



УДК 547.953:543.554

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
ФОСФОЛИПИДОВ НА МОДИФИЦИРОВАННОМ СИЛИКАГЕЛЕ

Воронин М. В., Василенко И. А., Швец В. П.

*Московский институт тонкой химической технологии
им. М. В. Ломоносова*

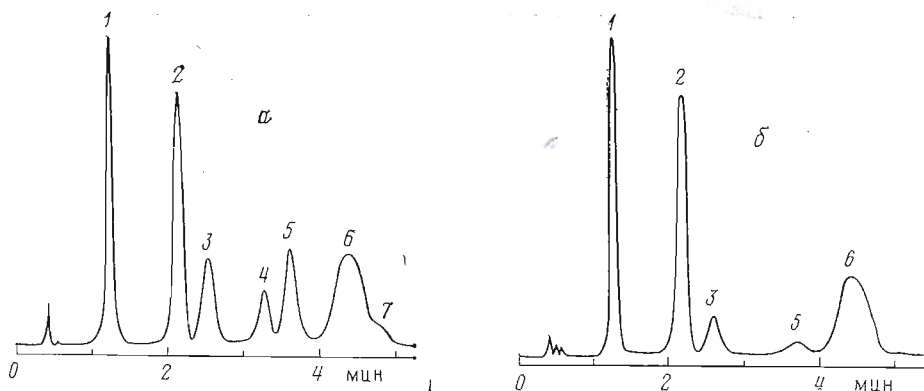
Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) как метод анализа фосфолипидного состава различных биологических объектов стала применяться сравнительно недавно [1–3]. Были разработаны две системы элюентов, пригодные для разделения фосфолипидов на немодифицированном силикагеле [1, 4]. Хакс и Ван Кессель описали метод разделения смеси фосфолипидов с использованием градиентного элюирования смесью гексан — изопропанол — вода с увеличением содержания воды [1]. Джангалвала с сотр. [4] использовали системы на основе ацетонитрила для быстрого и эффективного разделения фосфатидилхолина и сфингомиелина, однако другие типы фосфолипидов в этой системе не разделялись. Были также описаны хроматографические системы на основе ацетонитрила с добавками сильных кислот [5, 6], которые также могут быть использованы для разделения фосфолипидных смесей, не содержащих фосфолипидов с кислотолabile связями.

Перечисленные методы, однако, не свободны от недостатков. Так, градиентное элюирование, используемое в работах [1, 4], нельзя сочетать с применением рефрактометрического детектора. Хроматография на силикагеле с изократическим элюированием и УФ-детектированием практически не применяется ввиду больших времен удерживания полярных фосфолипидов.

В связи с этим нами была исследована возможность использования для ВЭЖХ фосфолипидов модифицированных силикагелей и осуществлен подбор систем элюентов, обеспечивающих эффективное разделение при изократическом элюировании, что дает возможность применения как УФ-, так и рефрактометрического детектора.

Для разделения фосфолипидов при изократическом элюировании была использована колонка с силикагелем, модифицированным аминопипильными остатками: Separon-NH₂ с частицами 7 мкм (ЧССР, Kova). Детектирование проводили по поглощению разделяемых компонентов в УФ-свете при длине волны 206 нм. Скорость подачи элюента 1,1 мл/мин. Для разделения использовали смесь ацетонитрил — изопропанол — вода — метанол (10 : 23 : 3 : 64). Образцы фосфолипидов вводили в колонку либо в этаноле, либо в смеси этанол — метанол (1 : 1). В качестве стандартов фосфолипидов были использованы вещества, полученные дополнительной очисткой коммерческих образцов. Все стандарты после очистки давали единственное пятно на пластинке с силикагелем (HPTLC, Merck, ФРГ). ТСХ проводили в системе хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4), разделяемые вещества обнаруживали обработкой раствором H₂SO₄ в метаноле с последующим нагреванием.

Мы осуществили хроматографическое разделение пятикомпонентной смеси модельных фосфолипидов (рисунок, а) и суммарной смеси фосфолипидов, выделяемых из яичного желтка (рисунок, б). Использование системы растворителей, приведенной выше, позволяет и в том, и другом случаях провести быстрое (менее 5 мин) и эффективное разделение исследуемых смесей веществ, за исключением фосфолипидов, содержащих первичную аминогруппу (фосфатидилэтанолламин и фосфатидилсерин). Фос-



ВЭЖХ модельной смеси фосфолипидов (а) и смеси фосфолипидов яичного желтка (б): 1 — жирные кислоты, 2 — фосфатидилхолин, 3 — сфингомиелин, 4 — фосфатидилинозит, 5 — лизофосфатидилхолин, 6 — фосфатидилэтаноламин, 7 — фосфатидилсерин. Условия: колонка Seraport-NH₂ (3,2 мм×30 см), элюент — ацетонитрил — изопропанол — вода — метанол (10 : 23 : 3 : 64), УФ-контроль (λ 206 нм)

фатидилсерин в этом случае регистрируется в качестве плеча пика, соответствующего ФЭА (рисунок, а).

Использование УФ-детектирования позволяет анализировать достаточно малые количества веществ, однако при этом возникает затруднение в количественной интерпретации получаемых результатов, так как молярный коэффициент поглощения для индивидуальных веществ, входящих в состав разделяемой смеси, как правило, неизвестен.

Данная система растворителей может быть применена также для препаративного выделения фосфолипидов из сложных фосфолипидных смесей. Эффективное разделение фосфатидилхолина и лизофосфатидилхолина за сравнительно короткое время дает возможность использовать данную хроматографическую систему для исследования кинетики гидролиза фосфатидилхолина фосфолипазой А₂, а также кинетических исследований гидролиза двухкомпонентных систем (фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин) липолитическими ферментами (фосфолипазами А₂, С) после проведения соответствующей калибровки сигнала УФ-детектора по исследуемым субстратам.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hax W. M. A., Geurts Van Kessel W. S. M.* // J. Chromatogr. 1977. V. 142. № 11. P. 735—741.
2. *Geurts Van Kessel W. S. M., Hax W. M. A., Demel R. A., De Gier J.* // Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 486. № 3. P. 524—530.
3. *Guichardant M., Lagarde M.* // J. Chromatogr.-Biomed. Appl. 1983. V. 275. № 2. P. 400—406.
4. *Jungawala F. B., Evans J. E., McCluer R. H.* // Biochem. J. 1976. V. 115. № 1. P. 55—60.
5. *Yandrasitz J. R., Berry G., Segal S.* // J. Chromatogr.-Biomed. Appl. 1981. V. 225. № 2. P. 319—328.
6. *Kaduce T. L., Norton K. C., Spector A. A.* // J. Lipid Res. 1983. V. 24. № 10. P. 1398—1403.

Поступило в редакцию
1.IX.1988

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF PHOSPHOLIPIDS ON AMINOPROPYL SILICA COLUMN

VORONIN M. V., VASILENKO I. A., SHVETZ V. I.

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

A sensitive method for the separation of phospholipids by a HPLC procedure is described. The separation was carried out on a 30 cm prepacked column with aminopropyl bonded silica under isocratic conditions. The effective separation of major phospholipid classes was carried out for less than 5 min. These chromatographic conditions were used for analysis of natural phospholipid mixtures.