

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра общей химии и хроматографии

А.В. Буланова, Ю.Л. Полякова

ХРОМАТОГРАФИЯ В МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ

*Учебное пособие для студентов
специальности «Химия» и «Биология»*

Издательство «Самарский университет»
2003

*Печатается по решению Редакционно-издательского совета
Самарского государственного университета*

УДК 543.544

ББК 24.4

Б 907

Буланова А.В., Полякова Ю.Л. Хроматография в медицине и биологии: Учебное пособие. Самара: Изд-во «Самарский университет», 2003. 116 с.

В пособии содержатся сведения по использованию хроматографических методов в медицине и биологии, рассмотрены основные теории удерживания веществ в жидкостной хроматографии, даны рекомендации по хроматографическому анализу лекарственных веществ.

Учебное пособие предназначено для специалистов, аспирантов, студентов, специализирующихся по медико-биологическим исследованиям.

Авторы выражают благодарность канд. хим. наук **Н.В. Нестеровой**, аспиранту **Н.И. Каюткиной** за помощь в оформлении учебного пособия, а также канд. хим. наук **Р.А. Минахметову** за помощь в написании разделов 3.4.1 и 3.4.2.

Рецензент проф., д-р хим. наук А.Л.Лобачев

© Буланова А.В.,
Полякова Ю.Л., 2003
© Изд-во «Самарский
университет», 2003

Содержание

| | |
|---|-----------|
| Введение..... | 5 |
| 1. Основные аспекты применения хроматографии в медицине и биологии | 7 |
| 1.1. Живой организм как совокупность микрохроматографических систем | 9 |
| 2. Газовая хроматография в медицине и биологии | 11 |
| 2.1. Анализ жирных кислот и микроорганизмов | 11 |
| 2.2. Пиролиз микроорганизмов..... | 12 |
| 2.3. Гидролиз и экстракция компонентов микробных клеток | 12 |
| 2.4. Перспективы применения газовой хроматографии в медицине и биологии | 19 |
| 3. Жидкостная хроматография в медицине и биологии | 21 |
| 3.1. Особенности хроматографирования макромолекул..... | 22 |
| 3.2. Градиентное элюирование | 24 |
| 3.3. Обращенно-фазовая хроматография | 28 |
| 3.3.1. Удерживание веществ в обращенно-фазовой хроматографии и особенности строения молекул сорбатов | 30 |
| 3.3.2. Аддитивные модели удерживания..... | 31 |
| 3.3.3. Модели «удерживание – свойство» | 31 |
| 3.3.4. Модели «удерживание – структура» | 33 |
| 3.3.5. Выбор элюирующей силы подвижной фазы в обращенно- фазовой хроматографии | 34 |
| 3.3.6. Упрощенный критерий гидрофобности | 35 |
| 3.4. Удерживание веществ в нормально-фазовой хроматографии..... | 36 |
| 3.4.1. Модели удерживания Свайдера, Сочевинского, Скотта–Кучеры, квазихимическая вытеснительная модель..... | 37 |
| 3.4.2. Сольвофобная теория удерживания | 44 |
| 3.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография лекарственных веществ | 46 |
| 3.5.1. Условия хроматографического анализа основных групп лекарственных веществ и отдельных соединений | 47 |
| 3.6. Варианты жидкостной хроматографии, наиболее часто применяемые для медико-биологических исследований..... | 48 |
| 3.6.1. Материалы матриц сорбентов и ионообменников..... | 48 |
| 3.6.2. Аффинная хроматография | 53 |
| 3.6.2.1. Механизм разделения в аффинной хроматографии | 53 |
| 3.6.2.2. Сорбенты, используемые в аффинной хроматографии | 57 |
| 3.6.3. Эксклюзионная хроматография | 57 |
| 3.6.3.1. Коэффициенты распределения в эксклюзионной хроматографии | 58 |
| 3.6.3.2. График селективности..... | 60 |

| | |
|---|------------|
| 3.6.3.3. Эффективность фракционирования | 60 |
| 3.6.3.4. Определение молекулярной массы белка | 62 |
| 3.6.3.5. Сорбенты, используемые в эксклюзионной хроматографии | 64 |
| 3.6.4. Ионообменная хроматография | 69 |
| 3.6.4.1. Физические основы метода | 69 |
| 3.6.4.2. Сорбенты в ионообменной хроматографии | 71 |
| 3.6.5. Тонкослойная хроматография и ее применение в биомедицинских исследованиях | 72 |
| 3.6.5.1. Физические основы метода | 74 |
| 3.6.5.2. Сорбенты, применяемые в ТСХ | 75 |
| 3.6.5.3. Выбор элюирующих систем | 76 |
| 4. Электрофорез | 79 |
| 5. Хроматографическое определение некоторых лекарственных препаратов в биологических жидкостях | 84 |
| 5.1. Барбитураты | 84 |
| 5.2. Трициклические антидепрессанты | 85 |
| 5.3. Антikonсультанты | 86 |
| 5.4. Бензодиазепины | 86 |
| 5.5. Противоопухолевые препараты | 88 |
| 5.6. Поиск наркотиков в образцах мочи | 89 |
| 6. Применение хроматографии в биохимических исследованиях | 90 |
| 7. Взаимосвязь «биологическая активность – физико-химическое свойство» | 93 |
| 7.1. Выбор оптимальных физических и химических характеристик для определения вида биологической активности | 93 |
| 7.2. Выбор характеристик для определения вида биологического ответа и его эффективности | 95 |
| 7.3. Метод Хенча | 96 |
| 7.4. Метод Фри-Уилсона | 97 |
| 7.5. Индекс связности Рандича | 98 |
| Библиографический список | 100 |
| Приложение | 106 |

Введение

Хроматография, открытая М.С. Цветом в начале XX столетия, динамично развивается и в XXI веке. Усовершенствование ставших рутинными и создание новых вариантов хроматографического метода связано как с развитием теоретических аспектов хроматографии, так и с необходимостью решать вновь возникающие практические задачи. Наиболее актуальным в настоящее время является медико–биологическое и экологическое применение хроматографии. Исследователи, разрабатывающие способы и приемы применения хроматографических методов для биомедицинских целей, понимают, какие широкие перспективы и большие возможности для изучения живой природы, процессов метаболизма, ключевых звеньев патогенеза заболеваний и даже лечения больных открывает эта область знаний.

С развитием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и капиллярного электрофореза значительно расширились возможности хроматографии в исследовании и анализе природных макромолекул и биополимеров и, как следствие, применения ее в медицинской практике для прогнозирования и диагностики заболеваний, а также для биохимических исследований. Однако это не означает, что другие варианты хроматографии (газовая, жидкостная плоскостная – бумажная и тонкослойная) перестали использоваться в медико–биологических исследованиях. Целесообразно сделать небольшой экскурс в историю «внедрения» хроматографии в медицину и биологию.

Еще в первой половине XX века были разработаны такие варианты хроматографических методов, как бумажная, тонкослойная, газовая хроматография, применяющиеся для аналитических целей в биологии и медицине. Однако малая эффективность бумажной и тонкослойной хроматографии, ограниченность использования газовой хроматографии для анализа летучих веществ препятствовали созданию унифицированных, быстрых, надежных и простых методов исследования нативных экстрактов из тканей органов и биологических жидкостей (кровь, моча, лимфа, слюна и т.д.). Поэтому в то время хроматографический анализ не нашел широкого распространения в клинической практике.

В 70–х годах XX столетия произошел качественный скачок в развитии хроматографии: разрабатывались новые, обладающие высокой селективностью сорбенты, автоматизированные и высокоэффективные хроматографические системы с использованием надежных интеграторов.

ров, микропроцессоров, прецизионных насосов. Это и определило несомненную целесообразность применения хроматографии в медицине и биологии.

В настоящее время разработаны и внедряются в практику здравоохранения методы ВЭЖХ, позволяющие определить качественно и количественно практически все встречающиеся в живом организме соединения: от низкомолекулярных (витамины, сахара, аминокислоты, нуклеотиды, пептиды и т.д.) до биологически активных полимеров (белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды, липопротеиды и др.).

Многообразие целей биомедицинского применения хроматографии обусловило наличие множества конкретных хроматографических систем, различающихся аппаратурным обеспечением, основными механизмами разделения и принципами детектирования.

Простейшая, наиболее распространенная в практике биомедицинских исследований хроматографическая система состоит из емкости для подвижной фазы, колонки и сосуда для сбора фракций. Эти основные элементы хроматографической системы в зависимости от задач и целей могут быть легко дополнены новыми звеньями: градиентным устройством, насосом, детектором, интегратором, микропроцессором, коллектором для сбора фракций, устройством для ввода проб и т.д. Например, препаративное разделение белков плазмы крови для получения чистой фракции с определенным молекулярным весом, с точки зрения биолога-экспериментатора достаточно прецизионный методический прием, может быть проведено с помощью простейшей хроматографической системы, не требующей сложного аппаратурного обеспечения, и зависит от правильности выбора параметров колонки, сорбента, условий работы подвижной фазы.

При исследовании же биологических жидкостей и экстрактов для диагностических, прогностических и других медицинских целей требуется новейшее хроматографическое оборудование, высокоэффективные хроматографические системы, прецизионные приборы, позволяющие в течение нескольких минут получить достоверные результаты с высокой воспроизводимостью, стабильностью и надежностью. Минимальный объем исходного материала, широкий диапазон концентраций компонентов смеси, наличие микропримесей определяют жесткие границы и условия выбора метода разделения смесей из биологических объектов для клинических целей и в особенности применения хроматографии в медицине.

1. Основные аспекты применения хроматографии в медицине и биологии

Благодаря развитию жидкостной тонкослойной и колоночной хроматографии стало возможным определение свободных аминокислот и нуклеотидов в биообъектах; исследователи получили инструмент для анализа состава белков и нуклеиновых кислот, а клиницисты – “аминокислотную” и “нуклеотидную” диагностику патологических состояний; стало возможным определение различного рода лекарственных препаратов и их метаболитов в крови и тканях органов больных экспериментальных животных, следовательно, фармакологи имеют возможность изучать фармакокинетику, а клиницисты – контролировать эффективность лечения.

При достаточно стандартизированных условиях можно получить хроматограммы с информацией, необходимой для диагностирования, не добываясь полного разделения смесей. Такие хроматограммы названы обзорными, а метод их использования для диагностики заболеваний человека, разработанный в лаборатории хроматографии 2-го медицинского института, – «методом обзорных хроматограмм» [1]. Так, по “обзорным” хроматограммам можно диагностировать рак, гастрит или устанавливать отсутствие патологии (рис. 1 и 2).

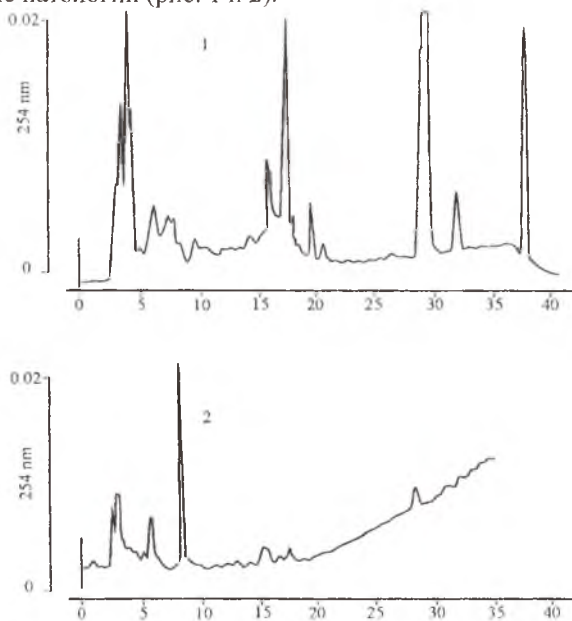


Рис. 1. «Обзорные» хроматограммы кислоторастворимой фракции плазмы крови здоровых (2) и больных раком желудка (1)

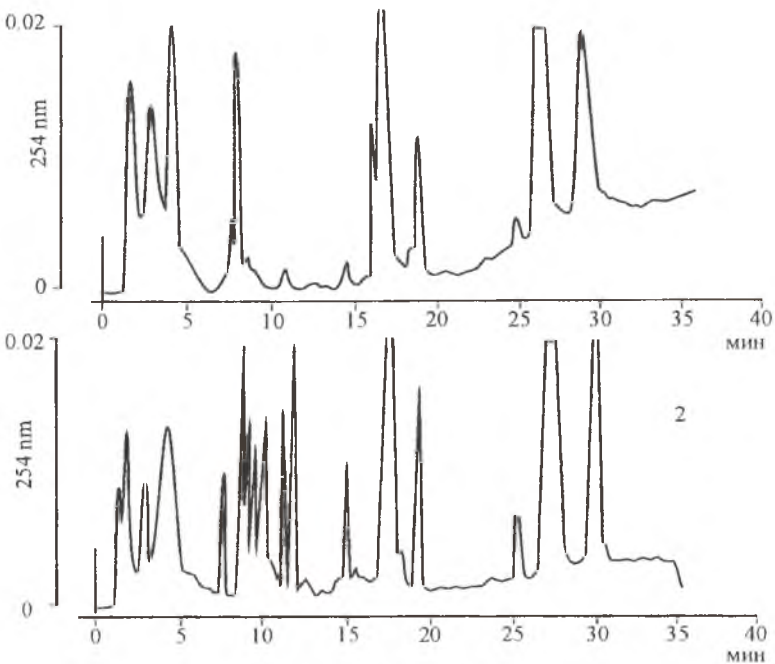


Рис. 2. «Обзорные» хроматограммы кислоторастворимой фракции эритроцитов больных гастритом (1) и раком желудка (2)

В практике клинической медицины большое распространение имеет лечение различных патологий с применением сорбентов, используемых в хроматографии. Так, под руководством академика АМН РФ Ю.М. Лопухина разработаны методы лечения больных посредством удаления из биологических жидкостей токсических метаболитов эндогенной и экзогенной природы с помощью различного рода сорбентов (сорбция токсичных агентов из крови – гемосорбция; из плазмы – плазмосорбция; из ликворы – ликворсорбция). Лопухиным с соавт. разработаны принципы, аппаратура, сорбенты, техника для реализации этих методик, получены положительные результаты при лечении больных с острыми отравлениями лекарственными препаратами и химическими ядами, больных с поражениями печени в стадии прекомы и комы.

Основой этого метода является жидкостно-адсорбционная хроматография, где неподвижная фаза – адсорбент, подвижная – плазма, лимфа, ликвор, а разделяемая смесь – вся масса веществ и токсических метаболиты соответствующей биологической жидкости. Техника лечения заключа-

ется в том, что соответствующий сосуд (артерия, вена, лимфатический поток и т.д.) подключается к колонке, заполненной специальным адсорбентом (различные типы активированных углей, ионообменные смолы и т.д.); биологическая жидкость подвергается перфузии – пропусканию через систему, находящуюся вне организма, затем очищенные жидкости направляются в организм. После проведения перфузии твердая фаза содержит вещество, ответственное за возникновение той или иной патологии, и в тех случаях, когда этиология заболевания неизвестна, а улучшение состояния больного налицо, можно сделать вывод о причине заболевания. Смыть с колонки, определить качественно и количественно это вещество – трудная, но выполнимая задача. Таким образом, гемосорбция – конкретный случай весьма успешного и результативного применения методов жидкостной хроматографии в клинической медицине.

1.1. Живой организм как совокупность микрохроматографических систем

В живой природе существуют объекты, аналогичные хроматографическим системам. Рассмотрим морфофизиологические характеристики кровеносного капилляра животного [1] (рис. 3).

Капилляр имеет стенку, внутренняя поверхность которой выстлана эндотелием, просвет заполнен протекающей кровью. Кровь состоит из так называемых форменных элементов – эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и жидкой плазмы. В крупных сосудах скорость тока плазмы и скорость движения форменных элементов одинакова, в кровеносном капилляре – разная, следовательно, в капилляре наблюдается ток плазмы относительно стенки и форменных элементов.

Таким образом, капилляр – суть естественная хроматографическая колонка, в которой роль сорбента выполняют клетки эндотелия и форменные элементы крови, а плазма – элюент.

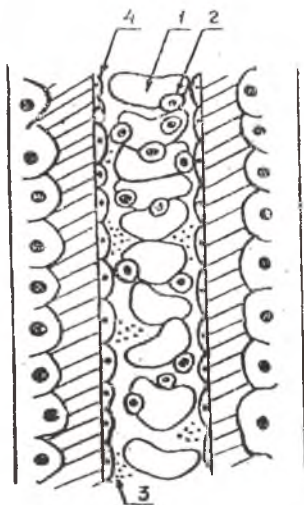


Рис. 3. Схема кровеносного капилляра:
1 – эритроциты, 2 – лейкоциты, 3 – тромбоциты, 4 – эндотелий

Для того, чтобы в данной системе имел место эффект разделения, поступление смеси веществ в естественных условиях в капилляр–колонку

должно быть прерывистым, импульсивным, в противном случае наступит равновесие. Такое импульсивное поступление в капилляр веществ в организме обусловлено как экзогенными факторами, так и эндогенной продукцией биомолекул.

Рассмотренное устройство естественной хроматографической системы очень важно для живого организма. Так, например, после внутривенного введения смеси лекарственных препаратов каждый из них по-разному будет давать фармакологический эффект вследствие различной последовательности выхода лекарственных компонентов из кровеносного капилляра. Аналогичная картина будет наблюдаться и при активизации организмом синтеза и выброса метаболитов (промежуточных продуктов обмена веществ в живых клетках) тканями, например, при выбросе в кровь гормонов надпочечников в результате действия стрессирующего фактора.

В живом организме существует клеточный органоид, называемый эндоплазматическим ретикуломом, который представляет собой систему канальцев, ограниченных мембранами. Этот органоид участвует в обменных процессах, обеспечивает транспорт веществ из окружающей среды в цитоплазму и таким образом осуществляет обмен всех видов биомолекул в клетке. Этот органоид – ни что иное, как ультракапиллярная хроматографическая система, от параметров которой зависит регуляция клеточного транспорта веществ. Аналогом микрокапиллярной хроматографической системы могут служить почечные каналы, где стенка – неподвижная фаза, первичная и вторичная моча – подвижная фаза, а разделяемая смесь – фильтрующиеся в клубочке метаболиты. Очевидно, что бесперебойная работа этих микро- и ультрамикрочроматографических систем приводит к нормальной регуляции транспорта биомолекул, а нарушение их работы – к появлению патологии.

Такие естественные хроматографические системы существуют в живой природе как самостоятельные явления, и таким образом хроматография как явление имеет место в любом биологическом объекте. Поэтому термин “хроматографическая биология”, или “хроматобиология”, “биохроматография” вполне может быть оправдан и имеет право на существование.

При хроматографическом исследовании как в биологии, так и в клинической медицине используются почти все варианты газовой и жидкостной хроматографии, в зависимости от целей и объекта исследований.

2. Газовая хроматография в медицине и биологии

Газовая хроматография используется во многих областях медицины и биологии: в гигиене и экологии для определения содержания вредных примесей в воздухе, воде и пищевых продуктах; в токсикологии и судебной медицине для диагностики отравлений техническими жидкостями (хлорпроизводными углеводов, алкоголем и его суррогатами) и пестицидами самой различной структуры; в фармакологии и фармации для контроля качества препаратов, исследования метаболизма лекарственных средств. Любой из этих примеров мог бы стать предметом отдельного разговора, но мы остановимся лишь на некоторых аспектах использования газовой хроматографии в клиническом анализе [2].

Применение газовой хроматографии в биохимических целях сравнительно долго не получало должной оценки. Считалось, что биологические объекты недостаточно летучи и малоустойчивы к различным физико-химическим воздействиям, применяемым в газохроматографическом анализе. Успехи в разработке методов расщепления липидов, углеводов и белков до более простых компонентов и превращение их в летучие соединения открыли широкую дорогу для применения метода в биохимическом анализе.

2.1. Анализ жирных кислот и микроорганизмов

В исследовании липидов, в особенности жирных кислот, газовая хроматография произвела настоящую революцию и до настоящего времени не имеет альтернативы. Первым анализом, выполненным с помощью газовой хроматографии, стало определение Джеймсом и Мартином карбоновых кислот. В процессе метаболизма микробные клетки производят низшие карбоновые кислоты, причем набор кислот является как бы визитной карточкой того или иного микроорганизма.

Газовая хроматография применяется для анализа компонентов микробных клеток и их метаболических продуктов. Традиционные пути идентификации микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний или гнойно-воспалительных процессов – включают в себя несколько этапов: посев биологического материала на питательные среды, получение чистых (то есть состоящих из одинаковых микробов) культур, выращивание их на средах обогащения и лишь затем их идентификацию по характеру разрушения тех или иных субстратов. Даже для микроорганизмов, обладающих способностью к быстрому росту, эти этапы исследования занимают не менее двух суток. С помощью газовой хроматографии можно проводить ускоренную (менее двух часов) идентификацию микроорганизмов по спектру специфических компонентов их мембран или специфическим продуктам пиролиза и гидролиза клеточных препаратов.

2.2. Пиролиз микроорганизмов

Микроорганизмы, так же как и другие клетки, при пиролизе с использованием тщательно контролируемых параметров нагрева дают газообразные продукты термической деградации. Эти фрагменты можно непосредственно анализировать, используя газовую хроматографию, с целью получения легко распознаваемых хроматограмм различных микробных родов, видов внутри родов или даже различных штаммов внутри видов. Как показано в [3], исследователи микроорганизмов получили с помощью пиролитической газо-жидкостной хроматографии (ПГЖХ) результаты, характеризующиеся превосходной качественной и количественной воспроизводимостью. Так, на рис. 4 приведены характерные пиелограммы микробактерий, которые были использованы для идентификации видов микроорганизмов, принадлежащих к различным семействам бактерий. Тем не менее многие авторы [3] утверждают, что результаты ПГЖХ в большой степени зависят от типов микроорганизмов и не являются достоверным методом идентификации бактерий.

2.3. Гидролиз и экстракция компонентов микробных клеток

Микроорганизмы содержат большой набор химических соединений в материале капсулы, клеточных стенках, цитоплазме, которые можно экстрагировать различными растворителями, гидролизовать кислотой или основанием и превратить в летучие производные. Классификация микроорганизмов по их химическому составу предложена в работе [4]. Эти исследователи экстрагировали и перезтерифицировали липиды отдельных видов различных бактериальных семейств и получили характерные для каждого из этих видов хроматограммы. На рис. 5 приведены хроматограммы некоторых из них [3].

Как показано в [3], методом газовой хроматографии могут быть качественно и количественно определены различные компоненты – жирные кислоты, липиды, углеводы, аминокислоты, аминокислота, компоненты нуклеиновых кислот и другие макромолекулы микроорганизмов. Газохроматографический анализ применим не только для идентификации организмов, но и для диагностики заболевания.

С помощью газовой хроматографии удалось разработать методику диагностики болезней, вызванных анаэробными инфекциями, в частности, газовой гангрены. Каждый двадцатый раненый в годы второй мировой войны страдал от гнойно-септических осложнений, вызванных анаэробными бактериями – возбудителями газовой гангрены. Успехи в лечении позволили снизить число осложнений, вызванных анаэробными микроорганизмами, почти в 100 раз.

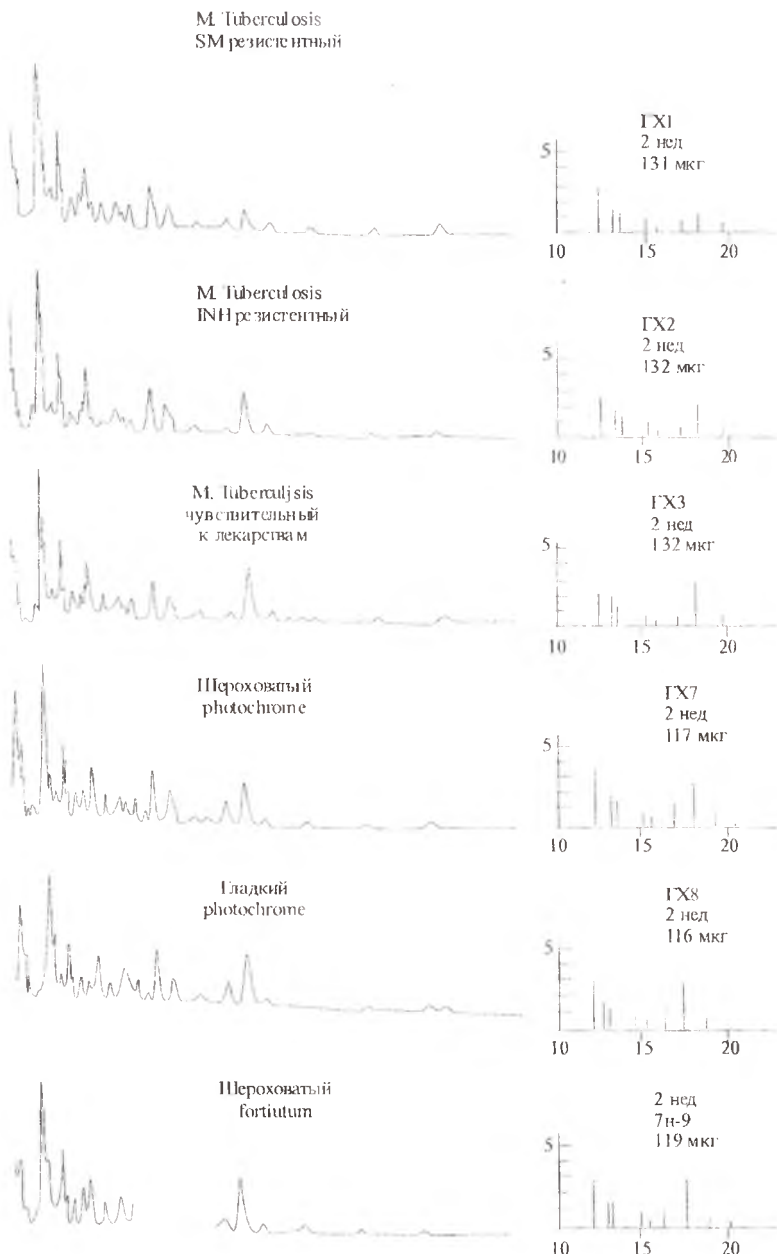


Рис. 4. Характерные пирограммы микобактерий.
 Воспроизведено из «American Review of Respiratory Diseases»

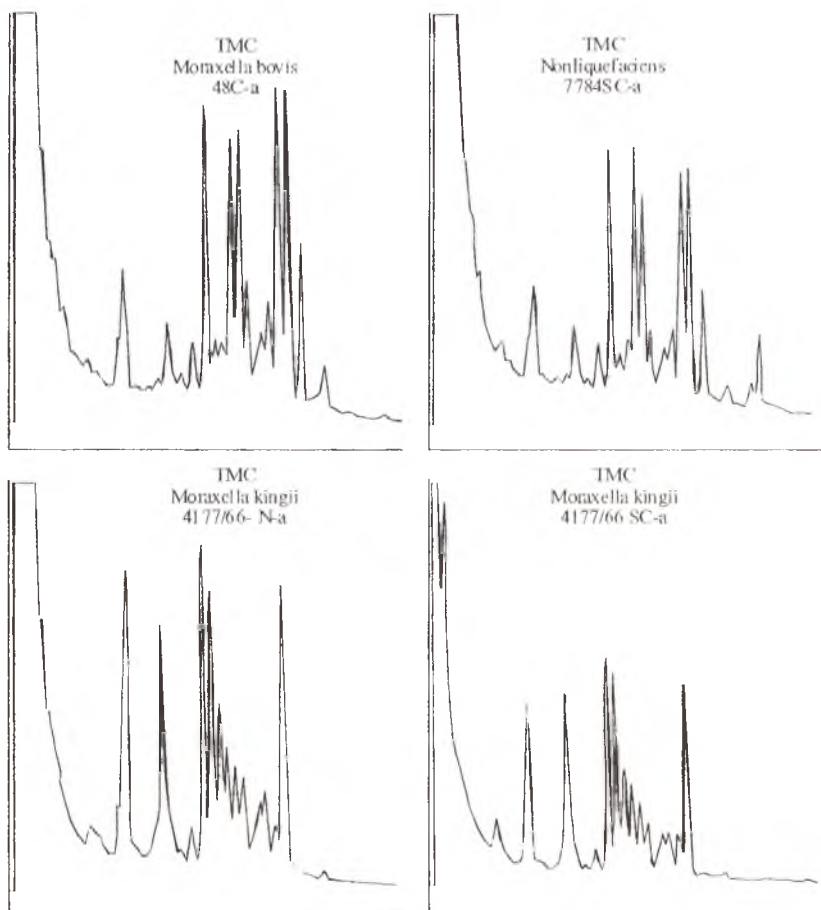


Рис. 5. Хроматограммы триметилсилильных производных микробных клеток видов *Moraxellae* [3]

Немалую роль в этом сыграл тот факт, что определение карбоновых кислот сделало возможным верификацию диагноза анаэробной инфекции в течение нескольких часов, тогда как традиционные бактериологические методы дают ответ в лучшем случае через 4–5 суток. Ценность метода газовой хроматографии для решения проблемы быстрого обнаружения и дифференциации анаэробов в настоящее время общепризнана. Такой анализ основан на определении летучих жирных кислот (ЛЖК) $C_3 - C_6$, включая изомерные, которые являются специфическими конечными продуктами метаболизма анаэробных бактерий. Аэробные бактерии не продуциру-

ют этих кислот, поэтому хроматограмма гноя аэробного происхождения обычно содержит только уксусную кислоту. В качестве примера на рис. 6а дана хроматограмма гнойных выделений легких больного, пораженного анаэробной инфекцией, в которых присутствует набор жирных кислот. Из рис. 6б видно, как под действием антибиотика эти кислоты исчезают, кроме уксусной кислоты, являющейся нашим естественным метаболитом. Таким образом, метод ГЖХ становится методом клинического контроля.

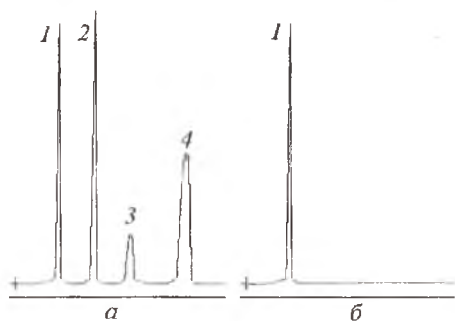


Рис. 6. Хроматограмма гноя из плевральной полости при анаэробном сепсисе: *а* – до лечения; *б* – после двухнедельного лечения антибиотиком цефалоспорином; 1 – уксусная кислота, 2 – пропионовая кислота, 3 – масляная кислота, 4 – изовалериановая кислота

А.Г. Витенбергом с соавт. [1] разработан парофазный анализ ЛЖК для быстрого обнаружения анаэробов при инфекциях. Метод может быть использован для идентификации отдельных видов анаэробных бактерий.

Сущность парофазного анализа (ПФА) состоит в том, что газохроматографический анализ проводят, исследуя не сам образец, а находящуюся с ним в контакте газовую фазу, насыщенную летучими компонентами анализируемого образца. Отличительной особенностью метода является предельно простая процедура подготовки биологического материала к исследованию и автоматическое введение пробы в хроматограф. Методика предусматривает использование отечественного оборудования и включает несколько несложных операций. Исследуемый образец помещается в стеклянный флакон (типа пенициллинового), к нему добавляется минеральная соль – бисульфат калия, создающая в анализируемом растворе кислую среду. Далее флакон герметизируется стандартной резиновой пробкой и выдерживается 15–20 мин при температуре 90 °С. После этого насыщенный летучими веществами газ из флакона с помощью специального пневматического дозатора вводится в хроматограф. Расшифровка результатов анализа производится по наличию или отсутствию на хроматограмме пиков ЛЖК. На рис. 7 и 8 приведены типичные хроматограммы гноя аэроб-

ного и анаэробного происхождения [1]. Если на хроматограмме выявлено обилие ЛЖК, это однозначно указывает на участие анаэробов в инфекции. Чаще всего анаэробные инфекции являются смешанными, т.е. гной из очага инфекции содержит метаболиты анаэробов различных видов.

Нетрудно увидеть, что ПФА позволяет в течение 30–40 мин с момента представления клинического образца в лабораторию, не пользуясь микробиологическими методами, получить ответ об участии анаэробов в инфекции. Однако отсутствие пиков ЛЖК на хроматограмме не является столь же надежным признаком отсутствия анаэробной инфекции. Некоторые виды анаэробных инфекций не продуцируют ЛЖК. К ним относятся, например, *Bacteroides corrodens* и *Peptococcus magnus*. Поэтому при моноинфекциях такими видами бактерий пиков ЛЖК на хроматограмме не будет. Однако вероятность получения такого ложноотрицательного результата очень низка, т.к. анаэробные моноинфекции встречаются довольно редко.

Существует большое количество и других патологий, которые можно обнаруживать по наличию на хроматограммах биологических объектов жирных кислот. Так, исследования состава липидов крови привели к пониманию проблемы атеросклероза – болезни, ведущей к появлению ишемической болезни сердца, нарушениям мозгового кровообращения.

Для практической медицины разработаны простые и эффективные средства диагностики нарушений метаболизма липидов. В повседневной практике врачи ежедневно назначают исследования холестерина, триглицеридов, липопротеидов. При разработке этих рутинных методик газовая хроматография использовалась как референтный метод, то есть метод–эталон. Широкое внедрение во врачебную практику исследований метаболизма липидов позволило разработать пути профилактики и лечения атеросклероза.

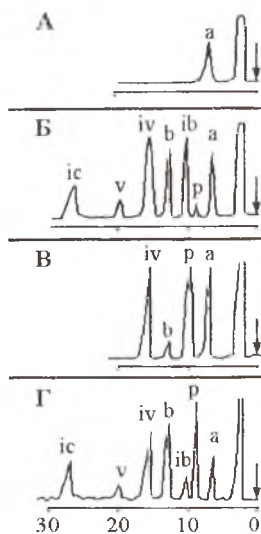


Рис. 7. Типичные хроматограммы экссудатов при абсцессе легкого (А), эмпиеме плевральной полости (Б), абсцессе легкого (В), нагноении раны (Г):

Легучие жирные кислоты: а – уксусная, р – пропионовая, ib – изомаляная, б – масляная, iv – изовалериановая, v – валериановая, ic – изокапроновая

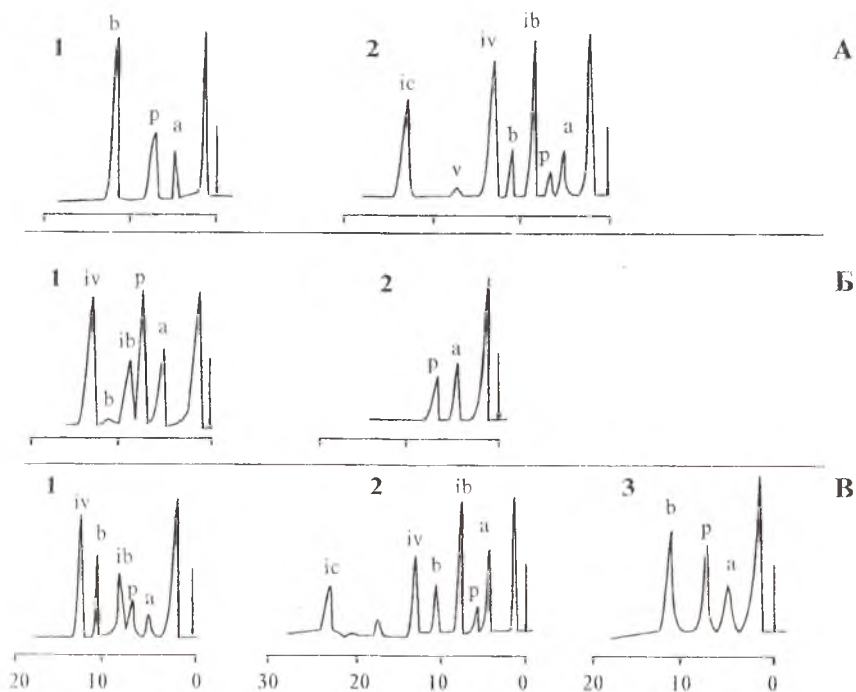


Рис. 8. Типичные хроматограммы чистых анаэробных культур, выделенных из нативного материала и выращенных на пептондрожжевой среде с глюкозой:

А – при эмпиеме плевральной полости выделены анаэробы: 1 – *Fusobacterium necrophorum*; 2 – *Peptostreptococcus anaerobius*.
 Б – при абсцессе легкого выделены анаэробы: 1 – *Bacteroides fragilis*; 2 – *Veillonella*.
 В – при нагноении раны выделены анаэробы: 1 – *Bacteroides melaninogenicus*; 2 – *Ps. Anaerobius*; 3 – *Fusobacterium necrophorum*.

Летучие жирные кислоты: а – уксусная, р – пропионовая, ib – изомасяная, b – н-масяная, iv – изовалериановая, v – н-валериановая, ic – изокапроновая

Возможность определения индивидуального состава жирных кислот тех или иных липидов является чрезвычайно мощным инструментом в познании структуры и функции биологических мембран, процессов внутриклеточного метаболизма. Энергетическое обеспечение клетки осуществляется в так называемом цикле трикарбоновых кислот – цикле Кребса. Газохроматографическое определение спектра карбоновых кислот цикла Кребса внесло большой вклад в понимание процессов внутриклеточного метаболизма при различных патологических состояниях [2].

Развитие биологии и медицины привело к пониманию того, что человеческий организм является своеобразным микрокосмом, и появлению новой науки – микробной экологии человека. Человеческий организм представляет собой систему сложных локальных экосистем. Нарушение экологического равновесия в любой из этих систем приводит к весьма серьезным последствиям. Ярким примером является кишечный дисбактериоз. При нарушении равновесия в системе микробы кишечника – организм-хозяин изменяется сам характер пищеварения. В норме у человека белки и углеводы перевариваются и всасываются в тонкой кишке, которая в физиологических условиях почти стерильна (от 10^5 до 10^8 микробов на 1 г содержимого), а грубая растительная клетчатка попадает в толстую кишку, где подвергается воздействию ферментных систем анаэробных микроорганизмов. Количество микробных тел в толстой кишке (10^{14}) на два порядка(!) превышает общее число клеток человеческого организма. Образовавшиеся в процессе переваривания клетчатки карбоновые кислоты выполняют важные для организма функции: питание клеток эпителия толстой кишки, угнетение канцерогенеза (то есть ракового перерождения) в клетках кишечного эпителия, регуляцию микробного биоценоза. При дисбактериозе анаэробные микроорганизмы заселяют тонкую кишку, утилизируют питательные компоненты и лишают организм питания, повреждают нежную слизистую оболочку тонкой кишки своими мощными ферментными системами.

Осуществить контроль дисбактериоза традиционными бактериологическими средствами нереально. Выполнение одного детального обследования на дисбактериоз требует свыше года трудозатрат в человеко-часах. Альтернатива этому исследованию – установление спектра карбоновых кислот в кишечном содержимом методом ГЖХ как интегрального показателя микробного состояния кишечника [2].

Газохроматографический анализ жирных кислот позволяет также проводить быструю диагностику так называемых пероксисомных заболеваний [2], которые были открыты сравнительно недавно и представляют собой семейство наследственных патологий. Пероксисомы – мельчайшие органеллы (части тела клеток), обнаруженные более четверти века назад. Метаболическая функция пероксисом – окисление жирных кислот, некоторых гормонов и т.д. Особенностью пероксисом является то, что они ответственны за окисление тех жирных кислот, которые неохотно метаболизируются иными органеллами. Пероксисомы превращают эти гидрофобные вещества в более гидрофильные.

Пероксисомные нарушения проявляются в задержке развития, поражении нервной и эндокринной систем, нарушении функции ряда внутренних органов. Практически для всех пероксисомных нарушений характерно накопление в клеточных мембранах и плазме крови так называемых очень длинных насыщенных жирных кислот с длиной цепи 24–28 углеродных атомов. В настоящее время газовая хроматография – самый эффективный метод для определения этих веществ.

Было бы неверно полагать, что газовая хроматография используется только в анализе карбоновых кислот. Разработаны и применяются методы газохроматографического анализа спиртов, альдегидов, аминокислот, углеводов, нуклеотидов, стероидов и других соединений. Для части перечисленных выше соединений газовая хроматография стала отправной точкой, позволившей разработать более практичные методики. В частности, методом газовой хроматографии определяют увеличение содержания ацетона, гептанона-2 и других кетонов при сахарном диабете. Диагностическим показателем цирроза печени служат ароматические кислоты; накопление фенилуксусной кислоты свидетельствует о некоторых заболеваниях нервной системы. Для контроля состояния ожоговых больных определяют производные углеводов – маннитол и лактулозу. Газовая хроматография дает возможность количественно оценить весь клинически значимый спектр стероидов из одной пробы. Подобный анализ незаменим в диагностике некоторых болезней (при нарушениях функции желез внутренней секреции – надпочечников, заболеваниях половой сферы). Были разработаны методы определения так называемых катехоламинов – адреналина, норадреналина – и родственных им соединений, гормонов щитовидной железы, гормонов надпочечников [2].

2.4. Перспективы применения газовой хроматографии в медицине и биологии

Можно с уверенностью сказать, что газовая хроматография будет востребована для биомедицинских исследований. Последние исследования биологов и медиков в области клеточного метаболизма [2] показали, что весь набор внутриклеточных сигналов опосредуется так называемыми вторичными биорегуляторами. Их множество. Но для хроматографистов, специализирующихся в области биомедицинских исследований, наиболее интересен один – оксид азота (II) (NO), к роли которого в клеточном метаболизме приковано внимание мировой медицинской общественности. Выяснено, что посредством оксида азота реализуется механизм расширения кровеносных сосудов. Именно этому обязаны жизнью тысячи пациентов, принимающих нитроглицерин (в биосредах нитроглицерин трансформируется в оксид азота). Предполагается, что наличие NO в некоторых нервных окончаниях связано с его участием в реализации механизмов восприятия боли и памяти. Оксид азота так или иначе участвует в осуществлении реакций воспалительного каскада, механизмах гибели клеток. Пока единственным прямым методом определения оксида азота в тканях является газовая хроматография.

Газовая хроматография незаменима при получении так называемых *метаболических профилей* биосред: крови, мочи, слюны, выдыхаемого воздуха. Они представляют собой хроматограмму соответствующих биологических сред. В одном образце может анализироваться несколько сот

компонентов, при этом необязательно даже знание состава компонентов метаболического профиля. Метаболические профили так же индивидуальны, как и отпечатки пальцев, но в отличие от папиллярных узоров хроматограмма метаболитов человеческого организма несет массу медицинской информации: какие лекарства или продукты получал человек в последнее время, каким микроорганизмом вызвано его заболевание и многое другое. В качестве примера на рис. 9 приведен метаболический профиль мочи, содержащий свыше сотни достоверно идентифицированных компонентов. Компьютерный анализ метаболических профилей является одним из мощнейших инструментов диагностики врожденных и приобретенных нарушений метаболизма, таких заболеваний, как сахарный диабет, подагра и многих других.

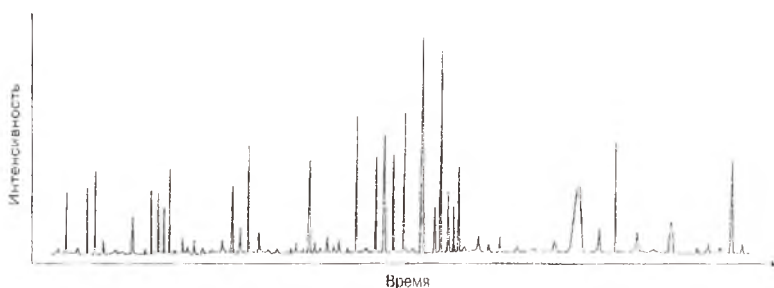


Рис. 9. Метаболический профиль органических компонентов мочи здорового человека

Еще не всегда можно объяснить причины формирования того или иного метаболического профиля. Например, анализ спектра насыщенных и ненасыщенных кислот и их количественных соотношений в мембране клеток крови с успехом применяется для определения прогноза при сепсисе. Отсутствие удовлетворительной гипотезы, объясняющей это явление, не мешает его практическому применению [2].

Таким образом, газовая хроматография – один из самых мощных аналитических методов, разработанных во второй половине XX столетия. Применение ее в медицине и биологии носит как прикладной, так и исследовательский характер. Основное направление – исследования нарушений метаболизма липидов, в частности жирных кислот, углеводов, органических кислот, аминосоединений. Традиционные сферы практического применения – медицинская микробиология и диагностика врожденных нарушений метаболизма. Перспективной применения газовой хроматографии является концепция метаболических профилей – систем интегральной оценки метаболизма. С унификацией методик газовой хроматографии, ростом чувствительности детекторов станет возможно повседневное использование метаболических профилей в целях практической диагностики.

3. Жидкостная хроматография в медицине и биологии

В настоящее время быстро развиваются все варианты жидкостной хроматографии, особенно высокоэффективной колоночной. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) получила широкое распространение во всех областях науки и техники. Однако наибольшее применение ВЭЖХ находит в медицине, фармакологии и биологии. По данным последних библиографических указателей, более половины всех публикаций посвящены этим вопросам. Издается отдельный журнал по хроматографии – Journal of Chromatography (Biomedical Application).

Широкое применение ВЭЖХ в медицине и биологии связано, прежде всего, с ее исключительно универсальными аналитическими возможностями: современные методы ВЭЖХ позволяют анализировать как смеси ионов или молекул, так и смеси ферментов, белков и даже вирусов (табл.1). ВЭЖХ обладает высокой эффективностью колонок и селективностью разделения, хроматографическое разделение проводится в мягких условиях (низкая температура, инертный растворитель, отсутствие контакта с кислородом), что очень важно при анализе термически и химически неустойчивых биологически активных соединений.

Таблица 1

Области применения основных методов ВЭЖХ в медицине и биологии

| Варианты ВЭЖХ | Области применения |
|--|--|
| Эксклюзионная (ситовая) | Белки, вирусы, ферменты, полипептиды, пептиды, нуклеиновые кислоты, липопротеины и др. |
| Молекулярные сорбционные (жидкостно-адсорбционная, жидкостно-жидкостная) | Аминокислоты, сахара, липиды, жирные кислоты, стероиды, простагландины, лекарства, катехоламины, порфирины, нуклеотиды, нуклеозиды, витамины, холестерин и его производные и др. |
| Энантиоселективная (хиральная) | Оптические изомеры биологически активных соединений |
| Аффинная (биоспецифическая) | Селективное выделение биологически активных соединений, в частности, ферментов |
| Ионообменная | Органические кислоты и основания, Cl^- , Na^+ , K^+ , HCO_3^- в желудочном соке; Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и др. в крови |

Методом жидкостной хроматографии и, в частности, ВЭЖХ анализируются многие биологически активные вещества и биологические объекты, такие как кровь, сыворотка и плазма крови, моча, слюна, спинномозговая жидкость, желчь, желудочный сок, мозг, печень, опухоли, миокард и

др. Так, анализ белков, нуклеиновых кислот, пептидов и их метаболитов, необходимый как для биохимиков и химиков, так и для медиков и фармакологов, осуществляется чаще всего с помощью жидкостной хроматографии. Перечисленные объекты являются, в основном, макромолекулярными соединениями, поэтому целесообразно подробнее остановиться на специфике хроматографии макромолекул.

3.1. Особенности хроматографирования макромолекул

Макромолекулы отличаются от малых молекул не только размером, но и лабильностью, которая в первую очередь связана с тем, что биологическая активность многих из них (например, ферментов) обусловлена третичной структурой, в образовании которой решающую роль играют слабые силы взаимодействия между достаточно удаленными друг от друга участками полипептидной или полинуклеотидной цепи. Кроме того, биологические макромолекулы являются полиэлектролитами, что в случае ионных взаимодействий с сорбентом приводит к многоточечному контакту. Часто эти молекулы имеют мозаично расположенные гидрофобные и гидрофильные участки, а также центры сорбции. Биологическая активность многих ферментов связана с сохранением четвертичной структуры, когда белковая молекула состоит из нековалентно связанных между собой субъединиц [5].

Термином “денатурация” обычно обозначают утрату макромолекулами четвертичной, третичной или вторичной структуры. Такая утрата может происходить в ходе самого хроматографического процесса (это влияние элюента и т.д.) и вследствие многоточечной сорбции, когда макромолекулы как бы “распластываются” на поверхности сорбента. При этом слабые связи между участками их цепей разрываются. Денатурация, как правило, приводит к увеличению молекулярного объема и к экспонированию гидрофильных участков, особенно у белков. Такие изменения при денатурации влияют на распределение макромолекул между подвижной и неподвижной фазами. Кроме того, это может быть неблагоприятным, поскольку развернутые полипептидные или полинуклеотидные цепи склонны очень прочно, а иногда и необратимо сорбироваться некоторыми неподвижными фазами. Белки, нуклеотиды и полипептиды большой молекулярной массы хроматографируют методом эксклюзионной хроматографии. Даже в этом случае увеличение молекулярного объема при денатурации может приводить к задержанию молекул внутри гранул, откуда они в нативном (врожденном, природном) состоянии могли свободно диффундировать. Экспонирование гидрофильных или гидрофобных участков может приводить к нежелательному взаимодействию фракционируемых молекул с самим материалом матрицы (здесь под матрицей понимают твердую ос-

нову неподвижной фазы – полимерной сетки), образующей каркас гранул неподвижной фазы.

Для уменьшения опасности денатурации нередко приходится вести хроматографию белков при пониженной температуре или вводить в состав элюента глицерин в качестве консерванта, что приводит к увеличению вязкости жидкостей подвижной и неподвижной фаз, требует повышения рабочего давления и нередко ухудшает разделение за счет затруднения диффузии. С уменьшением коэффициента диффузии снижается и допустимая скорость элюции, увеличивается продолжительность хроматографического процесса, а вместе с этим и вероятность денатурации, и поэтому здесь наиболее выгодно ступенчатое градиентное элюирование. Большой размер молекул обуславливает существенное уменьшение коэффициентов диффузии по сравнению с малыми молекулами.

Для приблизительно сферических макромолекул хорошо выполняется закон Стокса, и коэффициент диффузии D можно рассчитать по уравнению Стокса–Эйнштейна:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}, \quad (1)$$

где k – постоянная Больцмана, η – вязкость среды, r – радиус сферы.

Так, у белков значения коэффициентов диффузии молекул в подвижной (D_m) и неподвижной (D_s) фазах в 10–30 раз меньше, чем, например, у аминокислот, а для очень крупных молекул рибонуклеиновой кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) эти значения существенно меньше. Следовательно, расширение зон и ухудшение разрешения при хроматографировании макромолекул связано, главным образом, с трудностью установления равновесия между фазами. Продольная диффузия большой роли здесь не играет.

Важной особенностью, которую необходимо учитывать при хроматографировании макромолекул, является их полиэлектролитность. Наличие нескольких точек, связывающих макромолекулы с сорбентом, в случае обычной адсорбции или ионного обмена приводит к ряду специфических особенностей взаимодействия вещества с сорбентом. Во-первых, начинает сказываться стерическое соответствие между ними, например, близость средних расстояний между взаимодействующими (сорбционными, ионогенными) группами на поверхности макромолекулы и на сорбенте, что диктует определенную конфигурационную избирательность процесса. Во-вторых, «распластывание» молекулы на поверхности адсорбента может вызвать ее денатурацию.

Еще одна особенность хроматографии макромолекул заключается в проблеме доступности всего объема неподвижной фазы внутри гранул. Ограничение такой доступности вследствие статистического разброса размеров пор пространственной сетки гранул используется для фракциониро-

вания макромолекул в эксклюзионной (ситовой) хроматографии, однако в других вариантах хроматографии ограничение доступности всего объема пор не только уменьшает емкость системы, но и существенно затрудняет установление равновесия.

Как говорилось выше, для хроматографирования макромолекул более подходит градиентное элюирование. Рассмотрим этот способ проведения хроматографического процесса в варианте ВЭЖХ подробнее.

3.2. Градиентное элюирование

В целях уменьшения вероятности денатурации биологических макромолекул в хроматографической колонке используют градиентное элюирование. Кроме того, в химии лекарственных веществ и органическом синтезе исследователь чаще всего работает с относительно простыми смесями, содержащими не более 5–10 компонентов. Если компоненты не слишком различаются по своим свойствам, обычно не удастся подобрать такую подвижную фазу, которая обеспечивает приемлемую скорость анализа и селективность разделения. На рис. 10 приведены хроматограммы смеси, для которой не удастся подобрать изократический (т.е. при постоянном составе подвижной фазы) режим разделения [6].

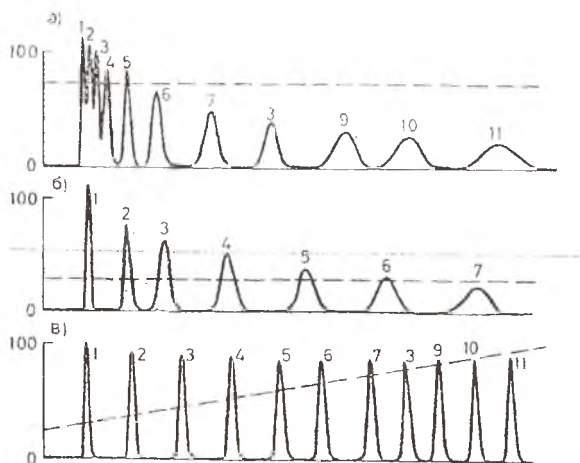


Рис. 10. Хроматограммы сложной смеси: *a* – изократическое элюирование, подвижная фаза сильная, из колонки выходят все компоненты пробы, однако рано выходящие делятся плохо; *b* – изократическое элюирование, сила подвижной фазы недостаточна, компоненты 8–11 из колонки не выходят; *v* – градиентное элюирование. Пунктир изображает содержание модификатора в подвижной фазе в ходе элюирования

В противоположность этому режиму под градиентным элюированием понимают такой способ проведения хроматографического процесса, когда в ходе анализа концентрация модификатора подвижной фазы изменяется по заданному закону. Некоторые вопросы теории и методики применения градиентного элюирования рассмотрены в статье [7].

Расчет удерживаемых объемов при градиентном элюировании базируется на следующей основной идее [7]. Предположим, что бесконечно малому объему подвижной фазы dV , прошедшему через колонку, отвечает смещение максимума хроматографической зоны, пропорциональное величине объема подвижной фазы в колонке dV_m . В течение этой бесконечно малой ступени элюирования фактор удерживания k можно считать постоянной величиной, поэтому:

$$dV = kdV_m \quad (2)$$

Это уравнение может быть записано в другой форме:

$$\int_0^{V_m} dV_m = V_m = \int_0^{V_g} \frac{1}{k} dV, \quad (3)$$

где V_g – удельный удерживаемый объем в режиме градиентного элюирования. Это же соотношение может быть представлено в единицах времени:

$$\int_0^t dt_m = t_m = \int_0^{t_R} \frac{1}{k} dt, \quad (4)$$

где t_R – время удерживания в режиме градиентного элюирования.

Для решения этих уравнений необходимо выразить зависимость факторов удерживания от объема элюента (или времени с начала градиента) в виде двух функций. Одна из них описывает связь между удерживанием и концентрацией модификатора, вторая – связь между этой концентрацией и объемом элюента (временем). Уравнение (3) тогда можно записать в виде:

$$\int_0^{V_m} dV_m = V_m = \int_0^{V_g} \frac{dV}{f[\Phi(V)]}, \quad (5)$$

где $\Phi(V)$ – функция градиента. В простейшем случае $\Phi(V)$ – линейная функция, и концентрация модификатора может быть выражена следующим образом:

$$c = \Phi(V) = A + BV, \quad (6)$$

где A – исходная концентрация модификатора; B – крутизна градиента.

С другой стороны, зависимость k от c может быть выражена уравнением, которое предложили авторы [7]:

$$\lg k = a - mc, \quad (7)$$

где a, m , – коэффициенты, c – объемная концентрация более сильного растворителя – модификатора; $a = k_{\omega}$; k_{ω} – фактор удерживания, экстраполированный к нулевому содержанию органического растворителя в подвижной фазе.

Объединив уравнения (5), (6) и (7), получим:

$$V_m = \int_0^g \frac{1}{k_{\omega}} \cdot 10^{m(A+BV)} dV \quad (8)$$

и после интегрирования найдем удельный удерживаемый объем:

$$V_g = \frac{1}{mB} \lg(2,31mBk_{\omega} V_m \cdot 10^{-mA} + 1). \quad (9)$$

Приведенный подход позволяет с достаточной точностью предсказать поведение соединений в градиентном режиме, если известны параметры уравнения (7). В таблице 2 приведены величины удельных удерживаемых объемов, рассчитанные по уравнению (9) и определенные экспериментально, для ряда лекарственных веществ.

Таблица 2

Сопоставление расчетных и экспериментальных значений V_g некоторых алкалоидов и барбитуратов [6]

Колонки с Лихросорбом RP18 (300×4,2 мм), $V_m = 3,2$ мл, градиент по уравнению (9)

| Соединение | $A = 0;$ $B = 0,06872$ | | $A = 0,1;$ $B = 0,06872$ | | $A = 0,1;$ $B = 0,01718$ | |
|---------------|---------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|
| | $V_{g\text{расч}}$ | $V_{g\text{эксп}}$ | $V_{g\text{расч}}$ | $V_{g\text{эксп}}$ | $V_{g\text{расч}}$ | $V_{g\text{эксп}}$ |
| Теобромин | 4,71 | 5,14 | 3,33 | 3,54 | 11,78 | 12,17 |
| Теофиллин | 5,78 | 6,32 | 4,42 | 4,74 | 13,84 | 15,56 |
| Кофеин | 6,92 | 7,26 | 5,50 | 5,64 | 18,71 | 19,51 |
| Барбитал | 7,09 | 7,25 | 5,69 | 5,84 | 18,05 | 17,92 |
| Гептобарбитал | 8,02 | 8,14 | 6,58 | 6,68 | 22,81 | 22,27 |
| Аллобарбитал | 8,61 | 8,72 | 7,17 | 7,31 | 24,74 | 24,34 |
| Апробарбитал | 9,14 | 9,28 | 7,70 | 7,90 | 27,10 | 26,75 |
| Бутобарбитал | 9,85 | 10,01 | 8,40 | 8,63 | 30,17 | 29,98 |
| Гексобарбитал | 10,37 | 10,58 | 8,91 | 9,13 | 32,21 | 31,90 |
| Пентобарбитал | – | – | 9,16 | 9,41 | 34,30 | 33,97 |

Фактор разделения в градиентном режиме α_g может быть рассчитан по аналогии с изократическими параметрами из формально вычисляемых, «кажущихся» факторов удерживания:

$$\alpha_g = \frac{k_{g_2}}{k_{g_1}} \quad (10)$$

Величина степени разделения R определяется для линейного градиента выражением:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\alpha_g - 1}{\alpha_g} \frac{\lg(2,31m_2BV_m k_{\omega_2} \cdot 10^{-m_2A} + 1) - 1}{\frac{B}{A} \cdot V_m [1 + k_{\omega_2} (2,31m_2BV_m k_{\omega_2} + 10^{m_2A})^{-1}]}, \quad (11)$$

где значения символов те же, что в уравнениях (2–9), индекс «2» отвечает параметрам второго пика разделяемой пары, индекс «g» – режиму градиентного элюирования.

При общей оценке применимости метода для разделения многокомпонентных смесей может быть использован параметр P – емкость хроматограммы (в изократическом P_c и градиентном P_g режиме элюирования):

$$P_c = \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \left(\frac{V_{RZ}}{V_{RA}} \right); \quad (12)$$

$$P_g = \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \left(\frac{V_{gZ}}{V_{gA}} - 1 \right), \quad (13)$$

где V_{RZ} и V_{RA} – удерживаемые объемы, отвечающие начальной и конечной точкам рассматриваемого участка хроматограммы в изократическом режиме; V_{gZ} и V_{gA} – аналогичные величины для градиентного элюирования.

Из вышеизложенного следует, что расчет оптимальных условий градиентного элюирования требует знания параметров k_{ω} и m уравнения (7). Разумеется, эти величины можно определить, проведя необходимые предварительные измерения в изократическом режиме. Однако не всегда компоненты смеси доступны в индивидуальном виде, в связи с чем условия градиентного элюирования, близкие к оптимальным, выбирают опытным путем на основании правил, приведенных ниже.

Выбрав подходящую колонку, проводят градиентное элюирование в таком режиме, чтобы концентрация модификатора изменялась по определенному закону от 0 до 100%, а объем растворителя в 10–15 раз превышал V_m . Если для разделения всей смеси веществ требуется изменение градиента не более чем на 25%, вполне вероятно, что для данной смеси можно подобрать условия элюирования в изократическом режиме. В противном случае градиентное элюирование необходимо, и дальнейшее улучшение режима производят на основании анализа распределения пиков на хроматограмме [6]:

– если пики располагаются равномерно, причем первые из них отстоят далеко от пика выхода несорбирующегося вещества и разделение недостаточное, следует уменьшить крутизну градиента B ;

- если при равномерном распределении пиков первые из них удерживаются слабо, должна быть уменьшена начальная концентрация модификатора A ;
- если при равномерном распределении пиков они хорошо разделены и продолжительность анализа велика, рекомендуется увеличить A и (или) B ;
- если разделение пиков удовлетворительное, но первое соединение имеет слишком большое время удерживания, требуется увеличить A ;
- если компоненты разделяемой смеси элюируются быстро и пики на хроматограмме плохо разделены между собой, то параметры A и B должны быть снижены;
- если некоторые компоненты смеси элюируются после завершения градиента, но разделение удовлетворительное и продолжительность анализа невелика, нет необходимости изменять профиль градиента. Однако если в этом случае хроматограммы имеют «лишние» участки нулевой линии, а время выхода последнего компонента велико, то модификатор должен быть заменен на другой, обладающий большей элюирующей силой;
- если нулевая линия имеет «лишние» участки в конце хроматограммы, а пики в начале хроматограммы плохо разделяются, следует изменить профиль градиента: крутизна его должна возрастать по ходу анализа, либо в начале анализа должен быть участок изократического элюирования;
- если в начале хроматограммы имеются «лишние» участки нулевой линии, а последующие пики разделены недостаточно, то крутизна градиента должна снижаться по мере его прохождения, либо в конце разделения должен быть участок изократического элюирования;
- если разделение и местоположение большинства пиков на хроматограмме удовлетворительное, но имеется одна или несколько пар плохо разделенных пиков в различных частях хроматограммы, то рекомендуется оптимизировать селективность разделения этих пар, например меняя B либо заменив модификатор другим, отличающимся по селективности.

Вопросы теории и методики применения градиентного элюирования подробно рассмотрены в работах [7–14].

3.3. Обращенно–фазовая хроматография

Из всех вариантов ВЭЖХ обращенно–фазовой применяется в настоящее время наиболее широко. Его привлекательность определяется методической простотой и универсальностью, во многих случаях – простотой механизма сорбции и предсказуемостью поведения веществ на основании их строения.

Термин «обращенно–фазовая хроматография» ввели Говард и Мартин в 1950 году [15], когда ими было описано разделение жирных кислот с использованием жидкого парафина и n -октана в качестве неподвижных фаз. В отличие от других, ранее применявшихся систем распределительной

хроматографии, здесь неподвижная фаза менее полярна, чем подвижная, что и послужило поводом к такому наименованию.

Важнейшую роль в понимании механизма удерживания сыграли работы Хорвата [16–18]. Суть теории Хорвата заключается в следующем: существует принципиальное различие между процессами сорбции на полярных поверхностях из относительно неполярных растворителей («нормально-фазовый режим») и сорбцией из воды, либо сильно полярных растворителей на поверхностях неполярных («обращенно-фазовый режим»). В первом случае между молекулами сорбатов и неподвижных фаз образуются ассоциаты за счет кулоновских взаимодействий или водородных связей. Во втором случае причиной ассоциации на поверхности являются так называемые сольвофобные взаимодействия в подвижной фазе. Для полярных подвижных фаз, в особенности содержащих воду, характерно сильное кулоновское взаимодействие и образование водородных связей между молекулами растворителей. Все молекулы в таких растворителях связаны довольно прочно межмолекулярными силами. Для того, чтобы «поместить» в эту среду молекулу сорбата, необходимо образование полости между молекулами растворителя. Энергетические затраты на образование такой полости частично покрываются за счет взаимодействия полярных групп в молекуле сорбата с полярными молекулами растворителя. В аналогичном положении по отношению к растворителю находятся и неполярные молекулы неподвижной фазы. С энергетической точки зрения более выгодно такое положение, когда поверхность раздела между полярной средой (растворителем) и полярными фрагментами неподвижной фазы и молекул сорбата минимальна. Уменьшение этой поверхности и достигается при сорбции (рис. 11).

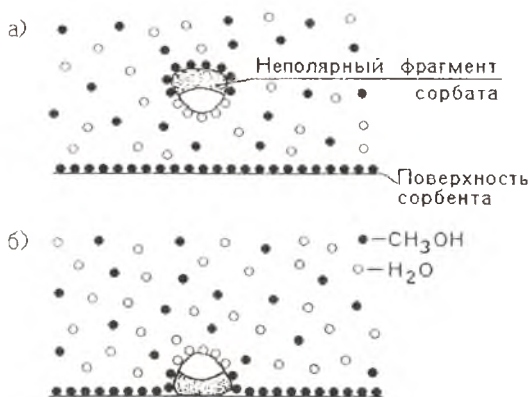


Рис. 11. К механизму обращенно-фазовой хроматографии [6]: а – сорбат в растворе; б – сорбат на поверхности неподвижной фазы. Молекулы воды и органического растворителя обозначены соответственно светлыми и темными кружками

Таким образом, причинами сорбции в обращенно-фазовой хроматографии служит сильное притяжение полярных молекул растворителя одна к другой, как бы «прижимающее» растворенные менее полярные молекулы к неполярной поверхности, и межмолекулярное взаимодействие «сорбтив – сорбент». Из всего этого следует, что роль химической природы неподвижной фазы в обращенно-фазовой хроматографии относительно мала по сравнению с нормально-фазовой хроматографией, так как взаимодействие сорбат – сорбент ограничивается слабыми дисперсионными силами.

3.3.1. Удерживание веществ в обращенно-фазовой хроматографии и особенности строения молекул сорбатов

При постоянных условиях хроматографирования удерживание различных сорбатов определяется следующими факторами:

- дипольным моментом сорбатов;
- объемом их молекул;
- поляризуемостью;
- уменьшением площади неполярной поверхности при сорбции.

Теоретическое исследование, связанное с выявлением роли каждого из этих факторов, послужило основой для многочисленных моделей, связывающих факторы удерживания с доступными структурными параметрами или физико-химическими свойствами сорбатов. Эти модели имеют большое практическое значение при интерпретации хроматограмм, выборе условий разделения. Полученные с их помощью результаты в совокупности подтверждают сольвофобную теорию обращенно-фазовой хроматографии.

Используемый принцип моделирования в общем виде может быть выражен уравнением:

$$R_i = R_0 + aS_i, \quad (14)$$

где R_i – параметр удерживания или какая-либо его функция, чаще всего $\lg k$ (k – фактор удерживания); R_0 – постоянная составляющая параметра R , общая для рассматриваемого множества соединений; S_i – параметр, описывающий существенные для хроматографического поведения особенности структуры сорбата i ; a – коэффициент.

В зависимости от вида параметра S_i модели удерживания могут быть отнесены к одной из трех групп:

- аддитивная модель удерживания,
- модель «удерживание – свойство»,
- модель «удерживание – структура сорбата».

3.3.2. Аддитивные модели удерживания

В простых аддитивных моделях S_i есть сумма инкрементов удерживания, выраженная непосредственно в единицах R_i :

$$S_i = \sum n_j s_j, \quad (15)$$

где s_j – инкремент R_i , отвечающий структурному фрагменту j ; n_j – число структурных фрагментов j в молекуле сорбата i . Разумеется, в этом случае $a=1$.

В работе [19] методом ВЭЖХ изучено поведение ряда биологически важных производных фенилэтиламина и аминокислот и найдены инкременты удерживания, отвечающие окси-, метокси- и метильной группам в различных положениях. Показано, что данные, полученные на одном сорбенте, могут быть перенесены на другой, если состав подвижной фазы в обоих случаях одинаков.

Авторы [20] детально изучили поведение большого числа замещенных пуринов. Найдены величины S_i для ряда характерных заместителей в различных положениях. Прогнозирующая способность полученной модели проверена на 62 соединениях, не входивших в первоначальный массив для определения S_i . Аддитивные схемы расчета позволяют добиться практически приемлемой надежности прогнозирования удерживания.

3.3.3. Модели «удерживание – свойство»

В таких моделях S_i представляет собой какое-либо (чаще всего нехромографическое) свойство сорбата. Этот тип моделей основан на том, что особенности строения в рамках ограниченных множеств сорбатов влияют на ряд других химических параметров аналогично их влиянию на удерживание.

Из моделей данного типа наиболее популярны уравнения, связывающие факторы удерживания с коэффициентами распределения (чаще всего в системе октанол – вода). Применение системы октанол – вода вызвано тем, что она широко используется для оценки биологической активности и для нее существует детально разработанная методика аддитивного расчета коэффициентов распределения исходя из строения веществ [21]. Работы этого направления преследуют обычно одну из двух противоположных целей:

- 1) на основании логарифмов коэффициентов распределения, найденных опытным или расчетным путем, рассчитать величины удерживания;
- 2) из величин удерживания, измеренных хроматографически, рассчитать коэффициенты распределения.

При решении первой задачи особенно привлекательна возможность использования аддитивного расчета логарифмов коэффициентов распределения, который в настоящее время разработан лучше, чем непосредственные аддитивные расчеты факторов удерживания. С другой стороны, применение хроматографии открывает новые возможности для измерения ко-

эффицентом распределения, в особенности гидрофобных соединений или веществ, недоступных в чистом виде. Решение обеих задач базируется на линейной зависимости между логарифмами коэффициентов распределения и факторов удерживания:

$$\lg k = a + b \lg P_{ij}, \quad (16)$$

где P_{ij} – коэффициент распределения вещества между фазами i и j .

Естественно, уравнение (16) является весьма приближенным уже потому, что в нем не учитываются различная селективность хроматографических систем и отличия селективности этих систем от классических систем распределения жидкость – жидкость. Отклонения от уравнения (16) нередки, в особенности, если рассматривать группы соединений, сильно отличающихся не только гидрофобными фрагментами, но и характером функциональных групп.

В работе [22] сделана попытка с помощью уравнения (16) описать величины удерживания пептидов – фрагментов кортикотропина, имеющих не более одной свободной концевой группы. Полученные значения коэффициентов a и b уравнения (16), а также коэффициент корреляции r представлены в таблице 3(А) [6]. Корреляция между $\lg k$ и $\lg P$ не может быть признана удовлетворительной.

Таблица 3

Параметры уравнения (16) для пептидов

| Концентрация ацетонитрила, об. % | a | b | r |
|-------------------------------------|--------|-------|-------|
| А | | | |
| 55 | -0.273 | 0.107 | 0.627 |
| 50 | -0.047 | 0.124 | 0.622 |
| 45 | 0.132 | 0.137 | 0.585 |
| 40 | 0.620 | 0.121 | 0.599 |
| 35 | 0.616 | 0.060 | 0.280 |
| Б | | | |
| 50 | -0.595 | 0.230 | 0.962 |
| 45 | -0.534 | 0.277 | 0.970 |
| 35 | 0.091 | 0.219 | 0.843 |

Примечание: А – в качестве $\lg P_{ij}$ взят расчетный параметр для системы октанол – вода по Реккеру; Б – в качестве $\lg P_{ij}$ взят параметр, рассчитанный по модифицированным инкрементам.

Наибольшие погрешности аппроксимации соответствуют пептидам с незащищенными концевыми группами. Это можно объяснить тем, что вклады этих полярных функциональных групп в баланс гидрофильных и гидрофобных свойств в системе, состоящей из водного раствора ацетонит-

рила и химически связанных групп $C_{18}H_{37}$, отличаются от аналогичного вклада для системы октанол – вода. Следовательно, возникает необходимость коррекции инкрементов IgP . Для этого можно попытаться по экспериментальным данным рассчитать значения инкрементов для характерных полярных функциональных групп пептидных соединений. Такие инкременты составляют: для $-CH_2CONH-$ 0,40; $-COOH_{пепт}$ – 2, 33; $-NH_{2 пепт}$ – 2,05. Эти значения, специфические для веществ пептидной природы, позволили значительно лучше описать поведение этой группы веществ в обратенно-фазовых системах (таблица 3(Б)).

Экспериментальное определение IgP чревато ошибками, связанными с недостижением равновесия, а также наличием примесей в исследуемом образце. Хроматографический метод определения этой величины свободен от вышеперечисленных потенциальных источников погрешности.

Для применения хроматографии с целью определения IgP в системе октанол – вода необходимо:

- на основании величин Igk и достоверных значений IgP для веществ-стандартов найти коэффициенты уравнения (16);
- измерить для изучаемых веществ Igk и рассчитать искомый параметр по уравнению:

$$IgP = \frac{Igak - a}{b}. \quad (17)$$

В качестве системы ij в уравнении (16) может выступать не только система двух несмешивающихся жидкостей, но и другая хроматографическая система. В этом случае можно связать непосредственно факторы удерживания в системах 1 и 2 по уравнению:

$$Igak_1 = a + bIgak_2. \quad (18)$$

Некоторые другие физико-химические свойства сорбатов, связанные с их гидрофобностью или определяющие ее, также могут использоваться для интерпретации хроматографических данных. Это могут быть корреляции между растворимостью, например, алифатических спиртов в воде и логарифмом фактора удерживания [23]; величинами молекулярной поляризуемости и логарифмом фактора удерживания ароматических углеводородов [24].

3.3.4. Модели «удерживание – структура»

Модели этой группы устанавливают связь между удерживанием и строением сорбатов, выраженным с помощью тех или иных структурных дескрипторов. Во многих случаях логарифм фактора удерживания линейно связан с числом повторяющихся структурных фрагментов n :

$$Igak = a + bn. \quad (19)$$

Самым распространенным дескриптором является число атомов углерода n_c в молекуле вещества, принадлежащего к определенному гомологическому ряду:

$$\lg k = a + bn_c, \quad (20)$$

где b – вклад в $\lg k$, соответствующий одному атому углерода; a – константа. Уравнение (20), как правило, прекрасно описывает экспериментальные данные соединений одного гомологического ряда, для которых a – постоянная величина. Сравнивая коэффициенты уравнения (20) для различных гомологических рядов, можно заключить, что величина b мало зависит от класса веществ, в то время как a закономерно уменьшается при переходе от менее полярных классов сорбатов к более полярным.

Хорошо коррелируют с физико-химическими свойствами веществ различные дескрипторы, характеризующие структуру молекул – индексы связности X . Подробно об этих параметрах и методах их расчета говорится в главе 7.

3.3.5. Выбор элюирующей силы подвижной фазы в обращенно-фазовой хроматографии

В настоящее время выбор концентрации модификатора в подвижной фазе осуществляется, главным образом, методом проб и ошибок с учетом самых общих представлений о влиянии полярности сорбатов на их удерживание. Выбрать оптимальный состав подвижной фазы для изократического элюирования можно также, осуществив пробное разделение в градиентном режиме. И, наконец, можно использовать расчетные методы, основанные на моделях, связывающих удерживание с составом подвижной фазы и параметрами гидрофобности сорбатов. Такие модели рассмотрены в разделах 3.3.2 – 3.3.4.

Иногда разнообразие разделяемых смесей велико, а анализ каждой из них предстоит выполнить несколько раз. В этих условиях не оправданы затраты на доскональные исследования и одновременно возрастает потребность в экспрессной оценке условий разделения. В данном случае лучше использовать двухстадийный подход к выбору условий разделения. На первой стадии желательно выбрать условия, чтобы основные компоненты смеси имели факторы удерживания в пределах 0,5–2. При этом на хроматограмме наиболее четко проявятся более полярные примеси, удерживаемые слабее основных компонентов смеси. Имеется также вероятность, что будет зафиксирован почти весь спектр менее полярных, сильнее удерживаемых соединений. Во многих случаях уже этот, первичный режим разделения позволит ответить на поставленные вопросы. Если все же разделение смеси недостаточное, может потребоваться изменение силы подвижной фазы, чтобы за счет увеличения фактора удерживания и фактора разделения добиться необходимой степени разделения. Выбор концен-

трации модификатора может осуществляться с помощью моделей, рассмотренных выше. Остановимся подробнее на выборе первичного режима разделения с помощью расчетных методов.

В идеале система априорного расчета величин удерживания должна отвечать следующим требованиям:

- универсальности, применимости к соединениям различного строения;
- точности;
- простоте и наглядности структурных параметров.

Рассмотренные выше модели удовлетворить всем требованиям, возможно, не смогут, однако, желательно, чтобы для анализа лекарственных веществ, к числу которых могут принадлежать представители различных классов органических соединений, модель по возможности была более простой и универсальной. Желаемого результата можно достичь, используя модель «удерживание-свойство», заменив в ней $\lg P$ и X на упрощенный критерий гидрофобности.

3.3.6. Упрощенный критерий гидрофобности

Упрощенный критерий гидрофобности (H) основан на следующих допущениях [6]:

- размер молекул органических соединений определяется в первую очередь числом атомов углерода;
- снижение гидрофобности при введении в молекулу сорбата полярной функциональной группы определяется для полифункциональных сорбатов не столько характером группы и ее специфической гидрофильностью, сколько самим фактом ее наличия.

Вышеперечисленные допущения при расчете упрощенного критерия позволяют не учитывать детализацию инкрементов гидрофобности. Суммарная гидрофобность соединения, молекулы которого состоят из углеводородных фрагментов и полярных функциональных групп, может быть выражена упрощенным критерием гидрофобности:

$$H = n_c + f(n_f), \quad (21)$$

где n_f – число полярных функциональных групп.

Анализ поведения монофункциональных полярных соединений в условиях обращенно-фазовой хроматографии показывает, что введение одной функциональной группы вызывает в среднем такое же уменьшение удерживания, как и уменьшение углеродного скелета на 4 атома углерода. Следовательно, в самой простейшей форме уравнение (21) может быть переписано так:

$$H = n_c - 4n_f. \quad (22)$$

Однако такая модель не может быть удовлетворительной уже начиная с $n_f = 2$, поскольку эффекты неаддитивности в обращенно-фазовом ре-

жиме проявляются даже при весьма отдаленном расположении функциональных групп. При последовательном введении в молекулу дополнительных функциональных групп неаддитивность возрастает как вследствие увеличения числа парных взаимодействий, так и вследствие уменьшения среднего расстояния между функциональными группами.

В качестве эмпирической функции, описывающей неаддитивность вкладов функциональных групп в гидрофобность, применяется соотношение [6]:

$$f(n_f) = -4\sqrt{n_f}. \quad (23)$$

Отдельно следует рассмотреть вопрос влияния на гидрофобность атомов галогенов и атомов серы в меркаптанах и тиоэфирах. Анализ величин парциальной гидрофобности и того эффекта, который эти атомы оказывают на удерживание, свидетельствует о том, что вклад атомов серы и галогенов в гидрофобность сильно зависит от характера остальной части молекулы. Тем не менее можно принять следующие утверждения:

- каждый атом галогена эквивалентен по своему влиянию одной метиленовой группе;
- атомы серы в тиоэфирах и меркаптанах не повышают и не снижают гидрофобности молекулы в целом.

Следовательно, в окончательном виде в уравнении (21) необходимо член n_c заменить членом n_h – числом элементарных гидрофобных фрагментов в молекуле, т.е. суммой числа атомов углерода и галогенов:

$$H = n_h - 4\sqrt{n_f}. \quad (24)$$

Критерий H не претендует на детальное описание гидрофобности в узких группах веществ, мало отличающихся по структуре, а предлагается в качестве универсальной меры гидрофобности для описания веществ, сильно отличающихся по структуре. Обнаружено, что упрощенный критерий гидрофобности хорошо коррелирует с параметрами $\lg P$. С помощью упрощенного критерия гидрофобности можно априорно подобрать концентрацию модификатора для конкретного разделения лекарственных веществ.

3.4. Удерживание веществ в нормально–фазовой хроматографии

В нормально–фазовой хроматографии, как уже говорилось выше, неподвижная фаза более полярна, чем подвижная. В этом случае неподвижной фазой, как правило, является адсорбент с развитой поверхностью – силикагель. Для адсорбции из жидких растворов характерно взаимное вытеснение молекул их компонентов с поверхности адсорбента, то есть адсорбция одних молекул обязательно сопровождается десорбцией других. Энергия адсорбции данного компонента из жидкого раствора определяется разностью энергий межмолекулярного взаимодействия его молекул с адсорбентом и с

соседними молекулами в объемном и поверхностном растворах. Поэтому она в несколько раз (иногда на порядок) меньше энергии адсорбции того же компонента из газовой фазы [25]. Это позволяет, во-первых, осуществлять жидкостно-адсорбционную хроматографию при значительно более низких температурах и, во-вторых, варьировать природу элюента, добавляя к нему вещества, адсорбирующиеся сильнее или слабее данного компонента, что, в свою очередь, дает возможность блокировать наиболее неоднородные и сильно адсорбирующие участки поверхности адсорбента, то есть делать ее более однородной по отношению к компонентам разделяемой смеси. В этом случае для полосы данного компонента имеет место адсорбция из трехкомпонентного раствора: данный компонент смеси, растворитель и добавленное к нему вещество, концентрация которого обычно много больше концентрации компонента разделяемой смеси.

Такой подход позволяет с единых позиций рассматривать нормально-фазовый и обращенно-фазовый варианты высокоэффективной жидкостной хроматографии, принципиально не отличающиеся друг от друга. Основное различие между этими вариантами ВЭЖХ заключается в разном характере межмолекулярных взаимодействий между молекулами адсорбата, с одной стороны, и подвижной фазы и неподвижной фазы – с другой.

В теории удерживания в жидкостной хроматографии существуют различные модели удерживания, некоторые из которых для обращенно-фазового варианта были рассмотрены выше. Далее рассмотрим так называемые «универсальные» модели, которые могут применяться для описания удерживания веществ в различных вариантах жидкостной хроматографии. Знание этих моделей позволит осознанно подходить к выбору хроматографических систем для хроматографирования конкретных смесей веществ, в том числе биологических объектов.

3.4.1. Модели удерживания Снайдера, Сочевинского, Скотта–Кучеры, квазихимическая вытеснительная модель

Модель Снайдера [26–31] предполагает, что однородная поверхность адсорбента полностью покрыта либо молекулами подвижной фазы X , либо молекулами анализируемого вещества S . Квазихимическая реакция адсорбции в этом случае может быть описана уравнением:



где $n = \frac{A_S}{A_X}$ – отношение площадей молекул адсорбата S и растворителя X

в адсорбционном слое; индексы m и a относятся к подвижной и адсорбированной фазам, соответственно. Следовательно, при адсорбции одной молекулы S в подвижную фазу вытесняется n молекул растворителя X .

По Снайдеру, зависимость фактора удерживания от состава бинарной подвижной фазы выражается уравнением:

$$\lg k = a - n' \cdot \lg X_m, \quad (26)$$

где $n' = \frac{A_S}{A_M}$ – отношение площадей молекул адсорбата S и более сильно адсорбирующегося компонента подвижной фазы (модификатора M).

Модель Сочевинского [32] в отличие от модели Снайдера предполагает, что поверхность адсорбента не однородна, а состоит из дискретных активных центров, между которыми расположены менее активные участки. Адсорбция происходит на активных центрах, при этом с участием функциональной группы сорбата с адсорбентом образуются адсорбционные комплексы состава 1:1. Влияние состава бинарной подвижной фазы на удерживание описывается тем же уравнением, что и в теории Снайдера:

$$\lg k = a - n'' \cdot \lg X_m. \quad (27)$$

Исходная концепция предполагала, что, поскольку адсорбция одной молекулы происходит на одном центре, значение $n'' = 1$. В ходе дальнейших исследований [33] было показано, что величина n'' может довольно значительно отличаться от единицы в обе стороны, то есть истинная стехиометрия вытеснения молекул растворителя с поверхности адсорбента отличается от постулированного первоначального отношения 1:1.

Таким образом, единственная разница между двумя моделями заключается в физическом смысле углового коэффициента уравнений (26) и (27). По Снайдеру, это отношение площадей молекул адсорбата и сильно адсорбирующегося компонента подвижной фазы, по Сочевинскому – число активных центров адсорбента, участвующих в адсорбции одной молекулы сорбата. Поскольку обе модели предполагают, что сорбент полностью покрыт (по Снайдеру – вся поверхность, по Сочевинскому – все центры) адсорбционным слоем, то возможна и общая для обеих моделей формулировка физического смысла n' и n'' , как число молекул подвижной фазы, вытесняемое при адсорбции одной молекулой хроматографируемого вещества [34]. В этих моделях пренебрегают взаимодействием между молекулами элюента и молекулами вещества. В модели Снайдера–Сочевинского фактор удерживания веществ k определяется следующим соотношением [28, 32]:

$$\lg k = \lg V_s - \alpha_a \cdot (S^0 - A_E \cdot \epsilon^0), \quad (28)$$

где V_s – объем адсорбента в колонке; α_a – адсорбционная активность адсорбента; S^0 – энергия адсорбции для стандартного элюента; A_E – площадь молекулы адсорбированного вещества; ϵ^0 – элюирующая сила подвижной фазы.

Эта модель проверена экспериментально для некоторых простых систем, в основном для силикагелей и оксида алюминия [35]. В работах [35, 36] показано, что эта модель удовлетворительно описывает удержива-

ние и на адсорбентах с привитыми фазами (элюент неполярный). Однако из-за ограничений и допущений, сделанных в этой модели, она не может быть использована для всех систем жидкостно-адсорбционной хроматографии, особенно с сильнополярными элюентами.

Линейная зависимость между удерживанием сорбатов и логарифмом молярной концентрации органического модификатора в подвижной фазе описывается уравнением [6]:

$$\lg k = b + p \cdot \lg c, \quad (29)$$

где b , p – константы. Коэффициенты корреляции таких зависимостей порядка 0,99.

Существует так называемая вытеснительная модель [37–39], описывающая адсорбцию молекул органических веществ на поверхности адсорбента при элюировании двухкомпонентной подвижной фазой. При взаимодействии бинарного раствора с мезопористым или непористым адсорбентом на поверхности образуется монослой адсорбированных молекул, состав которого в общем случае отличается от состава объемного раствора. Изменение состава монослоя в зависимости от состава равновесного с ним бинарного раствора описывается изотермой адсорбции. При этом происходит обогащение монослоя одним преимущественно адсорбируемым компонентом бинарного раствора и соответственно обеднение монослоя слабо адсорбируемым (вытесняемым) компонентом. С ростом концентрации сильнее адсорбируемого компонента в объемном растворе может идти образование монослоя постоянного состава. В некоторых случаях такой компонент может полностью вытеснить слабо адсорбируемый компонент из монослоя. Монослой постоянного состава в большинстве случаев может образоваться в довольно широкой области равновесных концентраций сильнее адсорбирующегося компонента в объемном растворе [40–42].

Для описания изотерм адсорбции из растворов применяют различные подходы и уравнения [40–44]. В некоторых из уравнений вместо равновесных концентраций используют активности компонентов объемного и адсорбционного растворов и с применением геометрической модели адсорбционной фазы рассчитывают состав адсорбционного монослоя и коэффициенты активности компонентов в адсорбированном состоянии.

В хроматографической колонке в условиях квазиравновесного режима разделение компонентов C и D анализируемой смеси протекает в монослое адсорбционного раствора компонентов A и B благодаря различию в энергиях взаимодействия компонентов C и D с адсорбентом и компонентами A и B поверхностного (адсорбционного) и объемного растворов. Процесс удерживания компонента C (и компонента D) в хроматографической колонке, через которую протекает бинарная подвижная фаза с компонентами A и B , можно описать в первом приближении обратимой квазихимической реакцией [37]:

$$mA(adc.) + nB(adc.) + C \Leftrightarrow mA + nB + C(adc.). \quad (30)$$

В реакции (30) одна молекула компонента C вытесняет из монослоя m молекул компонента B . Коэффициенты m и n могут иметь и дробные значения. Для константы адсорбционного равновесия K в этой системе можно записать следующее выражение:

$$K = \frac{X_1^m \cdot X_2^n \cdot X_{a,3}}{X_{a,1}^m \cdot X_{a,2}^n \cdot X_3}, \quad (31)$$

где X_i и $X_{a,i}$ – равновесные мольные доли компонентов A , B , C в объемном и адсорбционном растворах соответственно. Отношение $X_{a,3}/X_3 = K_x$ представляет коэффициент распределения компонента C между подвижной объемной и адсорбционной поверхностной фазами. В условиях ВЭЖХ мольные доли $X_{a,3}$ и X_3 во много раз меньше мольных долей компонентов A и B в объемном и адсорбционном растворах, поэтому с большой степенью точности можно считать, что $X_1 + X_2 \cong 1$ и $X_{a,1} + X_{a,2} \cong 1$, тогда выражение (31) можно записать в следующем виде:

$$K = \frac{K_x \cdot X_1^m \cdot (1 - X_1)^n}{X_{a,1}^m (1 - X_{a,1})^n}. \quad (32)$$

В логарифмической форме зависимость K_x от X_1 и $X_{a,1}$ примет вид:

$$\ln K_x = \ln K + m \cdot \ln X_{a,1} + n \cdot \ln(1 - X_{a,1}) - m \cdot \ln X_1 - n \cdot \ln(1 - X_1). \quad (33)$$

На основе условия равенства химических потенциалов при адсорбционном равновесии было получено уравнение изотермы адсорбции из идеальных растворов вида [38]:

$$X_{a,1} = \frac{\beta \cdot f \cdot X_1 \cdot (1 - X_1)}{1 + \beta \cdot (f - 1) \cdot X_1}, \quad (34)$$

где β – коэффициент аффинности, то есть отношение молекулярных площадей компонентов A и B ; f – константа уравнения изотермы адсорбции компонента A из растворов в компоненте B .

Таким образом, из сочетания уравнений (33) и (34) получена зависимость коэффициента распределения анализируемого вещества C от состава бинарного элюента с константами K , f и β и коэффициентами m и n , причем константы f и частично K отражают энергетику взаимодействия бинарной подвижной фазы с поверхностью адсорбента:

$$\ln K_x = \ln K + m \cdot \ln \left[\frac{\beta \cdot X_1 \cdot (1 - X_1)}{1 + \beta \cdot (f - 1) \cdot X_1} \right] + n \cdot \ln \left[\frac{1 - \beta \cdot X_1 \cdot (1 - X_1)}{1 + \beta \cdot (f - 1) \cdot X_1} \right] - m \cdot \ln X_1 - n \cdot \ln(1 - X_1). \quad (35)$$

Очевидно, что в уравнении (35) для неидеальных систем вместо концентраций следует использовать активности. Коэффициенты m и n могут зависеть от состава подвижной фазы.

К недостаткам модели вытеснительной физической монослойной адсорбции из растворов следует отнести то, что она не учитывает возможного изменения ориентации адсорбированных молекул и, следовательно, изменение усредненной толщины адсорбционного монослоя при изменении состава бинарного элюента.

При условии образования монослоя постоянного состава на поверхности адсорбента уравнение (33) принимает вид:

$$\ln K_x = Z - m \cdot \ln X_1 - n \cdot \ln(1 - X_1), \quad (36)$$

где $Z = \ln k + m \cdot \ln X_{a,1} + n \cdot \ln(1 - X_{a,1})$.

Коэффициенты Z , m , n уравнения (36) могут быть определены путем решения системы уравнений, основанной на применении этого уравнения в области постоянства состава адсорбционного слоя (например, $X_1 > 0,2$, где компонент 1 – модификатор (ацетонитрил), компонент 2 – например, вода). Если использовать экспериментальные значения K_x , полученные при трех значениях X_1 , то система трех уравнений:

$$\begin{aligned} a_1 &= Z_1 - b_1 \cdot X - c_1 \cdot Y \\ a_2 &= Z_2 - b_2 \cdot X - c_2 \cdot Y \\ a_3 &= Z_3 - b_3 \cdot X - c_3 \cdot Y \end{aligned} \quad (37)$$

где $a_i = \lg K_{xi}$, $b_i = \lg X_i$, $c_i = \lg(1 - X_i)$, позволяет вычислить величины Z , m и n , причем m и n соответствуют числу вытесненных молекул сильно и слабо адсорбирующегося компонента бинарной подвижной фазы соответственно.

Проверка выполнимости уравнения (36) заключается в построении зависимости $\lg K_x$ от $[m \cdot \lg X_m + n \cdot \lg(1 - X_m)]$, которая при его выполнении является линейной.

Уравнение (36) является более общим, чем уравнения (26) и (28). Они вытекают из уравнения (36) в предположении полного вытеснения молекул слабо адсорбирующегося компонента бинарной фазы ($n = 0$):

$$\lg K_x = Z - m \cdot \lg X_1. \quad (38)$$

Модель Скотта–Кучеры [45–50] основана на получении данных о строении поверхности силикагеля. Согласно этой модели, силикагель покрыт рядом молекулярных слоев, строение которых определяет сорбционную активность. Первый слой состоит из поверхностных силанольных групп. На них располагается второй слой – вода, связанная с силанолами водородными связями. Эти связи довольно прочны, поэтому первый слой воды растворителями не удаляется, его можно удалить лишь при нагревании сорбента до 200–650 °С. Следующий слой состоит из более слабо связанной воды, он уже может быть удален сухими растворителями и восста-

новлен пропусканием через колонку влажных растворителей. Наконец, четвертый слой связан наименее прочно и может состоять из молекул воды либо полярного компонента подвижной фазы.

В зависимости от полярности сорбата возможны следующие схемы взаимодействия с сорбентом:

- замещение молекул подвижной фазы в наружном слое (для наименее полярных сорбатов);
- ассоциация с адсорбционным слоем;
- ассоциация с замещением молекул воды в адсорбционном слое (для наиболее полярных сорбатов).

Согласно модели Скотта–Кучеры, взаимодействия сорбат – сорбент играют существенную роль только при небольших концентрациях полярного растворителя, пока не завершена дезактивация им сорбента. При дальнейшем увеличении концентрации полярного растворителя (примерно свыше 2%) удерживание продолжает уменьшаться, но уже за счет нарастания межмолекулярных взаимодействий сорбата с компонентами подвижной фазы. В соответствии с этой теорией зависимость удерживания от состава подвижной фазы выражается уравнением:

$$1/k = a + b \cdot X_m, \quad (39)$$

где a , b – константы; X_m – концентрация полярного растворителя в подвижной фазе.

Процессы сорбции, имеющие место как в подвижной, так и в неподвижной фазах, вносят существенный вклад в удерживание [51]. При малых концентрациях полярного растворителя в подвижной фазе на поверхности неподвижной фазы доминирует конкурирующая адсорбция. Если же концентрация полярного растворителя больше некоторого предела, становится возможным проникновение анализируемых молекул в адсорбированную фазу без вытеснения ее компонентов в элюент.

Следует отметить, что большинство моделей удерживания в хроматографических системах с бинарными подвижными фазами не учитывают процессов межмолекулярной ассоциации компонентов в растворе, поэтому они применимы для сильно адсорбирующихся веществ и в области не слишком высоких концентраций модификатора (сильно адсорбирующегося компонента) в подвижной фазе.

Наиболее общей является так называемая квазихимическая вытеснительная модель удерживания [52–56]. Согласно этой модели, адсорбция адсорбата и модификатора имеет вытеснительный (конкурентный) характер, нет ассоциации молекул в адсорбционном слое, поверхностный и объемный растворы идеальны. Адсорбционное равновесие для молекул адсорбата описывается уравнениями:



$$K_S = \frac{S_s \cdot L_m}{S_m \cdot L_s}; \quad (41)$$

и для модификатора:



$$K_M = \frac{X_s \cdot L_m}{X_m \cdot L_s}, \quad (43)$$

где K_S и K_M – константы равновесия реакций (40) и (42); S_s , S_m , L_s , L_m , X_s и X_m – мольные доли адсорбата (S), основного компонента элюента, например воды (L) и модификатора (X) в неподвижной и подвижной фазах, соответственно; индексы « s » и « m » относятся к неподвижной и подвижной фазам.

При этом выполняется условие:

$$X_s + S_s + L_s = 1. \quad (44)$$

Допускается равенство размеров молекул S , X и L в поверхностном слое. Полученная зависимость фактора удерживания от концентрации модификатора:

$$1/k = [1 + (K_M - 1) \cdot X_m] / (\phi \cdot K_S), \quad (45)$$

где $\phi = V_a/V_M$, V_M – объем подвижной фазы, V_a – объем адсорбционного слоя в колонке, включает в себя только константы адсорбционного равновесия K_S и K_M .

В реальных системах на удерживание адсорбата влияют не только межмолекулярные взаимодействия с поверхностью адсорбента, но и межмолекулярные взаимодействия в подвижной фазе, которые особенно сильно проявляются в обращенно-фазовой ВЭЖХ. Для случая образования димеров в растворе можно рассматривать равновесия [54]:



где

$$K_{SM} = \frac{(SX)_m}{S_m \cdot X_m}; \quad (47)$$

и



где

$$K_{MM} = \frac{(XX)_m}{X_m \cdot X_m} \quad (49)$$

Фактор удерживания может быть рассчитан, если известны концентрации адсорбата в неподвижной и подвижной фазах [26]:

$$k = \varphi \cdot \frac{S_s}{S_m}, \quad (50)$$

где k – фактор удерживания адсорбата.

Зависимость удерживания адсорбата от концентрации модификатора в подвижной фазе с учетом равновесий (40) – (43) выразится для случая ассоциации адсорбат – модификатор уравнением:

$$1/k = [1 + (K_M - 1) \cdot X_m] \cdot (1 + K_{SM} \cdot X_m) / (\phi \cdot K_S), \quad (51)$$

а для ассоциации модификатор – модификатор уравнением:

$$1/k = [1 + (K_M - 1) \cdot X_m - 2 \cdot K_{MM} \cdot X_m^2] / (\phi \cdot K_S). \quad (52)$$

Зависимости $1/k - X_m$, описываемые уравнениями (51) и (52), нелинейны. Лишь в области малых X_m , а также при низких значениях K_{SM} и K_{MM} они превращаются в линейное уравнение (45).

Квазихимическая вытеснительная модель хорошо подходит для объяснения закономерностей хроматографического удерживания производных бензола и фенола в обращенно-фазовой ВЭЖХ [52, 57], в нормально-фазовой ВЭЖХ на гидроксिलированном силикагеле [55] и на аминопропильной неподвижной фазе [36, 56].

3.4.2. Сольвофобная теория удерживания

Механизм удерживания в обращенно-фазовой хроматографии может быть объяснен на основании так называемой сольвофобной теории [58, 59], что и осуществил Хорват с соавт. [60–62]. В этих работах предложен сольвофобный (в частном случае, гидрофобный) механизм удерживания. Основной идеей при описании механизма удерживания является то, что причиной ассоциации на поверхности сорбента являются так называемые сольвофобные взаимодействия в подвижной фазе. Связь фактора удерживания хроматографируемого вещества с условиями эксперимента и свойствами системы в теории Хорвата выражается уравнением [59]:

$$\ln k = \Phi - \frac{\Delta F_{v,a}}{RT} + \frac{\Delta F_{v,s}}{RT} - \frac{N(\lambda - 1)\mu_s^2}{2\lambda v_s RT} \cdot D \cdot P + \frac{N\gamma\Delta A}{RT} + \frac{4.836N^{1/3}(k^e - 1)V^{2/3}\gamma}{RT} + \ln \frac{RT}{P_0 V}, \quad (53)$$

где Φ – логарифм отношения объемов неподвижной и подвижной фаз; $\Delta F_{v,a}$ – изменение свободной энергии при ассоциации компонентов системы, помещенных в газовую фазу; $\Delta F_{v,s}$ – изменение свободной энергии при образовании полости в элюенте и заполнении ее молекулой хроматографируемого соединения; R – газовая постоянная; T – температура; N – число Авогадро; μ_s – дипольный момент сорбата; v_s – объем молекулы сорбата; γ – поверхностное натяжение подвижной фазы; ΔA – изменение неполярной поверхности при сорбции; k^e – параметр, учитывающий отличие поверхности полости от плоской поверхности; P_0 – давление в колонке; V – мольный объем подвижной фазы, λ – коэффициент, D и P – параметры, определяемые соотношениями:

$$D = \frac{2(\varepsilon - 1)}{2\varepsilon + 1}, \quad (54)$$

$$P = \frac{1}{4\pi\varepsilon(1 - D \cdot \frac{\alpha_s}{v_s})}, \quad (55)$$

где ε – диэлектрическая проницаемость; α_s – поляризуемость молекулы сорбата.

Теория предполагает, что объем ассоциата сорбат – сорбент v_{SL} пропорционален объему молекулы сорбата:

$$v_{SL} = \lambda v_S. \quad (56)$$

Уравнение (53) выведено авторами с учетом следующих допущений:

- $\Delta F_{v,a}$ определяется только ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями;
- молекулы растворителя, сорбата, неподвижной фазы, а также ассоциаты сорбат – сорбент имеют сферическую форму;
- молекулы растворителя намного меньше молекул неподвижной фазы, а последние намного крупнее молекул сорбатов;
- давление равно 1 атм;
- подвижная фаза несжимаема.

Применительно к некоторым частным случаям уравнение (53) может быть представлено в упрощенном виде. Так, для данного сорбата при постоянной температуре зависимость удерживания от состава подвижной фазы выражается уравнением:

$$\ln k = A + BD + C\gamma + D(k^e - 1)V^{2/3}\gamma + E + \ln\left(\frac{RT}{P_0 V}\right); \quad (57)$$

с другой стороны, если состав подвижной фазы и колонка неизменны, фактор удерживания сорбата может быть найден по уравнению:

$$\ln k = A' + B' \cdot \frac{1-\lambda}{2\lambda} \cdot \frac{\mu_s^2}{v_s} \cdot \frac{1}{1-\alpha_s/v_s} + C'\Delta A, \quad (58)$$

где $A, B, C, D, E, A', B', C'$ – коэффициенты.

Несмотря на достаточно детальное физическое описание процессов, протекающих в обращенно-фазовой хроматографии, полностью априорный расчет удерживания – конечная цель хроматографической теории – остается трудноразрешимой задачей.

Рассмотрим конкретные случаи применения ВЭЖХ для биомедицинских целей, в частности, для анализа лекарственных веществ, который является важной составляющей при идентификации последних и обнаружении различных лекарственных препаратов в биологических жидкостях.

3.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография лекарственных веществ

В хроматографии вообще и в жидкостной, в частности, очень важен правильный выбор сорбента, элюента, условий хроматографирования. Для жидкостной хроматографии – это выбор такого сорбента и подвижной фазы, которые сочтались бы друг с другом. При этом подвижная фаза должна характеризоваться определенным качественным составом: величиной рН, наличием добавок кислого, щелочного и т.д. характера. Выбор необходимых компонентов подвижной фазы должен основываться на учете кислотности-основных свойств сорбатов и их полярности или гидрофобности. Так, например, анализ карбоновых кислот может быть проведен тремя вариантами. Высокополярные и гидрофильные кислоты слишком прочно удерживаются силикагелем, но не удерживаются силикагелем, модифицированным алкильными группами в обращенно-фазовом варианте. Поэтому для них предпочтителен ион-парный вариант обращенно-фазовой хроматографии. Кислоты умеренной полярности вполне поддаются разделению на силикагеле, однако для улучшения формы пиков к подвижной фазе желательно добавить около 1% уксусной кислоты. Третий вариант, пригодный для большинства кислот, кроме наиболее гидрофильных, предусматривает использование алкилсиликагеля в качестве неподвижной фазы. С целью подавления ионизации в составе подвижной фазы применяют буферные растворы с рН=2–5. Приближенная схема выбора типа хроматографических систем приведена в таблице 4.

Рекомендации по выбору типа хроматографических систем

| № п/п | Характеристика сорбата | | Сорбент | Характеристика подвижной фазы |
|-------|----------------------------|--|------------------|---|
| | Кислотно-основные свойства | Гидрофобность | | |
| 1 | Нсионогенный | Слабая, умеренная ($12 > H > 0$) | Силикагель | Смеси полярных и неполярных органических растворителей |
| 2 | | От слабой до сильной ($20 > H > 0$) | Алкил-силикагель | Водные растворы органических растворителей |
| 3 | | Очень сильная ($H > 20$) | | Смеси ацетонитрила либо метанола с менее полярными растворителями |
| 4 | Кислота | Умеренная ($12 > H > 6$) | Силикагель | Как № 1, с добавкой 1% уксусной кислоты |
| 5 | | Очень слабая ($H < 2$) | Алкил-силикагель | Буферный раствор, pH 5–7, органический растворитель, 1% соли тетраалкиламмония |
| 6 | | От слабой до сильной ($0 < H < 20$) | | Буферный раствор, pH 2–5, органический растворитель |
| 7 | Основание | От очень слабой до сильной ($-4 < H < 20$) | Алкил-силикагель | 0,01M алкилсульфата натрия в воде, 2,5% уксусной кислоты, органический растворитель |
| 8 | | От умеренной до сильной ($6 < H < 20$) | | Как № 6, pH 2–7 |

3.5.1. Условия хроматографического анализа основных групп лекарственных веществ и отдельных соединений

Рассмотренные выше модели удерживания и общие концепции, которыми можно руководствоваться при выборе условий разделения органических веществ, ранее не хроматографировавшихся, позволяют ориентироваться во взаимодействии различных факторов, влияющих на результаты хроматографического процесса. Все это может оказаться полезным в таких ситуациях, когда поиск условий разделения в литературе нецелесообразен либо

когда воспроизведение условий разделения, опубликованных в литературе, затруднительно. Тем не менее, хроматографисту немалую помощь могут оказать фактические справочные и библиографические данные по анализу определенных классов препаратов и отдельных лекарственных веществ.

Публикации, посвященные хроматографии лекарственных веществ, можно условно отнести к одной из двух групп. В первую группу входят работы, в которых рассматриваются общие условия или особенности хроматографирования той или иной группы веществ, сформированной по принципу химического родства или сходства биологической активности. Во вторую группу можно включить работы по анализу одного или нескольких веществ в конкретных объектах.

3.6. Варианты жидкостной хроматографии, наиболее часто применяемые для медико–биологических исследований

Для медико–биологических исследований применяются различные варианты жидкостной хроматографии. Однако для анализа белков, аминокислот, биологических макромолекул и надмолекулярных структур в основном используются аффинная, эксклюзионная и ионообменная хроматография. Все эти варианты жидкостной хроматографии различаются по способу взаимодействия молекул сорбата с компонентами нерастворимой полимерной матрицы.

3.6.1. Материалы матриц сорбентов и ионообменников

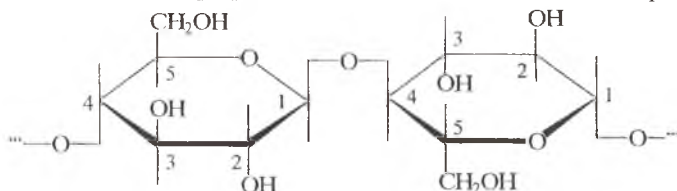
Матрицей называют твердую основу неподвижной фазы. Она имеет вид сплошных или пористых гранул. Для придания матрице необходимых хроматографических свойств материал матрицы модифицируют. Модификация может представлять собой химическое присоединение (“присадку”) ионогенных групп, гидрофобных молекул, биологически активных веществ или фиксацию путем адсорбции тонкого слоя растворителя. Хотя особенности хроматографического процесса определяются в основном характером модификации, физико–химические параметры матрицы могут существенно влиять на свойства неподвижной фазы. К таким параметрам относятся следующие: размер и форма гранул и их пор, диапазон разброса этих размеров; механическая прочность материала матрицы; характер его смачивания и набухания в элюенте; химическая стойкость и инертность в условиях хроматографической элюции; реакционная способность, обеспечивающая возможность химической модификации матрицы.

Прежде чем проанализировать свойства различных матриц, необходимо рассмотреть общие для них способы обозначения диапазонов линей-

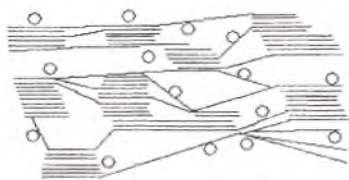
ных размеров гранул (а для сфер – их диаметров). Этот диапазон указывается либо непосредственно в микронах, либо в виде интервала чисел МЕШ (mesh). Число МЕШ соответствует числу нитей на дюйм в сетке с квадратными ячейками, через которые просеиваются гранулы. Таким образом, через сетку в 100 МЕШ пройдут все гранулы, максимальные размеры которых меньше 160 мкм, через сетку в 200 МЕШ – меньше 80, 400 МЕШ – меньше 40. Таким образом, диапазон размеров гранул 40÷80 мкм соответствует 200÷400 МЕШ. В него попадут гранулы, которые просеиваются через сетку в 200 МЕШ, но не проходят через ячейки в 400 МЕШ. Для мелких гранул, размер которых менее 40 мкм, принято обозначение 400 МЕШ.

Матрицы для жидкостной хроматографии изготавливают из природных и синтетических материалов. Остановимся на них подробнее.

Целлюлоза – полисахарид, линейный полимер, образованный остатками глюкозы. Каждое звено глюкозы имеет три свободные ОН-группы, таким образом, полимер представляет собой полиатомный спирт:



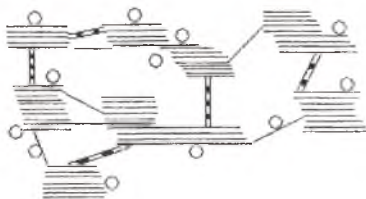
Для целлюлозы характерна высокая степень гидрофильности и склонность к образованию многочисленных водородных связей между нитями полимеров. Наличие множества ОН-групп позволяет легко модифицировать целлюлозу путем химического присоединения разнообразных заместителей, например, ионогенных групп или биологически активных молекул. Вместе с тем целлюлоза достаточно химически инертна и не вступает в реакции с белками, нуклеиновыми кислотами и их компонентами. Целлюлоза неустойчива к воздействию сильных кислот, щелочей и окислителей. Она выдерживает контакт с минеральными кислотами и щелочами, концентрация которых не превышает 0,5н, и то не более 2 ч при комнатной температуре. Рабочий интервал рН для обменников на основе обычной целлюлозы составляет 3–10. Целлюлоза охотно атакуется микроорганизмами даже на холоде, поэтому ее водные суспензии хранят в присутствии антисептиков. Водородные связи между линейными цепями в целлюлозе могут образовывать псевдокристаллические структуры, которые варьируются с рыхлыми участками, аморфными, “порами”. Так формируются макроскопические нити целлюлозы, легко набухающие в поперечном направлении. “Кристаллические” участки мало доступны для присоединения модифицирующих заместителей, которые из-за этого располагаются главным образом на поверхности нитей и в порах (кружками обозначены модифицирующие заместители):



В целом получается микрогетерогенная система, характер которой зависит от исходного материала и технологии обработки целлюлозы. По этой причине свойства целлюлозы, в том числе и хроматографические, могут весьма заметно варьировать не только у различных фирм, но и от партии к партии. Следует это учитывать и подбирать режим хроматографического процесса для каждой новой партии сорбента на основе целлюлозы.

Сушка также существенно влияет на свойства целлюлозы. При удалении воды образуется множество дополнительных водородных связей на аморфных участках матрицы, так что объем пор резко уменьшается. Далеко не все эти связи разрываются при простом замачивании целлюлозы в воде, поэтому необходима специальная обработка (“cycling”) как сухой продажной целлюлозы, так и уже использованного сорбента после каждого его высыхания. Такая обработка заключается в суспензировании целлюлозы в 15 объемах 0,5н NaOH на 30 мин и последующей промывке водой на фильтре до pH 8. Смысл этой обработки – в диссоциации OH-групп, после чего нити “расталкиваются” взаимодействием отрицательных зарядов, а дополнительные водородные связи рвутся. Ионообменники на основе целлюлозы обрабатываются аналогично. При набухании 1 г сухой целлюлозы связывает около 2,5 г воды.

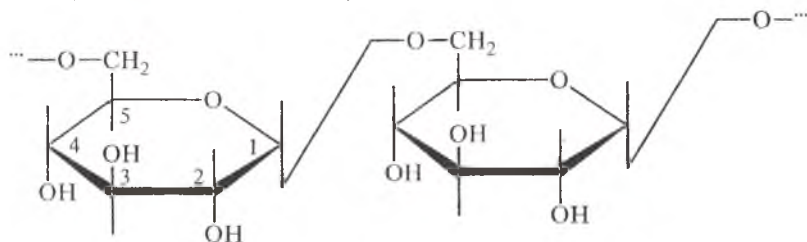
Микрогранулированная целлюлоза. Для повышения жесткости матриц на основе целлюлозы проводят частичный кислотный гидролиз, который разрушает аморфные участки матрицы. На их место между “кристаллическими” участками вводят химические шпивки. Одновременно увеличивается степень “кристалличности”, а поры становятся просторнее. Схема структуры получающейся микрогранулированной целлюлозы имеет вид:



«Лесенками» обозначены химические шивки между нитями полисахарида. Такую целлюлозу выпускают многие фирмы. Помимо повышенной жесткости, она более гомогенна, что обеспечивает более высокую по сравнению с волокнистой (обычной) целлюлозой разрешающую способность.

Микрогранулированная целлюлоза легко упаковывается в колонку, но отличается большим сопротивлением току элюента.

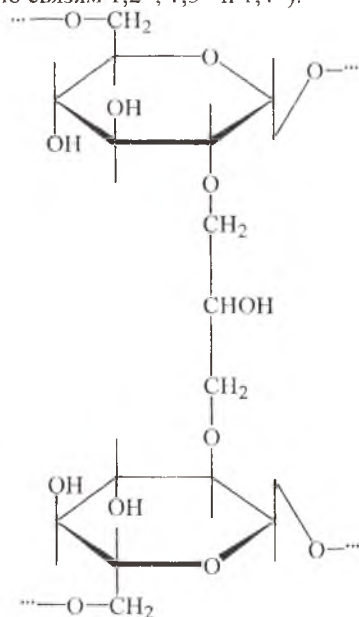
Декстран – полисахарид, в основном линейный полимер на основе глюкозы, где звенья связаны α -1,6-гликозидной связью:



Это тоже полиатомный спирт с высокой степенью гидрофильности, представляющий столь же широкие, как и целлюлоза, возможности для модификации, и также химически инертный. Устойчивость к действию кислот у декстрана еще меньше, чем у целлюлозы. Его не следует обрабатывать более крепким раствором, чем 0,1*n* HCl (в течение 2 часов). К щелочи гели на основе декстрана более устойчивы: они сохраняют свои свойства в 0,25*n* NaOH до 2 мес., даже при температуре 60 °С. Рабочий диапазон pH составляет 2÷12. Существенное отличие от целлюлозы состоит в том, что нити декстрана не образуют агрегатов, так как они не вполне линейны – имеются достаточно многочисленные ответвления (по связям 1,2-, 1,3- и 1,4-).

Структура сефадекса имеет вид:

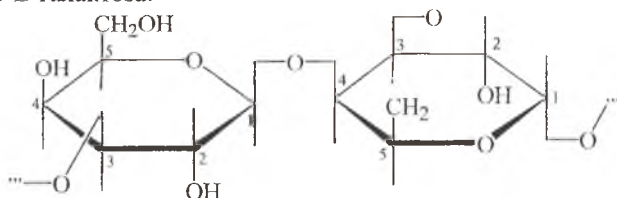
В гелях для хроматографии (сефадексах) нити декстрана химически сшиты эпихлоргидрином. Однако сшивка не очень жесткая – сефадексы относительно мягки и легко сжимаются, в водных растворах сильно набухают. Изменяя долю сшивки, можно регулировать средний размер пор, образуемых пространственной сеткой сшитого геля. Ввиду статистического распределения сшивок по объему геля разброс размеров пор невелик, и сефадексы заметно более однородны, а свойства их лучше воспроизводимы, чем у целлюлозы. Они “не боятся” высушивания и при замачивании не требуют специальной обработки. Сефадексы можно автоклавировать как в сухом, так и во влажном виде – в нейтральной среде при 120 °С в течение 30 мин.



Суспензию сефадекса (наполненную колонку) следует хранить с антисептиком, так как он, подобно целлюлозе, легко атакуется микроорганизмами. Сефадексы способны адсорбировать ароматические и гетероциклические молекулы. Это дает возможность разделять (фракционировать) нуклеиновые основания, ароматические аминокислоты и пептиды. Продажные сефадексы содержат в своем составе небольшое количество карбоксильных групп, что придает им некоторое сродство с катионами.

К некоторым недостаткам сефадекса можно отнести мягкость, что накладывает ограничения на допустимое значение скорости хроматографической элюции. Ионообменники на основе сефадекса также могут деформироваться за счет электростатического отталкивания ионогенных групп. В последние годы разрабатываются более жесткие матрицы.

Агароза – полисахарид – полиатомный спирт. Его элементарное звено – дисахарид агаробиоза, в состав которого входит необычный сахар – 3,6-ангидро-L-галактоза:



Агароза более устойчива к действию микроорганизмов, чем целлюлоза и сефадексы, однако ее тоже следует хранить в присутствии антисептика. Агароза – гидрофильна, нити способны в большей степени, чем нити целлюлозы, к образованию водородных связей. Благодаря этому горячий 2-6%-ный раствор агарозы застывает в виде жесткого и очень крупнопористого геля. Нити полимера собираются в пучки и образуют жесткий пространственный каркас с пустотами внутри. При 100 °С гель агарозы плавится, поэтому его нельзя автоклавировать. В условиях хроматографии агароза химически неактивна, но уязвима для действия щелочей, кислот и окислителей. Рабочий диапазон pH 4–9.

Полиакриламидный гель (ПААГ) – нити линейного полимера акриламида, сшитые N,N'-метилден-бис-акриламидом, образуют относительно жесткую и химически инертную пространственную сетку геля, хорошо удерживающую воду. Пористость и жесткость определяются процентным содержанием в нем полимера. Полярные амидные группы (–CO–NH₂) способствуют сольватации его в водной среде. В зависимости от условий полимеризации (соотношения мономеров, концентрации) получают сферические гранулы полимера с различными диаметрами пор. При высокой концентрации сшивающего агента образуется высокопористый гель.

Остановимся подробнее на вариантах жидкостной хроматографии, наиболее часто применяемых для медико-биологических исследований.

3.6.2. Аффинная хроматография

Аффинная хроматография представляет собой один из наиболее специфических методов выделения реакционноспособных соединений, в частности, ферментов, и даже таких надмолекулярных агрегатов, как вирусы. Разделение биологически активных веществ в этом варианте хроматографии основано на их специфическом взаимодействии с лигандами, ковалентно связанными с нерастворимым носителем (матрицей). Сорбентом в этом случае служит гель типа агарозы, к которому ковалентно присоединен подходящий лиганд, например субстрат фермента. Когда раствор, содержащий выделяемое вещество (скажем, фермент), пропускают через колонку с соответствующим образом приготовленным сорбентом, взаимодействие этого вещества с закрепленным на сорбенте лигандом (в данном случае фермента с его субстратом) приводит к его удерживанию и, следовательно, к концентрированию. Поскольку сорбция носит обратный характер, это вещество можно затем элюировать с колонки. Разделение по методу аффинной хроматографии может быть основано на различного рода специфических взаимодействиях, таких как связывание фермента с ингибитором, гормона с рецептором, антигена с антителом, а также гибридизация полинуклеотидов. Этот метод позволяет выделять даже целые клетки.

3.6.2.1. Механизм разделения в аффинной хроматографии

Схематически механизм разделения в аффинной хроматографии представлен на рис.12 [63]. Лиганд L фиксирован на матрице, целевое вещество S связывается с лигандом и вследствие этого извлекается из раствора. На стадии элюирования комплекс разрушается и целевое вещество вновь переходит в раствор.

Разделение основано на равновесной реакции:



где K – комплекс.

Взаимодействие вещество – лиганд должно быть специфическим и обратимым. Характеристикой обратимости процесса является константа диссоциации. Данные по константе диссоциации можно брать из литературных источников.

Лиганд должен иметь реакционноспособные функциональные группы, при помощи которых осуществляется его связь с матрицей, при этом должна сохраняться биоспецифическая активность лиганда. Если лиганд имеет несколько таких групп, его иммобилизация должна проводиться с участием той из них, которая не входит в участок, взаимодействующий с целевым веществом.

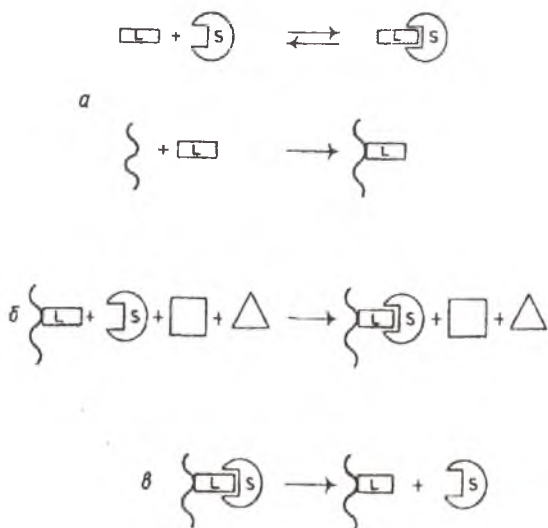


Рис. 12. Механизм разделения веществ в аффинной хроматографии: *а* – иммобилизация лиганда (ковалентно); *б* – связывание целевого вещества (нековалентно) и удаление сопутствующих примесей; *в* – десорбция целевого вещества

Активные центры многих биологически активных веществ (например, ферментов) часто локализованы в середине глобулы и недоступны для небольших молекул лигандов, непосредственно связанных с матрицей. Поэтому между матрицей и лигандом обычно встраивают дополнительный блок – «спейсер» (рис. 13).

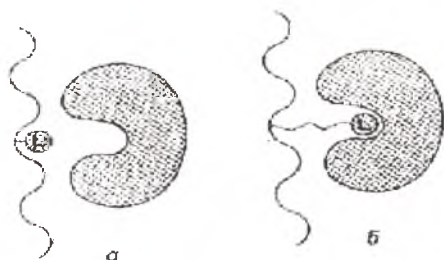


Рис. 13. Иллюстрация роли «спейсера»: *а* – лиганд фиксирован непосредственно на матрице и недоступен для целевого вещества; *б* – лиганд фиксирован через промежуточный «спейсер» и способен взаимодействовать с молекулой целевого вещества

В таблице 5 приведены сочетания функциональных групп лигандов и матриц, по которым проводят реакцию иммобилизации.

Таблица 5

Возможные сочетания функциональных групп лигандов и матриц

| Лиганды | Функциональные группы модифицированного | |
|-----------------------|---|--------------------------------------|
| | лиганда | носителя |
| Белки, пептиды | Амино- | Карбокси-, имидокарбонатная, эпокси- |
| Аминокислоты | Карбокси- Меркапто- | Амино- Пропил-тио, эпокси- |
| Полисахариды | Гидрокси- Карбокси- | Эпокси- Амино- |
| Полинуклеотиды | Амино- | Имидокарбонатная, пропил-тио |
| Коферменты, кофакторы | Амино-, карбокси- | Карбокси-, amino-, имидокарбонатная |
| Антибиотики, стероиды | Меркапто-, гидрокси- | Пропил-тио, эпокси- |

Кроме того, известны матрицы, на которых лиганды могут быть иммобилизованы только с помощью конденсирующих агентов (в качестве конденсирующих агентов используются водорастворимые производные карбодиимида, например, *N*-этил-*N'*-(3-диметиламинопропил)-карбодиимидгидрохлорид и др.). Аффинную хроматографию проводят в водных буферных растворах, подбирая оптимальные условия для каждого конкретного случая. Можно создать такие условия (значение pH раствора и концентрации соли), при которых взаимодействие целевого вещества с лигандом будет наиболее сильным.

Среди других методов выделения веществ аффинная хроматография занимает особое место, поскольку процесс идет крайне специфически с использованием биологической активности целевого вещества. Эта особенность позволяет концентрировать целевые вещества из больших объемов растворов.

Аффинная хроматография применяется для выделения следующих классов веществ: аналогов субстратов, ингибиторов, кофакторов (при этом роль лигандов играют ферменты; антигенов, вирусов, клеток (лиганды – антитела); полисахаридов, гликопротеинов, клеток (лиганды – лектины); гистонов, полимераз (лиганды – нуклеиновые кислоты); рецепторов, белков-переносчиков (гормоны, витамины); белков, специфически взаимодействующих с мембраной клетки, лектинов (лиганды – клетки).

3.6.2.2. Сорбенты, используемые в аффинной хроматографии

В качестве сорбентов для аффинной хроматографии применяются гели на основе агарозы: сефароза 4В, сефароза СL, аффи-гель.

Внутренняя поверхность гранул геля *сефарозы 4В*, благодаря крупным порам, доступна как для молекул лигандов, так и для молекул целевых веществ. Матрица имеет незначительную неспецифическую сорбцию. Частицы сефарозы мало сжимаемы, вследствие чего обеспечиваются хорошие гидродинамические свойства колонки.

Сефароза СL представляет собой ковалентно сшитые молекулы агарозы, устойчивые в органических растворителях (что существенно, например, при последующей иммобилизации лиганда). Сорбент устойчив при повышенной температуре и в присутствии денатурирующих агентов (мочевина, гуанидин-гидрохлорид). По сравнению с сефарозой 4В сшитая агароза обладает меньшей емкостью.

Аффи-гель – агарозный и полиакриламидный гель, модифицированный разнообразными функциональными группами. По сравнению с агарозными гелями сорбенты на основе полиакриламида имеют следующие преимущества: крайне незначительную неспецифическую сорбцию; биологическую инертность (устойчивы к действию ферментов); повышенную термическую и химическую устойчивость.

3.6.3. Эксклюзионная хроматография

Эксклюзионная (ситовая) хроматография – метод, основанный на различной способности молекул разного размера проникать в поры нейтрального геля или пористого тела, которые служат неподвижной фазой. Метод, в котором неподвижной фазой служит гель, называется гель-проникающей хроматографией.

Неподвижная фаза в гель-проникающей хроматографии представлена жидкостью, находящейся внутри пористых, хорошо смачиваемых гранул, заполняющих хроматографическую колонку. Если на такую колонку подается растворенная в элюенте смесь молекул различных размеров, то крупные молекулы, не способные проникнуть внутрь гранул, будут двигаться вдоль колонки вместе с подвижной фазой; для них коэффициент распределения $K = 0$. В то же время наиболее мелкие молекулы, размеры которых заведомо меньше диаметра пор в гранулах, будут равномерно распределяться между подвижной и неподвижной фазами. Для них будет осуществляться хроматографический процесс с присущим ему замедлением миграции хроматографической зоны; значение K при этом для них близко 1. Для молекул промежуточной величины благодаря статистическому распределению размеров пор окажется доступной только часть объема неподвижной фазы. Для них $0 < K < 1$, поэтому зона или зоны таких

молекул будут мигрировать вдоль колонки быстрее, чем мелкие молекулы, но медленнее, чем крупные. В результате произойдет фракционирование исходной смеси молекул на зоны в зависимости от их размеров. Зоны выйдут из колонки в порядке убывания этих размеров.

В простейшем случае, когда в исходной смеси содержатся молекулы только двух категорий – крупные и мелкие, эксклюзионная хроматография позволяет осуществить “сортировку” этих молекул. В частности, таким образом проводят обессоливание растворов биополимеров и очистку макромолекул от сопутствующих им низкомолекулярных компонентов, например от “предшественников”, участвующих в биосинтезе.

Смесь молекул нескольких промежуточных размеров в ходе эксклюзионной хроматографии разделяется на ряд дискретных групп, различающихся между собой по степени доступности для них объема внутри гранул. Соответствующие хроматографические зоны мигрируют с различными скоростями и выходят из колонки в виде разделившихся пиков [5, 64].

3.6.3.1. Коэффициенты распределения в эксклюзионной хроматографии

Вообще коэффициент распределения в хроматографическом процессе – это отношение масс (концентраций) вещества в неподвижной и подвижной фазах. В идеальном варианте эксклюзионной хроматографии (отсутствие процессов сорбции) концентрация вещества в обеих фазах одинакова, так что коэффициент распределения K можно представить отношением объемов неподвижной V_s и подвижной фаз V_m в пределах хроматографической зоны:

$$K = V_s/V_m. \quad (59)$$

В однородной цилиндрической колонке отношение объемов, записанное для зоны, сохраняется и для всей колонки в целом. Вместо V_m в этом случае можно подставить V_0 – свободный объем колонки (вне гранул), а под V_s следует понимать суммарный объем жидкости внутри гранул всей колонки, доступный для молекул данного размера. Тогда

$$K = V_s/V_0. \quad (60)$$

Обозначим через V_t полный объем пустой колонки, а V_i – полный внутренний объем всех гранул. Для очень мелких молекул $V_s = V_i$. При плотной упаковке шарообразных гранул любого размера $V_0 \approx V_i$. Это не означает, что V_i в два раза больше V_0 , так как следует учитывать и объем, занимаемый твердым материалом матрицы. Тем не менее для крупнопористых гранул $V_i > V_0$, а коэффициент распределения для малых молекул $K > 1$.

В общем случае долю внутреннего объема гранул, доступную для молекул данного размера, можно охарактеризовать неким коэффициентом K_d :

$$V_s = K_d V_i. \quad (61)$$

Очевидно, что его значения могут лежать в пределах $0 < K_d < 1$. Иногда вместо K_d используют обозначение K_D . Часто в литературе K_d тоже называют коэффициентом распределения ("distribution coefficient"), однако это не корректно. K_d – это коэффициент доступности внутреннего объема гранул матрицы для молекул данного размера, в точно определенном выше смысле. Величина K_d играет центральную роль в характеристике процесса, имеющего место в эксклюзионной хроматографии, тем более что ее можно определить по результатам хроматографического эксперимента для каждой группы молекул определенного размера, выходящих отдельным пиком.

Известно, что скорость движения зоны вещества в $(1+K)$ раз меньше, чем скорость движения подвижной фазы. Отсюда следует, что удерживаемый объем (объем элюента, вышедший из колонки к моменту максимума пика) будет в $(1+K)$ раз больше, чем V_0 . Таким образом,

$$V_R = V_0(1+K), \quad (62)$$

или

$$V_R = V_0 + V_0 K. \quad (63)$$

С другой стороны, $V_R = V_0 + V_s$, и с учетом уравнения (61):

$$V_R = V_0 + K_d V_i, \quad (64)$$

откуда

$$K_d = (V_R - V_0)/V_i. \quad (65)$$

Здесь все величины правой части можно определить опытным путем. Например, для данной колонки V_0 можно найти элюцией очень крупных молекул (те, которые не удерживаются), а V_i – через объем элюции очень мелких молекул и величину V_0 , когда $V_i = V_R - V_0$ (при этом $K_d = 1$). Однако при таком определении остается сомнение: не имеет ли место частичная сорбция мелких молекул внутри гранул, что привело бы к завышенному значению V_i . Поэтому на практике в эксклюзионной хроматографии нередко предпочитают использовать другой коэффициент K_{av} , характеризующий движение хроматографической зоны вдоль колонки и определяемый следующим соотношением:

$$K_{av} = (V_R - V_0)/(V_i - V_0). \quad (66)$$

Таким образом, в знаменателе правой части уравнения (66) вместо внутреннего объема гранул V_i фигурирует полный объем гранул $V_i - V_0$. Объем пустой колонки V_i легко определить по ее внутреннему диаметру и длине.

Формула (66) ниоткуда не следует, она служит для определения величины K_{av} . Из уравнений (65) и (66) следует, что K_{av} пропорциональна K_d , так как их выражения отличаются только значениями знаменателей дроби (постоянных для данной колонки).

В качестве вещества для определения V_0 на практике часто используют специальный окрашенный препарат, так называемый “голубой декстран” (“Blue Dextran 2000”), производимый для этой цели фирмой “Pharmacia”. Среднее значение его молекулярной массы – $2 \cdot 10^6$ Дальтон.

Необходимо отметить, что даже для самых мелких молекул при идеальном процессе в эксклюзионной хроматографии значение K_{av} должно быть меньше 1, так как $(V_i - V_0) > V_i$. Если же на практике оказывается, что $K_{av} \geq 1$ (то есть $V_R \geq V_i$), то это указывает на наличие сорбции молекул вещества в неподвижной фазе, о чем речь пойдет ниже.

3.6.3.2. График селективности

Для смесей молекул сходной формы и плотности, например различных глобулярных белков, попадающих для данного геля в разряд молекул промежуточного размера, было замечено, что уменьшение величины K_{av} связано с увеличением массы молекул следующим образом (рис. 15):

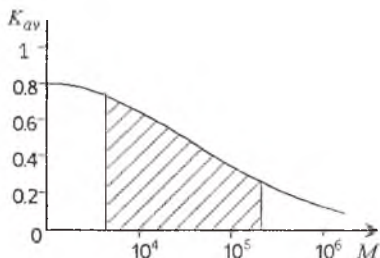


Рис. 15. График селективности матрицы для эксклюзионной хроматографии: M – молекулярная масса в Дальтонах; заштрихованный участок соответствует диапазону молекул промежуточного размера для данного геля

Эта зависимость почти линейна, если размеры молекул откладывать в логарифмической шкале. Такие графики называют графиками селективности. Ими удобно пользоваться для оценки возможности фракционирования с помощью эксклюзионной хроматографии на матрице данного типа смеси молекул, массы которых лежат в определенном интервале.

3.6.3.3. Эффективность фракционирования

Эффективность фракционирования из-за самой сути процессов, происходящих в эксклюзионной хроматографии должна быть заметно ниже, чем в других хроматографических методах. Действительно, здесь

все зоны элюируемых фракций должны укладываться в объеме элюента $V_R \leq V_i$ (V_i – полный внутренний объем всех гранул), в то время как в других методах, где может иметь значения $K \gg 1$, величина V_R может во много раз превосходить даже полный объем колонки. Вместе с тем, в эксклюзионной хроматографии, как ни в каком другом хроматографическом методе, на расширение пиков и ухудшение их разрешения сильно влияет фактор неравномерности распределения вещества по объему жидкости в неподвижной фазе. Это обусловлено тем, что при разделении методом эксклюзионной хроматографии размеры молекул должны быть соизмеримы с размерами пор, а это очень сильно затрудняет их диффузию внутри гранул. Отсюда следует, что хуже всех разделяются самые крупные молекулы, которые едва входят внутрь гранул ($K_{av} = 0,1 \div 0,2$). В результате всего этого даже для гранул диаметром 20–40 мкм высота теоретической тарелки в случае обычной гель-фильтрации составляет 2–5 мм, то есть разрешающая способность колонки в 1 м характеризуется числом теоретических тарелок = 200–500.

Отсюда следует, что число компонентов смеси веществ, которые в принципе можно разделить методом эксклюзионной хроматографии (при низком давлении), очень невелико. Показано, что число пиков (n), которое можно разделить с приемлемым разрешением на колонке, имеющей N теоретических тарелок, определяется соотношением:

$$n = 1 + 0,2\sqrt{N} . \quad (67)$$

При $N = 500$ получим $n = 5,46$. Таким образом, на колонке 1 м нельзя разделить более 5 пиков. Поэтому применяют колонки от 2 м и более.

Фракционирование белков методом гель-хроматографии используется довольно редко ввиду не очень высокой эффективности. Однако когда число компонентов белковой смеси заведомо невелико, то такое фракционирование может быть эффективным. Так, четыре главных белка вируса рака молочной железы мышей были успешно разделены по молекулярной массе методом гель-проникающей хроматографии на относительно короткой (80 см) колонке [64].

Чаще эксклюзионная (гель-проникающая) хроматография используется для очистки белка. Накоплен большой опыт применения гель-проникающей хроматографии для очистки рибосом, полисом и ферментов, участвующих в биосинтезе белка и образующих комплексы с нуклеиновыми кислотами, нуклеотидами и аминокислотами.

Эксклюзионная хроматография применяется также в препаративных целях (например, биотехнологическое производство): при определении степени полимеризации синтетических полимеров; фракционировании субклеточных частиц, вирусов; отделении низкомолекулярных радиоактивных веществ при введении изотопной метки в биополимеры; контроле кинетики реакции (в случае химической модификации белков); определении констант равновесия.

3.6.3.4. Определение молекулярной массы белка

Гель-проникающая хроматография широко используется для определения молекулярных масс (M) биополимеров, особенно белков. Основной закон гель-хроматографии: чем меньше белок, тем больше объем его элюции с колонки (V_R) (рис.15). Графики селективности должны быть для каждого геля, используемого в гель-проникающей хроматографии.

Однако необходимо иметь в виду, что эти зависимости носят ориентировочный характер, и для разных партий одного и того же геля истинные зависимости $K_{av} - M$ отличаются друг от друга. Поэтому целесообразно для каждой конкретной колонки построить такой график. Но какие выбрать белки для этого? Рассмотрим этот вопрос на примере нативных белков.

В 1966 г. Зигель и Монти [65] описали миграцию по колонке, содержащей сефадекс G-200, размером 3×48 см ($V_t = 340$ мл) серии белков с известной молекулярной массой. Подвижной фазой служил 0,04М Натрифосфатный буфер, объем препарата 1,5 мл. В таблице 6 приведены удерживаемый объем и некоторые физико-химические характеристики этих белков.

Таблица 6

Удерживаемый объем и физико-химические характеристики некоторых нативных белков [65]

| Белок | V_R , мл | K_d | M , тыс. Дальтон | a_s | f/f_0 |
|-----------------------------|------------|-------|--------------------|-------|---------|
| Фибриноген | 88 | 0.03 | 330 | 107 | 2.34 |
| Ферритин | 109 | 0.11 | 1300 | 79 | 1.14 |
| Уреаза | 132 | 0.20 | 483 | 61 | 1.19 |
| Каталаза | 148 | 0.26 | 250 | 52 | 1.25 |
| Бычий сывороточный альбумин | 191 | 0.43 | 65 | 35 | 1.30 |
| Цитохром С | 284 | 0.80 | 12 | 17 | 1.09 |

Белки в таблице 6 расположены в порядке увеличения V_R и, соответственно, значений K_d . Следовало бы ожидать, что в этом же порядке будут уменьшаться молекулярные массы M белков, однако это не так. Нетрудно видеть, что фибриноген имеет молекулярную массу меньше, чем ферритин и уреазы, а выходит из колонки раньше них.

Однако это не означает, что основной закон гель-проникающей хроматографии нарушается. При хроматографировании белков необходимо оценивать тот параметр, который действительно определяет возможность проникновения белка в поры геля – его молекулярные размеры. Известно, что плотности всех нативных белков, за некоторым исключением, одинаковы, и поэтому их объемы должны быть пропорциональны массам. Это

верно, но остается еще один фактор, играющий в хроматографировании белков методом эксклюзионной хроматографии ключевую роль, – форма молекулы. Белковая глобула может быть почти шаром, а может напоминать палочку, поэтому хроматографическое поведение таких молекул будет совершенно различным. Но можно ли составить представление о форме молекулы белка, если не рассматривать ее с помощью электронного микроскопа? Оказывается можно, причем опираясь на поведение молекулы в растворе, на ее гидродинамические свойства.

Величина, которая характеризует размеры и форму молекул, параметры, играющие решающую роль в гель-проникающей хроматографии, называется *стоксовым радиусом молекулы*.

Известен точный физический закон, описывающий движение частицы сферической формы в вязкой жидкости – закон Стокса:

$$F = 6\pi R\eta u, \quad (68)$$

где F – сила трения, действующая на частицу; R – радиус сферы; η – коэффициент вязкости среды; u – скорость движения частицы.

Если в вязкой среде движется частица несферической (или вообще неправильной) формы, то, как показывают точные физические измерения, сила трения, действующая на такую частицу, все равно оказывается прямо пропорциональна коэффициенту вязкости среды (η) и скорости движения частицы (u). Эту пропорциональность можно записать так:

$$F = 6\pi a\eta u. \quad (69)$$

Здесь в форме $6\pi a$ записан некий коэффициент пропорциональности, характеризующий размер и форму данной частицы. Можно было бы обозначить этот коэффициент одной буквой, но при сравнении с формулой (68) имеет смысл ввести в состав коэффициента пропорциональности неизменный множитель 6π . Проведя такое сопоставление, можно утверждать, что частица будет двигаться в вязкой жидкости точно так же, как сферическая частица с радиусом a . По крайней мере, в том смысле, что при движении со скоростью u эта, так называемая эквивалентная сфера будет испытывать действие точно такой же силы трения F как и частица несферической формы. Это – динамическая характеристика размера и формы частицы (в нашем случае – макромолекулы белка).

Не имея представления об истинной форме молекулы, можно охарактеризовать степень ее отклонения от сферической отношением a/R , R – истинный радиус сферической молекулы, и (69) записать в общем виде:

$$F = f u, \quad (70)$$

где f – коэффициент трения.

Для макромолекулы сферической формы $f_0 = 6\pi R\eta$, а для молекулы произвольной формы $f = 6\pi a\eta$, очевидно, что $a/R = f/f_0$. Это отношение можно условно назвать “коэффициентом формы”. Рассматривая последний

столбец табл. 6, можно высказать предположение, что «ненормальное» поведение молекул фибриногена при эксклюзионной (в данном случае, геле-проникающей) хроматографии обусловлено исключительно большим значением их коэффициента формы. Молекулы фибриногена вытянуты в «палочки» («глобулярными» называют белки, для которых $f/f_0 < 1,3$). Величина a называется «стоксовым радиусом».

Между массой молекулы и стоксовым радиусом существует зависимость

$$M = 4\pi \cdot N/3 \cdot \rho_m / (f/f_0)^3 \cdot a^3, \quad (71)$$

где ρ_m – плотность материала частицы.

Зависимость величин K_{av} и K_d от стоксова радиуса молекул исследовалась неоднократно. Было найдено, что эту зависимость можно выразить следующими линейными приближениями [64]:

$$(K_d)^{1/3} = \alpha - \beta a \text{ и } (-\lg K_{av})^{1/2} = \alpha' - \beta' a.$$

Коэффициенты α , β и α' , β' можно не определять, а по известным параметрам двух белков построить линейные графики вида (рис. 16):

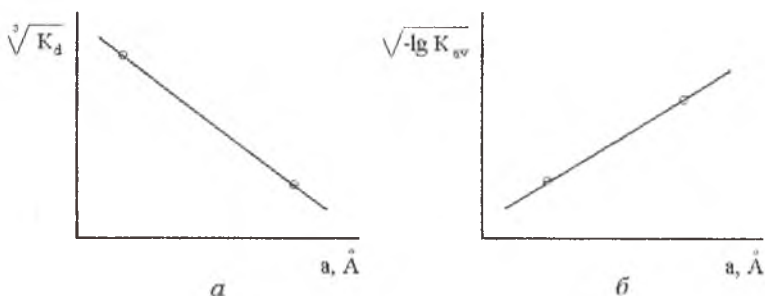


Рис. 16. Зависимость коэффициентов K_d (а) и K_{av} (б) от стоксова радиуса

С их помощью для исследуемого белка по экспериментальным значениям K_{av} и K_d , можно найти стоксов радиус, а потом определить молекулярную массу по уравнению

$$M = a \cdot 6\pi \cdot \eta \cdot N_A \cdot S / (1 - \rho/\rho_m), \quad (72)$$

где ρ – плотность среды, N_A – число Авогадро, S – коэффициент седиментации.

3.6.3.5. Сорбенты, используемые в эксклюзионной хроматографии

В качестве сорбентов в эксклюзионной хроматографии обычно используются гидрофильные и органотфильные гели.

Гидрофильные гели – это декстрановые гели или сефадексы. Они представляют собой полисахаридные цепи, сшитые эпихлоргидрином. Вследствие множества гидроксильных групп такая матрица хорошо удерживает воду. Степень набухания геля уменьшается по мере возрастания степени сшитости. По мере уменьшения размеров пор в объем элюирования попадают вещества все с меньшей молекулярной массой. В таблице 7 приведены свойства и указаны области применения различных сефадексов.

Таблица 7

Свойства сефадексов [63]

| Тип сефадекса | Размеры частиц в сухом состоянии, мкм | Область применения (молярная масса · 10 ⁻³) | | Объем матрицы (сухой гель), мг · г ⁻¹ | Время набухания, ч | |
|---------------|---------------------------------------|---|----------|--|--------------------|----------|
| | | пептиды и глобулярные белки | декстран | | при 20°C | при 90°C |
| G-10 | 40-120 | 0.7 | 0.7 | 2 – 3 | 3 | 1 |
| G-15 | 40-120 | 1.5 | 1.5 | 2.5 – 3.5 | 3 | 1 |
| G-25 крупный | 100-300 | 1 – 5 | 0.1 – 5 | 4 – 6 | 3 | 1 |
| средний | 50-100 | | | | | |
| мелкий | 20-80 | | | | | |
| супермелкий | 10-40 | | | | | |
| G-50 крупный | 100-300 | 1.5 – 30 | 0.5 – 10 | 9 – 11 | 3 | 1 |
| средний | 50-150 | | | | | |
| мелкий | 20-80 | | | | | |
| супермелкий | 10-40 | | | | | |
| G-75 | 40-120 | 3 – 80 | 1 – 50 | 12 – 15 | 24 | 3 |
| супермелкий | 10-40 | 3 – 70 | | | | |
| G-100 | 40-120 | 4 – 150 | 1 – 100 | 15 – 20 | 72 | 5 |
| супермелкий | 10-40 | 4 – 100 | | | | |
| G-150 | 40-120 | 5 – 300 | 1 – 150 | 20 – 30 | 72 | 5 |
| супермелкий | 10-40 | 5 – 150 | | 18 – 22 | | |
| G-200 | 40-120 | 5 – 600 | 1 – 200 | 30 – 40 | 72 | 5 |
| супермелкий | 10-40 | 5 – 250 | | 20 – 25 | | |

Чем меньше степень сшитости, тем мягче гель и, следовательно, меньше рабочее давление в колонках, а значит, и скорость подачи элюента. Так, сефадекс G-10 выдерживает давление до 10⁵ Па (например, ускоренный процесс обессоливания белков), а сефадекс G-200 выдерживает давление до 5 · 10³ Па. Как и полиакриламидные гели, декстрановые гели применяются для выделения и очистки ферментов, так как их матрица не обладает денатурирующими свойствами.

Полиакриламидные гели, как уже указывалось выше, при высокой концентрации сшивающего агента обладают высокой механической прочностью. Такие гели выпускаются под названием био-гель Р (Bio-Gel P). В таблице 8 приведены рабочие характеристики гелей этого типа.

Таблица 8

Свойства био-гелей Р* [63]

| Тип геля | Размер частиц в набухшем состоянии, мкм | Область применения (молярная масса · 10 ⁻³) для пептидов и глобулярных белков | Объем матрицы в сухом состоянии, мг · г ⁻¹ |
|----------|---|---|---|
| P-2 | 150-300 80-150 40-80, < 40 150-300 | 0.1-1.8 | 3.5 |
| P-4 | 80-150 40-80, < 40 150-300 | 0.8-4 | 5 |
| P-6 | 80-150 40-80, < 40 150-300 | 1-6 | 8 |
| P-10 | 80-150 40-80, < 40 150-300 | 1.5-20 | 9 |
| P-30 | 80-150, < 40 150-300 | 2.5-40 | 11 |
| P-60 | 80-150, < 40 150-300 | 3-60 | 14 |
| P-100 | 80-150, < 40 150-300 | 5-100 | 15 |
| P-150 | 80-150, < 40 150-300 | 15-150 | 18 |
| P-200 | 80-150, < 40 150-300 | 30-200 | 25 |
| P-300 | 80-150, < 40 | 60-400 | 30 |

* В сухом состоянии

Агарозные гели находят применение при разделении высокомолекулярных полимеров и в качестве матриц для сорбентов в аффинной хроматографии (см. раздел 3.6.2.2). Гели выпускаются под торговым названием сефароза и био-гель А. Рабочие характеристики гелей агарозы приведены в таблице 9.

Сравнительно новым является гель, основой которого служит каркас из полиакриламида, а промежуточное пространство заполнено гелем агарозы. Благодаря небольшим размерам гранул и их высокой механической прочности эти материалы можно использовать при более высокой скорости подачи элюента, чем принято для сефадексов и био-гелей. Этот тип геля выпускается под торговым названием ультрагель.

Таблица 9

Свойства агарозных гелей сефарозы и био-геля А [63]

| Тип геля | Концентрация агарозы, % | Размеры частиц в набухшем состоянии, мкм | Область применения (молекулярная масса) для глобулярных белков |
|------------------|-------------------------|--|--|
| Сефароза 2В | 2 | 60-200 | $7 \cdot 10^4 - 4 \cdot 10^7$ |
| Сефароза 4В | 4 | 60-140 | $6 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^7$ |
| Сефароза 6В | 6 | 45-165 | $10^4 - 10 \cdot 10^6$ |
| Био-гель А-150m* | 1 | 150-300 80-150 | $10^6 - 1.5 \cdot 10^8$ |
| Био-гель А-50m | 2 | 150-300 150-300 | $10^5 - 5 \cdot 10^7$ |
| Био-гель А-15m | 4 | 80-150 40-80 150-300 | $4 \cdot 10^4 - 15 \cdot 10^6$ |
| Био-гель А-5m | 6 | 80-150 40-80 150-300 | $10^4 - 5 \cdot 10^6$ |
| Био-гель А-1.5m | 8 | 80-150 40-80 150-300 | $10^4 - 1.5 \cdot 10^6$ |
| Био-гель А-0.5m | 10 | 80-150 40-80 | $10^4 - 5 \cdot 10^5$ |

* У био-гелей А пределы эксклюзии (исключения) отражены в маркировке, например био-гель А-5m имеет предел эксклюзии $5000000 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$.

Сефакрил – сополимер декстрана, несущего алильные группы, и N,N'-мстилен-бис-акриламида. Гранулы геля обладают высокой механической прочностью, химически устойчивы (стабильны в области pH 3–11, выдерживают стерилизацию в автоклаве при pH=7 и температуре до 120 °C); вследствие жесткой структуры устойчивы к действию органических растворителей. При переходе от воды к полярным органическим растворителям объем геля изменяется незначительно. Маркировка и области применения сефакрила приведены в таблице 10.

Свойства сефакрилов [63]

| Тип сорбента | Размер частиц во влажном состоянии, мкм | Область применения (молярная масса) | | Объем набухшего в воде геля в 100 мл указанного растворителя | | | |
|--------------------|---|-------------------------------------|-------------------------------|--|-------|-------------------|----------|
| | | глобулярные белки | полисахариды | ДФФ | AcOEt | CHCl ₃ | n-Гептан |
| S-200 супер-мелкий | 40–105 | $5 \cdot 10^3 - 2.5 \cdot 10^5$ | $1 \cdot 10^3 - 8 \cdot 10^4$ | 100 | 70 | 70 | 65 |
| S-300 супер-мелкий | 40–105 | $1 \cdot 10^4 - 1.5 \cdot 10^6$ | $1 \cdot 10^3 - 4 \cdot 10^5$ | 100 | 90 | 85 | 70 |

Органофильные гели – это производные декстрана и полистирольные гели.

Производные декстрана – сефадекс LH-20 и сефадекс LH-60. У этих сефадексов гидроксильные группы этерифицированы гидроксипропильной группой. Вследствие этого гели обладают как гидрофильными, так и липофильными свойствами. Из смеси полярных и неполярных растворителей (хлороформ – метанол, бутанол – вода) гель избирательно впитывает полярные компоненты, т.е. возникает положение, свойственное для распределительной хроматографии. Поэтому характер взаимодействия разделяемых веществ с сорбентом в значительной степени зависит от состава элюента. Регулируя состав элюента, можно либо подавить адсорбционные свойства геля, т.е. провести разделение в режиме эксклюзионной хроматографии, либо разделять вещества с близкими молекулярными массами, т.е. работать в режиме распределительной или адсорбционной хроматографии.

Полистирольные гели используют для работы в режиме эксклюзионной хроматографии, а также для адсорбции (извлечения, отделения) неполярных веществ и детергентов. Эти материалы выпускают под торговыми названиями био-бедс S и био-бедс SM. Эти гели являются сополимерами стирола и дивинилбензола; диаметр пор геля в значительной степени зависит от природы растворителя. Полистирольные гели сильно набухают в неполярных растворителях (толуол, четыреххлористый углерод), которые по этой причине часто используются в качестве элюентов. Поскольку гель легко деформируется, удовлетворительные результаты достигаются лишь при небольших скоростях потока.

Био-бедс S применяется для разделения и определения молекулярных масс алканов, жиров, жирных кислот и полистиролов. Био-бедс SM-2 – механически прочный макропористый гель, степень набухания которого в различных растворителях изменяется незначительно. Особенно удачно

гель используют при извлечении детергентов и других неполярных веществ из водных растворов.

Стирагель – сильносшитый макропористый полистирольный гель, вследствие высокой механической прочности применяется при работе в режиме ВЭЖХ. В качестве растворителей рекомендуется использовать тетрагидрофуран, диметилформамид, дихлорметан и ароматические углеводороды. Гель поставляется в набухшем состоянии; не рекомендуется высушивание геля, а также его контакт с полярными растворителями, например водой, метанолом.

Пористые стекла стойки ко всем типам растворителей и применяются в жидкостной хроматографии при высоком давлении. Адсорбционные свойства, характерные для обыкновенных кремнезёмов, у пористых стекол незначительны и могут быть сведены к минимуму при помощи дополнительной обработки. Однако для работы с легко денатурирующими белками их надо применять осторожно. Кроме того, растворы белков с изоэлектрическими точками выше $pH=7$ заметно адсорбируются кислыми функциональными группами пористого стекла. Для исключения денатурации и адсорбции белков на пористом стекле рекомендуется:

- изменить ионную силу элюента;
- заменить тип соли или буфера;
- уменьшить значение pH ;
- добавить в элюент 5%-ный этанол, 0,4%-ный полиэтиленгликоль 20 000 или детергент (например, 0,1%-ный додецилсульфат натрия);
- использовать модифицированное пористое стекло (амино- или глицерил-производные).

3.6.4. Ионообменная хроматография

Этот вариант жидкостной хроматографии основан на способности разделяемых ионов в растворе к ионному обмену с ионитом, который представляет собой нерастворимую полимерную матрицу, несущую химически связанные ионогенные группы. Противоионы удерживаются на матрице за счет сил электростатического взаимодействия и могут обмениваться на ионы разделяемой смеси, присутствующие в подвижной фазе.

3.6.4.1. Физические основы метода

Ионообменники по химическому строению матрицы подразделяются на следующие группы: синтетические смолы на основе полистирола или полиакриламида; сефадексы на основе сшитого декстрана; сефарозы на основе агарозы; целлюлозные ионообменники на основе микрокристаллической или сшитой микросферической целлюлозы; неорганические иониты на основе поверхности-модифицированных силикагелей.

Тип ионообменника определяется природой функциональных ионогенных групп. Ионит является слабокислым при наличии карбоксильных или оксифенильных групп; сильнокислотным при наличии сульфогрупп ($-SO_3 H^+$); слабоосновным при наличии аминогрупп различной степени замещения; сильноосновным при наличии групп четвертичных аммониевых оснований.

Разделение ионитов на сильные и слабые проводится по аналогии с делением на слабые и сильные кислоты и основания и отчасти отражает степень диссоциации ионогенных групп. Это свойство не следует путать с емкостью, которая для ионитов определяется абсолютным числом функциональных групп и их доступностью. Сильный ионит имеет полную емкость в большом диапазоне значений pH раствора, слабый ионит достигает полной емкости лишь в определенной области pH. Так, карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) при $pH < 3$ уже не несет диссоциированных карбоксильных групп и полностью лишена ионообменных свойств. Полной емкости КМЦ достигает при $pH > 6$.

Ионообменную хроматографию проводят в водной среде. В качестве примера ионообменного процесса можно привести операцию умягчения воды, при которой ионы кальция и магния обмениваются на ионы натрия. Помимо обычного обмена ионов на ионитах можно проводить разделение заряженных частиц, прежде всего биополимеров (белки, нуклеиновые кислоты), некоторые из которых обладают амфотерными свойствами. Именно эта область является главной для применения ионообменной хроматографии. Так как суммарный заряд таких макромолекул зависит от pH среды, хроматографию проводят в буферных растворах. В большинстве случаев pH среды в процессе разделения поддерживают постоянным. Разделение различных ионов возможно, если компоненты смеси по-разному взаимодействуют с заряженными группами ионита.

Если несколько повысить ионную силу элюента путем добавления нейтральных солей (например, хлорида натрия), то ионы элюента будут конкурировать с компонентами смеси. Вследствие этого один или несколько компонентов частично десорбируются и начнут медленно мигрировать по колонке в подвижной фазе. При повышении концентрации соли скорость миграции возрастает, одновременно десорбируются более прочно удерживаемые вещества. При некотором предельном значении ионной силы элюента все компоненты образца полностью десорбируются и мигрируют по колонке со скоростью движения подвижной фазы. Следовательно, важно найти оптимальное значение ионной силы, при котором достигается наибольшее разделение целевых компонентов смеси. В большинстве случаев при постоянной ионной силе буфера не удастся элюировать все компоненты смеси, присутствующие в образце. Поэтому общепринятым приемом в ионообменной хроматографии является элюирование в градиенте ионной силы.

3.6.4.2. Сорбенты в ионообменной хроматографии

В качестве сорбентов в ионообменной хроматографии используются иониты различных марок с матрицами синтетического и природного происхождения.

Иониты на основе синтетических смол. Основой этих ионитов являются полистирольные смолы. На рис. 17 приведена схема получения ионитов на основе синтетических смол.

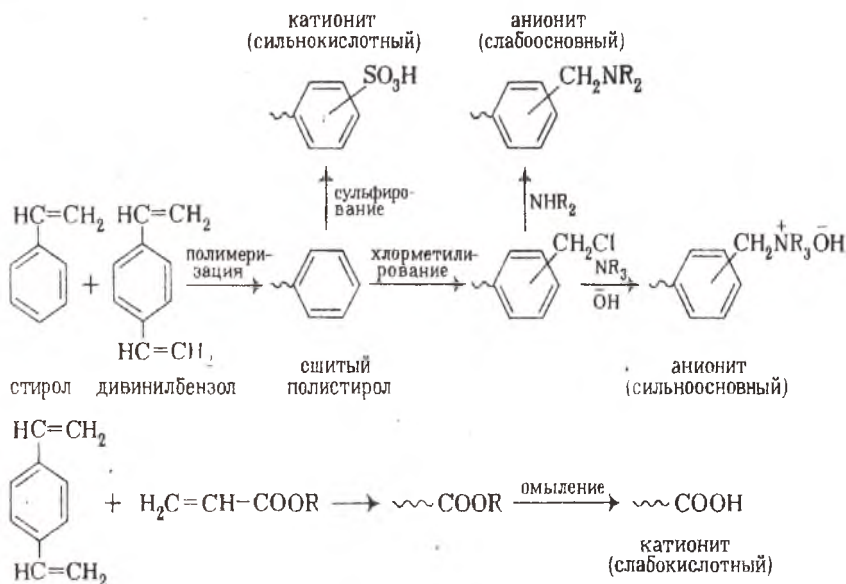


Рис. 17. Схема синтеза наиболее важных ионитов

Эти иониты производят в виде гранул диаметром от 5 мкм до 2 мм. Гранулы меньшего диаметра предназначены для проведения анализов при повышенном давлении (например, анализ аминокислот, углеводов).

Сефадексы. Это иониты на основе декстрана. Их готовят путем введения функциональных групп в сефадексы G-25 или G-50 (таблица 7), при этом получают иониты соответственно марок С-25, А-25, С-50 и А-50. Катионит С-25 и анионит А-25 используют при разделении веществ с небольшой молекулярной массой, иониты С-50 и А-50 – при разделении высокомолекулярных соединений с молекулярной массой до 30 000. Свойства сефадексов приведены в таблице 11.

Иониты на основе сшитого декстрана (сефадексы)

| Тип ионита | Свойства | Иониты и их функциональные свойства | Противоионы |
|---------------------------|--------------------------|---|-------------|
| DEAE-сефадекс А-25 и А-50 | Слабоосновный анионит | Сефадекс $-O-CH_2-CH_2-NH(C_2H_5)_2$ диэтиламиноэтильная группа | Cl^- |
| QAE-сефадекс А-25 и А-50 | Сильноосновный анионит | Сефадекс $-O-CH_2-CH_2-$ $-N(C_2H_5)_2CH_2CH(OH)CH_3$ (2-гидроксипропил) диэтиламиноэтильная группа | Cl^- |
| CM-сефадекс С-25 и С-50 | Слабокислотный катионит | Сефадекс $-O-CH_2-COO^-$ карбоксиметильная группа | Na^+ |
| SP-сефадекс С-25 и С-50 | Сильнокислотный катионит | Сефадекс $-O-CH_2-CH_2-CH_2-SO_3^-$ сульфопропильная группа | Na^+ |

Более высокомолекулярные вещества разделяют на ионообменной агарозе – *сефарозе*.

Иониты также изготавливаются из микрокристаллической или дополнительно сшитой целлюлозы. Гранулы имеют сферическую форму, что важно при упаковке колонок, обладают высокой жесткостью; совокупность перечисленных свойств делает иониты этого типа незаменимыми. Существуют иониты на основе *силикагелей* – модифицированные силикагели.

3.6.5. Тонкослойная хроматография и ее применение в биомедицинских исследованиях

Тонкослойная хроматография (ТСХ) до 70-х годов занимала ведущее место в исследованиях структуры белков и нуклеиновых кислот. В последующие годы этот метод был вытеснен ВЭЖХ и электрофорезом – первый превосходит ТСХ по разрешающей способности, второй – по скорости анализа. Все это в одно время порождало у исследователей мнение о полном вымирании метода ТСХ. Но с развитием аппаратного оформления и появлением новых материалов увеличились возможности ТСХ, и теперь этот вариант планарной хроматографии может конкурировать в качестве независимого метода при решении проблем идентификации вещества. Главное достоинство метода ТСХ – простота и дешевизна. С появлением новых микрогранулированных и весьма гомогенных носителей для ТСХ существенно повысилась разрешающая способность метода. Этому также способствовала разработка способов автоматизированного нанесения на пластинки микроколичеств препарата и

новых вариантов метода, например циркуляционной ТСХ. Совокупность этих новых приемов иногда называется высокоэффективной ТСХ (ВЭТСХ).

В настоящее время ВЭТСХ широко применяется в биомедицинских исследованиях. Ее положительные особенности [1, 66]:

1) движение элюента за счет капиллярных сил (простота хроматографического эксперимента, простота и низкая стоимость оборудования);

2) использование дешевого универсального адсорбента – силикагеля (однократное использование пластинки, отсутствие требований к чистоте пробы); в качестве адсорбента можно применять целлюлозу;

3) открытый слой адсорбента (одновременный анализ большого числа проб, отсутствие требований к УФ–прозрачности элюента, простота наблюдения, отсутствие необходимости в оптическом детектировании, большие возможности селективного детектирования, в том числе радиоактивных изотопов, детектирование всех компонентов пробы, легкость осуществления градиентной ТСХ, малое время анализа);

4) обеспечивается возможность одновременного элюирования различными растворителями (до шести растворителей при элюировании по соседним дорожкам) и регулируемого воздействия газовой фазы на разделение, можно изменить селективность за считанные секунды или минуты;

5) за счет подбора условий элюирования (хроматографического разделения) может быть оптимизирована разрешающая способность только по интересующим исследователя веществам; благодаря этому экономится время, затрачиваемое на анализ;

6) возможность хранить пластинку с разделенными образцами и детектировать вещества позже (независимо от процедуры разделения), тонкослойная пластинка может обследоваться так долго, сколько потребует, или столь быстро, насколько это позволяет детектор (и соответствующие электронные схемы). Обеспечивается возможность выполнять спектральную идентификацию какое-то время спустя после разделения (в любом диапазоне волн, включая инфракрасную область спектра);

7) затраты средств на количественный анализ составляют 1/3 от затрат на колонную жидкостную хроматографию. При хорошей организации хроматографического процесса количественная оценка результатов оказывается более точной, чем в случае колонной жидкостной хроматографии.

ВЭТСХ как метод была окончательно сформулирована немецкими учеными А.Златкисом и Р. Кайзером, вынудившими в 1977 году книгу «Высокоэффективная ТСХ». Современное состояние тонкослойной хроматографии детально изложено в монографии [67], которая издана в двух томах, и в работе [68]. Фирмы “Merck” и “Macherey and Nagel” – основные поставщики носителей для ТСХ. Сюда же можно отнести фирмы «Camag» (Швейцария) и “Desaga” (Германия). Развитие ТСХ повлекло за собой и возобновление интереса к электрофорезу на твердых носителях. Наиболее интересные результаты получаются при сочетании ТСХ и электрофореза в виде двухмерного фракционирования.

3.6.5.1. Физические основы метода

Разделение в ТСХ осуществляется вследствие многократного пересечения молекулами веществ границы фаз твердое вещество – жидкость (Т – Ж) или жидкость – жидкость (Ж – Ж), т.е. вследствие многократного процесса распределения вещества между подвижной и неподвижной фазами. Неподвижной фазой служит либо сухой сорбент (адсорбционная хроматография), либо сорбент, покрытый жидкой фазой (распределительная хроматография). Систему растворителей подбирают в соответствии со свойствами разделяемых веществ. Следует запомнить, что полярные вещества следует разделять в полярных растворителях, малополярные – в менее полярных или неполярных растворителях.

В различных системах растворителей вещества обладают различной подвижностью. Количественно подвижность выражается величиной R_f , иначе называемой фактором удерживания (рис. 18).

R_f равно отношению расстояний от стартовой линии до середины пятна вещества и от стартовой линии до линии фронта растворителя. Значение R_f практически не зависит от длительности проявления, но зависит от множества других факторов (в том числе и от влажности воздуха) и, следовательно, может служить лишь предварительным ориентиром. Большинство химических соединений лишено окраски, и для их обнаружения на пластине используют различные физические и химические методы, например флуоресценцию, абсорбцию или химические реакции.

Флуоресценция. Многие ароматические вещества имеют собственную флуоресценцию при 360 нм; при этой длине волны они обнаруживаются в виде желтых флуоресцирующих пятен на темном фоне.

Абсорбция. Большинство готовых ТСХ-пластин содержит люминофоры (такие пластинки помечены индексом Φ_{254}); при облучении УФ-светом с длиной волны 254 нм они светятся равномерным желто-зеленым фоном. Вещества, поглощающие в УФ-области, обнаруживаются в виде темных пятен на светлом фоне.

Химические реакции. Функциональные группы веществ способны вступать в реакции со специфическими реагентами с образованием хромофоров (аминогруппы белков и пептидов проявляются с помощью нингидрина).

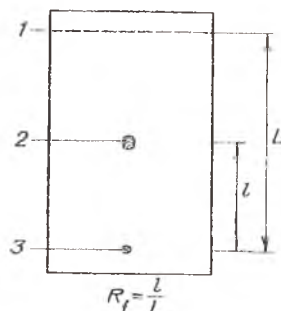


Рис. 18. Пластика ТСХ:

1 – фронт растворителя; 2 – пятно целевого вещества; 3 – стартовая точка; L – расстояние старт – фронт; l – расстояние старт – пятно целевого вещества

3.6.5.2. Сорбенты, применяемые в ТСХ

На ТСХ-пластинках сорбенты закрепляют при помощи органических связующих материалов. Высокое качество пластинок гарантируется лишь при условии правильного хранения (так как слой сорбирует летучие вещества из воздуха). Данные о свойствах наиболее важных сорбентов для ТСХ приведены в таблице 12.

Таблица 12

Сорбенты для ТСХ

| Сорбент | Область применения | Примечания |
|-----------------------------|--|--|
| Силикагель | Разделение неполярных веществ; выделение веществ, обладающих основными свойствами; рекомендуется использовать элюенты с основными свойствами | Поверхность сорбента сильнополярная; неполярные вещества разделяют методом распределительной хроматографии |
| Оксид алюминия | Разделение слабополярных основных веществ | Поверхность сорбента сильнополярная |
| Модифицированный силикагель | Разделение полярных веществ в условиях ОФХ | Поверхность покрыта химически связанными углеводородными группами |
| Полиамид | Разделение веществ, образующих с амидными группами сорбента водородные связи | Элюирующие свойства растворителей возрастают в следующем ряду: вода < метанол < ацетон < формамид < диметилформамид |
| Ацетилированная целлюлоза | Разделение липофильных веществ (полициклических ароматических углеводородов, антрахиноновых красителей) | Распределительная хроматография в условиях ОФХ; сорбент частично растворим в обычных растворителях (диоксане, ацетоне, эфире) |
| CM-целлюлоза | Слабый катионит | Содержит карбоксиметильную группу: $\text{---H}_2\text{C---}\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}\text{---}$ |
| DEAE-целлюлоза | Слабый анионит | Содержит диэтиламиноэтильную (DEAE) - группу: $\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---}\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_2\text{---CH}_3)_2$ |
| PEI-целлюлоза | Анионит, применяется для разделения ферментов и нуклеотидов | Содержит функциональную группу - фрагмент полиэтиленimina (PEI): $\text{---}(\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---}\overset{+}{\text{N}}\text{H---})\text{---}$ |

| | | |
|-----------------------|--|--|
| ЕСТЕОЛА-целлюлоза | Анионит | Более слабый анионит по сравнению с DEAE-целлюлоза |
| IONEX-смешанный ионит | Смесь кислого и основного ионообменника на основе силикагеля | — |

3.6.5.3. Выбор элюирующих систем

Наиболее сложен выбор элюента при разделении на полярных сорбентах, таких как силикагель или оксид алюминия. В случае обращенно-фазовой хроматографии проблема выбора элюента не такая острая. В таблице 13 приведен элюотропный ряд, в котором растворители располагаются в порядке возрастания элюирующих свойств. При этом соблюдаются следующие закономерности:

- вещество характеризуется большим значением R_f в более полярных растворителях;
- менее полярное вещество характеризуется большим значением R_f ; для веществ со сходными свойствами или соединений одного гомологического ряда R_f возрастает с увеличением числа полярных групп ($-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$); R_f уменьшается при увеличении числа полярных групп по мере увеличения полярности функциональных групп:



При элюировании в одном растворителе редко удается достичь удовлетворительного разделения. Более эффективными являются системы, составленные из двух или более растворителей. Поскольку силикагель обладает сродством к полярным веществам, т.е. избирательно удерживает полярные компоненты (из системы растворителей), в рабочем слое наряду с адсорбцией наблюдается и эффект распределения. По мере продвижения элюирующей смеси по пластинке изменяется ее состав, т.е. формируется градиент полярности растворителя; кроме того, при взаимодействии твердой и жидкой фазы в слое происходят очень сложные процессы, однако эти обстоятельства практически не влияют на конечные результаты, и разделение методом ТСХ дает хорошо воспроизводимые результаты.

Вещества с заряженными группами (амины, карбоновые кислоты) не удается разделить на силикагеле и оксиде алюминия, поскольку оба сорбента имеют собственные ионогенные группы (силикагель получают путем осаждения золя кремневой кислоты). Поэтому при составлении систем растворителей руководствуются общими правилами.

Элюотропный ряд растворителей*

| Растворитель | Элюирующая способность растворителей («полярность») | Вязкость η , мПа·с | Показатель преломления n_D | Наименьшая длина волны, нм |
|--------------------------|---|-------------------------|------------------------------|----------------------------|
| <i>n</i> -Пентан | 0.00 | 0.24 | 1.358 | 200 |
| <i>n</i> -Гексан | 0.01 | 0.33 | 1.375 | 200 |
| <i>n</i> -Гептан | 0.01 | 0.42 | 1.388 | 200 |
| Изооктан | 0.01 | 0.50 | 1.391 | 200 |
| Циклогексан | 0.04 | 0.98 | 1.426 | 210 |
| Четыреххлористый углерод | 0.18 | 0.97 | 1.466 | 265 |
| Диизопропиловый эфир | 0.28 | 0.37 | 1.368 | 220 |
| Толуол | 0.29 | 0.59 | 1.496 | 290 |
| <i>n</i> -Пропилхлорид | 0.30 | 0.35 | 1.389 | 225 |
| Бензол | 0.32 | 0.65 | 1.501 | 290 |
| Этилбромид | 0.37 | 0.39 | 1.421 | 230 |
| Диэтиловый эфир | 0.38 | 0.23 | 1.353 | 220 |
| Хлороформ | 0.40 | 0.57 | 1.443 | 250 |
| Дихлорметан | 0.42 | 0.44 | 1.424 | 250 |
| Тетрагидрофуран | 0.45 | 0.46 | 1.407 | 220 |
| Этиленхлорид | 0.49 | 0.79 | 1.445 | 230 |
| Ацетон | 0.56 | 0.32 | 1.359 | 330 |
| Диоксан | 0.56 | 1.54 | 1.422 | 220 |
| Этилацетат | 0.58 | 0.45 | 1.370 | 260 |
| Метилацетат | 0.60 | 0.37 | 1.362 | 260 |
| Нитрометан | 0.64 | 0.65 | 1.382 | 380 |
| Ацетонитрил | 0.65 | 0.37 | 1.344 | 210 |
| Пиридин | 0.71 | 0.94 | 1.510 | 310 |
| <i>n</i> -Пропанол | 0.82 | 2.30 | 1.380 | 200 |
| Этанол | 0.88 | 1.20 | 1.361 | 200 |
| Метанол | 0.95 | 1.20 | 1.361 | 200 |
| Гликоль | 1.11 | 19.90 | 1.427 | 200 |
| Вода | большая | 1.00 | 1.33 | — |
| Формамид | большая | 3.76 | 1.448 | — |
| Уксусная кислота | большая | 1.26 | 1.372 | — |

* Все значения измерены при 20 °С; полярность растворителей указана для оксида алюминия

На силикагеле (слабокислотный сорбент) разделяют соединения с кислотными свойствами в системах, содержащих кислоты (чаще органические – уксусную, муравьиную); соединения с основными свойствами – в системах, содержащих основания (аммиак). На оксиде алюминия (слабосредней сорбент) разделяют как соединения с кислотными свойствами в очень кислых системах, так и основные соединения, поскольку на силикагеле они, как правило, необратимо сорбируются.

ТСХ находит широкое применение в биомедицинских исследованиях, особенно при определении содержания различных лекарственных препаратов и их метаболитов в крови, моче и других биологических жидкостях. В работе [69] Ридель и Лауфен использовали технику горизонтальной ТСХ, когда образцы наносят на пластину с двух сторон и элюент также подают с двух сторон (рис.19), определили пироксикама в плазме крови, моче и тканях в 150 образцах за день (~ 4,5 мин на один образец) при содержании до 10 нг образца в 1 мл мочи или плазмы.

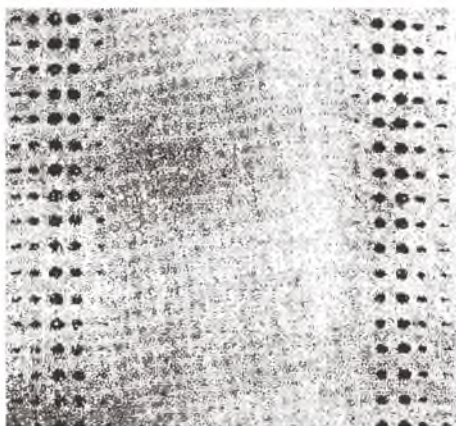


Рис. 19. ТСХ красителей в горизонтальной камере

Дэвис и Фенимор [70] определяли содержание фенотиазиновых препаратов в 30–60 образцах плазмы в день с точностью ~ 3 % при чувствительности анализа 0,1 нг/мл.

ТСХ находит также применение при изучении липидного метаболизма в плазме крови. Широко используют ТСХ судебные медики.

4. Электрофорез

Электрофорез занимает одно из центральных мест среди методов исследования белков и нуклеиновых кислот. В современной научной литературе редко можно встретить статью, в которой бы на той или иной стадии фракционирования биополимеров не был использован электрофорез. Метод позволяет разделять макромолекулы, различающиеся по таким важным параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд, причем эти параметры могут выступать как порознь, так и в совокупности.

Электрофорез – метод разделения веществ, основанный на явлении миграции заряженных микрочастиц в жидкой среде под действием внешнего электрического поля. Существуют три различных электрофоретических метода – собственно электрофорез (зональный электрофорез, ЗЭ), изоэлектрофокусирование (ИЭФ) и изотахофорез (ИТФ).

Электрофорез (или ЗЭ) применяют для разделения веществ, молекулы которых в соответствующих условиях заряжены и отличаются по электрофоретической подвижности. Путем изменения внешних условий (например, рН среды, температуры, силы тока, состава и концентрации буферного раствора или носителя) подбирают подходящие условия для разделения. Вследствие того, что при разделении на молекулы действуют только электростатические силы, электрофорез считают мягким методом и поэтому часто применяют при работе с лабильными веществами. Электрофорез можно проводить в растворе, но из-за неизбежного выделения тепла и возникающей в связи с этим тепловой конвекции процесс, как правило, проводят на носителе.

Физический принцип метода заключается в следующем. Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависят от рН среды. Если через этот раствор, заключенный в канал из изолирующего материала, например стеклянную трубку, начать пропускать электрический ток, то вдоль канала установится определенный градиент напряжения, т.е. сформируется электрическое поле. Его напряженность измеряется разностью потенциалов по концам рабочего канала (или его участка), отнесенной к его длине (В/см). Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода, причем трение, возникающее при этом, ограничивает скорость миграции.

В зависимости от величины заряда и размеров молекулы приобретают разные скорости – и в этом сущность процесса электрофореза. Постепенно исходный препарат, состоявший из различных молекул, разделяется на зоны одинаковых молекул, мигрирующих с одной и той же скоростью.

Со временем эти зоны распределяются по длине канала. Схема простейшего прибора для электрофореза приведена на рис. 20.

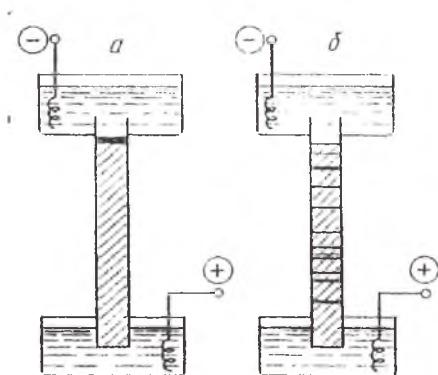


Рис. 20. Схема простейшего прибора для электрофореза в геле: *а* – до начала фракционирования, *б* – после его окончания

Как уже говорилось выше, во избежание конвекции, которая деформирует и смешивает разделяющиеся зоны, рабочий канал заполняют гелем (на рис. 20 он изображен штриховкой). Достаточно «чистая» и хорошо смачиваемая (гидрофильная) пространственная сетка геля удерживает жидкость от вытекания и препятствует конвекции.

Материалами-носителями для электрофореза могут быть не только гели на основе целлюлозы, агарозы, полиакриламида, но и бумага, и материалы для ТСХ (например, силикагель).

Процесс разделения макромолекул методом электрофореза регистрируется на *электрофореграмме*.

Ранее использовали один и тот же буфер в слое носителя и в электродных камерах, т.е. разделение вели в непрерывной буферной системе. В настоящее время этот прием все еще применяют при электрофорезе на бумаге и пластинках. Однако при электрофорезе с прерывистой буферной системой (различные буферы в слое носителя и в электродных камерах) быстро мигрирующие вещества образуют более узкие зоны. Электрофорез в прерывистой буферной системе используют главным образом в гель-электрофорезе.

ЗЭ обычно проводят на бумаге, пластинках и гелях в водных буферных растворах. Камера для ЗЭ представлена на рис. 21.

При электрофорезе в электродных камерах происходит электролиз раствора и вследствие этого – изменение состава буфера. Поэтому электроды располагаются так, чтобы они не касались носителя, а контакт между ними

осуществляется при помощи полосок фильтровальной бумаги. Электродная камера разделена на два отсека, которые соединяются дополнительным мостиком из фильтровальной бумаги. Подбирая соответствующий объем электродных камер или перекачивая насосом буфер от анода к катоду, поддерживают постоянными концентрацию и значение рН буфера в двухкамерной системе.

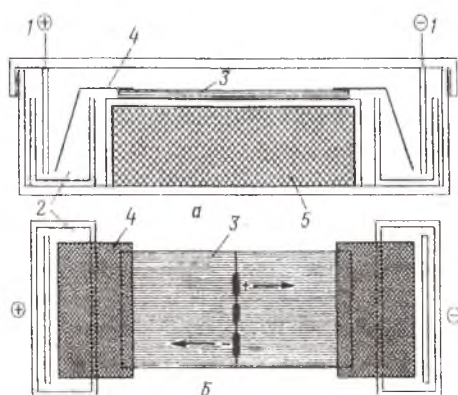
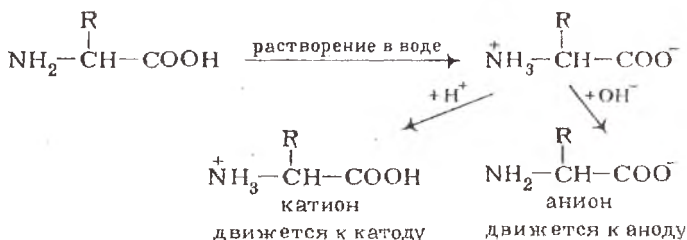


Рис. 21. Камера для зонального электрофореза: *а* – вид сбоку; *б* – вид сверху; 1 – электроды (анод и катод); 2 – буферный раствор в кювете; 3 – слой геля на пластинке (в центре пластинки показаны стартовые зоны анализируемой смеси); 4 – мостики из фильтровальной бумаги; 5 – охлаждаемая проточной водой металлическая пластинка для отвода избыточного тепла

Величина рН. При электрофорезе белков и аминокислот большое значение имеет величина рН. Эти вещества амфотерны и поэтому в кислой среде присоединяют протон и ведут себя как катионы, а в щелочной среде депротонируются и приобретают свойства анионов. В изоэлектрической точке (рI) они становятся цвиттер-ионами с нулевым суммарным зарядом, т.е. нейтральными молекулами, в которых противоположные заряды пространственно разделены. Суммарный заряд этих веществ зависит от рН среды в широком диапазоне. При электрофорезе они могут менять направление и скорость миграции. Ниже изображен цвиттер-ион с нулевым суммарным зарядом, скорость миграции которого в электрическом поле равна нулю:



На рис. 22 приведена зависимость изменения концентрации глицина в широком диапазоне pH. Очевидно, что при pH 2,34 и 9,60 концентрации катиона, аниона и цвиттер-иона равны.

Суммарный заряд аминокислот и пептидов в зависимости от pH оценивают (ориентировочно) следующим образом:

pH = 9,5 – пептид заряжен отрицательно и мигрирует к аноду;

pH = 3 – пептид заряжен положительно и мигрирует к катоду;

$3 < \text{pH} < 9,5$ – в соответствии со значением pI пептид мигрирует к катоду или аноду. При pH = pI суммарный заряд равен нулю, и пептид остается на стартовой линии.

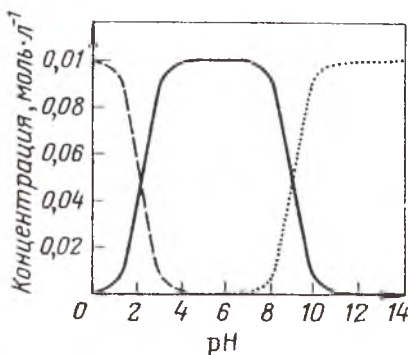


Рис. 22. Изменение концентраций аниона, катиона и цвиттер-иона в 0,1M растворе глицина в зависимости от pH среды ($\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{COOH}$ – штриховая линия; $\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{COO}^-$ – сплошная линия; $\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{COO}^-$ – точечная линия)

В ходе электрофореза зоны растворенных макромолекул остаются невидимыми. Для наблюдения за процессом в исходный материал добавляют краситель, молекулы которого несут электрический заряд того же знака, что и фракционируемые молекулы, но не взаимодействуют с ними. Краситель тоже передвигается в электрическом поле, но уже в виде окрашенной зоны.

Его подбирают таким образом, чтобы скорость миграции наиболее подвижных макромолекул была несколько ниже, чем у молекул красителя. Когда окрашенная зона доходит до конца трубки, электрофорез прекращают.

Напряженность электрического поля влияет на миграцию белков – чем она выше, тем больше скорость миграции.

Электрофорез нуклеиновых кислот отличается от электрофореза белков некоторыми характерными особенностями, вытекающими из различия природы этих биополимеров. Главное, что отличает нуклеиновые кислоты, – это неизменно отрицательный и значительный по величине суммарный электрический заряд, обусловленный диссоциацией многочисленных остатков фосфорной кислоты. Величина этого заряда мало зависит от pH среды, а отношение заряда к массе практически одинаково для всех нуклеиновых кислот, поэтому в подавляющем большинстве случаев фракционирование их при электрофорезе идет за счет различия размеров молекул, а не их зарядов.

Выбор буфера геля в такой ситуации не играет существенной роли – он обуславливается, в основном, теми условиями, в которых необходимо вести электрофорез. Если необходимо обеспечить нативность препарата и вести электрофорез в условиях, предотвращающих денатурацию, то применяют трис-боратный, трис-фосфатный или трис-ацетатный буфер. Если электрофорез надо вести в условиях, обеспечивающих денатурацию нуклеиновой кислоты, то они могут быть вызваны, в частности, полимеризацией геля в 0,02 – 0,03M растворе NaOH.

Вторая особенность электрофореза нуклеиновых кислот и их фрагментов – очень широкий диапазон молекулярных масс. Например, при определении нуклеотидной последовательности ДНК и РНК приходится разделять полученные при их гидролизе олигонуклеотиды, содержащие единицы и десятки мономерных звеньев, т.е. молекулы с массами от тысячи до нескольких сотен тысяч дальтон, а это – тот же диапазон, что и для белков. В этом случае электрофорез ведут в полиакриламидном геле (ПААГ).

Разделение крупных рестриктов ДНК, целых молекул ДНК или РНК вирусов ведут в гелях агарозы. Подробно метод электрофореза биологических макромолекул рассмотрен в книгах [63] и [64].

5. Хроматографическое определение некоторых лекарственных препаратов в биологических жидкостях

В этом разделе приведены хроматографические методики качественного и количественного определения некоторых лекарственных и наркотических средств в биологических жидкостях.

5.1. Барбитураты

Со времени введения в 1913 г. в клиническую практику первого производного барбитуровой кислоты эта группа седативных препаратов характеризуется неуклонно возрастающим уровнем потребления и злоупотребления. Подсчитано, что из синтезированных до сих пор 2500 барбитуратов более 50 в настоящее время поставляются на мировой рынок для клинического применения. Широкая доступность барбитуратов, приобретаемых как по назначению врача, так и нелегальным путем, а также возрастающая необходимость в их определении при лечении эпилептиков антиконвульсивными препаратами вызвали потребность в одновременном обнаружении этих веществ в сыворотке. Биохимики-клиницисты все чаще привлекаются для идентификации и количественного определения широкого круга седативных препаратов в крови людей, покушавшихся на самоубийство; при этом существенным является наличие быстрых и достоверных методов определения таких веществ.

ГЖХ на насадочных колонках с пламенно-ионизационным детектором широко употребляется для одновременного анализа барбитуратов в биологических жидкостях. Некоторые хроматографисты анализируют готовые формы лекарственных препаратов, другие перед анализом получают производные путем замещения кислого протона молекулы с целью уменьшения полярности и, следовательно, адсорбции на носителе и размывания пиков. В основном в последнее время используют капиллярные колонки с SE-30, OV-17. Сан и Хоффман описали чувствительный метод ГЖХ-анализа целого ряда барбитуратов, который включает стадии предварительной экстракции из сыворотки.

Обращенно-фазовая хроматография барбитуратов изучена достаточно широко. Эти вещества довольно легко разделяются в форме свободных кислот, а при значениях pH, обеспечивающих в основном анионную форму существования барбитуратов в системе, разрешение ухудшается. Кларк и Чан [71] обеспечили выполнение обоих этих требований в одном аналитическом методе. В их ВЭЖХ-методике барбитураты разделяют в виде свободных кислот и после этого переводят в анионную форму с помощью боратного буфера (pH=10) для обнаружения хромофоров в форме аниона.

Значения pK_a обычных барбитуратов, используемых в терапии, лежат в пределах от 7 до 8. Следовательно, при pH=10 эти слабые кислоты существуют почти исключительно в анионной, то есть хромофорной, фор-

ме. Площади пиков барбитуратов после ионизации возрастают в 20 раз. Джилл с соавт. применяли эффективную комбинацию трех ВЭЖХ, двух ГЖХ и двух ТСХ–методов для идентификации целого набора барбитуратов.

Для идентификации барбитуратов наиболее подходит, как показывает практика, колоночная хроматография на липофильных фазах, например ВЭЖХ на октадецилсиликагеле и ГЖХ на SE-30. В обращенно-фазовой хроматографии наиболее эффективно при разделении барбитуратов родственной структуры изменение рН. Например, комбинация двух обращенно-фазовых систем для ВЭЖХ (одна с рН=3,5, вторая с рН=8,5) оказалась весьма полезной при разделении бутабарбитона и фтор-бутабарбитона.

5.2. Трициклические антидепрессанты

Это лекарственные препараты, применяемые при психических расстройствах и при лечении депрессий. Измерения концентрации этих препаратов в биологических жидкостях могут оказать помощь в проведении фармакотерапии депрессивных больных. В настоящее время исследователи располагают целым рядом ВЭЖХ–методик анализа кломипрамина, имипрамина и их соответствующих диметилированных метаболитов.

Методы включают также и ион-парную, распределительную, адсорбционную или обращенно-фазовую хроматографию. Пределы обнаружения составляют от 1 нг/мл для флуориметрических детекторов до 5–20 нг мл⁻¹ для ультрафиолетовых детекторов. В таблице 14 указано время удерживания девяти циклических антидепрессантов в условиях ВЭЖХ на колонке с силикагелем.

Таблица 14

Время удерживания некоторых трициклических антидепрессантов в условиях ВЭЖХ [5]

| Соединение | Время удерживания, мин | |
|---------------------|------------------------|-----------|
| | Система А | Система В |
| Амитриптилин | 2,48 | 5,10 |
| Нортиптилин | 11,00 | 3,70 |
| Кломипрамин | 2,74 | 5,06 |
| Дезметилкломипрамин | 14,50 | 3,50 |
| Имипрамин | 3,38 | 6,16 |
| Десипрамин | 19,20 | 3,86 |
| Протриптилин | 10,20 | 3,70 |
| Тримипрамин | 1,72 | 4,30 |
| Доксепин | 3,26 | 5,84 |

Примечание. Колонка 100×4,6 мм; сорбент дихросорб Si 60, размер частиц 5 мкм; система А: гексан – дихлормеган – метанол (8:1:1), гексан содержал 0,001% об. метиламина; система В: 0,05M NaBr в метаноле

5.3. Антиконсультанты

ГЖХ-анализ антиконсультантов обычно требует относительно большого количества образца и существенных затрат времени на его предварительную обработку. ВЭЖХ предоставляет потенциальные преимущества для их определения, поскольку анализ можно проводить без предварительной модификации, а элюат собирать по фракциям для дальнейшего анализа присутствующих в них соединений.

Кабра и др. [72] сообщили об одновременном определении фенобарбитала, феноитоина, примидона, этосукцимида и карбамазепина всего в 25 мкл сыворотки с помощью ВЭЖХ. Антиконтанты элюировали с обращенно-фазовой колонки с привитыми октадецильными группами фосфатным буфером, содержащим ацетонитрил, и детектировали по поглощению при 195 нм. На проведение анализа требуется около 14 мин при оптимальной температуре колонки 50 °С. Нижний предел обнаружения для всех этих веществ не превышает 10 нг, что позволяет легко определять эти вещества при их содержании в сыворотке 1 мкг/мл.

В ВЭЖХ-методе терапевтического мониторинга этосукцимида, теофиллина и ацетомефена в сыворотке крови человека использовали программируемый автоматический инжектор и обращенно-фазовую колонку, содержащую сорбент с привитыми октадецильными группами. Подвижная фаза состояла из ион-парных буферных систем типа тетраэтиламин-уксусная кислота или N-этилморфолин-уксусная кислота в водном ацетонитриле при рН 4,8. Этот метод позволяет определить три упомянутых выше препарата от других 26 лекарственных средств, метаболитов и родственных соединений.

5.4. Бензодиазепины

В настоящее время наблюдается значительное возрастание потребности в увеличении числа и частоты анализов бензодиазепинов в крови и плазме. До недавнего времени ГЖХ с детектором электронного захвата считался одним из лучших аналитических методов обнаружения этих препаратов, однако недостатком его применения в криминалистической токсикологии является отсутствие надежной идентификации соединений. Поэтому применение ВЭЖХ при определении лекарственных препаратов этого класса все возрастает.

Котлер и др. разработали ВЭЖХ-метод определения диазепамы и его основных метаболитов (оксазепамы, темазепамы, нордиазепамы) в плазме, крови и моче. Метод включает экстракцию биологических жидкостей, забуференных до рН 9 смесью бензол – дихлорметан (9:1). Суммарный выход диазепамы и его основных метаболитов из плазмы и крови варьирует в пределах от 60 до 89%, а из мочи – в пределах от 79 до 93 %. Предел обнаружения в плазме и крови по поглощению при 254 нм составляет 50 нг/мл, а в моче – 200 нг/мл.

Обращенно-фазовую ВЭЖХ на сорбенте с привитыми октадецильными группами в водном метаноле использовали для изучения изменения концентрации диазепама в плазме человека после перорального приема 10 мг препарата, а также для аналогичных измерений в крови кошек после внутривенного введения диазепама или нордиазепама в дозе 10 мг/кг. Данные определения с помощью ВЭЖХ хорошо согласуются с данными ГЖХ-анализа.

Имеются данные [73], в которых описано разделение и количественное определение бензодиазепинов, присутствующих в сыворотке, слюне и моче в терапевтических концентрациях, методом адсорбционной ВЭЖХ в обращенно-фазовом режиме с УФ-детектором, обладающим высокой эффективностью и селективностью. Полное разделение 9 бензодиазепинов на метилсиликагеле, в водном 50 %-ном метаноле в качестве подвижной фазы происходит за 12 мин. Пределы обнаружения варьируют от 200 до 340 пкг.

Способность бензодиазепинов поглощать в УФ-диапазоне, термолabileность некоторых из них (например, оксазепам) или необходимость получения производных перед проведением ГЖХ-анализа с ДЭЗ (например, темазепам) – все это делает ВЭЖХ более пригодной для их анализа и позволяет реализовать ее преимущества в фармакокинетических исследованиях. Для анализа бензодиазепинов обычно предпочитают обращенно-фазовую хроматографию, поскольку она обеспечивает более высокое качество разделения по сравнению с адсорбционной [74, 75].

В таблице 15 приводятся параметры хроматографического удерживания бензодиазепинов при использовании ГЖХ и ВЭЖХ.

Таблица 15

Величины хроматографического удерживания бензодиазепинов ВЭЖХ

| Соединение | ВЭЖХ (объем удерживания, мл) | |
|-------------------------|---------------------------------|-----------|
| | Система А | Система В |
| Хлордиазепоксид | 12 | < 5 |
| Дезметилхлордиазепоксид | 9,6 | < 5 |
| Демоксепам | 6,7 | < 5 |
| Деазепам | 16,1 | < 5 |
| Дезметилдиазепам | 12,7 | < 5 |
| Флуразепам | > 25 | 11,0 |
| Дезалкилфлуразепам | 10,8 | < 5 |
| Оксазепам | 9,8 | < 5 |
| Празепам | > 25 | 8,5 |
| Флунитразепам | 8,2 | < 5 |

Примечание. Система А: метанол – фосфатный буфер (58:42); система В: метанол – фосфатный буфер (73:37)

5.5. Противоопухолевые препараты

Антагонист фолиевой кислоты – метотрексат (МТК) (4-амино-4-дезокси- N^{10} -метилптероилбутамат) с последующим введением цитроворум-фактора в качестве биохимического антидота широко используется при химиотерапии многих видов рака у человека.

Из-за риска токсикации, присущего данному способу лечения, надлежащий уход за больным диктует необходимость контроля за концентрацией МТК в сыворотке, что позволяет выявить лиц с высокими потенциально-токсическими концентрациями МТК и (или) его пониженным выведением из организма. Хотя для анализа МТК в плазме предложено множество методов, включая ингибирование ферментов, связывание с белком, радиоиммунный анализ и флуориметрию, ни один из них не содержит стадий разделения продуктов, с помощью которых можно было бы выделить или количественно определить важный метаболит: 7-оксиметотрексат (7-ОН-МТК).

Уотсон и др. разработали ВЭЖХ–метод анализа на сильном ионообменнике, который позволяет проводить количественное определение МТК и (7-ОН-МТК) после приема МТК в высоких дозах.

Для анализа сыворотки больных, принимавших МТК как в обычных, так и в высоких дозах, применяли обращенно–фазовую ВЭЖХ. Колонка из нержавеющей стали (250×4,1 мм), заполненная RP-8 (размер частиц 10 или 7 мкм) в системе 0,1М фосфатный буфер (рН=6,8) – метанол (17:3) при скорости потока 1,5 мл/мин. Уф–детектор при 313 нм.

Для определения МТК в плазме человека в концентрациях до 0,01 мкг/мл применяли ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием. МТК стехиометрически окисляли до 2,4-диаминоптеридин-6-карбоновой кислоты – флуоресцирующего продукта, который отделяли от других флуоресцирующих компонентов плазмы на колонке с привитыми октадецильными группами. Использовали две системы растворителей: 0,1М Трис, рН которого доводили до 6,7 фосфорной кислотой, и 20%-ный метанол в 0,1М Трис-фосфатном буфере (рН=6,7). При длине волны возбуждения флуорометрического детектора 275 нм зависимость сигнала детектора от концентрации МТК была линейной в диапазоне от 0,01 до 19 мкг/мл.

Ни фолиевая кислота, ни цитроворум-фактор не мешали определению. В качестве внутреннего стандарта можно использовать N^4 -[2,4-диокси-(6-птеридил)метил]аминобензоилглутаминовую кислоту, поскольку ее можно окислить и экстрагировать из плазмы подобно МТК. Продолжительность анализа – 30 мин.

5.6. Поиск наркотиков в образцах мочи

С ростом нелегального употребления наркотиков скрининг в моче лекарственных веществ, принимаемых не по назначению, становится необходимым дополнением к программам по предотвращению их злоупотребления и лечению наркомании.

Доул и др. [76] в 1966 году предложили использовать ТСХ для обнаружения в моче наркотиков, хинина, барбитуратов, амфетаминов и некоторых транквилизаторов. Лекарственное вещество сначала адсорбировали на ионообменной бумаге и затем при контролируемом рН экстрагировали органическим растворителем. Аликвотную порцию экстракта концентрировали и анализировали с помощью ТСХ. Хотя результаты определения морфина, кодеина и хинина с помощью этого метода были удовлетворительными, он не был пригоден для определения таких препаратов, как метадон, фенобарбитал и амфетамины.

Позднее, в 70-х годах [77,78], методы анализа мочи на содержание этих компонентов были усовершенствованы. Методика включает предварительный спектро-фотометрический анализ для выявления образцов мочи, содержащих морфин и хинин, которые затем определяют ТСХ. В нее входит кислотный гидролиз составляющих лекарственного вещества с последующей экстракцией при низких рН для удаления веществ кислотного характера, таких как барбитураты, дифенилгидантоин, глутетимид и далее экстракция наркотиков, транквилизаторов и амфетаминов при рН=10-11. Обнаружение проводят путем опрыскивания реагентами. Для последующей положительной идентификации и подтверждения рекомендуют ГЖХ. Определение проводят в образце объемом 60 мл; методика разрабатывалась для проведения анализа 500 и более образцов в день.

В начале и середине 70-х годов было предложено несколько методик выделения лекарственного вещества и анализа его. Каиста [79] опубликовал также руководство по анализу мочи в рамках программ по предотвращению злоупотребления наркотиками и терапевтическому лечению с использованием нескольких препаратов.

В настоящее время хроматографические методы широко применяются для анализа биологических жидкостей с целью обнаружения в них лекарственных веществ.

В Приложении, в таблице 1, приведены данные по условиям разделения некоторых лекарственных веществ, в таблицах 2 и 3 – необходимые пояснения.

6. Применение хроматографии в биохимических исследованиях

Хроматография применяется не только в клинической медицине, криминалистике и биотехнологии, но и в исследованиях биохимических процессов, протекающих в живом организме. Так, хроматография явилась действенным инструментом в исследованиях, касающихся функций эритроцитов человека. Биохимики предположили, что эритроциты способны к выполнению эндокринной функции, продуцируя соединения, являющиеся продуктами деградации гемоглобина, и что они обеспечивают постоянный уровень секреции биоактивных пептидов. С биохимической точки зрения важным является знание образования пептидов в человеческой крови. Такие исследования были проведены с использованием жидкостной хроматографии [80].

Использовали колонку, заполненную силикагелем с привитыми октадецильными группами. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила и воды. Идентификацию пептидов проводили по удерживанию стандартных образцов.

Объектом исследования служила периферическая венозная кровь, взятая у здорового донора. Используя оригинальную методику, авторы [80] получили экстракты пептидов из свежей крови, а также из крови, хранившейся в течение 3, 5 и 7 дней, чтобы имитировать условия энергодифицита. Использовали режим градиентного элюирования, приведенный в таблице 16.

Таблица 16
Режим градиентного элюирования [80]

| Время, мин | 0,75% ТХУ в воде, об. % | Ацетонитрил, об. % |
|------------|-------------------------|--------------------|
| — | 100 | 0 |
| 5 | 90 | 10 |
| 10 | 50 | 50 |
| 15 | 0 | 100 |

Факторы удерживания, структура и биологические свойства пептидов, обнаруженных в экстрактах из свежей крови и из крови, хранившейся 3, 5 и 7 дней, приведены в таблице 17. В первом столбце указаны сроки хранения крови, из которой были получены экстракты.

**Факторы удерживания (k), структура и биологические свойства
идентифицированных пептидов [80]**

| Время инку- бации, дни | k | Структура пептида | Биологическая активность |
|---------------------------|------|---|---|
| 3 | 0,27 | <i>Thr-Ser-Leu-Tyr-Arg</i> | Фрагмент <i>альфа</i> - цепи гемоглоби- на человека |
| 5 | 0,26 | | |
| 7 | 0,26 | | |
| 3 | 0,71 | <i>Val-His-Leu-Thr-Arg-Glu-Glu-Lys-Ser- Ala-Val</i> | Фактор гормона роста человека |
| 5 | 0,71 | | |
| 7 | 0,72 | | |
| 3 | 1,21 | <i>Val-His-Leu-Thr-Pro-Gly-Glu-Lys-Ser- Ala-Val</i> | |
| 7 | 1,21 | | |
| Свежая кровь | 6,62 | <i>Ala-Leu-Trp-Gly-Lys-Val-Asn-Val</i> | Фрагмент <i>бета</i> - цепи гемоглобина человека |
| 3 | 6,62 | | |
| 7 | 6,63 | | |
| 3 | 1,68 | <i>Val-Val-Ala-Gly-Val-Ala-Asn-Ala- Leu-His-Arg-Arg-Tyr-His</i> | |
| 7 | 1,69 | | |
| Свежая кровь | 1,06 | <i>Val-Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Asp-Lys-Thr- Asn-Val</i> | Гемопозитическая активность |
| 3 | 1,05 | | |
| 5 | 1,05 | | |
| 7 | 1,05 | | |

На рисунках 23 и 24 приведены хроматограммы экстрактов пептидов из крови, хранившейся различные сроки.

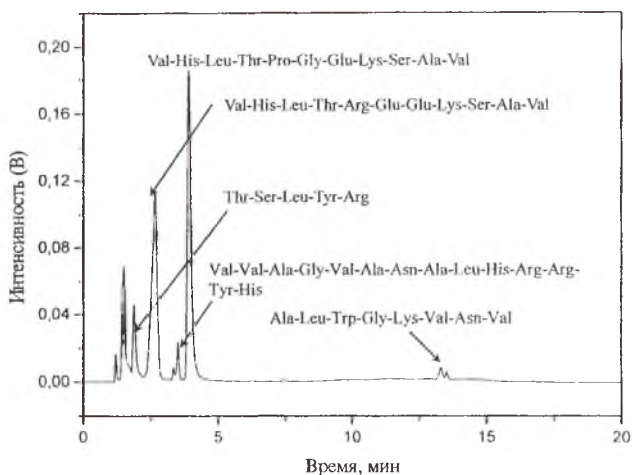


Рис. 23. Хроматограмма экстракта пептидов из крови, хранившейся 3 дня [80]

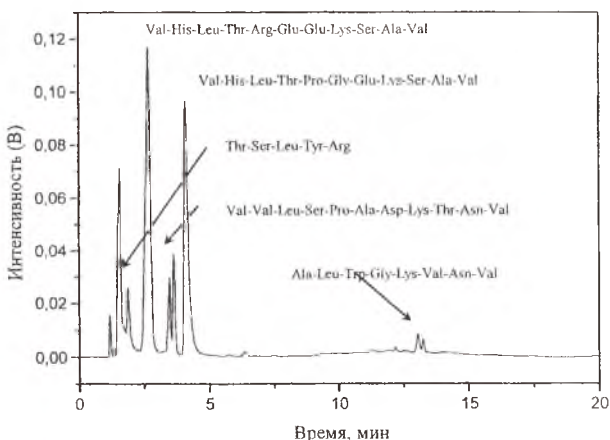


Рис. 24. Хроматограмма экстракта пептидов из крови, хранившейся 7 дней [80]

7. Взаимосвязь «биологическая активность – физико-химическое свойство»

Направленный синтез веществ, обладающих конкретным видом биологической активности – процесс трудоемкий и длительный, включающий различные этапы: от апробации вещества на различных стадиях синтеза до клинических испытаний. Поэтому важно *a priori* иметь представление о комплексе биологических свойств, которыми обладает или будет обладать синтезируемое соединение. Кроме того, выявление корреляционных зависимостей между молекулярными параметрами, физико-химическими характеристиками веществ и величинами их хроматографического удерживания – из наиболее перспективных подходов, позволяющих устанавливать связь между строением и свойствами веществ. Хроматографические исследования позволяют устанавливать связь между параметрами, характеризующими биологическую активность вещества, и величинами хроматографического удерживания [81-84].

Рассмотрим основные подходы, касающиеся нахождения связи «структура – свойство» на примере биологически активных веществ.

7.1. Выбор оптимальных физических и химических характеристик для определения вида биологической активности

Целостный организм, система M , состоит из N подсистем, связанных между собой. Поведение системы M под действием некоторого химического фактора X может быть охарактеризовано совокупным набором качественных и количественных параметров, определяющих свойства R биологической системы в целом: $(R_1 \dots R_i) = \bar{R}$.

В свою очередь, каждую из подсистем N можно охарактеризовать совокупностью параметров подсистем: $(r_1 \dots r_i) = \bar{r}$.

Если в результате действия вещества X , при некоторой его концентрации ΔC_x за время Δt инструментально регистрируется изменение одного или нескольких параметров \bar{R} (или \bar{r}), то вещество считается *биологически активным* (изменение \bar{R}) или *обладающим потенциальной биологической активностью*, если изменяется \bar{r} изолированных подсистем [85].

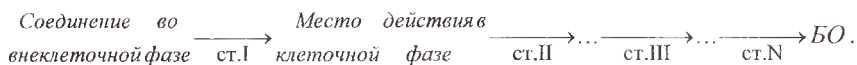
Современная концепция прогноза биологической активности свойств базируется на постулате: активность = f (структуры). Можно записать, что

$$\Delta BO = f(\Delta E_1 + \Delta E_2 + \dots + \Delta E_n), \quad (73)$$

где ΔBO – изменение в биологическом ответе (набор возмущений) организма на действие, $E_1 - E_n$ – физико-математические параметры соединения, вызывающего ΔBO .

Таким образом, при внесении изменений в структуру родоначального соединения изменение в биологическом ответе ΔBO , вызываемое структурными изменениями, может быть отнесено за счет изменений некоторых физико-химических параметров $E_1, E_2 \dots E_n$. Проблема состоит в том, чтобы найти соответствующие численные значения $E_1, E_2 \dots E_n$ из данных, полученных на модельных системах.

Следует иметь в виду, что тип и величина ΔBO определяется всем комплексом свойств химического соединения и его концентрацией. Во многом проявление BO в каком бы то ни было виде связано также со способностью химического соединения пройти путь от внешней среды до активного воспринимающего центра, связаться с ним и вызвать его реакцию. Весь этот путь химическое соединение проходит в соответствии с закономерностями, определяющими его физико-химические свойства. Этот процесс можно представить схематично:



Подходы к выявлению взаимосвязи «структура – свойство» отличаются, в основном, по методу выявления закономерностей и способу представления структуры. В зависимости от метода установления связи все подходы можно условно отнести к одной из трех категорий.

I. Подходы, основанные на статистических и статистико-эвристических методах:

- а) метод Хенча, метод Фри-Уилсона (регрессивные методы);
- б) методы теории распознавания образов, логико-структурный подход;
- в) методы математической логики.

II. Подходы, основанные на умозрительных заключениях, без применения вычислительной техники.

III. Подходы, реализующие теоретические представления – метод минимальных стерических топологических различий; метод моделирования межмолекулярных взаимодействий; использование данных, получаемых при квантово-химических расчетах.



7.2. Выбор характеристик для определения вида биологического ответа и его эффективности

Одним из первых сообщений на эту тему стала книга отечественного фармаколога Н.В. Лазарева «Неэлектролиты. Опыт биолого-физико-химической систематики» (1944 г.). В данной работе Лазаревым фактически сформулированы все основные положения современных концепций о роли физических и химических свойств химического соединения в их биологической активности (БА).

По Лазареву, основным критерием БА является коэффициент распределения вещества между водой и неводным растворителем, так называемый коэффициент Овертон-Мейера K_{OM} :

$$K_{OM} = \frac{C}{C_{H_2O}}, \quad (74)$$

где C – концентрация вещества в оливковом масле, C_{H_2O} – концентрация вещества в воде.

Лазарев пришел к следующим выводам:

- 1) сила специфического действия на биологические объекты увеличивается с увеличением растворимости в неводной фазе;
- 2) для создания системы, связывающей БА и физико-химические свойства вещества, нужно учитывать сочетание физико-химических свойств, в первую очередь тех, которые связаны с молекулярными и межмолекулярными характеристиками.

Почти одновременно с работами Лазарева появились публикации, в которых степень ионизации химического соединения связывалась с его БА. Заметной работой, развивающей основные идеи Лазарева, явилась книга А.А. Голубева (1973 г.), в которой токсические свойства 218 органических соединений корреляционно связывались с 38 физическими и химическими показателями, например с энтропией S .

Наибольшее число корреляционных отношений установлено между физическими показателями и теми видами активности, которые по природе своей интегративны, то есть конечный эффект может быть достигнут путем влияния на самые различные подсистемы r организма, клетки или этапы многоступенчатого биологического процесса.

7.3. Метод Хенча

В этом методе в качестве независимых переменных используются некоторые физико-химические свойства соединений. Исходя из предположения, что эффективность любого БА вещества определяется его исходной концентрацией, скоростью его проникновения к месту взаимодействия и способностью взаимодействовать с активным центром, Хенч вывел классическое уравнение [86]:

$$\lg 1/c = a_0 + a_1\pi + a_2\pi^2 + a_3\tau + a_4E_{st}, \quad (75)$$

где c – исходная концентрация вещества, a_i – коэффициент в уравнении регрессии, π – сравнительная константа заместителя, τ – электронная константа заместителя, E_{st} – стерический параметр Тафта.

Для ряда соединений вида $R_i, R_j \dots R_n$ из теории реакционной способности Гаммета–Тафта следует, что ΔG пропорциональна электронному эффекту τ и стерическому эффекту E_{st} .

По этой теории взаимодействие вещества D с активным центром S идет в 2 стадии:

1) $D + S \xrightleftharpoons{k_1} DS$ – обратимое образование комплекса DS , k_1 – константа равновесия;

2) $DS \xrightarrow{k_2} Q$ – необратимое превращение комплекса DS в продукт Q ; k_2 – константа равновесия.

Скорость образования продуктов:

$$\frac{d[Q]}{dt} = k_2[DS], \quad (76)$$

а для константы равновесия реакции образования комплекса:

$$k_1 = \frac{[DS]}{[D][S]} = e^{\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right)}, \quad (77)$$

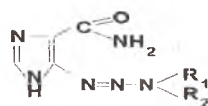
где ΔG – энергия Гиббса образования комплекса.

Выразив из (77) $[DS]$ и подставив в (76), получим:

$$\frac{d[Q]}{dt} = k_2[D][S]e^{\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right)}. \quad (78)$$

На практике, в качестве электронных параметров применяют потенциалы ионизации, сродство к электрону, дипольный момент, различные квантово-химические индексы. Для расчета стерических влияний используют молекулярные объемы, ван-дер-ваальсовы радиусы.

Так, Хенч рассмотрел активность имидазолкарбоксамидов,



где R_1, R_2 – алкильные группы.

Для 10 молекул было получено уравнение:

$$\log(1/c) = -0,280 \log^2 \pi + 0,539 \log \pi - 0,168 E_{st} + 3,430.$$

Коэффициент корреляции $r = 0,969$, стандартное отклонение $S = 0,104$.

В общем случае при выявлении корреляций на основе физико-химических свойств можно их выражать различными способами в зависимости от принятой модели и имеющихся данных. Можно использовать как экспериментальные, так и расчетные характеристики. Из факторов, отражающих гидрофобные и распределительные свойства, можно отметить:

- логарифм коэффициента распределения и связанные с ним величины: параметр липофильности, фактор удерживания;
- величины, связанные с размером и упаковкой молекул, молекулярной массой – все они могут быть успешно определены с помощью хроматографических методов.

Электронные факторы выражаются через данные квантово-химических расчетов и с помощью оценки различных видов межмолекулярных взаимодействий. Последние можно изучать с помощью хроматографических методов.

7.4. Метод Фри–Уилсона

Согласно методу, предполагается, что о механизме действия БА вещества ничего не известно. Общая БА определяется как функция суммы долей индивидуальной активности каждой из составляющих. МАД основана на предположении о независимости и аддитивности вкладов заместителей для ряда соединений Y_1, Y_2, \dots, Y_n , структура которых описывается основным фрагментом и переменными заместителями x_1, x_2, \dots, x_n . Вклад основы молекулы при этом постулируется постоянным. Зависимость БА от структуры выражается линейным уравнением регрессии [87]:

$$BA = a_0 + \sum a_i x_i, \quad (79)$$

где $a_0 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i$ – вклад основы молекулы, или базовая активность ряда, представляющая собой среднюю активность структуры рассматриваемого ряда соединений; a_i – вклады заместителей в суммарную активность; x_j –

независимые переменные, которые в отсутствии или присутствии i -го заместителя принимают значения = 0 или 1.

Так, в ряду ацетиленовых карбаматов, согласно методу Фри–Уилсона, наблюдается статистически значимая корреляция ($r = 0,800$).

Простая модель Фри–Уилсона не потеряла своей привлекательности до настоящего времени, более того, применение современных математических методов и способов обработки информации делает ее мощным инструментом в анализе связи структура – активность QSAR (Quantitative Structure – Activity Relationship). В начале QSAR был попыткой найти корреляцию между структурой и свойством на основе каких-либо локальных характеристик веществ. Сейчас – QSAR – некое компьютерное правило, описывающее через дескрипторы любое свойство молекулы.

Дескриптор – число или набор чисел, которые характеризуют структуру соединения, то есть это число, которое можно рассчитать исходя их структурной формулы (молекулярная масса, число каких-либо атомов, связей, групп, заряды на атомах).

QSAR – это уравнение, отражающее функциональную зависимость одного набора цифр (свойств) от другого набора цифр (переменных или дескрипторов).

7.5. Индекс связности Рандича

Среди дескрипторов большую роль играют топологические индексы – некоторые числовые характеристики структуры, получаемые чисто расчетным путем. Очень популярным является индекс связности (дескриптор связности) Рандича X [88], который рассчитывается непосредственно из матрицы связей. Чтобы его рассчитать, необходимо нарисовать молекулярный граф – структурную формулу химического соединения без атомов водорода. Атомы углерода обозначают точками – «вершины» графа, а связи, выходящие из вершин, – «ребра» графа.


Затем ребра графа нумеруют в произвольном порядке и для каждой вершины рассчитывают число выходящих из нее ребер.

Индекс Рандича вычисляют по формуле:

$$X = \sum \frac{1}{\sqrt{v_i v_j}}, \quad (80)$$

где суммирование проводят по всем связям молекулы, учитывая тип связи, прибавляя единицу на каждую π -связь; индексы i, j – относятся к номерам атомов.

X часто коррелирует с $T_{\text{кип}}$, $T_{\text{пл}}$, индексами удерживания и факторами удерживания.

Пример расчета индекса Рандича для имидазола  :



В таблице 18 приведены необходимые параметры для расчета индекса связности имидазола.

Таблица 18

Параметры, необходимые для расчета индекса связности имидазола по уравнению (80)

| № вершины | Кол-во связей, выходящих из вершины | Кол-во связей с учетом типа хим. связи | Вершины, между которыми связь | $(v_i v_j)$ | $\sqrt{v_i v_j}$ | X |
|-----------|-------------------------------------|--|-------------------------------|-----------------|------------------|---|
| 1 | 2 | $2 + 1 = 3$ | 1 - 2 | $3 \cdot 3 = 9$ | $\sqrt{9} = 3$ | $\frac{1}{3} + \frac{1}{3} + \frac{1}{3} +$ $+\frac{1}{\sqrt{6}} + \frac{1}{\sqrt{6}} =$ $= 1 + \frac{2}{\sqrt{6}}$ |
| 2 | 2 | $2 + 1 = 3$ | 2 - 3 | $3 \cdot 3 = 9$ | $\sqrt{9} = 3$ | |
| 3 | 2 | $2 + 1 = 3$ | 3 - 4 | $3 \cdot 3 = 9$ | $\sqrt{9} = 3$ | |
| 4 | 2 | $2 + 1 = 3$ | 4 - 5 | $3 \cdot 3 = 9$ | $\sqrt{6}$ | |
| 5 | 2 | $2 + 0 = 2$ | 5 - 1 | $3 \cdot 2 = 6$ | $\sqrt{6}$ | |

С помощью QSAR-уравнений можно проводить структурное конструирование неизвестных соединений с заданными биологически активными свойствами, а также прогнозировать наличие того или иного вида БА.

Библиографический список

1. Хроматография в биологии и медицине: Сб. научн. трудов / Под ред. Р.Т. Тогузова, М.И. Савиной. М.: 2-й МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова, 1985. 158 с.
2. Зеленин К.Н. Газовая хроматография в медицине // Соросовский образовательный журнал. 1996. № 11. С.20.
3. Митрука Б.М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине / Пер. с англ. М.: Медицина, 1978. 600 с.
4. Abel K., Schmmertzing H.S., Peterson J.I. // J. Bacteriol. 1963. V.85. P.1039.
5. Хроматография: Практическое приложение метода / Пер. с англ.; Под ред. Э. Хефтмана. М.: Мир, 1986. 336 с.
6. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография: Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии. Рига: Зинатне, 1988. 390 с.
7. Snyder L.R. Principles of adsorption chromatography. New York: Dekker. 1968. 413 p.
8. Jandera P., Churacek J. Gradient elution in liquid chromatography. XI. Influence of the adjustable gradient parameters on the chromatographic behaviour of sample compounds // J. Chromatogr. 1980. Vol. 192. № 1. P. 1-18.
9. Jandera P., Churacek J., Colin H. Gradient elution in liquid chromatography. XIV. Theory of ternary gradient in RPLC // J. Chromatogr. 1981. Vol.214. №1. P.35-46.
10. Schoenmakers P.J., Billiet H.A., de Galan L. Influence of organic modifiers on the retention behaviour in reversed-phase liquid chromatography and its consequences for gradient elution // J. Chromatogr. 1979. Vol.185. №1. P.179-195.
11. Schoenmakers P.J., Billiet H.A., de Galan L. Use of gradient elution for rapid selection of isocratic conditions in reversed-phase HPLC // J. Chromatogr. 1981. Vol.205. №1. P.13-30.
12. Borowko M., Jaroniec M., Narkiewicz J., Patrykiewicz A. Gradient optimization in elution liquid chromatography. II Theory of multi-step elution with a mobile phase of constant composition in each step // J. Chromatogr. 1978. Vol.153. №2. P.321-328.
13. Borowko M., Jaroniec M., Narkiewicz J., Patrykiewicz A. Gradient optimization in elution liquid chromatography. I. Theoretical considerations connected with evaluation of the concentration – time function for step-wise elution // J. Chromatogr. 1978. Vol.153. №2. P.309-319.
14. Dolan J.W., Gant J.R., Snyder L.R. Gradient elution in HPLC. II. Practical applications to RP systems // J. Chromatogr. 1979. Vol.165. №1. P.31-58.
15. Howard G.A., Martin A.J.P. The separation of the C₁₂-C₁₈ fatty acids by reversed-phase partition chromatography // Biochem. J. 1950. Vol.46. №5. P.532-538.

16. Horvath Cs., Melander W. Liquid chromatography with hydrocarbonaceous bonded phases; theory and practice of reversed-phase chromatography // *J. Chromatogr. Sci.* 1977. Vol.15. №9. P.393-404.
17. Horvath Cs., Melander W., Molnar J. Solvophobic interactions in liquid chromatography in nonpolar stationary phases // *J. Chromatogr.* 1976. Vol.125. №1. P.129-156.
18. Horvath Cs., Melander W., Molnar J. Liquid chromatography of ionogenic substances with nonpolar stationary phases // *Anal. Chem.* 1977. Vol.49. №1. P.142-154.
19. Chen B.K., Horvath Cs. Evaluation of substituent contributions to chromatographic retention: quantitative structure-retention relationships // *J. Chromatogr.* 1979. Vol.171. №1. P.15-28.
20. Assenza S.P., Broun P.R. Quantitative structure-retention relationships for purine compounds on reversed phase packings // *J. Chromatogr.* 1983. Vol.282. №1. P.477-486.
21. Rekker R.F. The hydrophobic fragmental constant. Amsterdam etc.: Elsevier. 1977. 350p.
22. Григорьева В.Д., Шатц В.Д., Бривкалие Л.А., Чипенс Г.И. Высокоэффективная жидкостная хроматография пептидных биорегуляторов, их фрагментов и производных. I хроматографическое поведение фрагментов кортикотропина на сорбенте Zorbax ODS // *Биоорган. химия.* 1981. Т.9. №7. С.869-877.
23. Colin H., Guiochon G. Selectivity for homologous series in reversed-phase liquid chromatography. I. Theory // *J. Chromatogr. Sci.* 1980. Vol.18. №2. P.54-63.
24. Jinno K., Kawasaki K. The correlation between molecular polarizability of PAHs and their retention data on various stationary phases in reversed-phase HPLC // *Chromatographia.* 1984. Vol.18. №2. P.103-105.
25. Киселев А.В., Яшин Я.И. Адсорбционная газовая и жидкостная хроматография. М.: Химия, 1979. 288с.
26. Snyder L.R., Kirkland J.J. Introduction of modern liquid chromatography. New York: Wiley Interscience. 1979. 863 p.
27. Snyder L.R., Poppe H. Mechanism of solute retention in liquid-solid chromatography and the role of the mobile phase in affecting separation. Competition versus "sorption" // *J. Chromatogr.* 1980. V.184. №4. P.363-413.
28. Snyder L.R., Glajch J.L., Kirkland J.J. Theoretical basis for systematic optimization of mobile-phase selectivity in liquid-solid chromatography. Solvent-solute localization effects // *J. Chromatogr.* 1981. V.218. № 1. P.299-326.
29. Snyder L.R., Glajch J.L. Solvent strength of multicomponent mobile-phases in liquid-solid chromatography. Further study of different mobile phases and silica as adsorbent // *J. Chromatogr.* 1982. V.248. № 2. P.165-182.
30. Snyder L.R. Mobile phase effects in liquid-solid chromatography. Importance of adsorption-site geometry, adsorbate delocalization and hydrogen bonding // *J. Chromatogr.* 1983. V.255. № 1. P.3-26.

31. Snyder L.R., Quany M.A., Glajch J.L. Solvent-Strength Selectivity in Reversed-Phase HPLC. // *Chromatographia*. 1987. V. 24. P.33-44.
32. Soczewinski E. Solvent composition effects in thin-layer chromatography systems of the type silica gel-electron donor solvent // *Anal. Chem.* 1969. V.41. №1. P.179-182.
33. Soczewinski E., Golkiewicz W. Simple molecular model for adsorption chromatography. YH. Relationship between the type (cyclohexane + polar solvent) / silica // *Chromatographia*. 1973. V.6. № 6. P.269-272.
34. Сахартова О.В., Шатц В.Д. Выбор условий элюирования в обращенно-фазовой хроматографии. Приближенная априорная оценка удерживания полифункциональных кислородсодержащих соединений // *Журн. аналит. химии*. 1984. Т. 39. № 8. С.1496-1503.
35. Ланин С.Н., Леденкова М.Ю., Никитин Ю.С. Закономерности удерживания производных бензола на аминопропильной фазе в высокоэффективной жидкостной хроматографии // *ИЗВ. АН. Сер. хим.* 1997. № 5. С.987-991.
36. Бэ Ен Ил, Ланин С.Н., Никитин Ю.С. Удерживание ароматических углеводородов на силикагеле, модифицированном цианодецильными группами // *Журн. физ. химии*. 1997. Т.21. № 4. С.713-717.
37. Эльтеков Ю.А. Зависимость коэффициента емкости от состава бинарного элюента // *Журн. физ. химии*. 1991. Т 65. № 9. С.2573-2575.
38. Эльтекова Н.А., Эльтеков Ю.А. Коэффициенты распределения бензола, дифенила и 4,4'-дипиридила между подвижной водно-ацетонитрильной и неподвижными нитрильной и углеродной фазами // *Журн. физ. химии*. 2002. Т.76. № 5. С.915-920.
39. Эльтекова Н.А., Эльтеков Ю.А. Зависимость удерживания пуриновых оснований модифицированными кремнеземами от состава бинарного элюента // *Журн. физ. химии*. 2000. Т.74. № 8. С.1468-1473.
40. Киселев А.В. Межмолекулярные взаимодействия в адсорбции и хроматографии. М.: Высшая школа, 1986. С.306-324.
41. Шай Г., Надь Л.Д. Адсорбция из бинарных растворов неэлектролитов на поверхности раздела твердое тело-жидкость и жидкость-пар // *Физическая адсорбция из многокомпонентных фаз*. М.: Наука, 1972. С.96-104.
42. Осцик Я.Я. Некоторые проблемы термодинамики адсорбции из многокомпонентных растворов // *Физическая адсорбция из многокомпонентных фаз*. М.: Наука, 1972. С.138-147.
43. Boehm R.E., Martire D.E. A unified theory of retention and selectivity in liquid chromatography. 1. Liquid-solid (adsorption) chromatography // *J. Phys. Chem.* 1980. V.84. № 26. P.3620-3630.
44. Ларионов О.Г., Курбанбеков Э. К вопросу об уравнении изотермы адсорбции из растворов // *Физическая адсорбция из многокомпонентных фаз*. М.: Наука, 1972. С.85-95.

45. Scott R.P.W. The role of molecular interactions in chromatography // *J. Chromatogr.* 1976. V.122. № 1. P.35-53.
46. Scott R.P.W. The silica gel surface and its interactions with solvent and solute in liquid chromatography // *J. Chromatogr. Sci.* 1980. V.18. № 7. P.297-306.
47. Scott R.P.W., Kucera P. Solute interactions with the mobile and stationary phases in liquid-solid chromatography // *J. Chromatogr.* 1975. V.112. № 1. P.425-442.
48. Scott R.P.W., Kucera P. Examination of five commercially available liquid chromatographic reversed phases (including the nature of the solute-solvent-stationary phase interactions associated with them) // *J. Chromatogr.* 1977. V.142. № 1. P.213-232.
49. Scott R.P.W., Kucera P. Solute-solvent interactions on the surface of silica gel // *J. Chromatogr.* 1978. V.149. № 1. P.93-110.
50. Scott R.P.W., Kucera P. Solute-solvent interactions on the surface of silica gel, II // *J. Chromatogr.* 1979. V.171. № 1. P.37-48.
51. Slaats E.H., Kraak J.C., Brugman W.J.T., Poppe H. Study of the influence of competition and solvent interaction on retention in liquid-liquid chromatography by measurement of activity coefficients in the mobile phase // *J. Chromatogr.* 1978. V.149. № 1. P.255-270.
52. Лапин С.Н., Ланина Н.А., Никитин Ю.С. Влияние ассоциации молекул сорбента и модификатора в подвижной фазе на удерживание в высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Журн. физ. химии.* 1995. Т.69. № 11. С. 2045-2051.
53. Ланин С.Н., Никитин Ю.С. Прогнозирование удерживания в ВЗЖХ. Вытеснительная модель // *Журн. аналит. химии.* 1991. Т.46. № 8. С.1493-1502.
54. Лапин С.Н., Никитин Ю.С. Прогнозирование удерживания в высокоэффективной жидкостной хроматографии. Межмолекулярные взаимодействия в подвижной фазе // *Журн. аналит. химии.* 1991. Т.46. № 10. С.1971-1980.
55. Ланин С.Н., Лятонина З.М., Никитин Ю.С., Шония Н.К. Влияние ассоциации молекул модификатора в подвижной фазе на удерживание в высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Журн. физ. химии.* 1993. Т.67. № 1. С.146-150.
56. Lanin S.N., Ledenkova M.Yu., Nikitin Yu.S. Influence of the concentration of adsorbate and modifier in the mobile phase on retention in high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr.* 1998. V.797. P.3-9.
57. Ageev A.N., Kiselev A.V., Yashin Y.I. Regularities in the Retention of Isomeric Aromatic Hydrocarbons in Liquid Chromatography. Part. 1. Analysis of Polymethyl- and Monoalkylbenzenes and Polynuclear Aromatic Hydrocarbons on Hydroxylated Silica Gel // *Chromatographia.* 1980. V. 13. P. 669-673.
58. Sinanoglu O. Molecular associations in biologie. New York: Acad. Press, 1968. P.427-445.

59. Sinanoglu, O., Abdulnur S. Effect of water and other solvents on the structure of biopolymers // Fed. Proc. 1965. V.24. № 22. P.12-23.
60. Horvath Cs., Melander W., Molnar J. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases // J. Chromatogr. 1976. V.125. № 21. P.129-156.
61. Horvath Cs., Melander W. Liquid chromatography with hydrocarbonaceous bonded phases; theory and practice of reversed-phase chromatography // J. Chromatogr. Sci. 1977. V.15. № 29. P.393-404.
62. Horvath Cs., Melander W., Molnar J. Liquid chromatography of ionogenic substances with nonpolar stationary phases // Anal. Chem. 1977. V.49. № 21. P.142-154.
63. Геккелер К., Экштайн Х. Аналитические и препаративные лабораторные методы. М.: Химия, 1994. 410 с.
64. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрирование: Практическое пособие. М.: Наука, 1981. 288 с.
65. Siegel L.M., Monty K.J. // Biochem. et biophys. acta. 1966. V. 112. P. 346-362.
66. Халпап Х., Рипфан Ж. Высокоэффективная тонкослойная хроматография / Ред. А. Златкис, Р. Кайзер; Пер. с англ. М.: Мир, 1979. С. 113.
67. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии: В 2 томах / Пер. с англ.; Под ред. В.Г. Березкина. М., 1999.
68. Белецкий Б.Г., Вольнец М.П., Ганкина Э.С. // ЖВХО им. Д.И. Менделеева. 1983. Т. 28. № 1. С. 30.
69. Riedel K.D., Laufen H. // J.Chromatogr. (Biomed. Appl.). 1983. V.276. P.243.
70. Davis C.M., Fenimor D.C. // J.Chromatogr. 1983. V.272. P.157
71. Clark G.R., Chan J. // Anal. Chem. 1978. V.50. P.635.
72. Kabra P.M., Staford B.E., Morton L.J // J. Clin. Chem. 1977. V.23. P.1284.
73. Tjaden U.R., Meeles M.T., Thys C.P., van der Kaay M. // J. Chromatogr. 1980. V.181. P.227.
74. Kabra P.M., Stevens G.L., Morton L.J // J. Chromatogr. 1978. V.150. P.355.
75. Cotler S., Publisi C.V., Gustajson J.H. // J. Chromatogr. 1981. V.222. P.95.
76. Dole V.P., Kim W., Eglitis I. // J. Amer. Med. Ass. 1966. V. 198. P.349.
77. Mulè S.I. // J. Chromatogr. 1971. V.55. P.255.
78. Mulè S.I., Bastos M.L., Jukofsky D., Saffer E. // J. Chromatogr. 1972. V.63. P.289.
79. Kaistha K.K. // J. Chromatogr. 1977. V.141. P.145.
80. Полякова Ю.Л., Роу К.Х. // Журн. приклад. химии. 2003 (в печати).
81. Полякова Ю.Л., Буланова А.В., Егорова К.В., Ларионов О.Г., Пурыгин П.П. Связь энергетических характеристик и индекса Рандича имидазола и некоторых азолидов сульфокислот // Изв. Акад. наук. Серия химическая. 2000. № 8. С.1401-1404.

82. Полякова Ю.Л., Буланова А.В., Вартапетян Р.Ш. Исследования гидролиза некоторых производных имидазола, бензимидазола и 1,2,3-бензотриазола по данным ВЭЖХ и ЯМР – диффузометрии // Изв. Акад. наук. Серия химическая. 2001. № 5. С.784-786.

83. Буланова А.В., Егорова К.В., Полякова Ю.Л., Пурыгин П.П., Зарубин Ю.П. Связь “биологическая активность – физико-химическое свойство” имидазолидов и триазолидов сульфокислот // Вестник СамГУ. Спец. выпуск. 2002. С. 124-131.

84. Григорьева О.Б., Курбатова С.В., Земцова М.Н., Ларионов О.Г. Влияние строения замещенных цинхониновых кислот на их удержание в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ // ЖФХ. 2002. Т. 76. № 5. С. 927-931.

85. Нижний С.В., Дмитриева Н.В. Скрининг физиологически активных соединений. М.: Медицина, 1985. 160 с.

86. Хенч К. // Хим.-фарм. журн. 1980. № 10. С. 15.

87. Free S.M., Wilson J.W. // J. Med. Chem. 1964. P. 395.

88. Randic M. // J. Amer. Chem. Soc. 1977. V. 66. P. 928.

Приложение

Таблица 1

ВЭЖХ лекарственных веществ

| Вещество | Н | Сорбент | Подвижная фаза | Детектор | Литература |
|----------------------------|------|----------|---|----------------|---------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Амидопирин | 6,1 | SH-RSPAK | 0,035M НГФ/0,3M КДФ+AM=65+35 | УФ-220 | АА, 312 |
| Аминазин (хлорпромазин) | 6,1 | M-CN-10 | ГК+МХ+АН+ПА=50+50+25+0,1 | УФ-254 | JCHR,1984,309,2,329 |
| | 12,3 | L-CN | 0,2M АА/рН6,99+AM=1+9 | Э,УФ-254 | JCHR,1982,231,2,361 |
| | 12,3 | N-C18 | ИР+ГФ+АН+0,1M АБ/рН3,5=0,1+1+68,9+30 | Э | JCHR,1982,227,1,103 |
| Ампициллин | 8,0 | N-5C18 | 0,05M ФБ/рН7,0+AM=75+25 | УФ,7 | АА,286 |
| | 8,0 | N-5C18 | ME+B=3+2 | Ф- 345/420 | JCHR,1983,276,1,478 |
| | 8,0 | ODS | 0,001M НГФ/0,001M НДФ+ME=2+1 | УФ-290 (пр) | ANCH,1985,57,8,1568 |
| | 8,0 | Z-C8 | ФБ/рН7,0+ME=75+25 | УФ-254 | JCHR,1982,244,2,299 |
| Анестезин | 3,3 | B-C18 | 0,03M ЭД | УФ-215 | JCSC,1983,21,4,145 |
| | | | ТА/1%УК+AM+ME=8+1+1 | 7 | JCHR,1982,245,3,355 |
| L-аскорбиновая кислота | -3,8 | RP-C-18 | 0,04 АБ/0,001M ДА+ME=85+15 | | |
| Аскорбиновая кислота | -3,8 | V-NS 201 | ГР 6-100%Б за 30 мин.; А=0,1M НА/рН 4,4; Б=ME+АН+В-10+40+50 | УФ-200 | АА,289 |
| Атропин | 10,1 | SF-S5W | ХК+ME+ГК=0,1+85+15 | УФ-215 | JCHR,1982,247,1,15 |
| Ацетилкодеин | 11,0 | L-RP2 | 0,1M НТА/рН 4,3+ME=6+4 | УФ,Э | JCSC,1983,21,4,145 |
| Ацетилморфин | 10,0 | L-RP2 | 0,1M НТА/рН 4,3+ME=6+4 | УФ,Э | JCSC,1983,21,4,145 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-------------------------------|------|--------------|----------------------------|----------|----------------------|
| Ацетилсалициловая кислота | 3,3 | EC-C18 | ME+B+YR=38+61+1 | УФ,Э | AA,275 |
| | 3,3 | RS/L-C18H4 | 0,05M AГФ/pH 5,0+ME=5+5 | УФ,Э | AA,277 |
| Барбитал (барбитон) (веронал) | 1,1 | FS-HS-C18 | ME+B+51+49 | УФ-210 | AA,269 |
| | 1,1 | H-OДС | 0,1M HДФ/pH 3,5+ME=6+4 | УФ-216 | JCHR,1981,204,1,275 |
| Бромгексин | 1,1 | N-10C18 | B+ME=45+55 | УФ-216 | AA,286 |
| | 10,3 | B-C18 | 0,005M HДС+ME+YK=25+75+0,1 | УФ-245 | JCHR,1982,249,2,1373 |
| Бутадиион (фенилбутадиион) | 13,3 | M-CN10 | ГК+MX+AH+ПА=50+50+25+0,1 | УФ-254 | JCHR,1984,30,92,329 |
| | -3,9 | SH-RS PAK | 0,55M HГФ/0,045M КДФ | УФ-254 | AA,312 |
| Витамин К1 | 25,3 | RSIL | MX | УФ-254 | AA,278 |
| Глазолин (ксийометазолин) | 10,4 | SF-S5W | 0,01M AПХ/0,0001M HГ/ME | УФ,Э | JCHR,1985,323,1,191 |
| | 11,0 | L-RP2 | 0,1M HТА/pH4,3+ME=6+4 | УФ-330 | JCSC,1983,21,4,145 |
| Гидрокортизон (кортизол) | 12,1 | A-C18 | ME+B=70+30 | УФ-330 | AA,271 |
| | 12,1 | B-C18 | ME+B=45+55 | УФ-254 | JCHR,1982,227,1,11 |
| 11-Дезоксириптагландин Е1 | 13,1 | Z-OДС | 0,2% ФК+AH=65+35 | P,УФ-210 | [Шапц] |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----------------------------------|------|---------|----------------------------|--------|----------------------|
| Дигидрокодеин | 10,0 | SF-A10X | 0,01M TMAГ/ЛК/рН6+АН=25+75 | Э | CHRA, 1983,17,7,394 |
| Дигидроморфин | 9,0 | SEA10X | 0,01M TMAГ/ЛК/рН6+АН=25+75 | Э | CHRA, 1982,17,7,394 |
| Димедол (дифенгидрамин) | 11,3 | SF-S5W | 0,01M AПX/0,0001M HГ/ME | УФ, Э | JCHR, 1985,323,1,191 |
| Ибупрофен | 9,0 | RP-C18 | АН+В+МЕ+ФК=58+37+5+0,05 | УФ-196 | JCHR, 1985,344,1,408 |
| Камфора | 6,0 | Z-CN | ГП | Р | СВМ,229 |
| Каротин | 40,0 | U-ODS | МЕ+ХЛ=10+3 | УФ-465 | LC-84, N168 |
| Клофелин (клодеин) | 4,1 | S-ODS | 0,02M КДФ+АН=37,5+62,5 | УФ-210 | JCHR/1982,231,1,210 |
| Кодеин | 10,0 | B-C18 | ФБ/рН 2,35+МЕ=93+7 | УФ-214 | JCHR, 1985,348,253 |
| Кокаин | 10,1 | V-C18 | 0,25M КДФ/рН 2,7+АН=83+17 | УФ-254 | AA,281 |
| | 10,1 | SF-S5W | 0,01M AПX/0,0001 HГ/ME | УФ, Э | JCHR, 1985,323,1,191 |
| Кофеин | 0,0 | N-50-5 | ЭТ+В+МХ=47+17+360 | УФ | AA,286 |
| Левомецитин (хлорамфеникол) | 5,0 | V-C18 | МЕ+В=60+60 | УФ | AA,281 |
| Менахионы (витамины группы К2) | | Z-ODS | МХ+МЕ=30+70 | УФ-250 | JCHR, 1981,206,2,233 |
| Ментол | 6,0 | Z-SI4 | ГП, ИПС=99+1 | Р | СВМ,229 |
| Метадон | 15,3 | SF-S5W | 0,01M AПX/0,0001M HГ/ME | УФ, Э | JCHR, 1985,323,1,191 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------------------|------|----------------|--------------------------------|--------|----------------------|
| Метиламфетамин | 6,0 | SF-S5W | XK+ME+ГК=0,02+85+15 | УФ-215 | JCHR,1982,247,1,15 |
| Метилтестостерон | 14,3 | S-OIS | АН+ГТФ+В=33,5+16,5+50 | УФ-280 | JCSC,1980,18,1,1,631 |
| Метилфенобарбитон | 6,1 | H-OIS | 0,1М НДФ/РН 3,5+ME=6+4 | УФ-216 | JCHR,1981,204,1,275 |
| Морфин | 9,0 | AS-HS-C18 | 0,02М КДФ/РН 3+АН=76+24 | УФ, Э | AA,269 |
| | 9,0 | B-C18 | ME+В+AX=50+50+0,1 | Э | JCHR,1983,276,1,202 |
| Нафтизин (нафазолин) | 8,3 | SF-S5W | 0,01М АПХ/0,0001М НГ/ME | УФ, Э | JCHR,1985,323,1,191 |
| Никотиновая кислота (ниацин) | 0,3 | RP | 0,15М АБ/рН5/0,01М ГСН+ME=91+9 | УФ-254 | JCHR,1982,232,2,261 |
| Новокаин (прокаин) | 6,1 | B-C18 | 0,3М Э ДТА/1% УК+AM+ME=8+1+1 | УФ | JCSC,1983,21,4,145 |
| Нозепам (оказепам) | 6,1 | SF-S5W | 0,0М АПХ/0,0001М НГ/ME | УФ, Э | JCHR,1985,323,1,141 |
| | 9,1 | N-C18 | 0,12% ПСК/рН3+AM=62+38 | УФ-220 | JCHR,1984,306,1,279 |
| Оксациллин | 9,1 | N-5C18 | 0,05 ФБ/рН7+AM=75+25 | УФ | AA,286 |
| Окситетрациклин | 9,4 | SU-LC18- ДВ | ТТФ+AM+0,005М НГФ/рН2=9+9+82 | УФ-254 | SU 24,132 |
| Папаверин | 11,1 | B-C18 | Гр 3-57%Б за 15мин | УФ-254 | CHRA,1985,20,5,289 |
| Парацетамол (ацетаминофен) | 2,3 | B-C18 | ФБ+ME=93+7 | УФ-214 | JCHR,1985,348,253 |
| Пирокарпиновая кислота | | B-C18 | 5% КДФ/рН2,5 | УФ-215 | JCHR,1981,212,3,331 |

Продолжение табл. 1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|------|---------|--|--------|----------------------|
| Пирацетам | 0,3 | L-RP18 | ME | УФ-206 | JCHR, 1982,232,1,203 |
| Преднизолон | 12,1 | PS-SIL | ЭТ+МХ+УК=30+500+1 | УФ-254 | JCHR, 1982,232,2,406 |
| Пробенид | 7,3 | B-C18 | АН+В=24+76 | УФ-280 | JCHR, 1986,374,1,191 |
| Промедол (тримениридин) | 11,3 | SF-S5W | 0,01M АПХ/0,0001M НГ/МЕ | УФ, Э | JCHR, 1985,323,1,191 |
| Простагландин А ₂ | 13,1 | SU-LC18 | АН+0,0174M ФК/рН2,5=32,8+67,2 | УФ-196 | SU24,134 |
| Е ₃ | 12,0 | SU-LC18 | АН+0,0174M ФК/рН2,5=32,8+67,2 | УФ-196 | SU24,134 |
| F ₂ | 12,0 | SU-LC18 | АН+0,0174M ФК/рН2,5=32,8+67,2 | УФ-196 | SU24,134 |
| Д ₂ | 14,0 | SU-LC18 | АН+0,0174M ФК/рН2,5=32,8+67,2 | УФ-196 | SU24,134 |
| В ₂ | 13,1 | SU-LC18 | АН+0,0174M ФК/рН2,5=32,8+67,2 | УФ-196 | SU24,134 |
| Простаглин (простагландин I ₂) | 12,0 | PRP-1 | АН+0,01M НГ/рН12,3=21+79 | УФ-206 | JCHR, 1983,277,1,287 |
| Рибофлавин (витамин В ₂) | 5,7 | V-HS201 | Гр6-100%Б за 30мин; А=0,1M НА/рН4,4; Б=МЕ+АН+В=10+40+50 | | АА,289 |
| Салициловая кислота | 1,3 | RPK-C18 | 0,005С ТБА/0,1M ЩК/рН4+АН=72+25 | УФ | JCHR, 1983,274,1,366 |
| Стрелтомицин | 0,3 | L-RP18 | 0,02M НГ/С/ФБ/рН6+АН=92+8 | УФ-195 | JCHR, 1981,219,1,89 |
| Стрелтоцид | 0,3 | RPR-1 | 0,1M НФ+АНрН12=28,6+71,4 | | АА,313 |
| Стрихин | 14,1 | SIL | АМ+МЕ=0,75+99,25 | УФ-254 | JCHR, 1982,232,2,440 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------------------------|------|---------|--|-----------|----------------------|
| Сульфадиметидин (сульфадиметидин) | 4,0 | SF-OДС | АН+0,05М ФК=2+78 | УФ-254 | JCHR, 1985,323,2,447 |
| Сульфадиметоксин | 2,2 | B-C18 | В+АН=80+20 | УФ-306 | JCHR, 1981,223,2,379 |
| Супрастин | 10,1 | SF-S5W | 0,01М АПХ/0,0001М НГ/МЕ | УФ, Э | JCHR, 1985,323,1,191 |
| Тавегил (клемастин) | 16,3 | SF-S5W | 0,01М АПХ/0,0001М НГ/МЕ | УФ, Э | JCHR, 1985,323,1,191 |
| Теофиллин | -1,0 | B-C18 | АН+В=24+76 | УФ-280 | JCHR, 1986,374,1,191 |
| Тестостерон | 13,3 | A-C18 | МЕ+В=70+30 | | АА,271 |
| Тетрациклин и аналоги | 10,0 | B-C18 | АН+В+ЭТА+ДМФА/АФТ/ФК/рН2,5 =240+760+5+60 | УФ | CHRA, 1985,20,5,313 |
| Тиноферол (витамин E) | 23,3 | SIL | ГК+ЭТ=99+1 | Ф-295/390 | JCHR, 1985,341,1,198 |
| Фенамин (амфетамин) | 5,0 | N-C18 | АК+В+МЕ+АН=3+75+100+100 | УФ-254 | JCSC, 1983,21,4,145 |
| Фенобарбитал (проминал) | 5,1 | N-10C18 | В+МЕ=45+55 | | АА,286 |
| (люминал) | 5,1 | Z-CN | АН+ИПС+ГК=5+10+85 | УФ-200 | JCHR, 1983,276,1,445 |
| | 5,1 | N-10C18 | В+МЕ=45+55 | | АА,286 |
| | 5,1 | L-RP8 | Гр18-23%Б за 6мин; 23%Б – 9мин; А=В Б=АН | УФ-207 | JCHR, 1984,305,1,127 |
| Феноксиметилпенициллин | 8,0 | U-OДС | АФБ/рН10+АН=70+30 | Э, УФ-220 | JCHR, 1983,268,1,120 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|------|----------|---|-----------|----------------------|
| Фолиевая кислота | 1,4 | VH-HS201 | Гр6 – 100%В за 30мин.; А=0,1М НА/рН4,4 Б=МЕ+АН+В=10+40+50 | | АА,289 |
| Фурагин | 2,0 | Z-ОДС | АН+В=3+7 | УФ-278 | [Шатц] |
| Фурадонин | 0,0 | Z-ОДС | АН+В=2+8 | УФ-278 | [Шатц] |
| Фурацилин | -2,0 | Z-ОДС | АН+В=2+8 | УФ-278 | [Шатц] |
| Фуросемид | 6,0 | L-РР-18 | 0,02М ФБ/рН3+МЕ=1+1 | Ф-275/410 | JCHR, 1982,229,1,129 |
| Хинин | 12,0 | SF-S5W | 0,01М АПХ/0,0001М НГ/МЕ | УФ, Э | JCHR, 1985,323,1,191 |
| Цианокобаламин (витамин В ₁₂) | | VH-HS201 | Гр6 – 100%В за 30мин.; А=0,1М НА/рН4,4; Б=МЕ+АН+В=10+40+50 | | АА,289 |
| Циклобарбитал | 5,1 | SU-LC8 | МЕ+0,1М КДФ+ГЭА=45+55+0,1 | УФ-254 | SU24,131 |
| Эргокальциферол (витамин Д ₂) и аналоги | 24,0 | Z-SIL | ГК=ИПС=95+5 | УФ-290 | JCHR, 1981,226,2,351 |
| Этазол | 24,0 | VH-HS201 | АН+ИПС+В=90+8+2 | | АА,289 |
| Эфидрин | 2,0 | I-C18 | 0,1%ФК+АН=7+3 | УФ-254 | [Шатц] |
| | 4,3 | SF-AIOY | 0,01М ТМАГ/ЛК/рН6+АН=25+75 | Э | CHRA, 1983,17,7,394 |

Растворители и модифицирующие добавки

| Обозначение в табл. 1 | Наименование | Обозначение в табл. 1 | Наименование |
|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| АА | Ацетат аммония | МПС | 3-Морфолинопропансульфонат |
| АБ | Ацетатный буфер | МХ | Метиленхлорид |
| АГ | Гидроксид аммония | МЦ | Метилцеллозольв |
| АГК | Гидрокарбонат аммония | МЭК | Метилэтилкетон |
| АГФ | Гидрофосфат аммония | НА | Нониламин |
| АДФ | Дигидрофосфат аммония | НБ | Борат натрия |
| АК | Карбонат аммония | НГ | Гидроксид натрия |
| АМ | Аммиак, 25%-ный раствор | НГС | Гептансульфонат натрия |
| АН | Ацетонитрил | НГФ | Гидрофосфат натрия |
| АПХ | Перхлорат аммония | НДС | Додецилсульфонат натрия |
| АТ | Ацетон | НДФ | Дигидрофосфат натрия |
| АФ | Формиат аммония | НКС | Камфорсульфонат натрия |
| АФГ | Фосфат аммония | НОС | Октансульфонат натрия |
| АХ | Хлорид аммония | НПС | Пентансульфонат натрия |
| АЦ | Цитрат аммония | НС | Сульфат натрия |
| ББ | Боратный буфер | НТА | Нитрат аммония |
| БЗ | Бензол | НФ | Фосфат натрия |
| БУ | Бутанол | НХ | Хлорид натрия |
| БУА | Бутиламин | ОА | Октиламин |
| БХ | Бутилхлорид | ОК | Октан |
| В | Вода | ОСК | Октансульфокислота |
| ГА | Гексиламин | ПА | Пропиламин |
| ГДАБ | Бромид гексадецилтри- метиламмония | ПР | Пиридин |
| ГК | Гексан | ПС | Пропиловый спирт |
| ГП | Гептан | ПСК | Пентансульфокислота |
| ГСК | Гептансульфокислота | СК | Соляная кислота |
| ГСН | Гекансульфонат натрия | Т | Типол (детергент) |
| ДА | Дициламин | ТБАБ | Бромид тетрабутиламмония |
| ДМФА | Диметилформамид | ТБАГС | Гидросульфат тетрабутил- аммония |
| ДО | Диоксан | ТБАФ | Фосфат тетрабутиламмония |

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|------|---------------------------|------|----------------------------------|
| ДХЭ | Дихлорэтан | ТГФ | Тетрагидрофуран |
| ДЭ | Диэтиловый эфир | ТМАГ | Гидроокись тетраметил-аммония |
| ДЭА | Диэтиламин | ТМД | Тетраметилэтилендиамин |
| ДЭАА | Ацетат диэтиламмония | ТМДА | Тетраметилендиамин |
| ИО | Изооктан | ТМОА | Гидроокись триметилоттил-аммония |
| ИПС | Пропанол-2 | ТРИС | Трис-(оксиметилаимноме-тан) |
| ИЭ | Диизопропиловый эфир | ТФУК | Трифторуксусная кислота |
| КБ | Бромид калия | ТЭА | Триэтиламин |
| КГФ | Гидрофосфат калия | ТЭАА | Ацетат триэтиламмония |
| КДФ | Дигидрофосфат калия | ТЭАФ | Фосфат триэтиламмония |
| КСК | Камфорсульфоновая кислота | УК | Уксусная кислота |
| КФ | Фосфат калия | ФБ | Фосфатный буфер |
| КФБ | Калиевый фосфатный буфер | ФК | Фосфорная кислота |
| КХ | Хлорид калия | ЭА | Этилацетат |
| ЛК | Лимонная кислота | ЭДТА | Этилендиаминтетраацетат натрия |
| ЛСК | Лаурилсульфоновая кислота | ЭТ | Этанол |
| МЕ | Метанол | ЭТА | Этаноламин |
| ХЛ | Хлороформ | | |
| ХК | Хлорная кислота | | |
| ЦБ | Цитратный буфер | | |
| ЦГ | Циклогексан | | |
| ЧУ | Четыреххлористый углерод | | |
| ЩК | Щавелевая кислота | | |

Литературные источники, цитированные в таблице 1 Приложения

| сокращенное в табл. 1 | Наименование | |
|--------------------------|--|--|
| | сокращенное | полное |
| AA | Alltech Associates | – Applied Science Chromatography Catalog. N 70 |
| ANCH | Analytical Chemistry | |
| CBM | Хроматография в биологии и медицине: Тезисы докладов I Всесоюзной конференции. М., 1983 | |
| CIIRA | Chromatographia | |
| DS85 | V Danube Symposium on Chromatography. Abstracts. M., Nauka, 1985 | |
| JA | Journal of Antibiotics | |
| JCHR | Journal of Chromatography | |
| JCSC | Journal of Chromatographic Science | |
| JPSC | Journal of Pharmaceutical Sciences | |
| LC-84 | III Всесоюзный симпозиум по молекулярной жидкостной хроматографии: Тезисы докладов. Рига: Зинантне, 1984 | |
| SH-84 | Advances in Liquid Chromatography. Abstracts of Presentations of the 4 th Annual American-Eastern European Symposium on Liquid Chromatography. Szeged (Hungary), 1984 | |
| SU24 | Supelco Chromatography Supplies. International Catalog 24, 1986 | |

Примечание:

Пример сокращения: 0,1 % НДС/0,01М ФБ/рН 3,0 + МЕ = 7 + 3 означает, что в объемном отношении (%) 3 : 7 смешан метанол и 0,01 М фосфатный буфер, содержащий 0,1 % додецилсульфата натрия и имеющий рН 3,0.

Градиентное элюирование изображается согласно следующей схеме:

ГР a - b % Б за t мин; А = [состав]; Б = [состав];

это означает, что состав подвижной фазы изменяется за t мин от a % компонента Б до b % данного компонента (состав компонентов А и Б изображается после знака равенства в соответствии с вышеприведенными правилами для подвижных фаз в изократическом режиме).

Детектор. Обозначение детектора состоит из букв и цифр, уточняющих условия работы: Р – рефрактометр; Э – электрохимический; УФ – детекторы по поглощению ультрафиолетового либо видимого света (например, УФ-254 – при длине волны 254 нм); Ф-250/320 – флуориметрический детектор, в данном случае с длиной волны возбуждения 250 и эмиссии 320 нм; МС – масс-спектрометрический.

Литературные источники. В табл. 1 принят сокращенный способ цитирования. Для журнальных статей, отделенных запятыми, указаны следующие сведения: сокращенное название журнала, год, том, номер выпуска, страница. Для книг приведены сокращенное наименование, номер страницы. Расшифровка сокращенных наименований дана в табл. 3.

Анджела Владимировна Буланова,
Юлия Львовна Полякова

ХРОМАТОГРАФИЯ В МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ

*Учебное пособие для студентов
специальности «Химия» и «Биология»*

Редактор Н.А. Волюнкина
Компьютерная верстка, макет Т.В. Кондрагьева

Лицензия ИД № 06178 от 01.11.2001. Подписано в печать 08.12.03. Формат 60x84/16.
Бумага офсетная. Печать офсетная. Усл.-печ. л. 6,74; уч.-изд. л. 7,25. Гарнитура Times.

Тираж 200 экз. Заказ № 1035

Издательство «Самарский университет», 443011, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.
УОП СамГУ, ПИД № 67-43 от 19.02.98.