



УДК 547.916:547.426.222–386:543.544.2

## ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ КООРДИНАЦИОННЫХ $Ag^+$ -КОМПЛЕКСОВ РАСТИТЕЛЬНЫХ ДИАЦИЛГЛИЦЕРИНОВ

© 2003 г. А. Г. Верещагин<sup>#</sup>, В. П. Пчелкин

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, Ботаническая ул., 35

Поступила в редакцию 11.10.2001 г. Принята к печати 04.02.2002 г.

Координационные комплексы ненасыщенных *rac*-1,2-диацилглицеринов (DAG) с ионами серебра разделяли адсорбционной и обращенно-фазовой ТСХ ( $Ag$ -TLC и  $Ag$ -гpTLC соответственно). Было показано, что при  $Ag$ -TLC серебряные комплексы образуются с координационными центрами DAG разной природы и только на поверхности адсорбента, механизм разделения комплексов является адсорбционным, а функциональная зависимость подвижности DAG от числа их двойных связей – отрицательной и экспоненциальной. В то же время при  $Ag$ -гpTLC ионы  $Ag^+$  формируют комплексы только с двойной связью, только в растворе и в соотношении 1 : 1. Фракционирование этих комплексов происходит за счет распределения между двумя жидкими фазами, и хроматографическая подвижность комплексов прямо пропорциональна их ненасыщенности. Несмотря на все различия обоих этих методов, TLC, DAG с изогнутой пространственной структурой ацильных групп значительно полярнее DAG с той же ненасыщенностью, но с конформацией ацильных групп, близкой к вытянутой; она больше в 2–3 раза при  $Ag$ -TLC и на 30–40% – при  $Ag$ -гpTLC. Кроме того, зависимость подвижности комплексов DAG от числа их двойных связей при обоих случаях аргентационной TLC обнаруживает количественные (но не качественные) различия между этими двумя группами DAG. Таким образом, подвижность комплексов и, следовательно, их полярность при всех условиях аргентационной жидкостной хроматографии определяются не только их составом (ненасыщенностью), но и пространственной структурой (конформацией) их молекул.

**Ключевые слова:** адсорбционная способность, адсорбционная TLC; диацилглицерины (DAG); жирные кислоты; комплексы липидов с  $Ag^+$ ; пространственная структура DAG; обращенно-фазовая TLC; полярность (липофильность) DAG; TLC-подвижность.

### ВВЕДЕНИЕ

Многочисленные исследования посвящены изучению количественной зависимости между молекулярными характеристиками (molecular descriptors) природных соединений и их поведением при жидкостной хроматографии (quantitative structure–chromatographic retention relationship). Результаты таких исследований важны как для понимания физико-химических механизмов взаимодействия разделяемых веществ с обеими фазами хроматографической системы, так и для оптимизации условий хроматографического разделения и достоверного предсказания подвижности таких

веществ с целью их предварительной идентификации (см. обзор в широко известной монографии Калишана) [1]. Большой интерес представляет хроматографическое разделение олефиновых соединений (в частности, ненасыщенных алифатических липидов) в виде их лабильных координационных комплексов с ионами серебра, далее для краткости обозначаемых термином “комплексы” [2]. Однако подвижность этих комплексов при аргентационной жидкостной хроматографии в зависимости от их состава и строения стали исследовать только в последнее время [3–8], а механизмы взаимодействия ионов серебра с двойными связями липидов и взаимодействие образовавшихся при этом комплексов с отдельными фазами хроматографических систем остаются до сих пор почти не изученными [6].

Цель настоящего исследования состояла в определении возможной функциональной зависимости между составом и конфигурацией отдельных ненасыщенных *rac*-1,2-диацилглицеринов (*rac*-1,2-DAG), близких по структуре к природным *sn*-1,2-DAG, с одной стороны, и относительной подвижностью комплексов этих DAG при адсорбционной и обращенно-фазовой хроматографии в тон-

Сокращения:  $Ag$ -HPLC,  $Ag$ -гpTLC и  $Ag$ -TLC – соответственно высокоэффективная жидкостная хроматография, обращенно-фазовая и адсорбционная хроматография в тонком слое координационных комплексов липидов с ионами  $Ag^+$ ; DAG – *rac*-1,2-диацилглицерины; FA, sFA, uFA – жирные кислоты, насыщенные и ненасыщенные, и их ацильные остатки в составе ацилглицеринов (Li – линолевая, Ln – линоленовая, Ol – олеиновая, Pl – пальмитиновая, St – стеариновая); LC – жидкостная хроматография; TAG – триацилглицерины; *rac*-1,3-LiLi – *rac*-1,3-дидиолеилглицерин; *rac*-1,2-LnLn – *rac*-1,2-дидиленилглицерин.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 903-93-51; факс: (095) 977-80-18; эл. почта: ifr@ippras.ru).

**Таблица 1.** Функциональные зависимости между ненасыщенностью ( $e$ ) диацилглицеринов и их относительной подвижностью ( $z$ ) при Ag-TLC и Ag-гpTLC

DAG ( $e$ )	Ag-TLC				Ag-гpTLC			$l^*$	$L^{**}$
	$z$ , найденны	$z$ , вычислены по уравнению		$p$	$z$ , найденны	$z$ , вычислены по уравнению			
		(1)	(2)			(12)	(13)		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
StOl (1)	4.88	–	4.88	1.03	0.15	–	0.13	33	33
OIOl (2)	2.50	–	2.42	2.06	0.30	–	0.27	30	30
StLi (2)	1.47	1.47	–	2.46	0.30	0.33	–	31	30
PIli (2)	1.47	1.47	–	2.46	0.38	0.33	–	29	28
OILi (3)	0.94	–	1.20	3.49	0.43	–	0.41	28	27
LiLi (4)	0.60	–	0.60	4.92	0.51	–	0.54	29	24
StLn (3)	0.33	0.44	–	5.45	0.51	0.50	–	26	24
PIln (3)	0.33	0.44	–	5.45	0.60	0.50	–	27	22
OILn (4)	0.20	0.13	–	6.48	0.69	0.67	–	26	21
LiLn (5)	0.10	0.04	–	7.91	0.83	0.83	–	24	18
LnLn (6)	0.03	0.01	–	10.90	1	1.00	–	22	12
Обозначение DAG		I	II	–	–	I	II	–	–
$r^{***}$		0.999	0.997	–	–	0.986	0.994	–	–

\*  $l = m - 2e - u$  – неисправленная липофильность комплексов DAG.

\*\*  $L = m - 2p - u$  – исправленная липофильность комплексов DAG.

\*\*\*  $r$  – коэффициенты корреляции величин  $z$ , найденных и вычисленных по уравнениям (1), (2), (12) и (13).

ком слое (Ag-TLC и Ag-гpTLC соответственно), с другой. На основе полученных данных был рассмотрен возможный механизм взаимодействия этих комплексов с той или иной фазой TLC-систем, содержащих (в случае Ag-гpTLC) ионы серебра. Мы исследовали DAG, содержащие остатки стеариновой, пальмитиновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислот.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Ag-TLC

Величины подвижности ( $z$ ) комплексов отдельных DAG при Ag-TLC приведены в табл. 1. Как и следовало ожидать, индивидуальные DAG, различающиеся между собой по суммарному числу двойных связей в обоих FA-остатках ( $e$ ) на одну или более, т.е. DAG с  $\Delta e \geq 1$ , всегда отделялись друг от друга, а компоненты, различившиеся только природой насыщенного остатка (sFA = St или Pl), т.е. с  $\Delta e = 0$ , совпадали по подвижности, т.е. по величине  $z$ . В то же время для трех пар DAG (sFALi и OIOl с  $e = 2$ , sFALn и OILi с  $e = 3$  и OILn и LiLi с  $e = 4$ ) разделение комплексов DAG наблюдалось и при  $\Delta e = 0$ . Следовательно, величина  $z$  могла определяться не только значением  $e$ , но и какими-то другими параметрами молекулы

DAG. Разделение липидов с  $\Delta e = 0$  обнаруживалось и ранее, при адсорбционном Ag-HPLC-анализе смесей TAG, однако объяснить это явление не удавалось [3].

В поисках его причины мы обратили внимание на то, что в каждой из приведенных выше пар DAG их первый компонент отличался от второго меньшей величиной  $z$ , т.е. большей полярностью его комплекса. Следовательно, в модельном препарате DAG можно было различить две группы – более полярную (StLi, PIli, StLn, PIln и OILn – группу I) и менее полярную при  $\Delta e = 0$  (OIOl, OILi и LiLi – группу II).

Как известно, при введении двух или более Z-олефиновых связей в ацильную цепь в ней происходят сильные изменения предпочтительной конформации (пространственной структуры), придающие цепям полиненасыщенных жирных кислот изогнутую структуру; в то же время у sFA-и Ol-замещенных глицеридов предпочтительная конформация алифатической цепи близка к вытянутой (линейной) [9]. Можно видеть, что в группе I FA-остатки каждого компонента резко различаются по пространственной структуре. Напротив, DAG вида OIOl и LiLi, входящие в группу II, построены из идентичных FA, а вид OILi – из FA, в целом сходных между собой по характеру прост-



ранственной структуры. Таким образом, можно считать, что в группах I и II подвижность комплексов,  $z$ , зависит не только от степени ненасыщенности DAG,  $e$ , но и от их конформационных особенностей, которые и обуславливают различия в относительной подвижности у DAG с  $\Delta e = 0$ .

Для установления функциональной зависимости подвижности,  $z$ , от молекулярных параметров ненасыщенных DAG мы избрали в качестве исследуемого параметра величину их суммарной ненасыщенности,  $e$ . Сопоставление величин  $z$  и  $e$  между собой в табл. 1 (столбцы 2 и 1) показывает, что при переходе от StOl к LnLn величина  $e$  возрастает менее чем на порядок, тогда как значение  $z$  снижается при этом более чем на два порядка. Поэтому можно было ожидать, что зависимость между величинами  $z$  и  $e$  должна носить экспоненциальный характер. Чтобы количественно оценить возможный вклад особенностей пространственной структуры отдельных DAG в эту зависимость, ее определяли не для всей совокупности DAG в табл. 1 (столбец 1), а отдельно для групп I и II. При этом в группу I дополнительно включали LiLn- и LnLn-DAG, содержащие сильно изогнутые цепи остатка Lr, а в группу II – StOl-DAG, для которого, как и для остальных представителей этой группы, характерна преимущественная конформация алифатических цепей, близкая к вытянутой. Следовательно, при установлении функциональной зависимости величин  $z$  от  $e$  группа I состояла из следующих DAG: StLi, PILi, StLn, PILn, OILn, LiLn и LnLn, а группа II – из таких DAG, как StOl, OIOl, OILi и LiLi.

Расчет с использованием величин  $z$  и  $e$  из табл. 1 (столбцы 1 и 2) показал, что для группы I эта зависимость отвечает уравнению

$$z = 4.88 \exp(1.2 - 1.2e), \quad (1)$$

а для группы II – уравнению

$$z = 4.88 \exp(0.7 - 0.7e). \quad (2)$$

Таким образом, в обеих группах функциональная зависимость величин  $z$  от  $e$  качественно имеет экспоненциальный характер. В то же время количественно характер этой зависимости существенно различен для этих двух групп: он отражает пониженную подвижность  $z$  (и повышенную полярность) у комплексов соответствующих DAG группы I по сравнению с DAG группы II.

Реальность существования групп I и II в модельном препарате DAG была доказана и тем, что при вычислении зависимости величин  $z$  от  $e$  для всей совокупности DAG с uFA (табл. 1, столбец 1) по уравнениям (1) и (2) полученные коэффициенты корреляции  $r = 0.970$  и  $0.958$  соответственно были значительно ниже, чем при расчете, описанном выше ( $r = 0.999$  и  $0.997$ ), когда вычисленные величины  $z$  (табл. 1, столбцы 3 и 4) в целом удовле-

творительно соответствовали найденным (столбец 2).

После окончания наших исследований [10] другие авторы разделили комплексы 19 ненасыщенных триацилглицеринов (TAG) с  $e = 1-9$  методом адсорбционной Ag-HPLC [8]. Чтобы сопоставить данные работы [8] с нашими, мы рассчитали значения  $z_{SSOI}^*$ , исходя из соотношения факторов емкости  $k'$  ( $k'_{SSOI}$ ) для разных TAG и стандартного TAG вида sFA<sub>2</sub>Ol. Для проведения этого расчета известно уравнение

$$R_f = 1/(k' + 1), \quad (3)$$

где  $R_f$  – относительная TLC-подвижность какого-либо TAG [11], выразили в виде уравнений

$$d_{TAG}/d_f = 1/(k'_{TAG} + 1) \quad (4)$$

и

$$d_{SSOI}/d_f = 1/(k'_{SSOI} + 1), \quad (5)$$

где  $d_{TAG}$ ,  $d_{SSOI}$  и  $d_f$  – расстояния (мм), пройденные от стартовой точки хроматограммы хроматографической зоной какого-либо TAG, зоной стандарта sFA<sub>2</sub>Ol и фронтом мобильной фазы  $f$  соответственно, а  $k'_{TAG}$  – величина  $k'$  для какого-либо TAG. Разделив левую и правую части уравнения (4) на соответствующие части уравнения (5), получили:

$$d_{TAG}/d_{SSOI} = z_{SSOI} = (k'_{SSOI} + 1)/(k'_{TAG} + 1). \quad (6)$$

Сопоставление значений  $z_{SSOI}$  для отдельных TAG, вычисленных с использованием значений  $k'$ , взятых из статьи Кристи и др. [8], и уравнения (6), с величинами  $e$  для тех же TAG показало, что функциональная зависимость между  $z_{SSOI}$  и  $e$  также экспоненциальна:

$$z_{SSOI} = \exp(2.3 - 2.3e) \quad \text{при} \quad r = 0.997. \quad (7)$$

Таким образом, результаты работы [8] подтвердили наши выводы.

Резко пониженная Ag-TLC-подвижность комплексов DAG с остатками Ln (табл. 1), которая обусловлена экспоненциальной зависимостью величин  $z$  от  $e$  и структурными различиями между DAG I и II группы, также согласуется с данными Кристи и др. [8]. Более того, если в нашей работе соотношение величин  $z$  для sFALn ( $e = 3$ ), OILi ( $e = 3$ ) и sFAOl ( $e = 1$ ) равно 1 : 3 : 15, то при Ag-HPLC комплексов TAG аналогичное соотношение величин  $z_{SSOI}$  для sFA<sub>2</sub>Ln ( $e = 3$ ), OIOIOl ( $e = 3$ ) и sFA<sub>2</sub>Ol ( $e = 1$ ) составляет уже 1 : 6 : 109 [8]. По-видимому, наблюдаемое различие связано с тем, что по сравнению с DAG TAG характеризуются более жесткой пространственной структурой за счет взаимного влияния остатков FA, закрепленных на молекуле глицерина. В пользу такого предположения свиде-

\*Здесь и далее индексы S и U обозначают sFA и uFA.

тельствуют прежде всего данные Ag-HPLC комплексов метиловых эфиров FA, цепи которых никак не связаны друг с другом. В данном случае соотношение между величинами  $z$  для комплексов эфиров Ln ( $e = 3$ ), Li ( $e = 2$ ) и Ol ( $e = 1$ ), вычисленное по уравнению (3), составляет 1 : 2.4 : 4.5; т.е. при повышении  $e$  втрое эта величина снижается не в 15 и 109 раз, как для DAG и TAG, а лишь в 4.5 раза [4]. Кроме того, наше предположение подтверждается и сопоставлением между собой величин степеней  $e$  в уравнении (7) для TAG, в уравнении (1) для DAG и в уравнении, аналогичном уравнению (7), для метиловых эфиров FA: эти величины равны 2.3, 1.2 и 1.0 соответственно. Таким образом, зависимость величин  $z$  комплексов от пространственной структуры липидных молекул проявляется не только в группах I и II DAG (табл. 1), но и в других классах нейтральных липидов.

Физико-химический механизм, который обуславливает экспоненциальный характер зависимости величин  $z$  от ненасыщенности  $e$  для комплексов ненасыщенных липидов при адсорбционной Ag-LC, еще не установлен [4]. Сейчас можно лишь предположить, что в его основе хотя бы отчасти лежит недавно обнаруженное одновременное обратимое взаимодействие одного иона серебра, прочно присоединенного ионной связью к силанольным группам на поверхности адсорбента, сразу с двумя координационными центрами липида [4]. Такими центрами служат либо две изолированные олефиновые связи, расположенные в одной и той же или в разных алифатических цепях данного липида, либо двойная связь и координационный центр в сложноэфирной группе липида, обусловленный наличием свободной электронной пары у карбонильного атома кислорода [7, 8]. При таком взаимодействии образуются полярные липидные комплексы хелатного типа с переносом заряда [6]. В полученных комплексах полиеновые цепи липидов, активные центры которых находятся на значительном расстоянии друг от друга, образуют псевдоциклические структуры, "расплатанные" на поверхности адсорбента. Двойные связи образовавшихся фиксированных структур оказываются вблизи от поверхностных ионов серебра, что благоприятствует их взаимодействию и значительно его усиливает при одновременном уменьшении сродства метиленовых групп таких структур к липофильной мобильной фазе [3]. В результате время пребывания комплексов ненасыщенных DAG в стационарной фазе возрастает, их подвижность ( $z$ ) значительно снижается, а зависимость величины  $z$  от  $e$  приобретает экспоненциальный характер [8].

#### Ag-*rp*TLC

Как известно, комплексы нейтральных липидов, в том числе DAG, можно также фракционировать методом Ag-*rp*TLC [2, 12]. Это фракционирование является одной из разновидностей распределительной LC и потому, прежде всего, зависит от липофильности разделяемых комплексов DAG. Последняя в свою очередь прямо пропорциональна числу атомов углерода ( $m$ ) и в целом обратно пропорциональна величинам  $e$  и  $u$ , то есть числу остатков ненасыщенных FA в молекуле DAG [12]. Поэтому ранее [12] липофильность комплексов DAG ( $l$ ) оценивали по уравнению

$$l = m - 2e - u. \quad (8)$$

Полученные величины  $l$  приведены в табл. 1 (столбец 9). Можно видеть, что отрицательная зависимость (столбец 6) между величинами  $z$  и  $l$ , характерная для обращенно-фазовой LC [13], изменяется при этом нерегулярно, а в двух случаях рост  $z$  сопровождается не снижением, а увеличением  $l$ .

В дальнейшем было обнаружено (см. выше), что при Ag-TLC полярность, а следовательно, и липофильность комплексов зависит не только от их ненасыщенности  $e$ , но и от особенностей пространственной структуры DAG. Мы предположили, что эти особенности будут влиять на подвижность DAG и при их разделении методом Ag-*rp*TLC. Для проверки этого предположения значение  $e$  в уравнении (8) было заменено эмпирической величиной  $p$  – относительной адсорбционной способностью комплекса отдельного DAG при Ag-TLC. Эта величина представляет собой сумму соответствующих величин  $p_1$  и  $p_2$  для остатков индивидуальных FA (St, Ol, Li и Ln), входящих в состав данного DAG:

$$p = p_1 + p_2. \quad (9)$$

Поскольку при Ag-TLC зависимость  $z$  от  $e$  экспоненциальна (см. выше), значения  $p_{1,2}$  для остатков каждой из uFA (Ol, Li или Ln) вычисляли, используя эмпирическое уравнение

$$(p_U)_{1,2} = \ln(z_{SS}/z_{UU}), \quad (10)$$

где  $z_{SS} = 7.00$  [13], а  $z_{UU}$  для OlOl, LiLi и LnLn равны 2.50, 0.60 и 0.03 соответственно (табл. 1, столбец 2). Очевидно, что при расчете согласно уравнению (10)  $(p_S)_{1,2} = \ln(z_{SS}/z_{SS}) = 0$ . Вычисленные по уравнению (10) значения  $p_{Ol}$ ,  $p_{Li}$  и  $p_{Ln}$  составили 1.03, 2.46 и 5.45 соответственно [14].

Рассчитанные по уравнению (9) значения  $p$  для комплексов ненасыщенных DAG помещены в табл. 1 (столбец 5). Эти значения использовали для вычисления липофильности комплексов DAG при Ag-*rp*TLC ( $L$ ) по уравнению (11), представляющему собой видоизмененное уравнение (8):

$$L = m - 2p - u. \quad (11)$$

Округленные до целого числа величины  $L$  приведены в табл. 1. Последовательности DAG, полученные при их расположении как в порядке убывания величин  $L$ , так и в порядке увеличения

величин  $z$  (столбец 6) оказались непрерывными и полностью совпали между собой. Следовательно, в отличие от величин  $l$  (см. выше), величины  $L$ , в которых учтен вклад пространственной структуры в молекулярные свойства комплексов DAG, более достоверно отражают липофильности DAG при Ag-гpTLC, чем величины  $l$ . Соответственно отрицательная корреляция между  $L$  и  $z$  была намного более достоверной ( $r = -0.999$ ), чем корреляция между  $l$  и  $z$  ( $r = -0.972$ ). Поэтому в табл. 1 (столбцы 9 и 10) величины  $l$  и  $L$  были обозначены соответственно терминами “неисправленная” и “исправленная” липофильность комплексов DAG.

Таким образом, несмотря на то что величины  $p$  были вычислены из результатов адсорбционной Ag-TLC комплексов DAG, они оказались пригодными для количественной характеристики величин  $z$  этих комплексов в условиях аргентационной обращенно-фазовой TLC. Можно видеть, что и при Ag-TLC, и при Ag-гpTLC, которые резко отличаются по механизму разделения липидов (см. ниже), пространственная структура комплексов DAG оказывает значительное влияние на полярность (липофильность) этих комплексов.

Переходя к определению функциональной зависимости величин  $z$  от молекулярных свойств комплексов DAG при Ag-гpTLC, сразу же подчеркнем, что установленную отрицательную зависимость  $z$  от  $L$  нельзя считать строго функциональной. Это ограничение связано с тем, что при расчете  $L$  мы исходили не только из показателей состава DAG ( $m$  и  $u$ ), но и из эмпирических величин  $p$ , полученных на основе подвижности DAG, хотя и в другой LC-системе. Поэтому в качестве независимого молекулярного параметра DAG мы выбрали, как и в случае Ag-TLC, значение  $e$ . Как показывает табл. 1, рост  $e$  от 1 до 6 (столбец 1) сопровождается увеличением  $z$  в 6.7 раза (столбец 6). Следовательно, при Ag-гpTLC, как и при гpTLC в отсутствие  $Ag^+$  [13], зависимость  $z$  от  $e$  близка к линейной.

В то же время при определении такой зависимости следовало учитывать различия не только в величинах  $e$  у индивидуальных DAG, но и в пространственной структуре их комплексов (см. выше). Как показывает табл. 1 (столбцы 1 и 6), в каждой из четырех пар DAG с  $e = 2, 3, 3$  и 4 (PILi и OIOl; StLn и OILi; PILn и OILi; OILn и LiLi соответственно) их первые компоненты более подвижны, т.е. более полярны, чем вторые. Следовательно, налицо две группы DAG, которые при  $\Delta e = 0$  характеризуются большей (PILi, StLn, PILn, OILn) и меньшей (OIOl, OILi, LiLi) полярностью их комплексов. Можно видеть, что и по составу, и по соотношению величин полярности эти DAG сходны соответственно с группами I и II, обнаруженными при Ag-TLC. Поэтому линейная функциональная зависимость величин  $z$  от  $e$  была оп-

ределена для комплексов DAG при Ag-гpTLC отдельно для группы I:

$$z = 0.167e \quad (12)$$

и группы II:

$$z = 0.135e. \quad (13)$$

Видно, что эти группы заметно отличаются друг от друга по величине углового коэффициента. Значения  $z$ , вычисленные по уравнениям (12) и (13) и приведенные в табл. 1 (столбцы 7 и 8), в целом близки к найденным (столбец 6); несколько пониженная достоверность  $r$  для группы I вызвана присутствием в ней липидов с одинаковым значением  $e$  (StLi и PILi с  $e = 2$ , а также StLn и PILn с  $e = 3$ ), но с различным  $z$  при Ag-гpTLC. Как и в случае Ag-TLC (см. выше), правомерность выделения групп I и II для характеристики различий в линейной зависимости величин  $z$  от  $e$  была доказана вычислением достоверности  $r$  этой зависимости по уравнениям (12) и (13) для всей совокупности DAG (столбец 1). Полученные величины  $r$  (0.983 и 0.966 соответственно) были заметно ниже, чем при расчете  $r$  для отдельных групп (столбцы 7 и 8).

Ранее зависимость между величинами  $z$  и  $e$  ацилглицеринов при аргентационной обращенно-фазовой хроматографии, по-видимому, не определяли. В то же время было изучено разделение методом Ag-гpHPLC фенэтиловых и фенациловых эфиров кислот St, Ol, Li и Ln [5]. Величины их удерживания относительно соответствующих эфиров миристиновой кислоты были приведены в табл. III работы [5], а на рис. 4 той же работы – графики зависимости между величинами  $m$  эфиров насыщенных FA с 12–18 атомами углерода и  $lgk'$  этих эфиров при Ag-гpHPLC. Величины  $lgk'$  и  $k'$  фенэтиловых и фенациловых эфиров приведены в табл. 2 (столбцы 2, 3, 6 и 7). Использование этих величин в уравнении (3) позволило нам определить относительную подвижность ( $z$ ) индивидуальных фенэтиловых и фенациловых эфиров (столбцы 4 и 8). Сопоставление величин  $z$  и  $e$  (столбец 1) соответствующих эфиров между собой показало, что для фенэтиловых эфиров зависимость между этими величинами отвечала линейному уравнению

$$z = 0.15e + 0.15, \quad (14)$$

а для фенациловых эфиров – уравнению

$$z = 0.16e + 0.16. \quad (15)$$

Между найденными (столбцы 4 и 8) и вычисленными по уравнениям (14) и (15) величинами  $z$  (столбцы 5 и 9) наблюдается тесная корреляция. Таким образом, и в данном случае подвижность нейтральных липидов при аргентационной обращенно-фазовой хроматографии связана с их ненасыщенностью  $e$  простой линейной зависимостью:



**Таблица 2.** Функциональные зависимости относительной подвижности ( $z$ ) феноэтиловых и феноциловых эфиров жирных кислот от их ненасыщенности ( $e$ ) при Ag-гpHPLC [5]

Ацильный остаток эфира ( $e$ )	Эфиры жирных кислот							
	феноэтиловые				феноциловые			
	$\lg k'$ [5]	$k'$	$z$ , найдены	$z$ , вычислены по уравнению (14)	$\lg k'$ [5]	$k'$	$z$ , найдены	$z$ , вычислены по уравнению (15)
St(0)	0.85	7.0	0.12	0.15	0.55	3.5	0.22	0.16
Ol(1)	0.42	2.5	0.28	0.30	0.28	1.9	0.34	0.32
Li(2)	0.17	1.5	0.40	0.45	0.04	1.1	0.48	0.48
Ln(3)	-0.16	0.7	0.59	0.60	-0.30	0.5	0.67	0.64
$r^*$			0.996				0.994	

\*  $r$  – коэффициенты корреляции между величинами  $z$ , найденными и вычисленными по уравнениям (14) и (15).

Полученные нами данные позволили рассмотреть возможный механизм образования комплексов DAG и их взаимодействия с отдельными фазами хроматографической системы при Ag-гpTLC. В этих условиях реакция комплексообразования осуществляется только в среде метанола (см. “Эксперимент. часть”), образовавшиеся комплексы, как и при обычной гpTLC, в ходе разделения свободно распределяются между мобильной (полярной) и стационарной (липофильной) фазами TLC-системы [13], а длительного удерживания комплексов неподвижной фазой не происходит. При равном числе углеродных атомов  $m$  полярность DAG может увеличиваться лишь за счет присоединения ионов серебра к олефиновым связям, а наличие прямой линейной зависимости этого параметра от ненасыщенности  $e$  свидетельствует о том, что гидрофильные комплексы липидов образуются здесь путем обратимого взаимодействия каждой двойной связи только с одним ионом  $\text{Ag}^+$  [5].

## ВЫВОДЫ

Можно видеть, что разделение комплексов индивидуальных DAG при аргентационной жидкостной хроматографии обусловлено только различиями в их полярности, которые зависят прежде всего от различий в составе DAG. Как при Ag-TLC, так и при Ag-гpTLC величины  $z$  определяются значениями  $e$ ; хотя в последнем случае они, кроме того, зависят от суммарного числа углеродных атомов в ацильных остатках и числа ненасыщенных остатков [2, 12]. Тем не менее, как уже отмечалось выше, эти две разновидности аргентационной жидкостной хроматографии сильно отличаются друг от друга. При Ag-TLC серебряные комплексы образуются с координационными центрами DAG разной природы и только на поверхности адсорбента, механизм разделения комплексов является адсорбционным, а функциональная зависимость подвижности DAG ( $z$ ) от числа их

двойных связей ( $e$ ) является отрицательной и экспоненциальной. Напротив, при Ag-гpTLC серебряные комплексы формируются только с двойными связями, только в растворе и в соотношении 1 : 1; фракционирование комплексов происходит путем распределения между двумя жидкими фазами, а величина  $z$  комплексов связана с их ненасыщенностью  $e$  положительной линейной зависимостью. Таким образом, эти два вида зависимости отличаются друг от друга качественно.

В то же время сейчас становится все более очевидным, что полярность комплексов DAG и других липидов в условиях аргентационной жидкостной хроматографии зависит не только от их состава, но и от строения этих липидов и, в частности, – от их пространственной структуры. До сих пор эта последняя зависимость не учитывалась, и потому нередко наблюдавшееся разделение липидов с  $\Delta e = 0$  при аргентационной жидкостной хроматографии не находило удовлетворительного объяснения [3].

В настоящей работе влияние конформационных различий DAG на полярность их комплексов было прежде всего доказано обнаружением групп I и II в модельном препарате DAG. При образцово-фазовой хроматографии в отсутствие ионов серебра различия в конформации двух типов DAG с  $\Delta e = 0$  никак не сказывались на их полярности [13]. Однако после образования серебряных комплексов такие различия проявлялись весьма резко. Независимо от условий формирования этих комплексов (на поверхности адсорбента или в растворе), полярности компонентов группы I всегда значительно превышали полярности соответствующих компонентов группы II с  $\Delta e = 0$  – в 2–3 раза при Ag-TLC и на 30–40% в условиях Ag-гpTLC (табл. 1, столбцы 2 и 6). Объединение DAG, близких по конформации, в отдельные группы (I и II) позволило определить воздействие конформационного параметра DAG

на зависимость величины  $z$  от  $e$  при аргентационной жидкостной хроматографии. Было показано, что конформационные различия DAG качественно не изменяли эту зависимость (экспоненциальную при Ag-TLC и линейную при Ag-гpTLC), но оказывали значительное влияние на ее количественные характеристики, что выражалось в различии степеней  $e$  между уравнениями (1) и (2) и в аналогичном различии коэффициентов между уравнениями (12) и (13).

Кроме того, реальное воздействие пространственной структуры DAG на полярность их комплексов, а также сходство между Ag-TLC и Ag-гpTLC в отношении свойств этих комплексов были продемонстрированы и в другом нашем опыте. Этот опыт показал, что наиболее достоверная количественная оценка зависимости величин  $z$  комплексов DAG при Ag-гpTLC от их липофильности ( $L$ ) была достигнута путем определения  $L$  на основе адсорбционного параметра  $p$ , который был найден из результатов, полученных при использовании другой разновидности аргентационной жидкостной хроматографии – Ag-TLC, резко отличной от Ag-гpTLC. Наконец, влияние пространственной молекулярной структуры липидов на относительную полярность их комплексов при адсорбционной аргентационной жидкостной хроматографии было обнаружено (в опытах с TAG и метиловыми эфирами FA) и другими авторами [4, 8]. Следует полагать, что аналогичные данные будут в дальнейшем получены и с применением Ag-гpHPLC.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Как уже отмечалось выше, объектом нашего исследования служил модельный препарат растительных DAG; в настоящей работе этим термином мы обозначали только один из возможных позиционных изомеров DAG, а именно *rac*-1,2-DAG. Этот препарат был получен из смеси TAG масел семян какао, мака и льна методом каталитической переэтерификации TAG с глицерином [13]; он содержал по 20 мол. % остатков кислот Pl, St, Ol, Li и Ln.

DAG выделяли из продуктов этой реакции с помощью адсорбционной хроматографии на колонке и TLC на пластинке с силикагелем, импрегнированным борной кислотой [10]. Комплексы ненасыщенных DAG разделяли как методом непрерывной адсорбционной TLC на силикагеле, пропитанном 1% AgNO<sub>3</sub> с применением смеси хлороформ–изопропанол (99 : 1) в качестве мобильной фазы (Ag-TLC [10]), так и методом непрерывной распределительной обращенно-фазовой TLC в системе *n*-тетрадекан–5% раствор H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> в ме-

таноле, насыщенный AgNO<sub>3</sub> и *n*-тетрадеканом (Ag-гpTLC [11]). TLC-зоны DAG обнаруживали путем опрыскивания пластинки 5% водно-спиртовым раствором фосфорно-молибденовой кислоты и последующего нагревания при 120°C в течение 10 мин. Подвижность этих зон ( $z$ ) в условиях непрерывной Ag-TLC и Ag-гpTLC определяли по отношению к подвижности стандартов – *rac*-1,3-LiLi и *rac*-1,2-LnLn соответственно [10, 12].

DAG, индивидуальные по составу FA, идентифицировали в модельном препарате путем их сопоставления со стандартными смесями DAG известного состава по качественному и количественному составу отдельных TLC-зон и по их относительной подвижности [10]. Кроме того, исследуемый состав модельного препарата DAG сопоставляли со статистическим, т.е. с составом DAG, вычисленным на основе теории статистического распределения остатков FA между молекулами DAG; такое сопоставление было вполне допустимым, поскольку наш препарат был получен методом переэтерификации TAG, и, следовательно, состав его DAG мог быть только статистическим [13].

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 99-04-49208).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kalisz R. Quantitative Structure-Chromatographic Retention Relationships. N.Y.: Wiley-Interscience, 1987.
2. Vereshchagin A.G. // J. Chromatogr. 1965. V. 17. P. 382–386.
3. Christie W.W. // Progr. Lipid Res. 1994. V. 33. P. 9–18.
4. Nicolova-Damyanova B., Herzlöf B.G., Christie W.W. // J. Chromatogr. 1992. V. 609. P. 133–140.
5. Nicolova-Damyanova B., Christie W.W., Herzlöf B.G. // J. Chromatogr. 1993. V. 653. P. 15–23.
6. Dobson G., Christie W.W., Nicolova-Damyanova B. // J. Chromatogr. B. 1995. V. 671. P. 197–222.
7. Nicolova-Damyanova B., Herzlöf B.G., Christie W.W. // J. Chromatogr. A. 1995. V. 693. P. 235–239.
8. Nicolova-Damyanova B., Christie W.W., Herzlöf B.G. // J. Chromatogr. A. 1995. V. 694. P. 375–380.
9. Brenner R.R. // Progr. Lipid Res. 1984. V. 23. P. 69–96.
10. Pchelkin V.P., Vereshchagin A.G. // J. Chromatogr. 1991. V. 538. P. 373–383.
11. Fried B., Sherma J. Thin-Layer Chromatography: Techniques and Applications. N.Y., Basel: Marcel Dekker, 1986. P. 13.
12. Pchelkin V.P., Vereshchagin A.G. // J. Chromatogr. 1992. V. 603. P. 213–222.
13. Pchelkin V.P., Vereshchagin A.G. // J. Chromatogr. 1981. V. 209. P. 49–60.
14. Пчелкин В.П., Верещагин А.Г. // Докл. АН СССР. 1991. Т. 318. С. 473–476.

## Thin-Layer Chromatography of Coordination Ag<sup>+</sup>-Complexes of Plant Diacylglycerols

A. G. Vereshchagin<sup>#</sup> and V. P. Pchelkin

<sup>#</sup> Phone: +7 (095) 903-9351, fax, +7 (095) 977-8018, e-mail: ifr@ippras.ru

Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya ul. 35, Moscow, 127276 Russia

Coordination complexes of unsaturated *rac*-1,2-diacylglycerols (DAGs) with silver ions were separated by adsorption and reversed-phase TLC (Ag-TLC and Ag-rpTLC, respectively). During the Ag-TLC, the silver ion complexes were shown to be formed by the DAG coordination centers of various structures and only on the adsorbent surface. Separation of the complexes proceeds according to the adsorption mechanism, and there is an inverse exponential functional relationship between the DAG mobility and their double bond number. Meanwhile, during the Ag-rpTLC, the Ag<sup>+</sup>-complexes are formed only with double bonds, only in solution, and at a 1 : 1 ratio. The complexes are fractionated by partitioning between two liquid phases, and the relationship between the mobility and unsaturation of these complexes is directly proportional. Nevertheless, despite all the differences between the two TLC methods, the polarity of DAGs with a bent configuration of their acyl chains greatly exceeds that of DAGs with the same unsaturation but with the acyl-chain conformation close to extended: it is two to three times greater in Ag-TLC and 30–40% greater in Ag-rpTLC. In addition, the relationship between the mobility and unsaturation of DAG complexes exhibits quantitative rather than qualitative differences in both versions of argentation TLC. Thus, under all conditions of argentation liquid chromatography, the mobility of complexes and, therefore, their polarity are determined not only by their composition (unsaturation), but also by the spatial structure (conformation) of their molecules. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* adsorption capacity, adsorption TLC, Ag<sup>+</sup> complexes of lipids, DAG polarity (lipophilicity), diacylglycerols (DAGs), fatty acids, DAG spatial structure, reversed-phase TLC, TLC mobility