



УДК 54–386:577.125.53

Подбор оптимальных условий разделения фосфолипидных комплексов, полученных из семян подсолнечника

Сикорская А.С., Назарова А.А., Селеменев В.Ф.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 10.12.2009 г.

Аннотация

Подобраны оптимальные параметры разделения фосфолипидов, полученных из семян подсолнечника различными способами, методом тонкослойной хроматографии на примере стандартного образца лецитина, состоящего из 7 компонентов.

Ключевые слова: семена подсолнечника, фосфолипиды, тонкослойная хроматография, лецитин.

Optimum parameters of division of phospholipids received from sunflower seeds are picked up. The method of thin layer chromatography (TLC) was used on the standard Lecithin consisting of 7 components.

Keywords: Sunflower seeds, phospholipids, TLC method, Lecithin

Введение

В настоящее время существует множество методов анализа, при помощи которых можно определить качественный и количественный состав фосфолипидных комплексов (ФЛК) из различных источников. Однако практически все эти методы требуют достаточно сложного приборного оформления. Отдельно стоит метод тонкослойной хроматографии (ТСХ), который позволяет быстро и без особых затрат определить состав фосфолипидных комплексов. К достоинствам этого метода следует отнести простоту выполнения, экспрессность и доступность реактивов и оборудования. Недостатком этого метода является невысокая точность при определении количественного состава, что, однако, можно исправить путем обработки данных специальной программой на ПК.

В нашей работе была поставлена цель выбрать оптимальные параметры определения фосфолипидов (ФЛ), выделенных из семян подсолнечника, при исследовании фосфолипидного комплекса методом ТСХ.

В опубликованных ранее работах [1] оптимальной для разделения фосфолипидов была признана система хлороформ - ацетон - метанол - уксусная кислота - вода в соотношении 12:6:3:3:1. Однако в условиях разделения фосфолипидных комплексов, полученных из семян подсолнечника, такая система

оказалась неэффективной. Это объясняется тем, что, помимо целевых компонентов, в таких комплексах содержатся и другие вещества, присутствие которых сильно ухудшает картину разделения. Поэтому была проведена работа по подбору оптимальной системы для разделения и определения ФЛ.

Эксперимент

Элюенты для анализа методом ТСХ готовились смешиванием компонентов в указанных соотношениях (табл.1) непосредственно перед использованием. В процессе приготовления смешанных элюентов нужно обратить внимание на точную дозировку компонентов, поскольку даже небольшие изменения состава смеси могут привести к изменению величины R_f .

Таблица 1. Полярность различных элюирующих систем, используемых для разделения фосфолипидов

| № | Системы | Соотношение растворителей | Полярность |
|---|--|---------------------------|------------|
| 1 | хлороформ-ацетон-метанол-уксусная кислота-вода | 8 : 4 : 2 : 2 : 1 | 5,33 |
| 2 | хлороформ-метанол | 19,5 : 7,5 | 4,94 |
| 3 | хлороформ-метанол | 19 : 9 | 5,04 |
| 4 | хлороформ-метанол-вода | 19,5 : 7,5 : 0,5 | 5,01 |
| 5 | хлороформ-метанол-уксусная кислота | 19,5 : 7,5 : 0,5 | 4,96 |
| 6 | хлороформ-метанол-уксусная кислота-вода | 50 : 25 : 8 : 4 | 5,35 |

На первом этапе работы для выбора системы нами был взят стандартный образец лецитина фирмы ICN Biomedical. Лецитин, выделенный из соевых бобов, по существу представляет собой смесь ФЛ, основным компонентом которой являются фосфатидилхолин (21%), фосфатидилэтаноламин (23%) и фосфатидилинозитол (19%). Кроме того, в состав лецитина входят лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин.

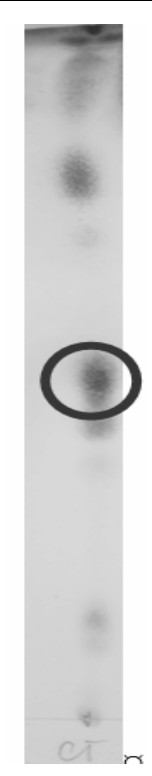


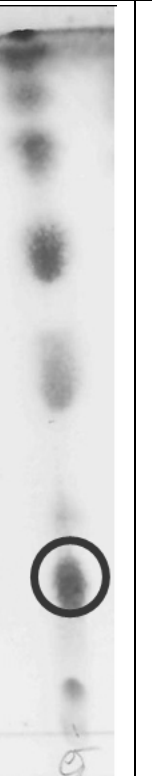
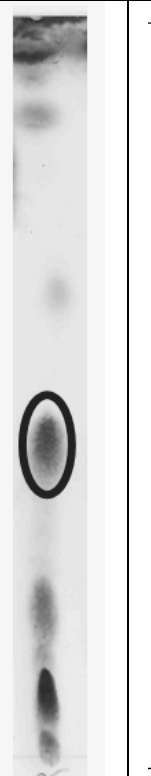
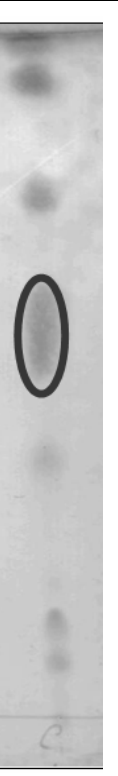
Для анализа использовались пластины марки Sorbfil. После нанесения проб стандартного образца концентрацией 5 мг/мл пластины помещались в камеру, насыщенную парами элюента. После поднятия фронта растворителя на 8 см пластины извлекались и просушивались. В качестве проявителя использовали 5%-ный спиртовой раствор фосфорномолибденовой кислоты (ФМК) и 1%-ный раствор нингидрина. Далее полученные хроматограммы были отсканированы на сканере Canon MP 180 и обработаны компьютерной программой Sorbfil TLC Videodensitometer.

Обсуждение результатов

В качестве определяемого вещества был выбран фосфатидилхолин, так как он является одним из основных компонентов фосфолипидного комплекса и присутствует в любых экстрактах или ФЛК, полученных из подсолнечного масла.

Хроматограммы разделения представлены в табл. 2 (на хроматограммах обозначены зоны основного компонента фосфолипидных комплексов - фосфатидилхолина).

Таблица 2. Хроматограммы стандартного вещества лецитина в различных системах

| № | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------|--|--|--|---|--|--|
| Состав | Хлороформ-ацетон-метанол-укс.к-та-вода (8:4:2:2:1) | Хлороформ-метанол (19,5: 7,5) | Хлороформ-метанол (19:9) | Хлороформ-метанол-вода (19,5: 7,5:0,5) | Хлороформ-метанол-укс. к-та (19,5: 7,5:0,5) | Хлороформ-метанол-укс. к-та-вода (50:25:8:4) |
| Хроматограммы |  |  |  |  |  |  |

Как видно из рисунков, размещенных в табл. 2, системы №№ 2, 3, 5 не подходят для разделения фосфолипидов, так как многие компоненты, особенно фосфатидилхолин, остаются в нижней части хроматограммы и плохо разделяются. Однако для выбора системы растворителей, наиболее подходящей для анализа фосфолипидов, был проведен расчет параметров хроматографирования, характеризующих эффективность разделения.

Положение каждой зоны характеризуется величиной R_f – относительной скоростью перемещения компонента, которую определяют как отношение расстояния, пройденного веществом от точки нанесения пробы до центра зоны (Z_x), к расстоянию, пройденному элюентом от стартовой линии до линии фронта (Z_f):

$$R_f = \frac{Z_x}{Z_f}. \quad (1)$$

Величина R_f является индивидуальной характеристикой соединения, хроматографируемого в данном растворителе, и изменяется от 0 до 1.

Из определения подвижности компонента следует выражение для измерения фактора удерживания K :

$$K = \frac{1 - R_f}{R_f}, \quad (2)$$

где величина $(1 - R_f)$ пропорциональна количеству растворенного вещества в неподвижной фазе, а величина R_f пропорциональна количеству растворенного вещества в подвижной фазе.

Эффективность процесса хроматографирования характеризует высота, эквивалентная теоретической тарелке (H) и число теоретических тарелок (N).

Высоту, эквивалентную теоретической тарелке (ВЭТТ), можно рассчитать как отношение дисперсии пятна к длине пути, пройденного пятном:

$$H = \frac{\sigma_x^2}{Z_x}, \quad (3)$$

где σ_x – стандартное отклонение дисперсии пятна.

Число теоретических тарелок рассчитывается как отношение длины пути, пройденного растворителем от линии старта до линии фронта, к ВЭТТ:

$$N = \frac{Z_f}{H}. \quad (4)$$

Расчитанные параметры приведены в табл. 3.

Таблица 3. Параметры хроматографирования, характеризующие эффективность различных систем при определении фосфатидилхолина

| № | Система | R_f | K | H , мм | N |
|---|--|-------|------|----------|--------|
| 1 | Хлороформ – ацетон – метанол – уксусная кислота – вода (8:4:2:2:1) | 0,49 | 1,04 | 0,10 | 830,00 |
| 2 | Хлороформ – метанол (19,5:7,5) | 0,24 | 3,17 | 0,50 | 150,00 |
| 3 | Хлороформ – метанол (19:9) | 0,25 | 3,00 | 0,45 | 175,56 |
| 4 | Хлороформ – метанол – вода (19,5:7,5:0,5) | 0,21 | 3,76 | 0,42 | 169,05 |
| 5 | Хлороформ – метанол -уксусная кислота (19,5:7,5:0,5) | 0,43 | 1,33 | 0,24 | 366,67 |
| 6 | Хлороформ – метанол -уксусная кислота - вода (50:25:8:4) | 0,56 | 0,79 | 0,22 | 463,64 |

Из данных табл. 3 видно, что самые высокие значения числа теоретических тарелок, а, следовательно, и самые низкие значения ВЭТТ наблюдаются в системах № 1 и 6. В системе №1 не все компоненты лецитина разделяются (в данном образце содержится 7 компонентов). Следовательно, для определения качественного состава ФЛК данная система непригодна, так как не позволяет определить все фосфолипиды. Из всего вышесказанного видно, что оптимальной системой для определения фосфолипидов является система № 6.

Далее был проведен качественный анализ фосфолипидов, входящих в ФЛК. Предварительно нами были получены значения относительной скорости перемещения различных фосфолипидов в выбранной нами системе растворителей,

которые затем сравнивались с данными, приведенными в литературе. Результаты приведены в табл. 4.

Таблица 4. Значения R_f различных фосфолипидов

| ФЛ | R_f | |
|---------------------------------|---------|-------------|
| | лит.[2] | практ. |
| Лизофосфатидилхолин (ЛФХ) | 0,10 | 0,14 |
| Лизофосфатидилэтаноламин (ЛФЭА) | 0,22 | 0,20 |
| Фосфатидилинозитол (ФИ) | 0,31 | 0,31 |
| Фосфатидилхолин (ФХ) | 0,55 | 0,54 |
| Фосфатидилсерин (ФС) | 0,66 | 0,67 |
| Фосфатидилэтаноламин (ФЭА) | 0,83 | 0,83 |
| Примеси нейтральных липидов | - | 0,95 – 1,00 |

Из данных табл.4 видно, что практически все фосфолипиды имеют значения R_f , сходные с данными из литературы. Исключение составляет только лизофосфатидилхолин, у которого разница в R_f между литературными и практическими результатами составляет 0,4. Однако это можно объяснить неполной идентичностью условий хроматографирования. Как известно, относительная скорость перемещения фосфолипидов очень чувствительна к малейшим изменениям полярности системы и соотношения компонентов. Именно этим причинам мы приписываем различие в R_f , обнаруженное нами. Кроме того, в данной области на хроматограмме находится только один фосфолипид, имеющий значения R_f ниже 0,15, а все остальные липиды имеют R_f больше 0,20. Следовательно, веществом на полученной нами хроматограмме с R_f 0,14 является лизофосфатидилхолин.

Все пластины обрабатывались двумя реагентами – ФМК и нингидрином. Как известно [3], нингидрин проявляет аминокислоты и фосфолипиды. Результаты обработки пластин нингидрином подтверждают полученные нами результаты: на таких пластинах ясно были видны пятна розового цвета, принадлежащие фосфатидилэтаноламину, и неяркие пятна желтого цвета, соответствующие фосфатидилсерину.

Таким образом, в результате проведенных исследований мы подобрали параметры разделения фосфолипидных комплексов, полученных из семян подсолнечника. Данная методика будет в дальнейшем применяться для экспресс-анализа фосфолипидного состава как непосредственно семян, так и отходов, получаемых в процессе отжима масла.

Список литературы

1. Сафонова Е.Ф. Выбор оптимальных параметров разделения фосфолипидов в тонком слое сорбента / Е.Ф. Сафонова [и др.] // Химико-фармацевтический журн. 2002. Т.36. №4. С.41-43.
2. Арутюнян Н.С., Корнена Е.П. Фосфолипиды растительных масел. М.: Агропромиздат, 1986. С. 3-105.
3. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. В 2-х т. / Под ред. В.Г. Березкина. / Т. 1 / Пер. с англ. Под ред. Д.Н. Соколова, М.И. Яновского. М.: Мир, 1981. 616 с.

4. Кейтс М. Техника липидологии / Пер. с англ. Под ред. В.А. Вавера. М.: Мир, 1975. 322 с.

5. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии. М., 1988. С. 31-85.

Сикорская Анна Сергеевна – бакалавр каф. аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, тел. (4732) 20-89-32

Назарова Александра Александровна – ассистент каф. аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, тел. (4732) 20-89-32

Селеменев Владимир Федорович – заведующий кафедры аналитической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, тел. (4732) 20-89-32

Sikorskaya Anna S. – the bachelor of the department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, e-mail: mablen@yandex.ru

Nazarova Alexandra A. – ass. of the department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, e-mail: march_rabbit@list.ru

Selemenev Vladimir F. – professor, head of the department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, e-mail: common@chem.vsu.ru