

В. Д. Цыдендамбаев, В. П. Пчелкин, А. Г. Верещагин

## ПРЕПАРАТИВНАЯ ПРОТОЧНАЯ ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ДИГЛИЦЕРИДОВ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ БИОМЕМБРАН

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва

Для проведения препаративного разделения позиционных изомеров диглицеридов (ДГ) в слое силикагеля испытана проточная камера горизонтальной конструкции. С целью определения точного времени наступления динамического равновесия между твердой, жидкой и газовой фазами в данной камере использовали органические красители. Установлено, что для создания этого равновесия поток хлороформа необходимо пропускать через слой адсорбента около 4 ч. В стабилизированном таким путем слое фракционировали смесь *rac*-1,3- и *rac*-1,2-ДГ (17,65 мг), которую получали переэтерификацией триглицеридов растительных масел и переносили на слой носителя стартовой концентрирующей зоны пластинки с помощью узла ввода пробы. Выход этой смеси после выделения с адсорбента составил  $16,88 \pm 0,77$  мг ( $95,6 \pm 4,4$  %), а соотношение между *rac*-1,3- и *rac*-1,2-ДГ было равно  $0,76 \pm 0,02$ .

Тонкослойная хроматография (ТХС) на протяжении многих лет служит одним из главных аналитических методов для разделения смесей очень многих БАВ природного происхождения [1]. Однако недостаточно стабильные условия ТХС-анализа органических соединений часто не позволяют обеспечить удовлетворительную воспроизводимость его результатов.

Для преодоления этих недостатков была разработана квазиколоночная ТХС, представляющая собой планарный вариант жидкостной хроматографии (ЖХ), в котором гидродинамические характеристики потока элюента, протекающего сквозь слой адсорбента практически в горизонтальной плоскости, не совпадают с параметрами, наблюдаемыми в случае колоночной ЖХ [2]. Тем не менее, в квазиколоночной ТХС, как и в колоночной ЖХ, стабильность скорости движения подвижной фазы по слою адсорбента в ходе разделения позволяет получать воспроизводимые результаты.

Равновесные условия в разделительных камерах для квазиколоночной ТХС и однородный состав многокомпонентной подвижной фазы на всех участках слоя адсорбента позволили свести к минимуму эффект ее демиксинга при миграции этой фазы по слою [3–5]. В опытах с открытой плоской колонкой (ТХС-пластинкой) в условиях динамического равновесия между жидкой и газовой фазами воздействие предварительной адсорбции подвижной фазы на конечный результат разделения компонентов смеси было исключено, что позволило проводить элюирование последних независимо от влажности воздуха лабораторного помещения. Такой планарный вариант относится к перспективным методам ЖХ и располагает широкими аналитическими возможностями [3, 6].

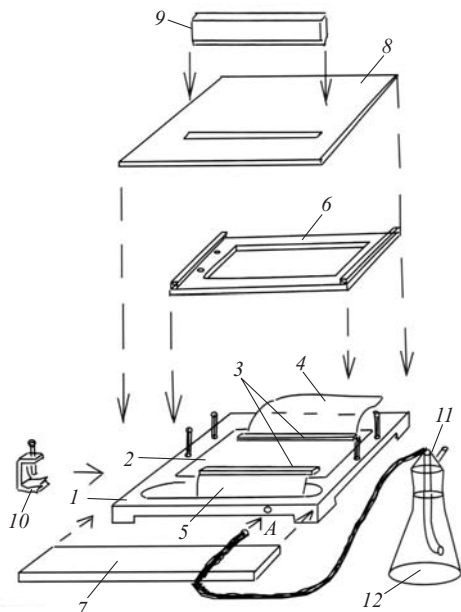
Известно, что проточную ТХС проводят в горизонтальном или восходящем направлениях, а также в нисходящем варианте ТХС на пластинах с незакрепленным слоем адсорбента [7]. Метод проточной ТХС в вертикальном направлении позволил достичь значительного “увеличения пробега” пробы благодаря испарению подвижной фазы с верхнего края пластинки [8].

При использовании данного метода заметно возрастает эффективность и селективность разделения компонентов пробы.

Сочетание квазиколоночной ТХС с проточной ТХС объединяет в себе большинство преимуществ и аналитических возможностей планарного и колоночного вариантов ЖХ-разделения смеси и позволяет такому сочетанию занимать промежуточное положение между традиционной ТХС и колоночной ЖХ [9]. Проведение квазиколоночной проточной ТХС обеспечивает постоянный расход подвижной фазы в единицу времени, т. е. равномерную скорость ее протекания в тонком слое адсорбента, подобно тому, как это имеет место в ЖХ-колонке. Для этого сочетания также характерно более простое оборудование, чем для колоночной ЖХ. Вместе с тем, как и в случае последней, сохраняется возможность переходить от одного элюента к другому на одной и той же пластинке. Новые конструкции разделительных камер позволяют проводить квазиколоночный проточный ТХС-анализ в условиях, близких к условиям колоночной ЖХ [10–13].

Целью настоящей работы было испытание возможностей квазиколоночной проточной ТХС для выделения в препаративном масштабе 1,2-диглицеридов (ДГ) высших жирных кислот — основы гидрофобного матрикса биомембран, промежуточного продукта биосинтеза триглицеридов (ТГ) всех растительных масел [14].

Для этого были использованы установка, сконструированная на основе предложенного ранее принципа [6], а также пластинка, содержащая два участка слоя, которые резко различались между собой по своим хроматографическим свойствам. Ее стартовый участок представлял собой неадсорбирующую концентрирующую зону носителя (кизельгур, закрепленный крахмальным гелем по оригинальной рецептуре), а рабочий — слой силикагеля, содержащий борную кислоту, которая внесена для дополнительного увеличения селективности разделения *rac*-1,2- и *rac*-1,3-ДГ [15]. Конструкцией установки предусмотрены: предварительная стабилизация слоя адсорбента, а также последующее



Прибор для квазиколонной проточной ТСХ: 1 – станина из фторопласта (250 × 200 × 25 мм), снабженная углублением для пластинки размером 200 × 200 × 1 мм и кюветой для подвижной фазы размером 190 × 30 × 20 мм. В отверстие А этой кюветы вставлена втулка из фторопласта (длиной 20 мм и наружным диаметром 10 мм), на которую насажена трубка из силиконового каучука (длиной 30 см и внутренним диаметром 5 мм). Другой конец этой трубки пропущен через пробку НШ-29 с отводной трубкой в колбу НШ-29 емкостью 300 мл, содержащую 150 мл хлороформа; 2 – стеклянная пластинка 200 × 200 × 2 мм; 3 – алюминиевые стержни размером 200 × 15 × 5 мм; 4 – приемная полоса обезжиренной фильтровальной бумаги 5 × 20 см; 5 – подающая полоса обезжиренной фильтровальной бумаги 7 × 18 см; 6 – алюминиевая рамка внешними размерами 250 × 235 × 5 мм и внутренним размером 200 × 200 × 5 мм с прикрепленными к ней и обращенными вверх алюминиевыми брусками размером 225 × 10 × 12 мм, а также четырьмя отверстиями, предназначенными для закрепления ее на стержнях станины 1; 7 – алюминиевая крышка кюветы 200 × 50 × 5 мм; 8 – алюминиевая верхняя крышка прибора размером 230 × 290 × 5 мм, имеющая щель размером 195 × 5 × 5 мм для помещения в ней алюминиевого бруска 9; 9 – алюминиевый брусок 190 × 25 × 5 мм, который перемещается в щели крышки 8 в вертикальной плоскости и служит для переноса пробы со своего нижнего торца на пластинку 2; 10 – одна из четырех стальных накладных скоб с винтовыми зажимами; 11 – пробка НШ-29 с отводной трубкой; 12 – колба НШ-29 емкостью 300 мл, содержащая 150 мл хлороформа

нанесение слоя ДГ и красителей на концентрирующую зону пластинки посредством модифицированного узла ввода пробы, который представляет собой алюминиевый брусок, имеющий в качестве нижнего рабочего торца неполированную поверхность со скошенными краями.

### Экспериментальная часть

Анализ жирнокислотного состава ДГ проводили в изотермическом режиме при 180 °С путем ГЖХ метиловых эфиров жирных кислот [16, 17] на 1,5-м набивной стеклянной колонке, наполненной частицами Inertion Super размером 160 – 200 мкм (“Chemapol”, Чехия) с 10 % жидкой фазы Silar 5CP (“Serva”, ФРГ) и уста-

новленной в приборе фирмы “Pye Unecam” (Великобритания), с электронным интегратором ИЦ-26 (“Изотимпекс”, Болгария). Скорость газа-носителя (аргона) – 10 мл/мин. Содержание ДГ в пробах рассчитывали методом внутреннего стандарта, используя в его качестве маргариновую кислоту (“Serva”, ФРГ); ацилсодержащие липиды превращали в метиловые эфиры жирных кислот в результате метанолиза [16].

В начальных опытах по количественному определению массы ДГ был взят синтетический препарат *rac*-1,3-стеароилпальмитоилглицерина, который был предоставлен кафедрой химической технологии тонких органических соединений Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова. В диапазоне отношений проба/стандарт по массе от 5 до 50 выход массы этого препарата после ГЖХ в наших опытах варьировал от 100,3 до 108,8 % ( $n = 8$ , табл. 1).

Модельную смесь *rac*-1,3- и *rac*-1,2-ДГ, которая была взята для наших дальнейших опытов и включала остатки пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислот в эквимолярном отношении, получали в ходе каталитической переэтерификации 10 г (11,5 мМ) сложной композиции ТГ с 1,3 г (0,3 мМ) глицерина (глицеролиза), а также в результате последующей хроматографии образовавшихся продуктов реакции на колонке с силикагелем (“M. Woelm”, Германия), используя в качестве элюентов бензол и диэтиловый эфир. Процесс глицеролиза композиции, составленной из масел плодов какао (*Theobroma cacao*), семян мака (*Papaver orientale*) и льна (*Linum usitatissimum*), проходил при 200 °С в течение 4 ч в присутствии 0,1 % гидроксида натрия [14].

Для приготовления концентрирующей зоны картофельный крахмал (0,2 г) перемешивали с 15 мл воды при 45 °С, а затем — с 30 мл кипящей воды; после образования геля добавляли 1 мл ацетона, 6 г силанизированного кизельгура (Хроматон марки N, ДМДХС, “Chemapol”, Чехия) и снова перемешивали.

Для нанесения слоев адсорбента и носителя пять стеклянных пластинок (200 × 200 × 2 мм) устанавливали на автоматическом аппликаторе слоя SSG-1 (“VEB Technisches Glass”, Германия). В главное отделение емкости с перегородкой (для адсорбента) помещали 150 мл суспензии 54 г силикагеля (марки LSL, “Chemapol”, Чехия) в насыщенном водном растворе борной кислоты [15], а в малое отделение — 50 мл суспензии носителя (для концентрирующей зоны). Пластины покрывали смежными слоями адсорбента и носителя (170 × 200 и 30 × 200 мм, соответственно). При этом величина просвета емкости с перегородкой аппликатора составляла 0,5 мм.

После нанесения слоев пластинку выдерживали в течение ночи до высыхания слоев и перенесли в прибор для квазиколонной проточной препаративной ТСХ (рис. 1). Затем регулировали положение колбы 12 относительно кюветы (станина 1), половину объема которой (150 мл) заполняли хлороформом, кювету накрывали крышкой 7, а крышку 7 и рамку 6 — крыш-

кой 8. Для изоляции слоя адсорбента от атмосферы крышку 8 плотно прижимали к станине 1 с помощью четырех накидных винтовых зажимов 10, укрепленных по бокам этой крышки.

Для установления минимального времени, необходимого для создания динамического равновесия между адсорбентом, подвижной фазой и свободным пространством камеры, использовали красители — судан Ж и 2,4-динитрофенол. По 10 мкл их 0,2 % растворов в бензоле наносили на левый и правый изолированные боковые участки нижнего торца бруска 9, который помещали в крышку 8 и закрепляли там так, чтобы этот торец находился на расстоянии 2 мм от слоя пластинки 2, помещаемой на станину 1 (рис. 1). Пластинку 2 переносили в углубление станины 1. На боковые края этой пластинки с адсорбентом и концентрирующей зоной помещали полосы бумаги 4 и 5, соответственно, таким образом, чтобы один из продольных краев полосы 5 был погружен в кювету станины 1. Бруску 3 переносили на края полос 4 и 5, контактировавших с пластинкой 2, а рамку 6 — на бруски 3.

В момент герметизации камеры регистрировали относительную влажность воздуха в рабочем помещении лаборатории. При поиске оптимальных условий разделения в различные дни проведения эксперимента, отличавшиеся между собой по температуре и относительной влажности воздуха, пластинку 2 выдерживали в приборе в течение 1, 2 или 4 ч. По истечении этого времени брусок 9 помещали в концентрирующую зону пластинки 2 и выдерживали ее в приборе еще 2 ч. По окончании опыта и разборки прибора измеряли расстояния, пройденные красителями по пластинке 2 ( $5 \pm 1$  см).

Для препаративного разделения использовали 17,65 мг препарата *rac*-1,2- и *rac*-1,3-изомеров ДГ в бензоле. Их раствор (0,5 мл) количественно наносили порциями на середину “рабочего” торца бруска 9, а на левый и правый края того же торца — два разных красителя, служивших как для подтверждения самого факта количественного переноса ДГ на концентрирующую зону, так и в качестве дополнительных ориен-

тиров относительной подвижности зон липидов после фракционирования последних (см. выше). Затем брусок 9 переворачивали на  $180^\circ$ , вставляли его в сквозное отверстие крышки 8 и закрепляли в верхнем положении. Через 4 ч опусканием бруска 9 вниз до упора препарат ДГ вместе с красителями переносили на пластинку 2 и поддерживали ток хлороформа в системе в течение еще 2 ч.

После окончания разделения и разборки установки пластинку опрыскивали 0,001 % водным раствором родамина 6Ж. Зоны, соответствовавшие *rac*-1,2- и *rac*-1,3-изомерам ДГ, обнаруживали в УФ-свете ( $\lambda = 254$  нм). Каждый изомер ДГ элюировали с адсорбента в экстракторе смесью хлороформа, метанола и триметилбората (2:1:0,1 по объему) в течение 1 ч [15]. Растворитель полностью отгоняли в вакууме. Остаток растворяли в бензоле. Бензольные растворы препаратов ДГ хранили на холоде.

Чистоту *rac*-1,2- и *rac*-1,3-ДГ контролировали с помощью аналитической ТСХ на пластинках с постоянным слоем адсорбента [18]. Для этой цели по 100 мкг *rac*-1,2- и *rac*-1,3-изомеров ДГ каждого и 0,5 мкг ТГ растительного происхождения, предварительно очищенных на оксиде алюминия, наносили в отдельные точки на одну и ту же пластинку, а затем разделяли и обнаруживали, как описано ранее [14].

#### Результаты и их обсуждение

В проточной ТСХ непрерывность потока подвижной фазы через адсорбент достигается удалением этой фазы с дистального участка тонкого слоя, находящегося в контакте с каким-либо пористым материалом [1, 3]. В наших опытах таким материалом служила фильтровальная бумага, промытая ацетоном в течение ночи в камере для вертикальной ТСХ.

Таблица 1  
Определение массы *rac*-1,3-стеароилпальмитоилглицерина по данным разделения метиловых эфиров жирных кислот препаратов методом ГЖХ

№ опыта	Масса, мкг			Получено, % от исходной массы препарата ДГ
	исходного препарата ДГ	внутреннего стандарта жирной кислоты	препарата ДГ по данным анализа	
1	3087,5	601,616	3318,7	107,5
2	3087,5	300,808	3096,8	100,3
3	3087,5	200,539	3178,0	102,9
4	3087,5	150,404	3291,3	106,6
5	3087,5	120,323	3247,4	105,2
6	3087,5	100,269	3359,2	108,8
7	3087,5	75,202	3195,6	103,5
8	3087,5	60,162	3167,8	102,6

Таблица 2  
Определение масс *rac*-1,3- и *rac*-1,2-диглицеридов в их модельной смеси после квазиколонной проточной ТСХ по данным ГЖХ

№ опыта	Масса исходной смеси ДГ, мг, нанесенной на пластинку	Позиционные изомеры ДГ	Масса ДГ, мг, элюированных с пластинки <sup>а)</sup>	Содержание позиционных изомеров ДГ, элюированных с пластинки, % от массы исходной смеси ДГ <sup>б)</sup>
1	17,65	<i>rac</i> -1,3-	7,75	43,9
		<i>rac</i> -1,2-	9,91	56,1
		Сумма	17,66 (100,0)	(0,78)
2	17,65	<i>rac</i> -1,3-	6,87	38,9
		<i>rac</i> -1,2-	9,24	52,3
		Сумма	16,11 (91,2)	(0,74)
3	17,65	<i>rac</i> -1,3-	7,31	41,4
		<i>rac</i> -1,2-	9,57	54,2
		Сумма	16,88 (95,6)	(0,76)

<sup>а)</sup> Числа в скобках — выход исходной смеси ДГ (%).

<sup>б)</sup> Числа в скобках — соотношения между изомерами по массе.

Расстояния, пройденные красителями, заметно изменялись в зависимости от влажности воздуха в момент герметизации камеры. В диапазоне влажности воздуха от 40 до 70 % постоянную подвижность красителей, составляющую для судана Ж и 2,4-динитрофенола  $5 \pm 1$  см, наблюдали только по истечении 4 ч после пропускания потока хлороформа по пластинке, т.е. того промежутка времени, который был необходим для достижения динамического равновесия.

После достижения такого равновесия между слоем твердой, жидкой и газовой фазами образец ДГ количественно переносили на концентрирующую зону пластинки с помощью узла ввода пробы. К моменту наступления этого равновесия на рабочем участке пластинки, использованной в наших опытах для разделения ДГ, было гарантировано отсутствие зоны адсорбента, не пропитанного подвижной фазой.

Данные разделения модельной смеси *rac*-1,3- и *rac*-1,2-ДГ приведены в табл. 2. Общий выход модельной смеси по массе после проведения квазиколонной проточной ТСХ в различных опытах варьировал от 91,2 до 100,0 %, при этом соотношении между *rac*-1,3- и *rac*-1,2-ДГ составило  $0,76 \pm 0,02$ .

В результате совместного аналитического фракционирования 0,5 мкг ТГ и 100 мкг аликвот выделенных препаратов *rac*-1,2- и *rac*-1,3-ДГ, которое было выполнено в тонком слое силикагеля на пластинке с постоянным слоем адсорбента, было обнаружено, что эти изомеры представлены индивидуальными зонами и заметно отличались между собой по хроматографической подвижности. Был сделан вывод, что полученные препараты *rac*-1,2- и *rac*-1,3-ДГ были хроматографически чистыми ( $\geq 99,5$  %).

Таким образом, использование квазиколонной проточной ТСХ обеспечило удовлетворительный результат при фракционировании в наших опытах смеси изомеров ДГ.

Можно предполагать, что описанный метод может быть использован для выделения в препаративном масштабе не только ДГ, но и других БАВ природного происхождения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. Г. Березкин, А. С. Бочков, *Количественная тонкослойная хроматография*, Наука, Москва (1980).
2. В. В. Помазанов, А. М. Алымов, К. И. Сакодынский, *Развитие методов аналитической хроматографии*, НИФХИ, Москва (1979), сс. 87 – 90.
3. А. М. Воронцов, А. С. Канев, О. А. Рысьев, В. Н. Чечевичкин, *Журн. физ. химии*, **54**(9), 2385 – 2388 (1980).
4. T. Wawrzynowicz and E. Soczewinski, *J. Chromatogr.*, **169**, 191 – 203 (1979).
5. А. В. Жуков, Э. И. Кузнецова, А. Г. Верещагин, *Журн. аналит. химии*, **44**(8), 1439 – 1440 (1989).
6. В. Г. Березкин, А. С. Бочков, А. С. № 752165 (1980).
7. А. С. Бочков, А. С. Лезин, Г. Г. Павлушков и др., *Измерения, контроль, автоматизация*, **5**(39), 36 – 42 (1981).
8. Л. В. Андреев, К. А. Кошечко, *Журн. аналит. химии*, **31**(2), 343 – 348 (1976).
9. E. Soczewinski and K. Czapinska, *J. Chromatogr.*, **168**, 230 – 233 (1979).
10. E. Tyihak, E. Mincsovics, and H. Kalasz, *J. Chromatogr.*, **174**, 75 – 81 (1979).
11. А. В. Каргаполов, *Биохимия*, **46**(4), 691 – 698 (1981).
12. T. H. Dzido and E. Soczewinski, *J. Chromatogr.*, **516**, 461 – 466 (1990).
13. P. Buncak, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **318**, 289 – 292 (1984).
14. В. П. Пчелкин, А. Г. Верещагин, *Приклад. биохим. микробиол.*, **15**(5), 764 – 768 (1979).
15. В. П. Пчелкин, А. Г. Верещагин, *Приклад. биохим. микробиол.*, **24**(6), 809 – 815 (1988).
16. А. В. Zhukov and V. P. Pchelkin, *J. Chromatogr.*, **132**, 543 – 547 (1977).
17. В. П. Пчелкин, *Журн. аналит. химии*, **48**(9), 1442 – 1449 (1993).
18. В. Д. Цыдендамбаев, А. В. Жуков, А. Г. Верещагин, *Физиол. растений*, **24**(2), 437 – 443 (1977).

Поступила 09.03.06

## PREPARATIVE FIELD-FLOW THIN LAYER CHROMATOGRAPHY OF DIACYLGLYCERIDES CONTAINED IN HIGHER FATTY ACIDS OF BIOLOGICAL MEMBRANES

V. D. Tsydendambaev, V. P. Pchelkin, and A. G. Vereshchagin

Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

A horizontal field-flow chamber for preparative thin layer separation of diacylglycerid positional isomers has been designed, constructed, and tested. Two organic dyes were used for determining the real time of a dynamic equilibrium onset between solid, liquid, and gas phases in the given chromatographic system. It is found that a continuous flow of chloroform must be passed through a silica gel layer during four hours for the establishment of this equilibrium. After this stabilization, a sample of the model mixture of *rac*-1,3- and *rac*-1,2-diacylglycerides (17.65 mg) obtained by continuous transesterification of plant oil triacylglycerides was into a start zone of a preparative plate, and fractionated in the stabilized layer. The total weight recovery of the mixture after its isolation from the adsorbent layer was  $16,88 \pm 0,77$  mg ( $95.6 \pm 4.4\%$ ) and the ratio of *rac*-1,3- to *rac*-1,2-diacylglycerides was  $0.76 \pm 0.02$ .