

Е. Ф. Сафонова, А. А. Назарова, В. Ф. Селеменев,
Т. А. Брежнева, А. И. Сливкин

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ РАЗДЕЛЕНИЯ ФОСФОЛИПИДОВ В ТОНКОМ СЛОЕ СОРБЕНТА

Воронежский государственный университет

В последнее время для разделения сложных смесей фосфолипидов (ФЛ) и продуктов их гидролиза [1] все шире используется метод тонкослойной хроматографии (ТСХ). Преимущества этого метода (экспрессность, простота, доступность, возможность препаративного разделения и малое количество анализируемого вещества) делают его незаменимым при исследовании и выделении этого сложного класса веществ.

В ТСХ на процесс хроматографирования влияют существенным образом растворитель, сорбент и условия анализа, причем наиболее сильным может оказаться влияние растворителя, т.к. выбор растворителей, различающихся как по силе, так и по селективности, очень велик. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение различных элюирующих систем и условий хроматографирования, позволяющих провести удовлетворительное разделение ФЛ в тонком слое сорбента.

Растворитель в ТСХ выполняет следующие функции [2]:

- 1) перемещение разделяемых веществ на пластине;
- 2) установление (подбор) оптимальных значений R_f ;
- 3) регулирование селективности сорбции L , т.е. отношение коэффициентов распределения двух веществ (K_1/K_2):

$$L = K_1/K_2, \quad (1)$$

Величину K принято называть “Фактором удерживания” или “коэффициентом емкости”. Этим параметром определяется отношение количества растворенного вещества, находящегося в неподвижной фазе, к количеству этого же вещества в подвижной фазе.

$$K = \frac{1 - R_f}{R_f}, \quad (2)$$

где R_f — относительная скорость перемещения компонента в тонком слое сорбента.

- 4) влияние на разделительные свойства слоя сорбента (H, N):

$$H = \frac{\sigma_x^2}{Z_x}, \quad (3)$$

где H — высота, эквивалентная теоретической тарелке, мкм; σ_x — стандартное отклонение дисперсии пятна; Z_x — длина пути, пройденного пятном, см.

$$N = \frac{Z_f - Z_0}{H}, \quad (4)$$

где Z_0 — расстояние от линии погружения до стартовой линии, см, Z_f — путь, пройденный фронтом растворителя, см, N — число теоретических тарелок.

Обычно в методе жидкостной адсорбционной хроматографии используются полярные неподвижные фазы (НФ) в сочетании с неводными подвижными фазами (ПФ). Типичным сорбентом является силикагель. Элюирующая система — это, как правило, смесь растворителей, состоящая из неполярного носителя, в который для регулирования элюирующей силы и селективности вводят различные полярные растворители. В варианте ТСХ с нормальными фазами (ПФ более полярна, чем НФ) элюирующая способность растворителя возрастает по мере увеличения полярности. Следовательно, увеличивая полярность, можно повысить R_f и понизить коэффициент распределения (K). Элюирующая сила растворителя пропорциональна его полярности. Мерой полярности растворителя является параметр P . Эта величина безразмерна, она может изменяться от 2 (фторзамещенные углеводороды) до 10,2 (высокополярный растворитель — вода). Изменение полярности на 2 единицы приводит к десятикратному изменению величины K .

Полярность смеси растворителей рассчитывается по формуле

$$P_{\text{смеси}} = \sum_{i=1}^n P_i V_i, \quad (5)$$

где $P_{\text{смеси}}$ — полярность смеси растворителей;

P_i — полярность i -го компонента смеси;

V_i — объемная доля i -го компонента.

Самой распространенной элюирующей системой для разделения и анализа ФЛ является система хлороформ – метанол – вода (19,5 : 7,5 : 1,2) [3]. Однако в ее состав входит токсичный и труднодоступный растворитель — метанол. Поэтому нами была проведена работа по замене растворителя на более приемлемый без нарушения элюирующей силы всей системы.

Было исследовано пять типов систем (табл. 1), причем соотношения растворителей подбирались таким образом, чтобы полярность системы приблизительно равнялась 5.

Элюенты готовили смешиванием компонентов в указанных соотношениях (табл. 1) непосредственно перед употреблением. В процессе приготовления смешанных элюентов необходимо обратить внимание на точную дозировку компонентов, поскольку даже небольшие изменения состава смеси могут привести к изменению величины R_f [2].

Таблица 1
Полярность различных элюирующих систем, используемых для разделения ФЛ

Система	Состав системы	Соотношение растворителей	Полярность (по формуле 5)
I	Хлороформ – метанол	19,5 : 7,5	5,02
II	Хлороформ – этанол	19,5 : 7,5	4,62
III	Бутанол – уксусная кислота – вода	4 : 1 : 5	5,8
IV	Ацетонитрил – этанол	4 : 1	5,01
V	Хлороформ – ацетон – метанол – уксусная кислота – вода	5 : 2 : 1 : 1 : 0,5	5,23

Согласно литературным данным [3] полярные липиды (ФЛ, сфинколипиды и гликолипиды) достаточно хорошо разделяются на силикагелевых пластинах. Силанольные группы, формирующие центры адсорбции, имеют кислотный протон ($pK_a = 3$) и основной атом кислорода. Эти центры могут взаимодействовать с анализируемыми веществами, являющимися донорами или акцепторами протонов за счет образования водородных связей. Нами была проведена работа по сравнению двух типов пластин для ТСХ с закрепленным слоем силикагеля (Silufol и Sorbfil) при одномерном элюировании. Характеристики пластин представлены в табл. 2.

Лучшее разделение и качество зон было получено на пластинах Sorbfil. Следует отметить, что пластины марки Silufol с УФ-добавкой пригодны только для обнаружения ФЛ с помощью реагента Родамин-6Ж в УФ-свете. Остальные реагенты, используемые для обнаружения ФЛ на этом типе пластин, не работают.

Анализ аминоксодержащих ФЛ (фосфатидилсерин и фосфатидилэтанолламин) рекомендуется проводить на пластинах, которые предварительно промываются в ацетоне и активируются в термостате при 100°C в течение 20 – 30 мин. Эта подготовка позволяет улучшить разделение и повысить предел обнаружения ФЛ.

Следует учитывать, что на немодифицированном силикагеле для некоторых ФЛ наблюдается “эффект нагрузки”, т.е. величина R_f становится зависимой от количества вещества, нанесенного на пластину. Поэтому предварительно нами были установлены оптимальные объемы наносимой пробы для каждого ФЛ в зависимости от концентрации вещества (табл. 3).

В [4] было показано, что угол, под которым пластина закреплена в камере, влияет как на форму пятен,

Таблица 2
Характеристика пластин для ТСХ

№ п/п	Название пластины	Размер см × см	Связующее вещество	Подложка	Высота подъема элюента, см
1	Silufol	5 × 15	Крахмал	Алюминиевая фольга	6
2	Sorbfil	10 × 10	Силиказоль	ПЭТФ	6 – 7

Таблица 3
Зависимость объема наносимой пробы ФЛ от концентрации

Название анализируемого объекта	Объем наносимой пробы, мкл	Концентрация раствора, мг/мл
Фосфатидилхолин (ФХ)	5	11,86
	10	3,28
	20	1,64
Лецитин (Л)	5	12,5
	10	9,82
	20	4,9
Фосфатинозитол (ФИ)	5	5,17
	10	3
	20	1,2

так и на скорость разделения. Если пластина наклонена слоем сорбента назад, то скорость проявления возрастает, однако пятна становятся более размытыми. Если наклонить пластину слоем сорбента вперед, скорость проявления также возрастает, однако пятна в этом случае более четкие. Авторы цитируемой работы рекомендуют в качестве оптимального угол между слоем сорбента и поверхностью растворителя в 45°. В качестве реагентов для обнаружения пятен ФЛ нами были использованы:

- 1) 0,0012-процентный раствор Родамина-6Ж;
- 2) 5 % спиртовой раствор фосфорномолибденовой кислоты (ФМК);
- 3) реагент Драгендорфа (смесь растворов основного нитрата висмута в 20 % уксусной кислоте и 40 % раствор йодистого калия).

В описанных выше условиях были прохроматографированы стандартные растворы ФХ, Л и ФИ в элюирующих системах, приведенных в табл. 1.

На хроматограммах для каждой элюирующей системы были рассчитаны величины R_f , K (2), H (3), N (4) (табл. 4).

Из данных табл. 4 следует, что самые высокие величины ЧТТ, а, следовательно, наибольшая эффектив-

Таблица 4
Величины R_f , K , H и N для ФЛ по данным ТСХ

Элюирующая система	Вещество	R_f	H , Мкм	$N \cdot 10^{-3}$	K
I	ФХ	0,15	2,1	3,8	5,6
	Л	0,30	2,2	3,5	2,3
	ФИ	0,08	0,4	19,5	11,5
II	ФХ	0,07	2,0	3,8	13,3
	Л	0,10	3,2	2,4	9
	ФИ	0,16	4,0	1,9	5,2
III	ФХ	0,34	0,9	7,1	1,9
	Л	0,27	0,7	9,0	2,7
	ФИ	0,89	0,04	15,7	0,12
IV	ФХ	0,05	0,9	8,7	19,0
	Л	0,78	1,7	4,5	0,28
	ФИ	0,65	0,1	7,8	0,54
V	ФХ	0,39	1,1	7,8	1,6
	Л	0,35	1,3	6,6	1,8
	ФИ	0,64	0,9	9,5	0,56

Таблица 5

Изменение селективности за счет эффектов локализации

Элюирующая система	K_1 (ФХ)	K_2 (Л)	K_3 (ФИ)	K_1/K_2	K_2/K_3	K_1/K_3
I	5,6	2,3	11,5	2,4	0,2	0,48
II	13,3	9	5,2	1,5	1,7	2,5
III	1,9	2,7	0,12	0,7	22,5	12,66
IV	19,0	0,28	0,54	7,8	0,5	36,6
V	1,6	1,8	0,56	0,8	3,2	2,8

ность для всех трех разделяемых ФЛ наблюдается в системе III, а наименьшая эффективность — в системах I и II.

Ф. Гесс [2] обращает внимание на тот факт, что применительно к ТСХ величины N и N' могут быть не сопоставимы с аналогичными параметрами, используемыми для описания процессов в ГЖХ или ЖХ, поскольку условия определения этих параметров различны.

В системе IV, хотя величина N имеет большее значение, чем в I и II, качество зон на хроматограммах значительно хуже, и, следовательно, затруднена их обработка. Лучшее качество зон было получено в системах I и II.

В табл. 5 представлены данные по влиянию эффектов локализации растворителя для различных элюирующих систем.

Как видно из данных табл. 5, лецитин удерживается в системе II, а ФХ — в системах I, II, и IV. Трудно осуществимое разделение ФХ и Л в системах растворителей III и V ($K_1/K_2 < 1$) становится реальным в системах I и IV. Таким образом, для улучшения разделения и качества зон наилучшими элюирующими системами являются I, III и IV.

Для улучшения разделения и повышения разделяющей способности более выгодно оптимизировать ПФ и в меньшей степени уделять внимание оптимизации сорбента.

В результате проведенного исследования были выбраны и обоснованы условия хроматографического разделения фосфолипидов в тонком слое сорбента.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. А. Василенко, Ю. М. Краснополский, А. Е. Степанов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **32**(5), 9 – 15 (1998).
2. Ф. Гейсс, *Основы тонкослойной хроматографии*, Т. 1, Мир, Москва (2000).
3. Ю. Кирхнер, *Тонкослойная хроматография*, Т. 1, 2, Мир, Москва (1981).
4. D. C. Abbot, H. Egan, E. W. Hammond, J. Thomson, *Analyst*, **89**, 480 (1964).

Поступила 30.10.01