

ЭКОЛОГИЯ МОРЯ



13
—
1983

НОВЫЙ ВАРИАНТ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ЛИПИДОВ И УГЛЕВОДОРОДОВ

Многие физиолого-биохимические и санитарно-гидробиологические исследования, а также работы экологического характера, связанные с изучением состава, распространения и трансформации РОВ, зачастую требуют разделения на отдельные классы соединений суммы веществ липидного и углеводородного характера. Для этой цели в настоящее время наиболее широко применяется метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) с адсорбционным механизмом разделения. Этому методу посвящено много сообщений, среди которых в первую очередь следует упомянуть работы, ставшие классическими [1, 3, 4, 8, 9].

Несмотря на широкое распространение, метод ТСХ липидов имеет ряд недостатков, связанных в основном с большими затратами времени, не всегда достаточным качеством разделения, трудностями обнаружения разделенных веществ, количественной обработкой результатов хроматографии. Как правило, разделение осуществляют на собственноручно подготовленных пластинках с закрепленным слоем силикагеля, что требует большого промежутка времени. В качестве хроматографической системы растворителей наиболее широко используется смесь гексана или петролейного эфира с диэтиловым эфиром в различных соотношениях — от 50 : 50 до 95 : 5 — с добавкой 1—2% уксусной кислоты, чтобы уменьшить образование «хвостов» свободными жирными кислотами [1—3, 7—9]. Однако отсутствие градиента полярности элюирующего растворителя в процессе хроматографии существенно снижает его возможности — этим методом обычно не удается достаточно четко разделить вещества, как значительно различающиеся по своей полярности, так и, наоборот, очень близкие по этому параметру. Поэтому, чтобы достичь более полного разделения многокомпонентных смесей, приходится прибегать к дополнительным методическим приемам: двумерной, ступенчатой, проточной ТСХ и т. д. Сам процесс хроматографии происходит сравнительно медленно: на одно разделение требуется не менее 1 ч [7].

Наиболее часто для обнаружения пятен пластину обрабатывают парами йода с дальнейшим колориметрическим или спектрофотометрическим окончанием или же опрыскивают каким-либо обнаруживающим реактивом общего характера (различные растворы H_2SO_4 , pH-индикаторов, фосфорномолибденовой кислоты и т. д.) с последующей денситометрией; иногда эти методы обнаружения комбинируют с другими аналитическими приемами, например с определением $C_{орг}$ [2]. Эти методы обнаружения длительны и трудоемки, особенно колориметрические, другие же требуют специальных приспособлений и к тому же небезопасны, как, например, опрыскивание хроматограммы концентрированной серной кислотой.

Ниже излагается новый вариант градиентной ТСХ веществ липидного и углеводородного характера, разработанный в отделе морской санитарной гидробиологии ИнБЮМ АН УССР. На наш взгляд, предлагаемый метод в значительной мере лишен недостатков общепринятых вариантов ТСХ липидных соединений. Он сравнительно прост, при соблюдении определенных условий хорошо воспроизводим и обладает высокой разрешающей способностью.

Принцип метода. В предлагаемом методе исследуемая смесь липидов или углеводов наносится в виде узкой полосы на пластину «Силуфола», предварительно промытую от загрязнений и обработанную спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты. Для улучшения хроматографического разделения используется простой метод создания градиента полярности растворителя с помощью принципа, который можно назвать «камера в камере». В большую хроматографическую камеру (I камера), насыщенную гексаном, помещается II камера, значительно меньшая по объему и высота которой составляет примерно $\frac{2}{3}$ длины пластины. Она насыщается смесью

растворителей гексан — диэтиловый эфир (9 : 1). На дно II камеры в чашку Петри наливается хлороформ, в который помещается пластинка с нанесенной пробой.

По мере поднятия по пластине хлороформ постепенно испаряется с одновременной сорбцией из паровой фазы относительно менее полярной системы гексан — эфир (9 : 1). После того как фронт растворителя поднимается по пластинке до высоты, равной высоте II камеры, произойдет постепенная замена системы гексан — эфир неполярным гексаном. Таким образом, применяя летучие растворители с различной полярностью и используя процессы сорбции и десорбции, мы создаем в хроматографической камере градиент полярности растворителя [4], что резко улучшает качество разделения. Разделенные фракции обнаруживаются при нагреве пластины в сушильном шкафу. Количественная обработка результатов проводится денситометрически, хотя возможны и другие варианты (например, колориметрический или спектрофотометрический).

Чувствительность метода: 5—10 мкг для каждой фракции липидов при денситометрическом окончании.

Пределы определяемых концентраций — 0,1—1,0 мг суммы липидов в пробе, нанесенной на пластинку.

Оборудование: 1) пластины «Силуфол» («Кавалиер», ЧССР), 50 × 150 мм; 2) цилиндрические хроматографические камеры с крышками: I камера — диаметр 140 ± 20 мм, высота 220 ± 20 мм; II — камера — диаметр 65 ± 5 мм, высота 100 ± 5 мм; камера для промывки пластин произвольного размера; 3) химический стакан или цилиндр для обработки пластин раствором фосфорномолибденовой кислоты диаметром не менее 55 мм и высотой не менее 160 мм; 4) эксикатор; 5) пинцет пластмассовый (фотопинцет); 6) микродозиметр типа 328 («Унипан», Польша) или микропинетки на 0,1 мл; 7) мерная колба на 1 л; 8) чашки Петри диаметром 50—55 мм или аналогичная посуда; 9) боксы диаметром 55—60 мм и высотой 40—50 мм; 10) сушильный шкаф с точностью регулировки температуры ±1° С; 11) вентилятор; 12) денситометр, например, ERJ-65 («Карл Цейсс», ГДР); 13) спектрофотометр.

Реактивы: 1) этилацетат, «хч»; 2) гексан, «ч»; 3) диэтиловый эфир — «для наркоза»; 4) хлороформ перегнанный, стабилизированный 1% метанола; 5) спиртовой раствор фосфорномолибденовой кислоты. Готовят 1 л 10%-ной фосфорномолибденовой кислоты («хч») в обезвоженном и перегнанном этиловом спирте; можно использовать также метанол или изопропанол. Нерастворимый остаток отфильтровывают через стеклопористый фильтр. Реактив следует хранить в склянке со шлифом на холоду, не оставлять надолго открытым на воздухе.

Описание метода. Подготовка пластин для ТСХ. В предлагаемом методе используются готовые пластины для ТСХ типа «Силуфол» (как с люминесцентным индикатором, так и без него) размером 150 × 50 мм. При наличии пластин размером 150 × 150 мм их можно нарезать на нужные размеры.

При предварительной подготовке к работе, чтобы удалить органические загрязнения, пластины следует промыть этилацетатом. На дно хроматографической камеры без фильтровальной бумаги наливается этилацетат слоем 2—4 мм и в него одним из узких концов ставятся пластины вдоль всей боковой поверхности камеры (здесь и далее конец пластины, погруженный в этилацетат, будем называть стартовым, а противоположный ему — верхним. Камера закрывается, и растворителю дают подняться до верхнего конца пластины. После того камеру приоткрывают на 10—15 мин с тем, чтобы дать возможность загрязняющим веществам сконцентрироваться вверху в виде узкой желтой полосы шириной не более 1 мм. Затем пластины в течение 10—15 мин высушиваются под тягой, желтая полоса загрязнений соскабливается и с помощью скальпеля и линейки с обеих боковых сторон по всей длине очерчиваются поля шириной 5 мм. Подготовленные таким образом пластины могут храниться в эксикаторе несколько недель.

При непосредственной подготовке к работе пластины следует обработать спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты. Для этого пластины

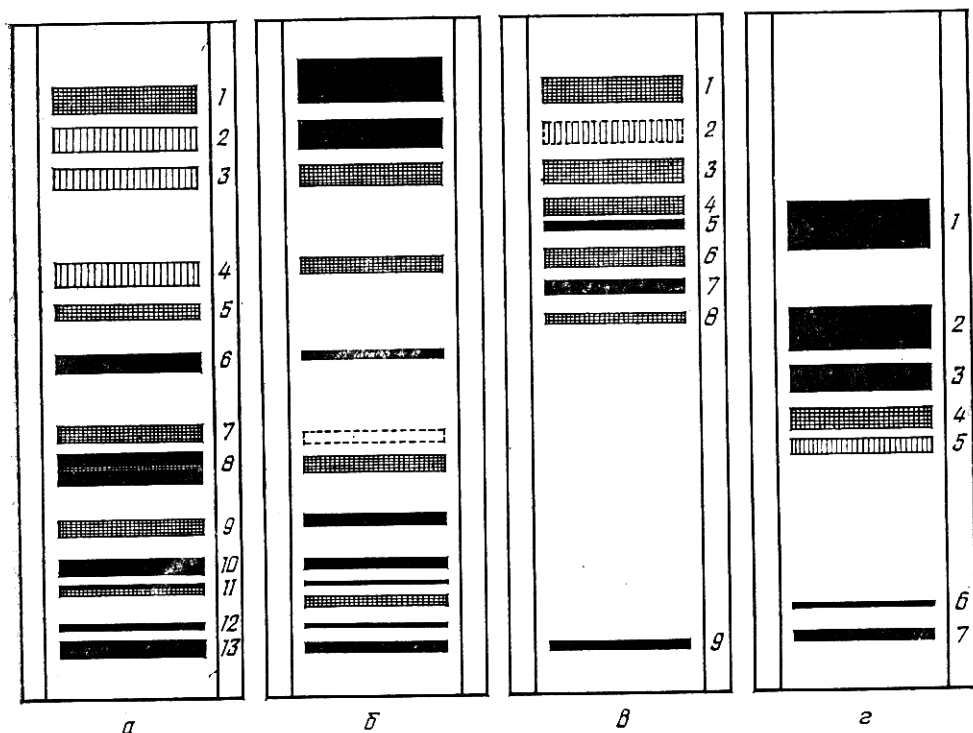


Схема ТСХ разделения липидов (а, б) и углеводов (в, г); а—в — хроматография по варианту, описанному для липидов; г — вариант ТСХ для углеводов (объяснение в тексте):

а — липиды из гепатопанкреаса мидии *Mytilus galloprovincialis*; 1—3 — углеводы (1 — парафины); 4 — неидентифицированная фракция; 5 — эфиры стерина; 6, 7 — неидентифицированные фракции; 8 — триглицериды; 9 — жирные кислоты; 10 — стерины; 11 — ди- и моноглицериды; 12 — фосфолипиды; б — липиды из морской воды; в — модельная смесь углеводов; г — Анастасиевская нефть (классы соединений): 1 — парафино-нафтеновые; 2 — моноциклические; 3 — бициклические; 4 — трициклические; 5 — тетрациклические; 6 — вещества кислотного характера; 7 — полярные соединения (смолы, асфальтены). Интенсивность окраски фракций на схеме приблизительно соответствует окраске пятен на хроматограммах. Пунктирной линией отмечены слабоокрашенные пятна.

погружают на 20—30 с в этот раствор стартовым концом вниз. Важно проследить, чтобы пластина погружалась в раствор полностью, равномерно, без остановок. Обработанную пластину вынимают пластмассовым пинцетом, излишек растворителя удаляют энергичным встряхиванием, при этом пластину держат пальцами за боковые стороны верхнего конца. Сушат пластину в сильной струе воздуха от вентилятора в течение 10 мин, затем 20—25 мин ее выдерживают в сушильном шкафу при 60° С, после чего она готова к работе. В процессе подготовки пластин к работе и после этого следует избегать касания пальцами слоя сорбента, чтобы не загрязнить пластин. В случае необходимости пластины могут сохраняться 2—3 сут, лучше их хранить в эксикаторе.

Нанесение пробы. Исследуемая проба липидов или углеводов не должна содержать нелипидных примесей и воды; кроме того, ее следует растворять в неполярном или малополярном органическом растворителе (петролейный эфир, гексан, бензол, хлороформ, четыреххлористый углерод и т. д.). Методики подготовки к анализу экстрактов липидов и углеводов из различных объектов можно найти в руководствах [3, 5—9].

Проба наносится полосой шириной 1—2 мм и длиной 34—36 мм на расстоянии 10 мм от стартового конца. Для этого удобнее всего пользоваться микродозиметром типа 328 («Унипан», Польша) с капровым капилляром на конце, который не царапает пластину. С его помощью можно наносить пробы объемом 4—100 мкл. Ее можно наносить также микропипеткой или калиброванным капилляром, важно только, чтобы при этом не повреждался слой сорбента. Объем наносимой аликвоты не должен превышать 100 мкл.

Во избежание артефактов необходимо после нанесения пробы как можно быстрее приступить к хроматографии.

Подготовка камер. I и II камеры изнутри в 1—2 слоя по всей высоте выстилают полосой фильтровальной бумаги. На дно I камеры слоем в 3—5 мм наливают гексан. Камеру можно считать готовой к работе, когда гексан полностью смачивает бумагу. Эта камера многократного использования — важно только следить за наличием гексана на дне камеры.

II камеру готовят отдельно, вне I камеры. На ее дно наливают 3—5 мл смеси растворителей гексан — эфир (9 : 1) и помещают пустую чашку Петри диаметром 50—55 мм. Эта камера насыщается 10 мин, после чего ее немного приоткрывают и в чашку Петри осторожно, с помощью пипетки доливают 1,5 мл хлороформа. С этого момента II камера готова к работе.

Хроматография липидов. Пластину с нанесенной пробой быстро ставят во II камеру стартовым концом в хлороформ, затем II камеру вместе с пластиной быстро помещают на середину дна I камеры. После поднятия фронта растворителя до верхнего конца пластины, на что уходит примерно 15 мин, I камеру приоткрывают, пластину вынимают, высушивают ее в слабом токе воздуха в течение 1—2 мин до исчезновения видимых следов растворителя и вновь помещают во II камеру. После повторного пропускания растворителя ТСХ липидов можно считать законченной. Эта процедура длится около 30 мин. I камеру следует слегка проветрить для удаления следов хлороформа и эфира, II камеру вынимают и для следующей пробы готовят заново.

Хроматография углеводов. Для разделения углеводов по классам соединений и определения их концентрации (что часто бывает необходимо при санитарно-гидробиологических исследованиях) можно использовать другой вариант этого метода, более простой и быстрый. В I камеру, подготовленную к работе, как описано выше, помещают бюксу (кристаллизатор) диаметром 55—60 и высотой 40—50 мм с налитым на дно хлороформом. В нее вставляют пластину с нанесенной пробой. Однократного пропускания растворителя обычно вполне достаточно для хорошего разделения фракций. Проведенное исследование показало, что разделение ароматики идет в основном по числу циклов, а при одинаковом количестве последних некоторую роль начинает играть их взаимное расположение, т. е. изомерия (рисунки).

Однако в том случае, если анализу подвергается сложная смесь полициклических ароматических углеводов (ПАУ) с числом циклов более 5, содержащая к тому же продукты окисления и гетероциклы, то для ее разделения удобнее использовать вариант хроматографии, описанный для липидов. Он обладает лучшей разрешающей способностью по отношению к полярным веществам.

Обнаружение и количественная обработка. Чтобы выявить разделенные фракции, хроматограмму достаточно прогреть в сушильном шкафу 10 мин при 100° С. При количественных исследованиях важно очень точно соблюдать экспозицию, особенно температуру, поскольку в основном именно от этого зависит воспроизводимость результатов. Количественную обработку удобнее всего проводить с помощью денситометра ERJ-65, снабженного интегрирующим устройством. При отсутствии денситометра, а также в экспедиционных условиях обнаруженные фракции можно вырезать, соскабливать и извлекать окраску спиртом с последующим колориметрированием элюата на длине волны 700 нм; в качестве бланка используется эквивалентный участок хроматограммы холостого опыта. Наконец, если используется предлагаемый метод для определения концентраций и состава нефтепродуктов в полевых условиях, что, на наш взгляд, представляется весьма перспективным, то можно воспользоваться оригинальным способом определения размеров площади фракций, предлагаемым в методе «канальной хроматографии» [5, 6].

Кроме того, ТСХ углеводов и липидов в предлагаемом варианте можно сочетать со спектроскопией и (или) газо-жидкостной хроматографией (ГЖХ). Для этого после разделения с обеих боковых сторон пластинки отрезаются узкие полоски хроматограммы с таким расчетом, чтобы захватить

небольшую часть разделенных веществ. После нагрева полосок эти вещества обнаруживаются. Если приложить полоски к оставшейся части хроматограммы, можно определить местоположение интересующих веществ, соскоблить их, элюировать соответствующим органическим растворителем, а затем исследовать выделенные вещества более тонкими аналитическими методами. Такое сочетание различных методов значительно расширяет возможности анализа и позволяет исследовать смеси веществ сложного состава.

1. Ахрем А. А., Кузнецова А. И. Тонкослойная хроматография.— М.: Наука, 1964.— 175 с.
2. Беляева А. Н. Метод определения группового состава липидов в морской воде, взвеси и донных осадках.— В кн.: Методы исследования органического вещества в океане. М.: Наука, 1980, с. 143—150.
3. Кейтс М. Техника липидологии.— М.: Мир, 1975.— 322 с.
4. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография.— М.: Мир, 1981.— Т. 1. 616 с.; Т. 2. 527 с.
5. Лейте В. Определение органических загрязнений питьевых, природных и сточных вод.— М.: Химия, 1975.— 199 с.
6. Лурье Ю. Ю., Рыбникова А. И. Химический анализ производственных сточных вод.— М.: Химия, 1974.— 335 с.
7. Филиппович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Г. А. Практикум по общей биохимии.— М.: Просвещение, 1975.— 318 с.
8. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биологии.— М.: Мир, 1980.— Т. I, II. 621 с.
9. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях.— М.: Мир, 1965.— 508 с.

Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского АН УССР

Поступила в редколлегию
23.11.81

Уи. Р. КОПУТОВ

A NEW VARIANT OF THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY FOR LIPIDS AND HYDROCARBONS

Summary

A new variant of a gradient method of thin-layer chromatography for lipids and hydrocarbons is suggested with various ways of its application considered. Finished 50 × 150 mm Siluphol plates pre-treated with alcohol solution of phosphomolybdic acid are used for chromatography. Fractionation is improved due to formation of a polarity gradient of the developing solvent on the basis of the «chamber in chamber» principle combined with utilization of volatile organic solvents of different polarity. The gradient is formed as a result of gradual replacement of more polar solvent evaporating in its movement upwards the plate by a less polar one due to the latter sorption from the vapour phase. Employment of two chromatographic chambers saturated with various solvents and inserted one into another creates an eluting solvent polarity gradient of required rate of change. To reveal the fractionated substances it is enough to heat the plate at 100° C for 10 min. The method is high-sensitive, sufficiently rapid and simple with high resolution.