

УДК 543.54+543.544+541.49

РАСЧЕТ ГИДРОФОБНОСТИ ЛИПИДНЫХ МОЛЕКУЛ ПО ЭЛЮИРУЮЩЕЙ СИЛЕ РАСТВОРИТЕЛЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

© 2020 г. В. П. Пчёлкин*

*Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева Российской академии наук
Ботаническая ул., 35, Москва, 127276 Россия*

**e-mail: pchel_up@ippras.ru*

Поступила в редакцию 02.02.2019 г.

После доработки 21.03.2019 г.

Принята к публикации 01.11.2019 г.

Рассчитаны значения относительной полярности и гидрофобности главных классов ацилсодержащих глицеролипидов. Эти значения, полученные с помощью стандартных величин элюирующей силы растворителей (от *n*-гексана до воды), могут принадлежать шкалам относительной полярности и гидрофобности, включающим многообразие органических соединений природного происхождения. В качестве условных границ обеих этих шкал, охватывающих диапазон от 0 до 100, предложено использовать *n*-гексадекан и воду. Вариации усредненных уровней относительной полярности отдельных классов природных смесей глицерофосфолипидов, которые могут быть установлены после их адсорбционной жидкостной хроматографии, зависят не только от состава использованных фаз, но и от видового состава липидов. Показана тесная взаимосвязь этих уровней с углеродными числами отдельных молекул.

Ключевые слова: липиды, гидрофобность, тонкослойная хроматография.

DOI: 10.31857/S0044450220050175

Полный учет всех компонентов клеточных мембран в фиксированный момент времени их существования часто необходим с целью корректной оценки как фенотипических различий внутри одного и того же биологического вида каждого представителя животного и растительного мира, так для максимального охвата всего диапазона генотипического разнообразия природных объектов. Процесс эволюции многообразных биологических видов флоры и фауны окружающего мира в постоянно меняющихся условиях внешней среды сформировал к настоящему времени в этих клетках весьма специфичные и в некоторой мере ограниченные в своем разнообразии характерные комбинации молекул различных классов липидов. Эти комбинации обладают специфичными для условий окружающей их среды характеристиками, которые должны обеспечить выживаемость конкретного биологического объекта в часто меняющихся условиях такой среды, в том числе с целью регуляции в данном объекте разнообразных метаболических процессов, в которые могут быть вовлечены десатуразы жирных кислот [1].

Каждую из них отличает от прочих прежде всего общее число (*m*) атомов углерода (C) в молеку-

ле. Между тем, несмотря на все разнообразие жирных кислот, число таких атомов в алифатической цепи молекул разных классов липидов природного происхождения, как правило, варьирует в относительно узком интервале (преимущественно от 12 до 24), причем среди значений *m* углеводородных цепей обычно доминируют величины 16 и 18. В то же время цепи с одним и тем же числом *m* часто отличаются друг от друга наличием олефиновых связей (*e*), присутствие которых неизбежно придает таким молекулам новые физико-химические характеристики и резко снижает их общую гидрофобность. Результат анализа возможных вариаций гидрофобности для всей совокупности таких молекул можно представить в виде некой последовательности значений, установленных для молекул любого класса липидов природного происхождения на том отдельном участке общей шкалы липофильности, который охватывает лишь часть диапазона величин гидрофобности органических соединений.

Выбор характерного представителя класса углеводородов в качестве одного из двух пограничных “реперных” соединений для данной шкалы продиктован величинами *m*, обычно доминирующими в подавляющем большинстве липидных

молекул природного происхождения. В качестве индивидуальных соединений были взяты *n*-гексадекан ($C_{16}H_{30}$), длина цепи которого наиболее удовлетворительно совпадает с таковой в молекулах ацилсодержащих фосфо- и гликолипидов биологических мембран, а также глицерин, являющийся главным структурным элементом молекул различных классов этих липидов. Длинные цепи углеводов, которые служат основой гидрофобной структуры всех глицеролипидов, наиболее эффективно функционируют лишь в режиме тех же температур, что и температура плавления $C_{16}H_{30}$.

Эквивалентные длины цепей (ЭДЦ) ацильных остатков липидных молекул или величины их эквивалентной липофильности L_1 (гидрофобности) зависят не только от числа m , но и от значения e , которые резко снижают данную величину и могут быть вычислены для каждой такой молекулы: $L_1 = m - 2e$ [2]. Такие величины часто удовлетворительно отражают последовательность элюирования большинства молекул одного и того же класса нейтральных липидов в обращено-фазовой жидкостной хроматографии (ОФ ЖХ). Вместе с тем последовательность элюирования молекул ненасыщенных видов полярных липидов, помимо их величин L_1 , может быть лучшим образом описана расчетными значениями L_2 : $L_2 = m - 2e - u$, где $u = 0.96 \pm 0.17$ – общее число олефиновых цепей в каждой такой молекуле [3]. Тот индивидуальный (молекулярный) вид данного класса ацилсодержащих липидов, который имеет большую величину L_2 , как правило, отличается в планарном или колоночном варианте ОФ ЖХ на частицах силикагеля с привитыми углеводородными цепями заметно меньшей подвижностью, чем его молекулярный вид с одним и тем же значением L_1 ; наоборот, в случае адсорбционной ЖХ на однородных частицах силикагеля без привитых углеводородных цепей он, как правило, находится именно во фронтальной области зоны элюирования такого класса. В случае невысокой эффективности адсорбционной ЖХ эти индивидуальные виды, т.е. отдельные молекулы в составе их смесей, которые принадлежат к одному и тому же классу липидов и специфичны для каждого биологического объекта, часто не образуют при фракционировании отдельные зоны, причем молекулы с наиболее низкими значениями L_1 и L_2 обычно завершают собой весь процесс элюирования.

Нейтральные липиды отличает особенно высокое число таких молекул [4]. Если обратить внимание на разнообразие животных жиров и растительных масел, обязательно входящих в состав запасяющих структур подавляющего большинства объектов природного происхождения, то можно заметить, что в них обнаружено несколько сотен индивидуальных видов жирных

кислот, тогда как общее число индивидуальных компонентов в составе белков и нуклеотидов практически на порядок ниже [5]. Диапазон значений L_1 и L_2 отдельных молекул триацилглицеринов природного происхождения является весьма широким; число индивидуальных видов всех триацилглицеринов, которые возможны при статистическом распределении ацильных остатков, растет практически в геометрической прогрессии при увеличении разнообразия индивидуальных жирных кислот, входящих в их состав. Вместе с тем в природной среде это число видов в значительной мере ограничено стандартными условиями существования биологических структур, что несколько сужает возможный разброс молекулярных компонентов многих смесей нативных триацилглицеринов по шкале гидрофобности липофильных соединений.

Процесс идентификации отдельных молекул эфиров жирных кислот различной ненасыщенности после проведения газожидкостной хроматографии их смесей обычно связан с использованием ЭДЦ, которые всегда жестко привязаны к углеродной шкале [4]. При этом реперными величинами наиболее часто являются именно четные значения ЭДЦ, по-видимому, благодаря наиболее широкому распространению соответствующих жирных кислот в липидах большинства объектов природного происхождения. При градиенте состава подвижной фазы в условиях адсорбционной ЖХ тех многокомпонентных смесей липидов, которые имеют очень широкий диапазон значений полярности отдельных молекул, точная количественная оценка гидрофобности каждой отдельно взятой молекулы в системе *n*-октанол–вода ($\log P$) часто представляет собой, к сожалению, практически трудно реализуемую задачу.

Ранее оценка усредненной величины гидрофобности набора молекул одного и того же класса липидов была сделана в том компартменте занимаемой им зоны, где вариация концентрации какого-либо класса липидов при изменении времени его удерживания (ее первая производная) принимала значение, равное нулю, т.е. когда концентрация данного класса в этой зоне достигала своего максимального уровня [6]. В ходе настоящей работы предпринята попытка уточнить при тонкослойной хроматографии (ТСХ) наиболее вероятные границы диапазона разброса значений эквивалентной липофильности молекул каждой отдельно взятой ее зоны, принадлежавшей одному и тому же классу липидов природного происхождения в стандартных условиях адсорбционной ЖХ на однородных частицах силикагеля.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Адсорбционную ТСХ позиционных изомеров модельной смеси 15 индивидуальных видов диа-

цилглицеринов – гидрофобной основы молекул большинства классов липидов биомембран – проводили в подвижной фазе хлороформ–изо-пропанол (99 : 1, по объему) на пластинках с закрепленным слоем силикагеля G (Merck), который включал 2% ионов Ag^+ [7]. Кроме значений относительной подвижности (R_f) отдельных компонентов этой смеси, для дальнейшего расчета взяты известные уровни R_f различных классов других липидов, также полученные путем адсорбционной ТСХ [8]. На первом этапе обработки исходных данных эти уровни были предварительно преобразованы в соответствующие им факторы удерживания k по формуле $k = R_f^{-1} - 1$ [9].

Кроме того, для расчета значения элюирующей силы смеси растворителей P' использовали стандартные величины P' тех чистых растворителей, которые входили в состав системы для адсорбционной ТСХ; при этом предполагали, что значение P'_{mol} является аддитивным и представляет собой сумму произведений молярной доли каждого растворителя в такой смеси на параметр P' , который может служить мерой элюирующей силы в распределительной хроматографии [9]. В ходе дальнейшей обработки данных сделали допущение, что величины произведений фактора удерживания отдельных классов липидов (k_i) на частицах силикагеля одного и того же типа связаны не только свойствами обеих фаз, но и с характерными для таких классов усредненными уровнями их относительной полярности: $(P'_{\text{mol}})_i = P'_{\text{mol}} k_i$.

С учетом такого допущения ряд произведений величин полярности каждой подвижной фазы (P'_{mol}) и последовательности значений k_i вполне можно представить в качестве массива уровней $(P'_{\text{mol}})_i$, удовлетворительно отражающих относительную полярность отдельных классов самих липидов. Расчетные значения P'_{mol} для каждой подвижной фазы оценивали, исходя не только из свойств ее отдельных компонентов, но и из их молярной доли в этой фазе, так как эти доли точнее, чем массовые, характеризуют получаемые аддитивные уровни полярности P'_{mol} самих фаз. Поэтому во всех последующих расчетах наряду с традиционными объемными соотношениями (P'_{vol}) между отдельными компонентами обсуждаемых ТСХ-систем использовали именно молярные доли.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Значения P'_{mol} и P'_{vol} для каждой из трех подвижных фаз, использованных для ТСХ фосфо- и гликолипидов, а также соответствующие им

уровни $(P'_{\text{mol}})_i$ и $(P'_{\text{vol}})_i$ отдельных классов этих липидов представлены в табл. 1–3. Наиболее подходящей парой для фиксации реперных значений P'_i оказались два фосфолипида – фосфатилхолин и фосфатидилэтаноламин, которые представляют собой главные классы из всего разнообразия полярных ацилсодержащих фосфолипидов и почти всегда в тех или иных количествах присутствуют в составе большинства природных липидных смесей. С помощью пары этих значений оценили величины P'_i всех остальных классов липидов в трех подвижных фазах стандартного состава; две из таких фаз включали помимо хлороформа, метанола и воды либо уксусную кислоту, либо водный раствор аммиака и заметно отличались друг от друга кислой или щелочной реакцией среды (табл. 2 и 3 соответственно).

Кроме того, в состав табл. 1–3 также включены значения гидрофобности (HB) $_i$ молекул глицеролипидов, обратно пропорциональные их уровням $(P'_{\text{mol}})_i$ и $(P'_{\text{vol}})_i$: $(\text{HB}_{\text{mol}})_i = (P'_{\text{mol}})_i^{-1}$ и $(\text{HB}_{\text{vol}})_i = (P'_{\text{vol}})_i^{-1}$. Введение нового параметра (HB) $_i$ в дополнение к уровню (P') $_i$, который вполне удовлетворительно отражает относительную полярность этих молекул в подвижных фазах разного состава, позволило заметно снизить величину погрешности, что было особенно актуально при определении абсолютных величин этого параметра для высокополярных липидов. Для расчета величин HB_i липидных молекул для той же системы использованы стандартные уровни $hR_f = 100(R_f)_i$ [7]. В результате этого расчета массивы произведенных значений k отдельных классов липидов на величину P' подвижной фазы известного состава можно представить в качестве неких усредненных уровней полярности индивидуальных (молекулярных) видов липидов каждого такого класса, чьи молекулы характеризуются различной длиной и ненасыщенностью углеводородных цепей, а следовательно, собственными значениями L_1 и L_2 . Эти массивы, т.е. расчетные величины P'_i и HB_i , а также значения десятичных логарифмов HB_i главных классов липидов и их метаболических предшественников представлены в табл. 1–3; все данные получены, исходя либо из объемных, либо из молярных соотношений между отдельными компонентами подвижных фаз с различными концентрациями H_3O^+ ($2 \leq \text{pH} \leq 10$).

Из табл. 1–3 можно видеть, что независимо от состава подвижной фазы величины P' и HB у фосфатилхолина находятся на почти одном и том же уровне (10.8 ± 1.4 и 0.10 ± 0.02 соответственно). Вместе с тем в подвижной фазе с $\text{pH} > 7$ значение P' для фосфатидилэтаноламина трех-

Таблица 1. Параметры классов полярных липидов, рассчитанные из данных тонкослойной хроматографии в нейтральной подвижной фазе [8]

Класс липидов	R_f	k	$(P'_i)_{vol}^*$	$(P'_i)_{mol}^{**}$	$(HB_i)_{vol}^*$	$(HB_i)_{mol}^{**}$	$lg(HB_i)_{vol}^*$	$lg(HB_i)_{mol}^{**}$
N-Me-PtdEtn	0.83	0.21	0.9	1.1	1.06	0.92	0.02	-0.04
Gal ₁ acyl ₂ Gro	0.77	0.30	1.4	1.6	0.72	0.63	-0.14	-0.20
PtdOH	0.74	0.35	1.6	1.9	0.62	0.54	-0.21	-0.27
Ptd ₂ Gro	0.71	0.41	1.9	2.2	0.53	0.46	-0.28	-0.34
LysoPtdOH	0.70	0.43	2.0	2.3	0.50	0.44	-0.30	-0.36
PtdEtn	0.62	0.61	2.8	3.2	0.35	0.31	-0.45	-0.51
Gal ₂ acyl ₂ Gro	0.62	0.61	2.8	3.2	0.35	0.31	-0.45	-0.51
N,N-Me ₂ PtdEtn	0.52	0.92	4.3	4.9	0.23	0.20	-0.63	-0.69
PtdGro	0.48	1.08	5.0	5.7	0.20	0.17	-0.70	-0.76
PtdCho	0.33	2.03	9.4	10.8	0.11	0.09	-0.97	-1.03
PtdIns	0.23	3.35	15.5	17.7	0.06	0.06	-1.19	-1.25
PtdSer	0.15	5.67	26.2	30.0	0.04	0.03	-1.42	-1.48

* Смесь CHCl₃-CH₃OH-вода (65 : 25 : 4, по объему), $P' = 4.626$; ** смесь CHCl₃-CH₃OH-вода (49 : 37.5 : 13.5, молярные доли), $P' = 5.298$.

Классы липидов: N-Me-PtdEtn – N-метилфосфатидилэтаноламин, Gal₁acyl₂Gro – моногалактозилдиацилглицерин, PtdOH – фосфатидная кислота, Ptd₂Gro – дифосфатидилглицерин, LysoPtdOH – лизофосфатидная кислота, PtdEtn – фосфатидилэтаноламин, Gal₂acyl₂Gro – дигалактозилдиацилглицерин, N,N-Me₂PtdEtn – N,N-диметилфосфатидилэтаноламин, PtdGro – фосфатидилглицерин, PtdCho – фосфатидилхолин, PtdIns – фосфатидилинозит, PtdSer – фосфатидилсерин.

Таблица 2. Параметры классов полярных липидов, рассчитанные из данных тонкослойной хроматографии в подвижной фазе, включавшей уксусную кислоту (pH ≥ 2) [8]

Класс липидов	R_f	k	$(P'_i)_{vol}^*$	$(P'_i)_{mol}^{**}$	$(\Delta P'_i)^{***}$	$(HB_i)_{vol}^*$	$(HB_i)_{mol}^{**}$	$lg(HB_i)_{vol}^*$	$lg(HB_i)_{mol}^{**}$
PtdEtn	0.83	0.21	1.0	1.1	-1.8/-2.1	1.01	0.89	0.00	-0.05
N,N-Me ₂ PtdEtn	0.66	0.52	2.5	2.8	-1.8/-2.1	0.40	0.35	-0.40	-0.45
N-Me-PtdEtn	0.62	0.61	3.0	3.4	2.0/2.3	0.34	0.30	-0.47	-0.53
PtdSer	0.55	0.82	4.0	4.5	-22.2/-25.5	0.25	0.22	-0.60	-0.65
PtdIns	0.47	1.13	5.5	6.2	-10.0/-11.6	0.18	0.16	-0.74	-0.79
PtdCho	0.31	2.23	10.8	12.2	-1.4/-1.4	0.09	0.08	-1.03	-1.09
LysoPtdCho	0.10	9.00	43.7	49.2	-	0.02	0.02	-1.44	-1.50

* Смесь CHCl₃-CH₃OH-CH₃COOH-вода (65 : 25 : 15 : 4, по объему), $P' = 4.857$; ** смесь CHCl₃-CH₃OH-CH₃COOH-вода (36 : 43 : 12.9 : 8.1, молярные доли), $P' = 5.47$; *** в числителе приведены значения, рассчитанные по объему компонентов подвижной фазы $(P'_i)_{vol}$, в знаменателе – согласно молярным долям тех же компонентов $(P'_i)_{mol}$.

Классы липидов: PtdEtn – фосфатидилэтаноламин, N-Me-PtdEtn – N-метилфосфатидилэтаноламин, N,N-Me₂PtdEtn – N,N-диметилфосфатидилэтаноламин, PtdSer – фосфатидилсерин, PtdIns – фосфатидилинозит, PtdCho – фосфатидилхолин, LysoPtdCho – лизофосфатидилхолин.

кратно возрастает (табл. 2), а его вариация положительна ($\Delta P' = 4.2 \pm 0.3$ в зависимости от взятого соотношения между отдельными элюентами этой подвижной фазы), тогда как для другой подвижной фазы с pH < 7 она отрицательна ($\Delta P' = (-2.0) \pm (-0.2)$, табл. 3). Тот же резкий рост селективности разделения имеет место не только для этих главных фосфолипидов, но и для тех классов глицерофосфатидов, которые имеют в составе молекул частично блокированную аминогруппу (N-

Me-PtdEtn и N,N-Me₂PtdEtn) и отличаются друг от друга противоположным знаком уровня $\Delta P'_i$ (2.1 ± 0.2 и -2.1 ± ± (-0.2) соответственно). В то же время уровень P' молекул фосфатидилсерина в подвижной фазе с pH < 7 претерпевает почти шестикратное падение ($\Delta P' = -24 \pm 2$), тогда как использование фазы с pH > 7 приводит к его трехкратному росту ($\Delta P' = 24 \pm 1$). В случае фосфатидной кислоты этот рост уже пятидесятикратен, а вариации усредненных величин P' для ис-

Таблица 3. Параметры классов полярных липидов, рассчитанные из данных тонкослойной хроматографии в подвижной фазе, включавшей аммиак ($pH \geq 8$) [8]

Класс липидов	R_f	k	$(P'_i)_{vol}^*$	$(P'_i)_{mol}^{**}$	$(\Delta P'_i)^{***}$	$(HB_i)_{vol}^*$	$(HB_i)_{mol}^{**}$	$lg(HB_i)_{vol}^*$	$lg(HB_i)_{mol}^{**}$
PtdEtn	0.41	1.4	6.7	7.7	3.9/4.5	0.15	0.13	-0.83	-0.89
Ptd ₂ Gro	0.38	1.6	7.6	8.8	5.8/6.6	0.13	0.11	-0.88	-0.94
PtdGro	0.37	1.7	8.0	9.2	3.0/3.4	0.13	0.11	-0.90	-0.96
PtdCho	0.33	2.0	9.5	10.9	0.1/0.2	0.11	0.09	-0.98	-1.04
LysoPtdEtn	0.20	3.9	18.4	21.1	—	0.05	0.05	-1.26	-1.32
PtdIns	0.11	8.1	37.9	43.5	22.4/25.8	0.03	0.02	-1.58	-1.64
LysoPtdCho	0.08	11.5	53.9	61.8	—	0.02	0.02	-1.73	-1.79
PtdOH	0.05	19.0	89.0	102.1	87.4/100.3	0.01	0.01	-1.95	-2.01
PtdSer	0.05	19.0	89.0	102.1	62.8/72.1	0.01	0.01	-1.95	-2.01
LysoPtdOH	0.05	19.0	89.0	102.1	87.0/99.0	0.01	0.01	-1.95	-2.01

* Смесь $CHCl_3-CH_3OH$ -водный раствор NH_3 (65 : 25 : 4, по объему), $P' = 4.684$; **смесь $CHCl_3-CH_3OH$ -водный раствор NH_3 (49 : 37.5 : 13.5, молярные доли), $P' = 5.298$; ***величины $\Delta P'_i$, которые приведены в числителе, рассчитаны по объему компонентов подвижной фазы $(\Delta P'_i)_{vol}^*$, в знаменателе – согласно молярным долям тех же компонентов $(\Delta P'_i)_{mol}^{**}$.

Классы липидов: PtdEtn – фосфатидилэтаноламин, Ptd₂Gro – дифосфатидилглицерин, PtdGro – фосфатидилглицерин, PtdCho – фосфатидилхолин, LysoPtdEtn – лизофосфатидилэтаноламин, PtdIns – фосфатидинозит, LysoPtdCho – лизофосфатидилхолин, PtdOH – фосфатидная кислота, PtdSer – фосфатидилсерин, LysoPtdOH – лизофосфатидная кислота.

пытанной смеси ее индивидуальных (молекулярных) видов особенно значительны ($\Delta P' = 94 \pm 6$). Близкий результат получен для смеси молекул фосфатидинозита ($\Delta P' = (-11) \pm (-1)$ и 24 ± 2 соответственно).

Предлагаемый подход позволяет количественно оценить взаимосвязь весьма условных усредненных относительных величин P'_i природных смесей отдельных классов глицеролипидов с присутствием или отсутствием фосфоэфирной группы в их молекулах, а также с наличием в последних иных дополнительных полярных или неполярных заместителей. Кроме того, появляется шанс оценить возможный вклад в эту величину вариаций структуры гидрофобной основы этих молекул. Следует отметить, что удерживание в адсорбционной ТСХ двух главных классов гликолипидов природного происхождения (моногалактозил- и дигалактозилдиацилглицеринов), молекулы которых не содержат такой группы, не претерпевает в диапазоне $2 \leq pH \leq 10$ столь заметных перемен. Таким образом, можно предположить правомерность использования предложенного подхода с целью расчета величин P'_i и HB_i для иных классов липидов. В качестве примера в табл. 4 представлены усредненные уровни P'_i , HB_i и $lg(HB_i)$ молекул главных классов нейтральных липидов, которые были получены, исходя из из-

вестных значений R_f , установленных другими авторами [8]. Можно видеть, что эти уровни вполне удовлетворительно отражают усредненную гидрофобность всех молекул отдельного класса таких липидов, каждая из которых имеет собственные значения L_1 и L_2 .

Полученные данные показывают, что величины P'_i , усредненные по всем индивидуальным видам отдельных классов липидов, варьируют в относительно узком интервале, причем максимальное отклонение этих величин друг от друга можно наблюдать только для высокополярных соединений, где уровень возможной погрешности определения точных значений параметра $(R_f)_i$ наиболее высок. Удовлетворительная корреляция между данными значениями и величинами P'_i отдельных классов липидов дает возможность расположить такие величины в некоторой последовательности их роста. Кроме того, ряд значений HB_i тех же классов может быть представлен в качестве совокупности элементов шкалы гидрофобности липидов, величины которой варьируют от 0 до 100 и границами которой могут служить параметры стандартной двухфазной смеси (высший углеводород/вода).

Анализ результатов проведенного расчета позволяет сделать вывод о том, что значения P'_i и HB_i вполне удовлетворительно отражают относитель-

Таблица 4. Параметры классов нейтральных липидов, рассчитанные из данных тонкослойной хроматографии [8]

Класс липидов	R_f	k	$(P'_i)_{vol}^*$	$(P'_i)_{mol}^{**}$	$(НВ_i)_{vol}^*$	$(НВ_i)_{mol}^{**}$	$lg(НВ_i)_{vol}^*$	$lg(НВ_i)_{mol}^{**}$
Высшие углеводороды	0.98	0.0	0.01	0.01	70.70	74.12	1.85	1.87
Эфиры стерин	0.94	0.1	0.04	0.04	22.60	23.70	1.35	1.37
Диалкилацилглицерины	0.88	0.1	0.09	0.09	10.58	11.09	1.02	1.05
Триалкилглицерины	0.85	0.2	0.12	0.12	8.18	8.57	0.91	0.93
Алкилдиацилглицерины	0.78	0.3	0.20	0.19	5.12	5.36	0.71	0.73
Метилловые эфиры высших жирных кислот	0.77	0.3	0.21	0.20	4.83	5.06	0.68	0.70
Высшие альдегиды	0.73	0.4	0.26	0.24	3.90	4.09	0.59	0.61
Высшие метилкетоны	0.63	0.6	0.41	0.39	2.46	2.58	0.39	0.41
Триацилглицерины	0.60	0.7	0.46	0.44	2.16	2.27	0.34	0.36
Ацетаты диацилглицеринов	0.50	1.0	0.69	0.66	1.44	1.51	0.16	0.18
Жирные кислоты	0.39	1.6	1.08	1.03	0.92	0.97	-0.04	-0.01
Высшие спирты	0.30	2.3	1.62	1.54	0.62	0.65	-0.21	-0.19
<i>sn</i> -1,3-Диацилглицерины	0.21	3.8	2.61	2.49	0.38	0.40	-0.42	-0.40
Стерины	0.19	4.3	2.95	2.82	0.34	0.35	-0.47	-0.45
<i>sn</i> -1,2-Диацилглицерины	0.15	5.7	3.93	3.75	0.25	0.27	-0.59	-0.57
1-Моноалкилглицерины	0.03	32.3	22.41	21.38	0.04	0.05	-1.35	-1.33
1-Моноацилглицерины	0.02	39.0	27.03	25.78	0.04	0.04	-1.43	-1.41
2-Моноацилглицерины	0.01	57.8	40.08	38.23	0.02	0.03	-1.60	-1.58

* Смесь n -C₆H₁₄-(C₂H₅)₂O-CH₃COOH (80 : 20 : 1, по объему), $P' = 0.693$; **смесь n -C₆H₁₄-(C₂H₅)₂O-CH₃COOH (81.7 : 16.0 : 2.3, молярные доли), $P' = 0.661$.

ную полярность самих липидных молекул и могут служить в адсорбционной ТСХ на частицах силикагеля ориентиром для их сравнения между собой. Однако нельзя утверждать, что эти значения определяют последовательность элюирования индивидуальных видов всех классов липидов на иных сорбентах. Состав большинства этерифицированных жирных кислот разнообразных липидных молекул природного происхождения претерпевает весьма значительные вариации от объекта к объекту и даже внутри каждого такого объекта в зависимости от условий внешней среды. Любое аддитивное значение P' липидных молекул i -го класса в фиксированный момент времени жизни клетки, а также их координационных комплексов может зависеть *in vivo* и от иных, пока неизвестных нам факторов, а не только от катионов переходных металлов из этой среды.

Резкий скачок уровня полярности молекул полиненасыщенных липидов происходит при появлении в системе для ЖХ соединений, склонных к образованию с этими липидами лабильных координационных комплексов, например солей серебра

[7, 10]. В наших опытах по планарной адсорбционной ЖХ (ТСХ) весьма узкий диапазон распределения рацемической модельной смеси индивидуальных видов *sn*-1,2-диацилглицеринов растительного происхождения по шкале гидрофобности их ненасыщенных молекул был многократно расширен в присутствии соли серебра. Это всегда происходило за счет образования π -комплексов олефиновых связей данных молекул с ионами кластеров Ag [7, 10]. В то же время насыщенные молекулы такой смеси характеризовались одними теми же значениями P'_i и $НВ_i$, практически идентичными найденным по данным [8], несмотря на разительные отличия в составе обеих подвижных фаз для ТСХ, использованных в данной паре опытов. Это позволяет судить о правомерности подхода к оценке P'_i и $НВ_i$ в данной работе.

Вместе с тем для π -комплексов гексаеновых индивидуальных видов той же модельной смеси (дилиноленоата) величина L была ниже, чем у молекул дистеарата с тем же числом m не в два, как в отсутствие Ag⁺, а в целых три раза [7, 10].

Кроме того, в адсорбционной ТСХ с солью серебра были зарегистрированы отдельные зоны π -комплексов стеароолеата и пальмитоолеата, молекулы которых имели один и тот же уровень e , но разные величины L_1 (34 и 32 соответственно [7, 10]).

Разность их расчетных значений P'_i составила здесь 3.0 ($\Delta P'_i = 5.0 - 2.0$), т.е. вклад одной метиленовой единицы в вариацию размера P' этих молекул может быть оценен как 1.5.

Совсем недавно дополнительно подтверждено существование не только одиночных ионов Ag^+ , но и устойчивых высокоупорядоченных структур как катионных Ag_n^+ и нейтральных Ag_n кластеров серебра, так и их анионных кластеров Ag_n^- с $n \geq 2$, электронные характеристики и геометрия которых значительно меняются по мере увеличения числа n до 7, 18 и 22 [11]. Вероятно, высоконасыщенные ацильные остатки в составе молекул липидов природного происхождения обладают повышенной склонностью к взаимодействию с такими кластерами сразу по нескольким внешним трехатомным участкам последних и легко могут тесно обволакивать внешнюю поверхность этих кластеров, что приводит к многократному росту полярности структуры самого комплекса и резко снижает его подвижность [10].

Всю совокупность характеристик молекул липидов отдельных классов нельзя воспринимать как некую статичную систему, где место каждого ненасыщенного индивидуального вида на шкале гидрофобности органических соединений строго определено. Заметное удлинение диапазона распространения молекул индивидуальных видов одного и того класса по этой шкале может быть вызвано как искусственным приемом, намеренно выполненным оператором с целью увеличения селективности разделения этих молекул, так и представлять собой чисто спонтанный процесс. Последний может быть связан с произвольным попаданием из внешней среды в достаточно замкнутую систему живой клетки с ограниченным набором природных соединений какого-либо вполне естественного метаболита, который способствует протеканию в том же направлении аналогичного процесса образования координационных комплексов, но с участием иных ионов или их кластеров.

Появление высокочувствительных вариантов масс-спектрометрии (МС) создало возможность, используя огромные базы данных, быстро идентифицировать и достоверно устанавливать место каждого мономолекулярного компонента в ряду всех элюируемых соединений. В ходе комплексных экспериментов по ВЭЖХ–МС сложных смесей триацилглицеринов получена новая информация [12]. В повседневной работе аналитик достаточно часто имеет дело с гомологическими

рядами молекул в пределах одного и того же класса, т.е. с разнообразными комбинациями соединений с произвольными значениями m . В настоящее время липиды обычно фракционируют путем разнообразных комбинаций ГЖХ и ВЭЖХ с масс-спектрометрией [12]. В этой связи представляет особый интерес оценка последних данных колоночной ВЭЖХ–МС для отдельных вариантов такого фракционирования на еще более разнообразных комбинациях молекул высоконасыщенных видов липидов природного происхождения. В таком случае для более корректного сравнения между собой уровней NB_i молекул разной полярности относительно неполярного углеводорода (например, n -гексадекана), по-видимому, целесообразно использовать липиды с одним и тем же числом m в их ацильных цепях (16), что наиболее характерно лишь для некоторых объектов природного происхождения.

В заключение отметим, что попытку установить строгую взаимосвязь между значениями k при адсорбционной ВЭЖХ, а также величинами кислотности и поляризуемости отдельных классов органических соединений предпринимали и ранее [13]. Тем не менее, для достаточно аргументированного объяснения механизма фракционирования таких соединений необходимы еще более точные данные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот. М.: Научный мир, 2014. 372 с. (*Los Dmitry A. Fatty Acid Desaturases*. М.: Scientific World, 2014).
2. Pchelkin V.P., Vereshchagin A.G. Reversed-phase thin-layer chromatography of diacylglycerols as their labile dimethylborate esters // *J. Chromatogr.* 1981. V. 209. P. 49.
3. Пчелкин В.П. Количественная оценка результатов обращенно-фазового фракционирования природных фосфатидилхолинов и продуктов их гидролиза // *Журн. аналит. химии*. 1997. Т. 52. № 2. С. 118.
4. Christie W.W. *Advances in Lipid Methodology – Three*. Dundee: The Oily Press, 1994. V. 7. P. 377.
5. Верещагин А.Г. Биохимия триглицеридов. М.: Наука, 1972. 308 с.
6. Пчелкин В.П. Элюирующая сила растворителя как критерий относительной полярности липидов // *Журн. физ. химии*. 2016. Т. 90. № 9. С. 409. <https://doi.org/10.7868/S0044453716090235>
7. Pchelkin V.P., Vereshchagin A.G. Identification of individual diacylglycerols by adsorption thin-layer chromatography of their coordination complexes // *J. Chromatogr.* 1991. V. 538. № 2. P. 373.
8. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир, 1975. 322 с. (*Kates M. Techniques of Lipidology. Isolation, Analysis and Identification of Lipids*. Amsterdam, London: North-Holland Publishing Company; N.Y.: American Elsevier Publishing Co., Inc., 1972.)

9. Сакодынский К.И., Бражников В.В., Волков С.А., Зельвенский В.Ю., Ганкина Э.С., Шатц В.Д. Аналитическая хроматография. М.: Химия, 1993. 464 с.
10. Пчелкин В.П. Хроматографический анализ видового состава липидов биомембран. Riga: Lambert Academic Publishing, 2018. 388 с.
11. McKee M.L., Samokhvalov A. Density functional study of neutral and charged silver clusters Ag_n with $n = 2-22$. Evolution of properties and structure // J. Phys. Chem. A. 2017. V. 121. № 26. P. 1.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpca.7b03905>
12. Byrdwell W.C. Comprehensive dual liquid chromatography with quadruple mass spectrometry (LC1MS2 × LC1MS2 = LC2MS4) for analysis of *Parinari curatellifolia* and other seed oil triacylglycerols // Anal. Chem. 2017. V. 89. № 19. P. 1.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02753>
13. Abraham M.H., Chadha H.S., Leitao R.A.E., Mitchell R.C., Lambert W.J., Kaliszan R., Nasal A., Haber P. Determination of solute lipophilicity, as $\log P_{\text{octanol}}$ and $\log P_{\text{alkane}}$ using poly(styrene-divinylbenzene) and immobilized artificial membrane stationary phases in reversed-phase high performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 1997. V. 766. P. 35.