатов бария, методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации – масс-спектрометрии (МАЛДИ-МС). Масс-спектры были получены в режиме рефлектрон при регистрации положительных

ионов с помощью тандемного времяпролетного масс-спектрометра UltrafleXtreme (Bruker Daltonics) на базе Научного парка СПбГУ.

Анализ каротиноидов. Суммарное содержание каротиноидов в лиофилизате икры определяли спектрофотометрически (в пересчете на  $\beta$ -каротин) по значению оптической плотности при длине волны 451 нм [17]. Идентификацию каротиноидов осуществляли методами тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах HPTLC Si 60F<sub>254</sub> (Merck). В случае анализа методом МАЛДИ-МС после препаративного разделения смеси с помощью ТСХ окрашенные полосы вырезали, экстрагировали хлороформом, высушивали, затем осадок перерастворяли в 100 мкл ацетонитрила. На ячейку МАЛДИ мишени наносили 0,5 мкл полученного раствора, добавляли 0,5 мкл раствора матрицы (раствор  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты (5 мг/мл) в 70% ацетонитриле с 0,1% трифторуксусной кислотой (ТФУ)), высушивали и анализировали с помощью масс-спектрометра UltrafleXtreme.

Элементный анализ проводили методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой с использованием спектрометра Optima 2100DV (Perkin Elmer).

Исследование белкового состава икры *S. droebachiensis*. Для выделения белков лиофилизат икры гомогенизировали в лизирующем буфере (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% TritonX-100; cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail), инкубировали при перемешивании (1 ч, 4 °C), затем полученные лизаты центрифугировали и супернатант отбирали. К отобранному супернатанту добавляли трехкратный объем этанола (-20 °C), инкубировали при 4 °C в течение 40 минут, центрифугировали, супернатант отбрасывали. Полученный осадок дважды промывали этанолом (-20 °C) и высушивали в вакуумной центрифуге. Выделенную таким способом смесь белков исследовали двумя методами. В первом случае белки разделяли с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях [18] в 12% полиакриламидном геле с использованием аппарата Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad). После электрофореза гели окрашивали с помощью EZBlue™ Gel Staining Reagent. Окрашенные полосы геля иссекали. Обработку геля, карбамидометилирование и ограниченный протеолиз белков в присутствии трипсина в геле, а также экстракцию пептидов и дальнейшую идентификацию осуществляли в соответствии с известным методом [19]. Во втором случае перерастворенную в воде смесь белков подвергали ограниченному протеолизу в присутствии трипсина. Разделение смеси триптических пептидов осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с помощью хроматографа Милихром А-02 (Эконова) с использованием

хроматографической колонки Prontosil 120-5 (2x75 мм, C18, 5 мкм). Режим элюирования градиентный (А: 0,1% ТФУ; В: ацетонитрил + 0,1% ТФУ, 0-20 мин – В от 3% до 100%, 20-24 мин – В 100%; 24-28 мин – В от 100% до 3%) при скорости потока подвижной фазы 100 мкл/мин. Элюат наносили на ячейки МАЛДИ мишени, затем добавляли раствор матрицы. Время накопления элюата составляло 1 с для каждой ячейки. Масс-спектрометрический анализ триптических гидролизатов выполняли с помощью масс-спектрометра UltrafleXtreme. Поиск и идентификацию белков производили с использованием программного обеспечения Mascot (Matrix Science) при следующих настройках: База данных – NCBI nr; Таксон – Other Metazoa; Фермент – трипсин; Число пропущенных ферментом сайтов расщепления – 1; Модификации – Carbamidomethyl (C), Oxidation (M), Phospho (ST), Phospho (Y); Peptide tol. – 50 ppm; MS/MS tol. – 0,4 Da.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

По данным литературы, наиболее эффективным способом переработки икры морского ежа, позволяющим максимально сохранить все нативные компоненты, является лиофилизация [20]. В настоящей работе мы получили и исследовали лиофилизат икры камчатского зеленого морского ежа *S. droebachiensis* (см. раздел Материалы и методы) – одного из важнейших отечественных промысловых представителей данного семейства. Ниже рассмотрены основные классы биологически активных веществ в составе данного лиофилизата, и подходы к их определению.

Жирные кислоты. Среди липидных компонентов икры морского ежа значительную роль играют жирные кислоты, особенно полиненасыщенные (ПНЖК), которые считаются важным гипополипидемическим и антиатеросклеротическим фактором [4]. В связи с этим был исследован состав липидной фракции для оценки общего содержания ЖК (метод ГХ-МС) и отдельно – свободных ЖК (метод МАЛДИ-МС) в лиофилизате икры морского ежа (Табл. 1).

| Название ЖК         | Обозначение | Мол. вес, Да | Относительное содержание, % |              |
|---------------------|-------------|--------------|-----------------------------|--------------|
|                     |             |              | Все формы                   | Свободные ЖК |
| Насыщенные ЖК       |             |              | Σ=43,3                      | Σ=44,5       |
| Миристиновая        | C14:0       | 228,209      | 22,3                        | 2,5          |
| Пентадекановая      | C15:0       | 242,225      | 0,4                         | 2,5          |
| Пальмитиновая       | C16:0       | 256,240      | 17,9                        | 14,1         |
| Стеариновая         | C18:0       | 284,272      | 1,8                         | 24,6         |
| Эйкозановая         | C20:0       | 312,303      | 0,5                         | 0,8          |
| Генейкозановая      | C21:0       | 326,319      | 0,4                         | <0,1         |
| Мононенасыщенные ЖК |             |              | Σ=26,9                      | Σ=33,6       |
| Миристолеиновая     | C14:1       | 226,193      | 2,0                         | 0,6          |

|                                 |                  |         |               |               |
|---------------------------------|------------------|---------|---------------|---------------|
| Пентадециленовая                | C15:1            | 240,209 | <0,1          | 0,7           |
| Пальмитолеиновая                | C16:1            | 254,225 | 5,6           | 10,2          |
| 9-Гексадекаеновая               | C16:1            | 254,225 | 0,1           |               |
| Олеиновая                       | C18:1            | 282,256 | 3,9           | 17,4          |
| 15-Октадеценовая                | C18:1            | 282,256 | 3,0           |               |
| Гондоиновая                     | C20:1            | 310,287 | 10,5          | 4,7           |
| 8-Эйкозаеновая                  | C20:1            | 310,287 | 2,5           |               |
| 14-Эйкозаеновая                 | C20:1            | 310,287 | 0,3           |               |
| <i>Полиненасыщенные ЖК</i>      |                  |         | $\Sigma=29,8$ | $\Sigma=21,9$ |
| Гексадека-6,9,12,15-тетраеновая | C16:4 $\omega$ 3 | 248,178 | 0,1           | <0,1          |
| Гексадека-9,12,15-триеновая     | C16:3 $\omega$ 3 | 250,193 | 0,1           | <0,1          |
| Стиридовая                      | C18:4 $\omega$ 3 | 276,209 | 3,8           | 2,6           |
| Линоленовая                     | C18:3 $\omega$ 6 | 278,225 | 0,1           | 1,9           |
| Линолевая                       | C18:2 $\omega$ 6 | 280,240 | 0,3           | 6,5           |
| 5,8,11,14,17-Эйкозапентаеновая  | C20:5 $\omega$ 3 | 302,225 | 9,9           | 4,4           |
| Арахидоновая                    | C20:4 $\omega$ 6 | 304,240 | 3,3           | 2,7           |
| 5,11,14,17-Эйкозатетраеновая    | C20:4 $\omega$ 3 | 304,240 | 2,1           |               |
| Дигомо-гамма-линоленовая        | C20:3 $\omega$ 6 | 306,256 | 8,9           | 1,2           |
| 8,11- Эйкозодиеновая            | C20:2            | 308,271 | 0,9           | 2,6           |
| Докозодиеновая                  | C22:2            | 336,303 | 0,3           | <0,1          |
| <i>Сумма всех ЖК</i>            |                  |         | 100           | 100           |

Табл. 1. Содержание ЖК в липидной фракции, выделенной из лиофилизата икры *S. droebachiensis*

С учетом того, что липиды составляют 18% от сухого веса икры ежа, можно заключить, что в исследованном лиофилизате содержится 4,2% ПНЖК в разных формах, а в нативной сырой икре общая доля этих кислот составляет около 1%. В основном ЖК присутствуют в связанной форме в виде глицеридов, тогда как доля свободных ЖК сравнительно невелика. Эти результаты согласуются с известными данными о составе икры морских ежей [1], однако отмечаются и отличия. Так, изученные нами образцы икры содержали большое количество миристиновой кислоты (22,3%) и не содержали докозагексаеновой кислоты, тогда как по данным работы [1], напротив, кислота C22:6 является одним из основных компонентов (15,3%), а миристиновая отсутствует.

Помимо ЖК, в составе липидов методом ГХ-МС было обнаружено небольшое количество альдегидов C16-C18 (до 0,1%) и холестерин (1%). В целом, хроматографический профиль метилированной липидной фракции весьма характерен, что позволяет использовать его для оценки подлинности и качества икры морского ежа. Признаками снижения качества может служить снижение содержания ПНЖК, а также повышение содержания альдегидов - продуктов окисления липидных компонентов.

Другим перспективным подходом для оценки состава свободных ЖК оказался использованный нами метод МАЛДИ-МС в сочетании с технологией Ленгмюра [15], позволяющий определять свободные ЖК в виде бариевых аддуктов. Хотя данный метод не позволяет различить кислоты с одинаковым молекулярным весом (например, структурные изомеры), однако его достоинствами по сравнению с ГХ-МС являются экспрессность процедур пробоподготовки и анализа, а также простота интерпретации результатов. Данные о составе ЖК, полученные с помощью двух различных аналитических подходов (ГХ-МС и МАЛДИ-МС), достаточно хорошо согласуются друг с другом.

Каротиноиды. Также важной группой биологически активных компонентов икры морского ежа являются каротиноиды. С присутствием этих веществ, обладающих высокой антиоксидантной активностью, связывают адаптогенные, кардиопротекторные и онкопротекторные свойства икры морского ежа, а также ее профилактическая эффективность при различных возрастных нарушениях, вызываемых свободнорадикальными процессами.

Для определения каротиноидов в икре зеленого морского ежа был использован метод ТСХ в сочетании с МАЛДИ-МС. Дихлорметановый экстракт липидов разделяли на пластине ТСХ, при этом наблюдалось не менее 5 окрашенных пятен - оранжево-красного (эхиненон) и желто-оранжевого ( $\beta$ -каротин и остальные, Табл. 2) цвета. Все окрашенные вещества на хроматограммах показывали качественную реакцию на каротиноиды (синее окрашивание при обработке парами HCl) [21].

| №                                     | Rf *        | Каротиноид                             | Содержание, мг/г | Относительная доля, % |
|---------------------------------------|-------------|----------------------------------------|------------------|-----------------------|
| 1                                     | 0,96        | $\beta$ -Каротин                       | 0,036            | 18                    |
| 2                                     | 0,39 и 0,44 | Эхиненон ( $\beta$ + $\alpha$ изомеры) | 0,153            | 76                    |
| 3                                     | 0,31        | Изокриптоксантин                       | 0,006            | 3                     |
| 4                                     | 0,22        | Не идентифицирован                     | 0,004            | 2                     |
| 5                                     | 0,03        | Фукоксантинол                          | следы            | < 1                   |
| Сумма в пересчете на $\beta$ -каротин |             |                                        | 0,199            | 100                   |

Примечание: \* - хроматографический индекс в системе хлороформ-гексан 1:1

Табл. 2. Содержание каротиноидов в лиофилизате икры *S. droebachiensis*

Структура каротиноидов (Табл. 2) была доказана путем исследования окрашенных зон на пластинах ТСХ методом МАЛДИ-МС, а их количественное содержание было установлено спектрофотометрически по поглощению при длине волны 450 нм. Обнаруженный набор каротиноидов достаточно типичен для гонад представителей рода *Strongylocentrotus* [12]. Как и у большинства морских ежей, основным каротиноидом икры

*S. droebachiensis*, оказался эхиненон. Следует отметить, что эхиненон встречается практически только у морских ежей, причем именно в гонадах его содержание наиболее велико. В связи с этим, анализ каротиноидного профиля методом ТСХ может служить надежным способом проверки подлинности продуктов переработки икры морских ежей.

Тем более это важно при оценке качества лекарственных препаратов и БАД на основе икры морских ежей, так как уровень содержания каротиноидов в соответствии с их химической природой может стать наиболее информативным показателем. Как известно, каротиноиды являются весьма лабильными соединениями, легко разрушающимися под действием кислорода, света, повышенной температуры, а также при неправильной заготовке сырья. Например, в данной работе было показано, что одного цикла заморозки-разморозки сырой икры *S. droebachiensis* достаточно для того, чтобы уровень каротиноидов снизился на 20-25%. Таким образом, снижение содержания каротиноидов может служить индикатором нарушений процедуры заготовки и хранения сырья, в результате которых падает его биологическая ценность.

Макро- и микроэлементы. При стандартизации состава икры морских ежей следует учитывать также макро- и микроэлементы, которые играют немаловажную роль в формировании биологических эффектов [2]. Исследованный нами элементный состав лиофилизата икры *S. droebachiensis* приведен в Табл. 3.

| Элемент           | Mg  | Ca  | Na    | K    | P    | Co   | Cr  | Zn   | Cu  | Se  | I   |
|-------------------|-----|-----|-------|------|------|------|-----|------|-----|-----|-----|
| Содержание, мкг/г | 673 | 143 | 11103 | 4615 | 9651 | 0,25 | 1,0 | 42,7 | 1,8 | 0,5 | 9,8 |

Табл. 3. Содержание важнейших макро- и микроэлементов в лиофилизате икры *S. droebachiensis*

Наличие около 1% органического фосфора в значительной степени связано с присутствием фосфолипидов, отвечающих за гепатопротекторные и мембранопротекторные свойства икры морского ежа. Анализ фосфора в липидной фракции позволяет оценить общее количество фосфолипидов, составляющее в лиофилизате икры *S. droebachiensis* около 6%. Важную роль играет также йод, входящий в состав тиреоидных гормонов, отвечающих за регуляцию функций щитовидной железы. Наряду с фосфором и йодом определенный вклад в биологическую активность могут вносить цинк, селен, магний и другие элементы [2,3], что также следует учитывать при стандартизации состава икры морского ежа.

Оценка белкового состава икры *S. droebachiensis*. Одной из важнейших характеристик при оценке пищевой ценности сырья для продуктов питания или БАД может служить белковый состав. Известно, что основной яичный белок, а также его предшественник – вителлогенин, составляют большую часть общего содержания белка в икре морских ежей [22]. В связи с этим для определения максимально возможного числа белков нами было использовано два метода предварительного разделения: ВЭЖХ триптического гидролизата белкового пула икры с нанесением элюата на ячейки МАЛДИ мишени и гель-электрофорез экстрагированной смеси белков в денатурирующих условиях с последующим триптическим гидролизом белков в иссеченных окрашенных полосах геля. После поиска и идентификации белков с использованием базы данных NCBI в Табл. 4 были вынесены результаты, полученные для организмов, относящихся к классу Echinoidea. В качестве организма, по гомологии с белками которого в большинстве случаев определялись белки в исследованной икре, был *S. purpuratus*, геном которого изучен достаточно хорошо [23], в то время как в базе данных NCBI для *S. droebachiensis* экспериментально подтвержденные данные практически отсутствуют. Необходимо отметить, что только 9 белков из 21 были идентифицированы по гомологии с известными белками (белки, наличие которых в составе организма проверено экспериментально с помощью методов, отличных от геномных). Остальные белки (помечены звездочкой в Табл. 4) были соотнесены с белками, присутствие которых в *S. purpuratus* предсказано теоретически на основе кодирующих участков генома *S. purpuratus*. Кроме упомянутых выше основного яичного белка и вителлогенина в составе икры были обнаружены белки (актин, тубулин), участвующие в формировании одних из основных компонентов цитоскелета эукариотических клеток (микрофиламенты и микротрубочки). Помимо структурных белков были выявлены ферменты: глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, катализирующая одну из реакций гликолитического пути, и белок, обладающий глутатион-S-трансферазной активностью. Среди идентифицированных соединений присутствует ряд белков, функции которых на данный момент ещё неизвестны, что делает актуальным дальнейшее изучение белкового состава икры морских ежей.

| Идентифицированный белок | Число пептидов, отнесенных к данному белку |                   | Score |                   | Вид морского ежа      |
|--------------------------|--------------------------------------------|-------------------|-------|-------------------|-----------------------|
|                          | ВЭЖХ                                       | Гель-электрофорез | ВЭЖХ  | Гель-электрофорез |                       |
| Major yolk protein       | 29                                         | 16                | 2277  | 888,8             | <i>S. intermedius</i> |
| Vitellogenin             | 20                                         | 9                 | 1445  | 496,5             | <i>P. depressus</i>   |
| Actin 2 protein          | -                                          | 7                 | -     | 865               | <i>S. purpuratus</i>  |

|                                                                     |   |    |       |       |                       |
|---------------------------------------------------------------------|---|----|-------|-------|-----------------------|
| Tubulin beta chain-like*                                            | - | 10 | -     | 807,3 | <i>S. purpuratus</i>  |
| Cytoplasmic actin CyII                                              | 6 | 6  | 583,4 | 596,1 | <i>H. tuberculata</i> |
| Actin, cytoskeletal 3A                                              | 8 | -  | 609,2 | -     | <i>S. purpuratus</i>  |
| Uncharacterized protein LOC580672*                                  | 5 | 8  | 154,3 | 464,1 | <i>S. purpuratus</i>  |
| Actin-5C-like*                                                      | 6 | -  | 380,9 | -     | <i>S. purpuratus</i>  |
| Tubulin alpha-3 chain-like*                                         | 1 | 3  | 147,5 | 367,3 | <i>S. purpuratus</i>  |
| Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                            | - | 4  | -     | 292,5 | <i>P. depressus</i>   |
| Apolipoprotein B-100-like*                                          | - | 5  | -     | 272,2 | <i>S. purpuratus</i>  |
| Voltage-dependent anion-selective channel protein 2-like isoform 1* | - | 2  | -     | 249,8 | <i>S. purpuratus</i>  |
| Glutathione S-transferase alpha-4-like*                             | - | 4  | -     | 227,9 | <i>S. purpuratus</i>  |
| Uncharacterized protein ZK1073,1-like*                              | - | 3  | -     | 191,4 | <i>S. purpuratus</i>  |
| Uncharacterized protein LOC753186*                                  | 3 | 4  | 105,2 | 176,5 | <i>S. purpuratus</i>  |
| Histone H2B.2, sperm                                                | 2 | -  | 159,6 | -     | <i>S. purpuratus</i>  |
| Tubulin alpha-3 chain-like*                                         | 1 | 3  | 147,5 | 367,3 | <i>S. purpuratus</i>  |
| Tubulin beta-4 chain-like isoform 2*                                | 1 | -  | 129,7 | -     | <i>S. purpuratus</i>  |
| Tubulin alpha-1C chain isoform 1*                                   | 1 | -  | 103,3 | -     | <i>S. purpuratus</i>  |
| Histone H2B.1, sperm                                                | 2 | -  | 90,6  | -     | <i>S. purpuratus</i>  |
| Melanotransferrin-like                                              | 1 | -  | 89,6  | -     | <i>S. purpuratus</i>  |

Примечание: \* - белки, наличие которых теоретически предсказано на основе кодирующих участков генома *S. Purpuratus*

Табл. 4. Список идентифицированных белков в составе лиофилизата икры *S. droebachiensis*

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Проведенное исследование и литературные данные позволяют считать, что наиболее информативными группами соединений с точки зрения стандартизации и контроля качества икры морского ежа, являются каротиноиды, жирные кислоты, фосфолипиды, соединения йода и, возможно, некоторые протеины. В связи с этим, разработка методов химико-фармацевтического контроля должна быть сфокусирована, прежде всего, на определении этих групп соединений. Особенно важно контролировать содержание каротиноидов - как на стадии заготовки сырья, так и при изготовлении БАД и фармацевтических средств. Для определения перечисленных выше важнейших групп компонентов в икре *S. droebachiensis* в настоящей работе предложен ряд аналитических

подходов, основанных на ГХ-МС, ТСХ, спектрофотометрии, МАЛДИ-МС, однако проблема стандартизации данного сырья и препаратов на его основе требует дополнительных исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА.

1. Балыкова, Л.И. Низкотемпературная обработка икры гидробионтов: монография / Л.И. Балыкова, М.В. Гоконаев, Ю.А. Юрков. – Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2008. – 140 с.
2. Яковлев, С.А. Сила и энергия морского ежа // С.А. Яковлев. М.: Издательство Академии акварели и изящных искусств, 2014. – 50 с.
3. Крыжановский, С.П. Биологически активные вещества морских ежей – основа для разработки лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций / С.П. Крыжановский // Бюллетень СО РАМН. – 2013. – Т. 33, № 2. – С. 39-48.
4. Крыжановский, С.П. Гиполипидемическое действие БАД к пище из икры морских ежей в монотерапии и комбинации с аторвастатином / С.П. Крыжановский, М.А. Яцкова, В.Д. Головачева // Тихоокеан. мед. журн. – 2012. – №1. – С.29–31.
5. Garama, D. Extraction and analysis of carotenoids from the New Zealand sea urchin *Evechinus chloroticus* gonads / D. Garama, P. Bremer, A. Carne // Acta Biochim. Pol. – 2012. – Vol. 59, №1. – P.83–85.
6. Sheean, P. Bioactivity of extracts from gonadal tissue of the edible Australia purple sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* / P. Sheean, L.D. Hodges, N. Kalafatis, P. FA. Wright, P.M. Wynne, M.W. Whitehouse, T.A. Macrides // J. Sci. Food Agric. – 2007. – Vol. 87, №4. – P.694–701.
7. Тутельян, В.А. Новые стратегии в лечебном питании / В.А. Тутельян, Т.С. Попова. – М.: Медицина, 2002. – 144 с.
8. Чепурной, И.П. Идентификация и фальсификация продовольственных товаров: учебник / И.П. Чепурной. – М.: Издательско-торговая корпорация «Дашков и К°», 2006. – 460 с.
9. ТУ, ТИ № 9253–094–00472012–97 «Ежи морские – сырец».
10. ТУ, ТИ № 9265–030–00472182–05 «Икра морских ежей охлажденная».
11. Юрьева, М.И. Состав липидов гонад морского ежа *Strongylocentrotus pallidus* / М.И. Юрьева, Г.И. Викторская, В.Н. Акулин // Изв. ТИНРО. – 2000. – Т. 127. – С.483–489.
12. Задорожный, П. А. Влияние среды и состояния организма на содержание каротиноидов у морских ежей: дис. ... канд. биол. Наук / П. А. Задорожный. – Владивосток: 2003. – 126 с.

13. Лебская, Т.К. Химический состав и биохимические свойства гидробионтов прибрежной зоны Баренцева и Белого морей / Т.К. Лебская, Ю.Ф. Двинин, Л. Л. Константинова и др. – Мурманск: ПИНРО, 1998. – 150 с.
14. Баранов В.М., Осипов Г.А., Мухамедиева Л. Н., Белобородова Н.В., Пахомова А.А., Ильин В.К., Родионова Т.А. Оценка микроэкологического статуса человека методом хроматомасс-спектрометрии. Новая медицинская технология. - № рег. в Росздравнадзоре НЮ-40006 от 17.08.2009 г. - М. - 37 с.
15. Podolskaya, E.P. Thin film chemical deposition techniques as a tool for fingerprinting of free fatty acids by MALDI-TOF-MS / E.P. Podolskaya, A.S. Gladchuk, O.A. Keltsieva, P.S. Dubakova, E.S. Silyavka, E. Lukasheva, V. Zhukov, N. Lapina, M.R. Makhmadaliev, A.M. Gzgzryan, N.G. Sukhodolov, K.A. Krasnov, A.A. Selyutin, A. Frolov // *Anal Chem.* – 2019. – Vol. 91, № 2. – P. 1636–1643.
16. Podolskaya, E.P. Application of Langmuir–Blodgett technology for the analysis of saturated fatty acids using the MALDI-TOF mass spectrometry / E.P.Podolskaya, M.V. Serebryakova, K.A. Krasnov, S.A. Grachev, A.M. Gzgzryan, N.G. Sukhodolov // *Mendeleev Commun.* – 2018. – Vol. 28. – P.337-339.
17. ГОСТ Р 54058-2010. Продукты пищевые функциональные. Метод определения каротиноидов. - Дата введения 2012-01-01.
18. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
19. Shevchenko, A. In-gel digestion for mass-spectrometric characterization of proteins and proteomes / A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havlis, J.V. Olsen, M. Mann // *Nat. Protoc.* – 2006. – Vol. 1, № 6. – P. 2856-2860.
20. Патент № 2273435 С1. Россия. МПК A23L 1/30, 1/325, 1/328. Способ получения биологически активной добавки к пище из икры морских ежей // М.И. Юрьева, Н.Н. Ковалев и др. Оpubл. В бюлл. № 10, 2006.
21. Досон, Р. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. – М.: Мир, 1991. – 540 с.
22. Harrington, F.E. A putative precursor to the major yolk protein of the sea urchin / F.E. Harrington, D.P. Easton // *Dev. Biol.* – 1982. – Vol. 94, №2. – P.505–508.
23. Sea Urchin Genome Sequencing Consortium. The Genome of the Sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus* / Sea Urchin Genome Sequencing Consortium // *Science.* – 2006. – Vol. 314. – P.941-952.