



УДК 577.115.083:543.544.42

ПРИМЕНЕНИЕ ПЛАСТИНОК СО СЛОЕМ  
МИКРОФРАКЦИОНИРОВАННОГО СИЛИКАГЕЛЯ,  
ЗАКРЕПЛЕННОГО ЗОЛЕМ КРЕМНЕВОЙ КИСЛОТЫ,  
ДЛЯ АНАЛИЗА ЛИПИДОВ

*Беленький В. Г., Ганкина Э. С., Литвинова Л. С.,  
Ефимова И. И.*

*Институт высокомолекулярных соединений Академии наук СССР, Ленинград*

*Васьковский В. Е., Хотимченко С. В.,  
Дикарев В. П.*

*Институт биологии моря ДВНЦ Академии наук СССР, Владивосток*

Для высокоэффективной ТСХ разработан метод получения пластин со слоем микрофракционированного силикагеля, прочно закрепленного на стеклянной подложке связующим составом на основе золя кремневой кислоты. Полученные пластины механически прочны, позволяют проводить последовательное опрыскивание пятью-шести реагентами для обнаружения разных классов липидов, их можно многократно (до 10–15 раз) регенерировать агрессивными реагентами (горячей хромовой смесью, концентрированными минеральными кислотами). Подвижность веществ на разработанных пластинах соответствует их подвижности на обычных силикагелевых пластинах. Регулируемая прочность слоя допускает извлечение силикагеля для экстракции веществ из хроматографической зоны. Эти пластины обладают рядом преимуществ при ТСХ нейтральных и полярных липидов по сравнению с обычно используемыми микропластинками со слоем силикагеля с гипсом и высокоэффективными пластинами типа ПРТLC-Alufolien фирмы Merck.

Высокоэффективная тонкослойная хроматография [1] (ВЭТСХ) занимает видное место среди других хроматографических методов. Наиболее эффективно ее применение в массовом анализе однотипных проб с количественной оценкой ограниченного числа компонентов. При качественных исследованиях (идентификация компонентов в пробе) как в биоорганической химии, так и в других разделах химии роль ВЭТСХ еще больше повышается. Особенности ВЭТСХ обуславливают легкость проведения адсорбционной и двухмерной хроматографии при невысоких требованиях к качеству адсорбента, чистоте пробы и элюента с возможностью выявления всех компонентов пробы, в том числе и необратимо сорбирующихся.

ВЭТСХ представляет собой современный этап развития ТСХ. Использование частиц адсорбента оптимального размера, как это было показано нами ранее [2], позволяет увеличить скорость анализа примерно в 10 раз и повысить чувствительность определения компонентов в пробе примерно в 100 раз [3, 4]. Проведение ВЭТСХ в кондиционированных условиях (стандартизованные пластины, камеры со стабилизацией газовой фазы) позволяет резко повысить воспроизводимость ВЭТСХ, доведя ее до уровня воспроизводимости колоночной хроматографии.

Двухмерное разделение, которое особенно легко реализуется в ТСХ, позволяет довести пиковую емкость метода до многих десятков компонентов. В ВЭТСХ расход элюента и адсорбента существенно сокращается благодаря применению камер сэндвич-конфигурации, пластинок уменьшенного размера и их многократного использования.

Основными требованиями к силикагелевым адсорбентам для ВЭТСХ являются узкое фракционирование частиц (диаметр 5–10 мкм), размер пор не менее 100–120 Å и их объем не менее 1 мл/г [1–3].

Хотя связующее и подложка — вспомогательные элементы ТСХ-пластин, тем не менее они должны иметь комплекс свойств, обеспечивающих

эффективное функционирование адсорбента в хроматографическом слое. Они должны придавать ему химическую стойкость, механическую прочность, обеспечивать оптическое пропускание слоя, не флуоресцировать, не влиять на подвижность разделяемых соединений и обеспечивать возможность извлечения адсорбента из хроматографической зоны для экстрагирования вещества. Идеальным связующим является такое, которое химически родственно адсорбенту, а подложка должна быть инертна. Стеклопластиковая пластинка в качестве подложки и устойчивый золь кремневой кислоты (силиказоль) в качестве связующего, превращающийся при нагревании в силикагель, пористость которого можно регулировать [5], обладают этими свойствами. Стекло, как и силикагель, выдерживает обработку агрессивными реагентами, а область пропускания стекла обеспечивает прозрачность хроматографической пластины при  $\lambda > 300$  нм, что удовлетворяет задаче денситометрического анализа многих соединений. Применение в качестве связующего силиказоля позволяет получать механически прочные и химически стойкие пластины. Последнее дает возможность пропитывать пластины любыми растворами, проводить последовательное детектирование пятью-семью реагентами с использованием концентрированных минеральных кислот при нагревании, регенерировать пластины для их многократного использования и очищать слои силикагеля от механических и органических загрязнений обработкой горячей хромовой смесью с последующей отмывкой водой.

В литературе описан еще один тип химически стойкого связующего для силикагелевых пластинок — легкоплавкое стекло, которое применяется для закрепления силикагеля на стеклянной подложке в так называемых прокаливаемых (англ. *sintered*) пластинках [6, 7]. Химическая стойкость таких пластинок позволяет проводить их многократную регенерацию хромовой смесью. Однако прокаливаемые пластинки имеют ряд недостатков: 1) их связующее изменяет удерживающую способность силикагеля; 2) из них невозможно извлечь силикагель для элюирования разделенных компонентов; 3) их приготовление требует сложной технологии, связанной со спеканием слоя адсорбента на стекле, в ходе которого также может происходить частичная дегидратация силанольных групп силикагеля.

В настоящее время для ВЭТСХ наиболее широко используются пластины фирмы Merck (ФРГ), приготовленные из силикагеля с диаметром пор 60 Å и диаметром частиц 5 мкм, закрепленного с помощью органического полимерного связующего на стеклянной, алюминиевой или полимерной подложке [8]. Эти пластинки с успехом применяются для анализа многих классов веществ. Однако использование среднепористого силикагеля накладывает ограничение в применении этих пластинок для анализа высокомолекулярных соединений, а наличие органического связующего препятствует использованию химически агрессивных реагентов (сильных неорганических кислот и окислителей) и высоких температур для обнаружения зон и модифицирования сорбента.

Наши исследования были направлены на создание пластинок для ВЭТСХ, свободных от этих недостатков. С этой целью мы использовали в качестве адсорбента узкофракционированный крупнопористый силикагель КСКГ со средним диаметром пор  $\sim 120$  Å, а в качестве связующего — устойчивый золь кремневой кислоты (силиказоль) [9, 10], который при нагревании превращается в крупнопористый силикагель, что не только обеспечило возможность применения агрессивных реагентов для детектирования и модификации пластин, но и позволило их регенерировать в горячей хромовой смеси для многократного использования.

Проводилось сравнение приготовленных таким образом пластинок с разным размером частиц силикагеля КСКГ и силиказолем в качестве связующего с пластинками НРТLC-Alufolien и DC-Alufolien (Merck, ФРГ) по эффективности и возможности их использования в анализе липидов.

Влияние размера частиц на эффективность пластинок с силикагелем КСКГ показано на рис. 1: силикагель с частицами 5 и 10 мкм позволяет получать хроматограммы высокого качества с пятнами круглой формы, что свидетельствует об отсутствии влияния на размывание массопереноса

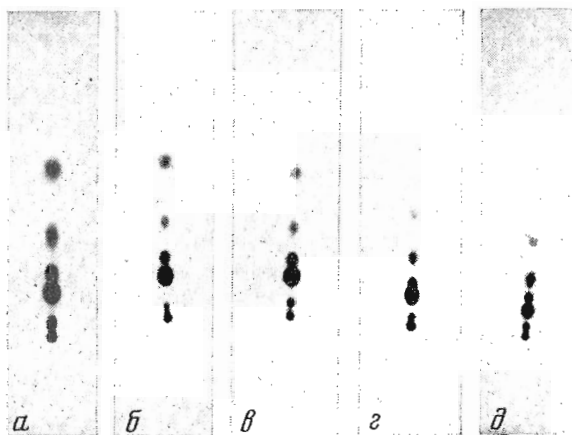


Рис. 1. ВЭТСХ тестовой смеси красителей в толуоле на пластинках с силикагелем КСКГ и силиказолем с диаметром частиц ~15 (а), 10 (б) и 5 мкм (в), а также на пластинках фирмы Merck (ФРГ) НРТLC-Alufolien (г) и DC-Alufolien (д)

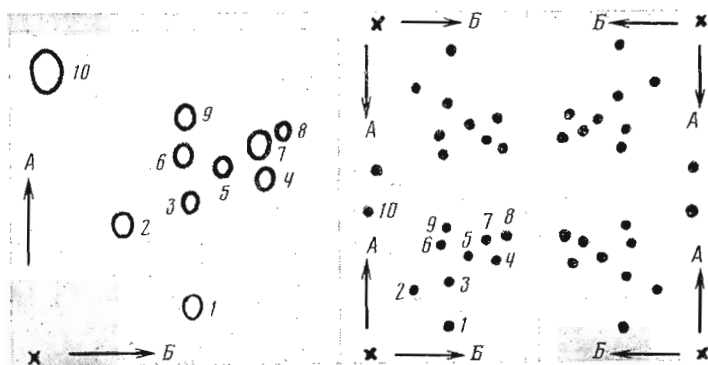


Рис. 2. Двухмерная ВЭТСХ стандартной смеси Dns-производных Pro (1), Gly (2), Tyr(Dns) (3), Leu (4), Phe (5), Ala (6), Val (7), Ile (8), Lys(Dns) (9), Dns-OH (10) на пластинке с силикагелем КСКГ и силиказолем размером 6×6 см (а) и 3×3 см (б) в элюентах: ацетон – изопропиловый спирт – 25% водный аммиак (9:7:0,5) – направление А (двукратно); хлороформ – бензиловый спирт – этилацетат – лед. уксусная кислота (6:4:5:0,2) – направление В [3].

между подвижной и стационарными фазами [41]. При использовании силикагеля с диаметром частиц 15 мкм хроматографические пятна приобретают слегка вытянутую форму. По эффективности пластинки с частицами силикагеля диаметром 15 мкм приближаются к пластинкам фирмы Merck для традиционной ТСХ (DC-Alufolien). Эффективность же пластинок с 5- и 10-мкм силикагелем соответствует эффективности ВЭТСХ-пластинок фирмы Merck.

Скорость подъема элюента по пластинке определяется средним диаметром частиц сорбента. При этом ВЭТСХ-пластинки фирмы Merck имеют скорость подъема элюента, среднюю между скоростью для пластинок с 5- и 10-мкм силикагелем КСКГ.

Эффективность разработанных нами пластинок была проверена при анализе Dns-аминокислот (см. рис. 2а) и оказалась столь высокой, что стандартную смесь удалось разделить при подъеме элюента на 3 см и получить таким образом на пластинке размером 6×6 см четыре хроматограммы (рис. 2б).

Одно из наиболее интересных свойств разработанных пластинок связано с возможностью их многократной регенерации горячей хромовой смесью с последующей промывкой водой. В этих условиях силикагель обезвоживается и подкисляется, при этом его адсорбционные свойства изменяются по отношению к сильнополярным веществам. Так, после регенера-

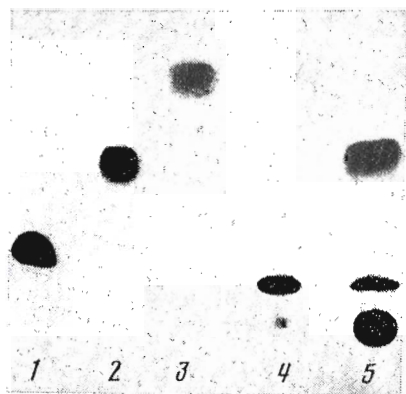


Рис. 3

Рис. 3. ВЭТСХ нейтральных липидов: стеариновая кислота (1), тристеариоилглицерин (2), метиловый эфир стеариновой кислоты (3), холестерин (4), нейтральные липиды морской травы (5). Элюент гексан – диэтиловый эфир – уксусная кислота (85:15:1) на пластинках с силикагелем КСКГ и силиказолем. Детектирование: 10% раствор серной кислоты в этаноле с последующим нагреванием при 180° С [4]

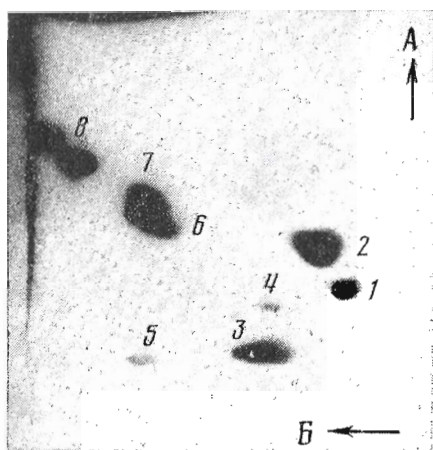


Рис. 4

Рис. 4. Двухмерная ВЭТСХ на пластинках с силикагелем КСКГ и силиказолем липидов мозга крысы: сфингомиелин (1), фосфатидилхолин (2), фосфатидилсерин (3), фосфатидилинозит (4) фосфатидовая кислота (5), сульфатиды (6), фосфатидилэтаноламин (7), цереброзиды (8). Системы растворителей [12]: хлороформ – метанол – бензол – аммиак (65:30:10:6) – направление А и хлороформ – метанол – ацетон – бензол – уксусная кислота – вода (70:30:5:10:4:1) – направление Б. Детектирование как на рис. 3

ции хромовой смесью адсорбционная активность силикагеля в отношении Dnp-аминокислот резко уменьшается. Однако она полностью восстанавливается при обработке слоя смесью ацетона с 25% аммиаком (1 : 1). Что же касается малополярных веществ, к которым относятся многие липиды, то регенерация пластин в хромовой смеси практически не приводит к изменению их подвижности. При подобной обработке слой силикагеля очищается от пылинок и органических веществ, и при последующей ТСХ с обнаружением агрессивными реагентами хроматографические зоны наблюдаются на чистом белом фоне, что особенно важно для количественных определений.

На рис. 3 и 4 показано разделение нейтральных (одномерная ВЭТСХ) и полярных (двухмерная ВЭТСХ) липидов [12] на пластинках с силикагелем КСКГ и силиказолем в качестве связующего. Величины подвижности нейтральных липидов практически не изменялись и при 15–20-кратной регенерации пластин горячей хромовой смесью с отмывкой водой (регенерация пластин длится 20–30 мин). Можно отметить, что разделение полярных липидов водорослей даже улучшалось на пластинках с силиказолем в сравнении с разделением на традиционных пластинках (рис. 5) (ср. [13]). Слой адсорбента с силиказолем не повреждался ни одним из применяемых при работе с липидами неспецифических и специфических реагентов, включая реагент на основе малахитового зеленого, который требует предварительного прокалывания пластинок, смоченных хлорной кислотой [14] (рис. 6). Это делает пластинки с силиказолевым связующим особенно удобными для исследования состава сложных смесей липидов, для чего хроматограмму необходимо последовательно обрабатывать различными реагентами, например нингидрином для обнаружения липидов со свободной аминогруппой, «молибдатным реактивом» [16] для обнаружения главных фосфолипидов и с последующим нагреванием при ~180° С для выявления всех присутствующих в смеси липидов, реактивом на основе малахитового зеленого [14] для контроля результатов, полученных с помощью «молибдатного реактива», и обнаружения фосфолипидов, присутствующих в очень малых количествах.

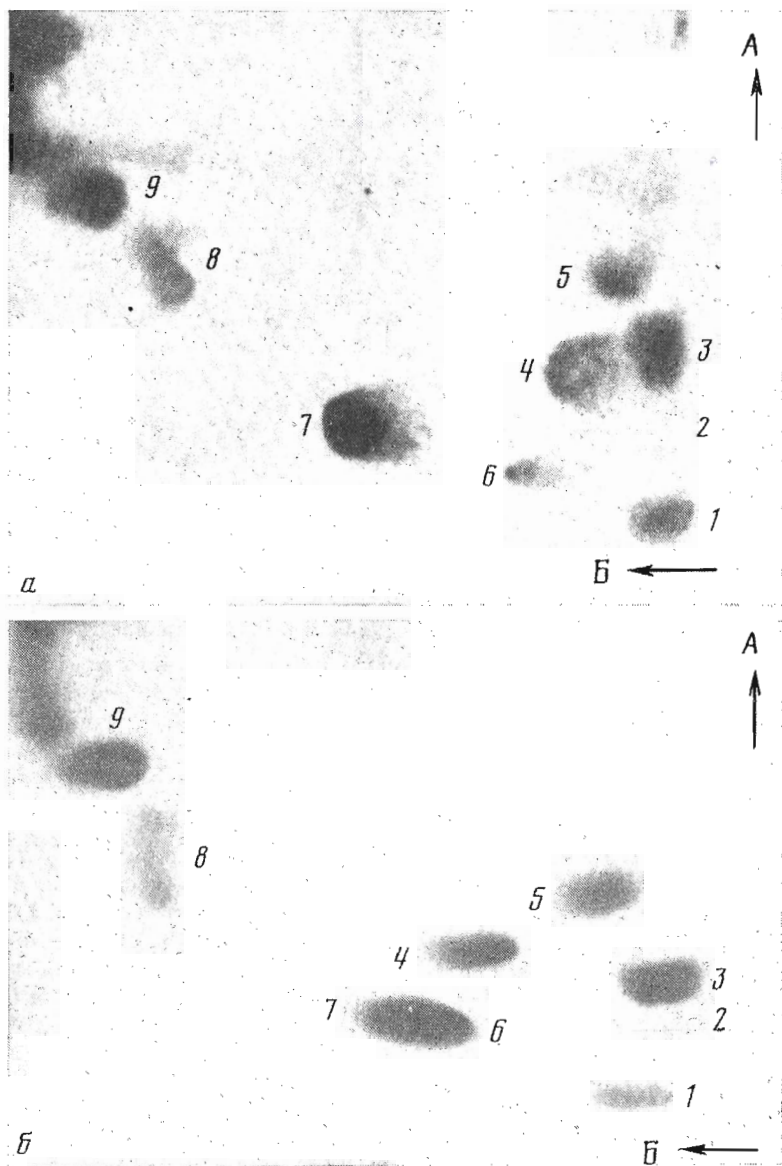


Рис. 5. Двухмерная ВЭТСХ липидов морской травы: фосфатидилинозит (1), фосфатидилсерин (2), фосфатидилхолин (3), фосфатидилглицерин (4), фосфатидилэтанол-амин (5), сульфохинозилглицерид (6), цереброзиды (7, 8), моногалактозилглицерид (9). Система растворителей [13]: хлороформ – ацетон – метанол – муравьиная кислота – вода (100 : 40 : 20 : 20 : 8) – направление А; ацетон – бензол – муравьиная кислота – вода (200 : 30 : 53 : 10) – направление Б. Пластины с силикагелем КСКГ: а – с гипсом, б – с силиказолем. Детектирование как на рис. 3

Для обнаружения липидов на пластинках с силиказолем можно успешно применять и процедуры, требующие погружения пластинок в различные реагенты с последующей отмывкой их водой, например при использовании фосфорно-молибденовой кислоты для обнаружения липидов, содержащих четвертичные аммониевые основания [17]. Разработанные пластинки удобны и для хроматографии с предварительной пропиткой адсорбента различными реагентами при погружении их в соответствующий раствор (например, см. рис. 7) [18].

Механическую прочность закрепленного силиказолем слоя можно регулировать, варьируя концентрацию силиказоля в суспензии адсорбента, что позволяет получать пластины с легко снимаемым с помощью микрошпателя силикагелем, содержащим разделенные компоненты, для их ис-

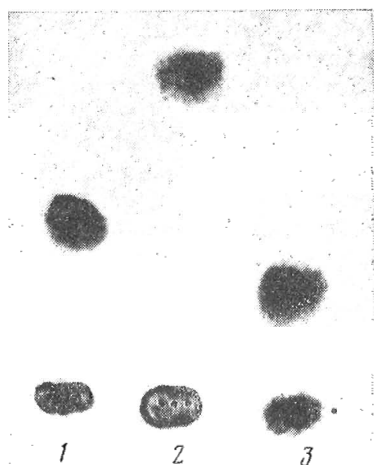


Рис. 6

Рис. 6. ВЭТСХ глицерофосфохолина (1),  $\alpha$ -глицерофосфата (2), фосфата холина (3) в элюенте метанол — вода — аммиак (5:3:1) [15]. Пластина с силикагелем КСКГ и силиказолем. Детектирование: реактив с малахитовым зеленым после разложения веществ на пластине хлорной кислотой при 200° С [14]. Окраска в стартовых зонах — неорганический фосфат



Рис. 7

Рис. 7. ВЭТСХ метиловых эфиров жирных кислот соевого масла (1), арахидоновой кислоты (2), эйкозапентаеновой кислоты (3), липидов ночесветки (4) на пластине с силикагелем КСКГ и силиказолем, пропитанной насыщенным раствором азотнокислого серебра в метаноле. Система растворителей: гексан — диэтиловый эфир — уксусная кислота (96:3:3) — двукратно [18]. Детектирование как на рис. 3

следования. Это было успешно применено для измерения радиоактивности меченых липидов и определения содержания фосфора в фосфолипидах после снятия силикагеля с пластин [16, 19].

### Экспериментальная часть

В работе использовали силикагель КСКГ отечественного производства и пластины с закрепленным слоем НРТLC-Alufolien и DC-Alufolien (Merck, ФРГ), Dns- и Dnp-производные аминокислот (Serva, ФРГ), смесь красителя для тестирования пластин (Merck, ФРГ). Растворители для хроматографии квалификации ч.д.а. использовали без дополнительной очистки. Силикат натрия — технический.

*Золь кремневой кислоты* получали аналогично описанному [5]: 114 г силиката натрия (30% SiO<sub>2</sub>, модуль 2,65—3,4) разбавляли дистиллированной водой до 1 л и, добавляя набухшую в воде катионообменную смолу в H<sup>+</sup>-форме, доводили pH раствора до 6. Смолу отфильтровывали и pH фильтрата доводили до 7,4—7,8 4 н. NaOH. 200 мл полученного фильтрата заливали в круглодонную колбу объемом 1 л и кипятили с обратным холодильником 30 мин, затем остальную часть фильтрата добавляли в кипящий раствор из капельной воронки в течение 3 ч, а затем кипятили еще 30 мин.

Полученный золь кремневой кислоты может храниться в течение года. Перед употреблением pH золя доводили до 7 и разбавляли в два раза дистиллированной водой.

*Приготовление пластин.* Суспензию из 4 г силикагеля КСКГ (фракция частиц размером 10 мкм) и 10 мл золя кремневой кислоты перемешивали 1,5—2 мин с помощью гомогенизатора и заливали в аппликатор. При ширине щели аппликатора 130 мкм получали 12—15 пластинок размером 6×6 см с толщиной слоя 130—150 мкм. Пластины высушивали 1 ч на воз-

духе при 20° С, затем активировали 30 мин при 120° С. Для приготовления 10 пластин размером 6×6 см без аппликатора 2 г силикагеля КСКГ (фракция 10 мкм) и 8 мл золя кремневой кислоты перемешивали на магнитной мешалке до получения однородной суспензии, затем, не выключая мешалки, отбирали пипеткой 0,8 мл суспензии и наносили на пластинку 6×6 см. Пластинки подсушивали ИК-лампой до схватывания слоя, а затем до полного высыхания — на воздухе. Перед употреблением пластины активировали 30 мин при 120° С.

*Регенерация пластин.* Пластины погружали на 1–2 мин в нагретую до 150–180° С свежую хромовую смесь, затем переносили в стакан с горячей водой и после охлаждения помещали под струю водопроводной воды до полного обесцвечивания. Затем пластины ополаскивали несколько раз дистиллированной водой и активировали 30 мин при 120° С.

*Хроматография и детектирование.* Хроматографию липидов, их обнаружение путем опрыскивания хроматограмм различными реагентами осуществляли описанными ранее методами [4, 12–19].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Zlatkis A., Kaiser R. E. HPTLC. High Performance Thin-Layer Chromatography. Amsterdam: Elsevier, 1977.
2. Белецкий Б. Г., Ганкина Э. С., Нестеров В. В. Докл. АН СССР, 1967, т. 172, № 1, с. 91–93.
3. Белецкий Б. Г., Нестеров В. В., Ганкина Э. С. В кн.: Физические и физикохимические методы анализа органических соединений. М.: Наука, 1970, с. 80–91.
4. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E. J. Chromatogr., 1972, v. 67, № 2, p. 376–378.
5. Добрускин В. Х., Белоцерковский Г. М., Карельская В. Ф., Плаченов Т. Г. Ж. прикл. химии, 1967, т. 40, № 11, с. 2443–2448.
6. Okumura T., Kadano T., Nakatani M. J. Chromatogr., 1972, v. 74, № 1, p. 73–84.
7. Okumura T. J. Chromatogr., 1980, v. 184, № 1, p. 37–78.
8. Thin-Layer Chromatography, Prospect Camag, TL-8-E.
9. Patent № 3.594.217 (U.S.A.). Binder for thin-layer Chromatographic absorbents / Seybert E. K., Limk W. 20.7.1971.
10. Patent № 149185 (ЧССР). Способ упрочнения слоев адсорбента для хроматографических целей / Viska J., Uhrova Z., Danek J. Заявл. 08.VII.1971. Выдан 15.VI.1973.
11. Belenkii B. G., Nesterov V. V., Gankina E. S., Smirnov M. M. J. Chromatogr., 1967, v. 31, № 2, p. 360–368.
12. Vaskovsky V. E., Terekhova T. A. J. HRC/CC, 1979, v. 2, № 11, p. 671–672.
13. Vaskovsky V. E., Khotimchenko S. V. J. HRC/CC, 1982, v. 5, № 10, p. 635–636.
14. Vaskovsky V. E., Latyshev N. A. J. Chromatogr., 1975, v. 115, № 1, p. 246–249.
15. Latyshev N. A., Vaskovsky V. E. J. HRC/CC, 1980, v. 3, № 9, p. 478–479.
16. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. M. J. Chromatogr., 1975, v. 114, № 1, p. 129–141.
17. Schnider R. B. J. Lipid Res., 1966, v. 7, № 1, p. 169–170.
18. Dudley P. A., Anderson R. E. Lipids, 1975, v. 10, № 2, p. 113–115.
19. Vaskovsky V. E., Terekhova T. A. J. HRC/CC, 1979, v. 2, № 10, p. 630–631.

Поступила в редакцию

14.III.1983

После доработки

25.VIII.1983

#### APPLICATION IN LIPID ANALYSIS OF PLATES WITH A LAYER OF MICROFRACTIONATED SILICA GEL FIXED WITH SILICIC-ACID SOL

BELENKII B. G., GANKINA E. S., LITVINOVA L. S., EFIMOVA I. I.,  
VASKOVSKY V. E., KHOTIMCHENKO S. V., DIKAREV V. P.

*Institute of High Molecular Weight Compounds, Academy of Sciences of the USSR,  
Leningrad; Institute of Marine Biology, Far East Science Center, Academy  
of Sciences of the USSR, Vladivostok*

It has been shown that plates with a layer of microfractionated silica gel tightly fixed on a glass support with an adhesive based on a silicic-acid sol make it possible to carry out all operations in the analysis of lipids described previously for microplates with a silica gel — gypsum layer. The plates can be repeatedly regenerated after qualitative analysis. The advantages of new plates over other chromatographic plates described in the literature are discussed.